



République Algérienne Démocratique et Populaire



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر

Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach - Alger

Département de Technologie Alimentaire

Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Option: Sciences Alimentaires

THEME:

**Extraction des composés bioactifs de *Chlorella sp*
par Ultrasons et Champ électrique pulsé**

Présentée par:

M^{me} ATTAL Fella-Sara Eps DEKKICHE

Devant le jury composé de :

Président	M ^r Bitam A.	Professeur (ENSA)
Directeur de Thèse	M ^r Amiali M.	Professeur (ENSA)
Examineurs	M ^r Amrouche T.	Professeur (Université de Tizi Ouzou)
	M ^r Benakmoum A.	Professeur (Université de Boumerdes)
	M ^{me} Meribai A.	Maitre de Conférences A (ENSA)
	M ^r Aissiou MYE.	Maitre de Conférences A (ESSAIA)

Soutenue le : 17 / 05 / 2023

Remerciements

Je voudrais d'abord adresser mes remerciements distingués à **Mon directeur de thèse, Malek Amiali** (Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El harrach, Alger) de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques, son expérience, ses conseils, de m'avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et ma profonde gratitude.

J'adresse mes remerciements sincères aux membres du jury. Merci d'avoir accepté de juger ce travail, et accepté de consacrer de votre temps à la critique constructive de ce travail de recherche.

Tahar Amrouche,

Professeur à l'université Mouloud Maameri, Tizi Ouzou

Amar Benakmoum,

Maitre de Conférences A, à l'Université de M'hamed Bougara, Boumerdes

Yahia Aissiou,

Maitre de Conférences A, à l'Ecole Supérieure des Sciences Alimentaires; Beaulieu, Alger

Amel Meribai,

Maitre de Conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El harrach, Alger,

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, vous avez été présente au tout début, vous voilà à la fin.

Merci également à **Arezki Bitam**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El harrach, Alger, de présider ce jury de thèse. Je tiens à vous remercier pour vos efforts et vos facilitations en tant que chef de département

Je souhaite sincèrement remercier du fond du coeur le **Dr Affaf Kord, ma Co-Directrice de thèse officieuse**. Merci pour votre confiance, votre implication, votre dynamisme, votre disponibilité, votre aide précieuse et ta patience. Vous m'avez beaucoup appris, nos échanges ont toujours su être constructifs

Un merci particulier au Professeur **Ahmed Benchabane** de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger, pour son soutien constant et sa présence depuis de nombreuses années, sa confiance et sa générosité. Merci de m'avoir toujours ouvert votre porte, ainsi que toutes les autres portes, de m'avoir tout mis à ma disposition et de m'avoir laissée au département comme chez moi, tous les merci ne suffiront pas, veuillez trouver ses lignes pour vous témoigner ma reconnaissance.

Je présente aussi mes remerciements les plus distingués à tous les ingénieurs et techniciens des laboratoires du département et de l'école: **Fatma-zohra, Khadidja Remini, Mohamed Belahmer et Mohamed Benalia, Redouane, Nesrine et Meriem Zourourou**; qui ont toujours ouvert leurs portes, même aux heures de poses, et de m'avoir assistés durant mes manipulations.

J'adresse mes remerciements à **Rania Semmar**, doctorante à l'Université des Frères Mentouri de Constantine, pour toutes les analyses effectuées au Laboratoire de la Police Scientifique, Chateau-neuf, Alger.

Merci également à mon amie **Samia Benlahrech**, Maitre de Conférence B, à l'Université Houari Boumediene, Bab Ezzouar, pour l'aide précieuse pour l'analyse statistique, et pour sa présence malgré ses obligations personnelles et professionnelles.

Ces remerciements ne seraient pas complets, sans nommer mon amie et ma binôme de toujours, **Nour el Houda Berrouane**, merci pour ton intégrité, ton éternelle présence malgré les aléas de nos vies, tes encouragements et tes conseils, depuis notre rencontre. Espérant que l'équipe de choc complémentaire se reforme.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon Mari **Abdesslam**, pour les encouragements, les coups de pouces, l'aide, la compréhension et la patience, qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Sans oublier mes filles, **Anaïs**, la mini-thésarde pour sa participation aux manipulations au laboratoire, et qui a attendu impatiemment l'accomplissement de ce travail et **Sofia**, la micro-thésarde pour sa participation quotidienne à la rédaction.

Un merci, à ma belle-mère **Louisa**, pour ses encouragements constants, et ses prières. Mon beau-père, **Mohamed**, pour son aide quotidienne. Aussi, à **Raihab et Yasmine Zermani**, pour avoir ajouté leur grains de sel, aussi petits soient-ils à ce travail.

Enfin et évidemment, sinon toutes ces lignes n'auraient pas de sens, j'adresse mes grands et spéciaux remerciements à ma Mère **Hassina** et mon Père **Abdenour**, pour m'avoir toujours pousser à chercher plus, à aller plus loin, plus haut et plus fort. De m'avoir inculqué la valeur des études, des sciences et du bagage intellectuel et la volonté qui coutent plus cher que toutes les fortunes du monde. Aussi, à ma soeur **Amina**, et mon frère **Mohamed**, pour leur originale sympathie, leur sourire constant et leur générosité infinie.

Qu'ils puissent TOUS être fiers de ce travail, votre contribution est indirecte, mais est la.

Difficiles ont été tous ces mots à écrire, pour exprimer brièvement tout ce qui m'a traversé durant ce chemin obscur et sinueux, et de résumer ce que je souhaiterais dire à :

Toutes les personnes qui m'ont aidée, soutenue, portée, supportée aussi... et qui ont participé, directement ou indirectement, au bon déroulement de ces 10 années de thèse. Je tiens à leur exprimer du fond du cœur toute ma reconnaissance et ma gratitude, pour leur présence, leur soutien, leur aide, leurs mots, et tout ce qui a pu contribuer à me faire tenir tout au long de ces travaux. Je m'excuse d'avance auprès de celles et ceux dont le nom n'apparaîtrait pas dans ces paragraphes, vous avez tous été précieux.

Mais je n'oublierai pas ceux qui m'ont volé mes résultats, mis des bâtons dans les roues, qui n'ont pas répondu à mes sollicitations, qui ont été avarés de savoir et de savoir-être, qui ont profité de ma gentillesse et de mon temps, vous êtes acteurs aussi, ces lignes sont pour vous.

A Madjid...

Tables des matières

Remerciements

Tables des matières

Listes des Tableaux

Listes des Figures

Liste des abréviations

Résumé

Summary

ملخص

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

PARTIE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LA CHLORELLE, NOVEL FOOD

1.1. Introduction	5
1.2. Généralités sur les microalgues	5
1.3. La Chlorelle.....	8
1.3.1.Définition et origine	8
1.3.2.Morphologie	9
1.3.3. Reproduction	9
1.3.4. Culture de la chlorelle	10
1.3.4.1.Conditions de la culture.....	10
a) Energie lumineuse.....	10
b) Température	10
c) Agitation	10
d) Dioxyde de carbone	11
e) Eléments minéraux.....	11
f) pH.....	11
1.3.4.2.Milieu de culture	12
1.3.4.3.Techniques de culture.....	12
1.3.4.2.1.Mode de culture.....	12
1.3.4.2.2. Les réacteurs de culture	13
1.3.4.2.3. Mise en culture et maintenance	14
1.3.5. Récolte.....	14
1.3.5.1 Centrifugation.....	14

1.3.5.2. Flocculation.....	14
1.3.5.3. Sédimentation.....	15
1.3.5.4. Flottation	15
1.3.5.5. Filtration	15
1.3.6. Composition nutritionnelle.....	16
1.3.6.1. Macronutriments	16
1.3.6.2. Micronutriments	18
1.3.7. Intérêt thérapeutique et contre-indication	19
I.4. Les composés bioactifs de la Chlorelle.....	20
1.5. Les Aliments fonctionnels.....	22
1.5.1. Généralités sur les aliments fonctionnels	22
1.5.2. Classification des aliments fonctionnels	23
1.5.3. Nouvel aliment ou "novelfood"	24
1.5.4. La chlorelle ingrédients des aliments fonctionnels	25

CHAPITRE 2 : MÉTHODES D'EXTRACTION DES COMPOSÉS BIOACTIFS DE LA CHLORELLE

2.1. Introduction	27
2.2. Les méthodes conventionnelles.....	27
2.2.1. Macération.....	28
2.2.2. Congélation/Décongélation	28
2.3. Extraction verte	29
2.4. Les méthodes innovantes	30
2.4.1. Méthodes chimiques et enzymatiques	31
2.4.2. Méthodes physiques	32
2.4.2.1. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction).....	32
2.4.2.2. L'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)	32
2.4.2.3. L'Extraction Assistée par Micro-ondes(MAE, Microwave Assisted Extraction).....	32
2.4.2.4. L'extraction assistée par ultrasons (USAE-Ultrasound assisted extraction)	33
a. <i>Principe</i>	33
b. <i>Mécanismes associés à la sonication ;</i>	35
c. <i>Paramètres influençant la sonication</i>	35
d. <i>Approches combinatoire des Ultrasons</i>	36
e. <i>Avantages et inconvénients</i>	36
f. <i>Exemples d'applications des US</i>	37

g. Applications industrielles.....	37
2.4.2.5. Le champ électrique pulsé (CEP- Pulsed Electric Field PEF)	37
a. Principe.....	38
b. Mécanismes d'action	39
c. Equipements du système du CEP	41
d. Paramètres influençant le CEP.....	42
e. Avantages et Inconvénients.....	43
f. Exemples d'applications du CEP	44
g. Application du CEP à l'échelle industrielle	44
2. 5.Extraction biomasse fraîche	44
2.6. Extraction des Lipides à partir de Chlorella.....	45
2.6.1. Approches conventionnelles- extraction directe aux solvants	46
2.6.2. Méthodes non-conventionnelles/ Innovantes	46
2.6.2.1.Champ électrique pulsé (CEP)	46
2.6.2.2.Ultrasons (US).....	47

PARTIE 2: PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION GÉNÉRALE DE LA CHLORELLE

3.1. Introduction	48
3.2. Matériel et méthodes	49
3.2.1. Matériel biologique	49
3.2.2. Préparation du milieu de culture	51
3.2.3. La Culture de la Chlorella	52
3.2.4.Récolte de la biomasse	55
3.3. Analyses biochimiques et physico-chimiques de la Chlorella	55
3.3.1.Détermination de la matière sèche	55
3.3.2. Détermination du taux de cendres	56
3.3.3. Détermination de la teneur en protéines.....	56
3.3.4. Détermination de la teneur en matière grasse	57
3.3.5. Détermination du profil en Acides Gras	58
3.3.6. Détermination des sucres totaux	58
3.3.7. Identification des sucres	59
3.3.8. Détermination des acides organiques	59
3.3.9. Dosage des éléments minéraux et des métaux lourds	59

3.3.10. Détermination des pigments	60
3.4. Analyses microbiologiques	60
3.4.1. Germes mésophiles aérobies totaux (GMAT).....	61
3.4.2. Flore fongique (FF)	61
3.4.3. Coliformes totaux (CT)	61
3.5. Analyse statistique.....	61
3.6. Résultats et Discussion.....	61
3.6.1. Morphologie et Courbe de croissance	61
3.6.2. Composition physico-chimique de la chlorelle	64
3.6.2.1. Profil nutritionnel de la chlorelle	64
3.6.2.2. Evaluation de la teneur en glucides	64
3.6.2.3. Evaluation de la teneur en protéines	66
3.6.2.4. Evaluation de la teneur en lipides et profil en acides gras	67
3.6.2.5. Evaluation de la teneur en cendres et composition en éléments minéraux	69
3.6.2.6. Evaluation de la teneur en pigments	70
3.6.2.7. Evaluation de la teneur en acides organiques.....	71
3.6.3. Analyses microbiologiques	72
Conclusion.....	74

CHAPITRE 4: EFFETS DES US ET DU CEP SUR LES EXTRACTIONS PAR SOLVANTS DE COMPOSÉS BIOACTIFS A PARTIR DE *CHLORELLA SP*

4.1. Introduction	75
4.2. Matériel et méthodes	76
4.2.1. Matériel biologique	76
4.2.2. Screening phytochimique	76
4.2.2.1. Préparation des extraits	76
4.2.2.2. Tests phytochimiques	79
4.2.3. Dosage des polyphénols	81
4.2.4. Dosage des flavonoïdes	81
4.2.5. Détermination de la teneur en Chlorophyll a and b et des Carotenoides totaux	81
4.2.6. Activités anti-bactériennes	82
4.2.7. Activités antifongiques.....	82
4.2.8. Activités anti-oxydante	82
4.2.8.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.(1,1-diphenil-2-picrylhydazyl)....	82

4.2.8.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS+ ou 2,2- Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	83
4.2.9. Analyse statistique.....	84
4.3.Résultats et discussion.....	84
4.3.1. Screening phytochimique	84
4.3.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	85
4.3.3.Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	86
4.3.4.Teneur des pigments.....	88
4.3.4.1.Chlorophylle a and b	88
4.3.4.2. Caroténoïdes Totaux	89
4.3.5. Evaluation de l'Activité antibactérienne des différents extraits	91
4.3.6. Evaluation de l'Activité antifongique des différents extraits	2
4.3.7.Evaluation de l'Activité antioxydante des différents extraits	3
4.4. Conclusion.....	5

CHAPITRE 5 : EFFETS DES ULTRASONS, DU CHAMP ELECTRIQUE PULSÉ ET DE LA CONGÉLATION/DÉCONGÉLATION SUR LE PROFIL LIPIDIQUE DE *CHLORELLA SP*

5.1. Introduction	97
5. 2. Matériel et méthodes	98
5.2.1. Espèces/ Conditions de Culture / Récolte	98
5.2.2. Extraction des Lipides	99
5.2.3. Caractérisation des acides gras.....	100
5.2.4.Analyses statistiques	101
5.3. Résultats et Discussion.....	101
5.3.1. Rendement de l'extraction	101
5.3. 2. Profil en acides gras	104
3.3. Variation des proportions AGMI, AGPI, AGS	109
4.4. Conclusion.....	111

CHAPITRE 6: ELABORATION D'UNE BOISSON FONCTIONNELLE

-JUS DE FRUITS ENRICHI EN CHLORELLE -

6.1. Introduction	112
6.2. Matériel et méthodes	113
6.2.1. Méthodologie	113
6.2.1.1.Matières premières	114
6.2.2.2. Elaboration des boissons	114

6.2.2. Analyse sensorielle.....	115
6.2.3. Analyses physicochimiques des boissons	116
6.2.3.1. Détermination de la matière sèche	116
6.2.3.2. Détermination de l'extrait soluble total (AFNOR ; NF05-10, 1996).....	116
6.2.3.3. Mesure du pH (AFNOR ; NF05-108, 1996)	117
6.2.3.4. Détermination de la densité optique (Maydav et al., 1977)	117
6.2.3.5. Détermination de l'acidité titrable (AFNOR. NF V 05-101)	117
6.2.3.6. Détermination du taux de cendres	117
6.2.3.7. Détermination des pigments.....	118
6.2.3.8. Détermination de la teneur en protéines.....	118
6.2.3.9. Détermination de la teneur en matière grasse	119
6.2.3.10. Détermination du profil en Acides Gras	119
6.2.3.11. Détermination des sucres totaux	120
6.2.3.12. Détermination de la valeur énergétique	120
6.2.4. Analyses microbiologiques	120
6.2.4.1. Analyses effectuées sur la poudre de Chlorelle	120
6.2.4.2. Analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini enrichi	121
6.2.5. Etude de la stabilité de la boisson au cours de stockage	121
6.2.6. Analyse statistique.....	121
6.2.7. Etude de la valeur marchande	121
6.3. Résultats et discussion.....	121
6.3.1. Analyse sensorielle.....	121
6.3.2. Effet de l'incorporation de la chlorelle sur les paramètres physico-chimiques des boissons.	125
6.3.3. Effet de la chlorelle sur la qualité microbiologique des boissons	131
6.3.4. Analyse de l'épreuve de stabilité des boissons	131
6.3.4.1. Evolution des caractéristiques physico-chimiques après stockage	131
6.3.4.2. Evolution des caractéristiques microbiologiques après stockage	1
6.3.5. Valeur marchande	2
6.4. Conclusion.....	3
Conclusion générale	137
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140

ANNEXES

PUBLICATIONS

Listes des Tableaux

Tableau 1.1 Production mondiale des microalgues (d'après Spalaore et <i>al.</i> , 2006)	7
Tableau 1.2 Composition des macronutriments de la chlorelle en poudre (%MS) (Ibrahim et Elbaily, 2020; Safi et <i>al.</i> , 2014).....	17
Tableau 1.3 Composition des micronutriments de la chlorelle en poudre (mg pour 100g de MS) (AFSSA, ;Higdonet al., 2009).....	18
Tableau 3.1 Préparation du milieu BBM (Connon, 2007)	51
Tableau 3.2 Conditions de culture de Chlorella.....	55
Tableau 3.3 Composition physico-chimique de la Chlorelle	64
Tableau 3.4 Teneur des sucres simples identifiés	66
Tableau 3.5 Profil des acides gras de la chlorelle obtenu par CPG	68
Tableau 3.6 Proportion des acides gras saturés, mono et polyinsaturés	68
Tableau 3.7 Teneur en éléments minéraux en mg/g de MS	70
Tableau 3.8 Teneur en pigments de <i>Chlorella sp.</i>	70
Tableau 3.9 Teneur des acides organiques majoritaires.....	71
Tableau 3.10 Dénombrement de la microflore de la chlorelle.....	72
Tableau 4.1 Screening Phytochimique des extraits de <i>Chlorella sp.</i>	85
Tableau 4.2 Activités antimicrobiennes des extraits de <i>Chlorella sp</i> exprimées en diamètres d'inhibition en (mm).....	0
Tableau 4.3 : Activités antifongiques des extraits de <i>Chlorella sp</i> exprimées en diamètres d'inhibition en (mm).....	2
Tableau 4.4 Activité antioxydante exprimée en % d'inhibition	4
Tableau 5.1 Profils des acides gras obtenus après prétraitements	105
Tableau 5.2 Proportions AGMI, AGPI, AGS (%)	109
Tableau 6.1 Les différentes doses incorporées dans les 2 types de boissons.....	115
Tableau 6.2 Caractéristiques physico-chimiques des boissons formulées.....	126
Tableau 6.3 Caractéristiques physico-chimiques des boissons à 4°Cet à 50°C, respectivement pendant 21 jours et 3 jours.	0
Tableau 6.4 Prix unitaires des ingrédients des boissons formulées enrichies en chlorelle.....	2
Tableau 6.5 Estimation de la valeur marchande des boissons formulées.	2

Listes des Figures

Figure 1.1 : Diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009).	6
Figure 1.2 : Applications potentielles des microalgues modifié de (Enamala et <i>al.</i> , 2018).....	8
Figure 1.3 : Cellules de <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B observées au microscope optique (Culture collection of algae and protozoa, Royaume-Uni)	9
Figure 1.4 : Un schéma représentant les différentes phases de la formation de la paroi cellulaire de la cellule fille chez <i>Chlorella vulgaris</i> : a) la phase précoce de croissance cellulaire ; (b) la phase de croissance cellulaire tardive ; (c) la phase de division.....	9
Figure 2.1 : Niveaux de destruction cellulaire (Zinkone, 2018)	31
Figure 2.2 : Le spectre du son (Carreire-Casais et <i>al.</i> , 2021).....	34
Figure 2.3 : Mécanisme de l'électroporation (Joannes et <i>al.</i> , 2015).....	40
Figure 2.4 : Installation CEP (Amiali, 2005)	42
Figure 2.5 : Chambres de traitement continues (a), (b), (c) et statique (d) (FDA, 2000).....	42
Figure 3.1 : Aspect de la souche étudiée vu au microscope électronique (a) : x50 , (b) x100)	50
Figure 3.2 : Culture de <i>Chlorella sp</i>	54
Figure 3.3 : Les couches obtenues durant l'extraction des lipides.....	58
Figure 3.4 : <i>Chlorella sp</i> à deux stade de croissance (a: phase de latence, b: phase exponentielle).....	62
Figure 3.5 : Courbe de croissance de <i>Chlorella sp</i>	63
Figure 3.6 : Chromatogramme en sucres simples de la Chlorelle analysé par HPLC.....	65
Figure 4.1 : Circuit électrique d'une installation d'un traitement par CEP en continu. (Aouir et <i>al.</i> , 2015).....	78
Figure 4.2 : Détermination de la teneur en polyphénols totaux, macération (noir),ultrasons (gris clair), Champ Electric Pulsé (gris foncé) <i>a, b, c, d, e, f, g, h</i> – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).	85
Figure 4.3 : Flavonoïdes extraits de la biomasse de <i>Chlorella</i> : macération (noir),ultrasons (gris clair), Champ Electric Pulsé (gris foncé)(<i>a, b, c, d, e, f, g, h</i> – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$))......	87
Figure 4.4 : Chlorophylle a extraite de la biomasse de <i>Chlorella</i> : macération (noir),ultrasons (gris clair), Champ Electric Pulsé (gris foncé). <i>a, b, c, d, e, f, g, h</i> – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).	88

Figure 4.5 : Chlorophylle b extraite de la biomasse de <i>Chlorella</i> : macération (noir),ultrasons (gris clair), Champ Electrique Pulsé (gris foncé) <i>a, b, c, d, e, f, g, h</i> – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).	89
Figure 4.6 : Caroténoïdes extraits de la biomasse de <i>Chlorella</i> : macération (noir),ultrasons (gris clair), Champ Electrique Pulsé (gris foncé) <i>a, b, c, d, e, f, g, h</i> – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).	90
Figure 5.1 : Rendement de l'extraction des Lipides	101
Figure 5.2 : Variation des teneurs des acides gras (Oléiques, linoléique, linoléique) selon les prétraitements et leur combinaison (%); <i>a, b, c, d, e, f, g, h</i> – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).	106
Figure 6.1 : Comparaison du caractère goût des boissons formulées.....	122
Figure 6.2 : Comparaison du caractère odeur des boissons formulées.....	123
Figure 6.3 : Comparaison du caractère couleur des boissons formulées.....	123
Figure 6.4 : Comparaison du caractère consistance des boissons formulées.	124
Figure 6.5 : Comparaison du caractère acidité des boissons formulées.	124
Figure 6.6 : Comparaison du caractère qualité d'ensemble des boissons formulées.	125
Figure 6.7 : Cercle de corrélation entre les paramètres de dégustation	130
Figure 6.8 : Classification hiérarchique ascendante	131

Liste des abréviations

A		
Abréviation	Définition	Unité
°Brix	Degré Brix	-
°F	Degré fahrenheit.	-
A	Surface de l'électrode	(m ²)
Abs	Absence.	-
AFJA	Australian Fruit Juice Association	-
AFNOR	Association Française de Normalisation	-
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments	-
AG	Acides Gras	
AGE	Acides gras essentiels	-
AGMI	Acides gras monoinsaturés	-
AGPI	Acides gras polyinsaturés	-
AGS	Acides gras saturés	-
APAB	Association des Producteurs Algériens de Boissons	-
B		
BBM	Bold's Basal Medium	-
BHT	Butylehydroxytoluène	-
BPF	Bonne pratique de fabrication	-
BPL	Bonne pratique de laboratoire	-
C	Capacitance	Farad(F)
C. ellipsoidea	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	-
C. pyrenoïdosa	<i>Chlorella pyrenoïdosa</i>	-
C. sorokiniana	<i>Chlorella sorokiniana</i>	-
C. vulgaris	<i>Chlorella vulgaris</i>	-
Car	Caroténoïde	
CD	Congélation décongélation	
CEP	Champ électrique pulsé	-
Chl	Chlorophylle	-
CSFII	Continuing Survey of Food Intake of Individual	-
d	Distance entre les électrodes	-
D/C	Double Concentration	-

DO	Densité optique	(nm)
DPD	Diéthyl-phénylènediamine	-
DPPH	α,α -Diphényle- β -picrylhydrazyle	-
E	Intensité du champ électrique	-
E.D.T.A	Éthyle diamine tétra acétique	-
Er	Intensité du champ électrique de rupture	Kilovoltparcentimètre(kVcm ⁻¹)
F	Débit	(kVcm ⁻¹)
F		
FAME	Méthyl Esters Fatty Acid	
FDA	Food and Drug Administration	-
Fr	Fréquence	ml/s
G		
GAMT	Germes Aérobie Mésophile Totaux	-
GRAS	Generally Recognized as Safe	-
I	Courant	Ampère(A)
IB	Infusion Broth de Biomérieux	-
IC	Concentration d'inhibition	
IFIC	International Food Information Council	-
M		
MSDA	Manuel suisse des denrées alimentaires	-
N		
n	Nombre de pulsation	-
N.E	Noire Erichrome	-
NaOH	Hydroxyde de sodium	-
NLEA	Nutrition Labelling and Education Act	-
NPP	Nombre Plus Probable	-
P	Puissance	Watt(W)
pH	Potentiel hydrogène.	-
PTM	Potentiel transmembranaire	-

Q	Energie stockée dans le condensateur	Joule
Qe	Densité d'énergie	Joule par mètre(J/m ³)
R	Résistance	Ohms(Ω)
S/C	Simple Concentration	-
ST	Sans Traitement	
Tps	Temps de traitement	Seconde(s)
T°	Température	°C
T	Témoin	-
TGEA	Gélose Tryptone Glucose à l'extrait de levure Agar	-
TH	Titre Hydrométrique	-
TSE	Tryptone Sel Eau	-
UE	Union européenne	-
UI	Unité internationale	-
US	Ultrasons	-
USDA	United States Department of Agriculture	-
V	Voltage	kilo-Volt(kV)
v	Volume de la chambre de traitement	Mètre cube(m ³)
VF	Viande Foie	-
VRBL	Gélose Lactosée Bilié au cristal Violet et au Rouge neutre	-
W	Energie	Joule
ρ	Résistivité	Ohmsparmètre(Ω -m)
Σ	Conductivité électrique(CE)	Siemens par mètre(Sm ⁻¹)
τ	Durée de la pulsation	microseconde(μ sec)

Résumé:

Chlorella sp. A été signalée comme une source non conventionnelle de protéines et est l'une des microalgues les plus utilisées comme additifs pour les améliorer les teneurs nutritionnelles des aliments conventionnels. La caractérisation de la chlorelle, d'un point de vue physico-chimique et nutritionnel, a donné les résultats suivants: 58 ± 2.02 % de protéines; 19 ± 1.1 % de glucides avec la présence de glucose, fructose et saccharose, 11.8 ± 1.06 % de lipides avec une majorité en acide palmitique avec $40,12 \pm 0,75$ % et la présence des acides gras mono et polyinsaturés a été notée représentant 31.66% des acides gras totaux, et enfin $9,11 \pm 0.7$ % de cendres avec le Sodium comme composant majoritaire avec $186,9 \pm 3,3$ mg/g de MS, suivi par le Magnésium avec $13,21 \pm 1,85$ mg/g de MS, mais aussi la présence d'autres minéraux comme le fer, l'aluminium, le cuivre, le potassium, le manganèse et le zinc. Pour les pigments, la chlorophylle *a* est présente une valeur de $10,65 \pm 1.2$ mg/g de matière sèche, la chlorophylle *b* et les caroténoïdes avec $7,03 \pm 0.6$ et $1,32 \pm 0.14$ mg/g de matière sèche, respectivement.

Le screening phytochimique a montré la présence de molécules bioactives telles que : tannins, caroténoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes, chlorophylle, phénols, glycosides and sucres réducteurs. Ces dernières ont inhibé la croissance *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, et *E. coli* à des degrés différents selon la techniques d'extraction. Aussi, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, et *Aspergillus niger* ont été sensibles aux extraits obtenus avec le chloroforme. L'Extraction utilisant le méthanol, éthanol et acétone ont donné les meilleures activités. Les combinaisons CEP/éthanol and CEP/acétone ont obtenu les activités antioxydantes les plus intéressantes. Le Champ électrique Pulsé a représenté le meilleur pré-traitement pour l'extraction des molécules bioactives, suivi par les ultrasons.

L'extraction des lipides de *Chlorella sp.*, ainsi que les observations faites sur le rendement en lipides et le profil en acide gras obtenus et la combinaison avec ce dernier, a montré une amélioration significative. Les US et leur combinaison ont montré quant à eux des résultats non satisfaisants.

Les résultats obtenus l'élaboration d'une boisson fonctionnelle, par l'enrichissement en *Chlorelle* sous forme de poudre lyophilisée, ont révélé que l'incorporation de la *Chlorelle* dans le jus de fruits à différentes doses (0.5 et 1.5 g/l), influence les paramètres physico-chimiques du jus: Un taux de protéines de ($1,52 \pm 0,02$ g/l) , sucres totaux ($8,22 \pm 0,5$ g/l), pH ($3,28 \pm 0,1$) et ESS ($8,35 \pm 0,2$ %), cendres ($0,02 \pm 0$ %), chlorophylle *a* et *b* ($0,831 \pm 0,001$ et $0,97 \pm 0,008$ mg/g) et en caroténoïdes ($0,96 \pm 0,04$ mg/g). Cependant, la qualité bactériologique n'a pas été affectée par l'introduction de la *Chlorelle* ; en laissant les produits conformes selon la

reglementation algérienne. Sur la base de six formules de boissons élaborées avec des doses de Chlorelle différentes (0.5 et 1.5 g/l), l'analyse des paramètres sensoriels du panel de dégustation a révélé que le consommateur a réagi positivement à l'incorporation de la Chlorelle.

Mots clé: *Chlorella sp*, caractérisation, activité, extraction, Ultrasons, Champs Electrique Pulsé, boisson fonctionnelle

Summary:

Chlorella vulgaris algae is one of the most important additives for enhancing the nutritional quality of conventional foods, hence positively affecting human health. This algal is known as a rich source of protein, fatty acids, fiber, essential vitamins and minerals.

The physico-chemical and nutritional gave the following results: $58 \pm 2.02\%$ of proteins; $19 \pm 1.1\%$ of carbohydrates with the presence of glucose, fructose and sucrose, $11.8 \pm 1.06\%$ of lipids with a majority in palmitic acid with $40.12 \pm 0.75\%$ and the presence of mono and polyunsaturated fatty acids was noted representing 31.66% of total fatty acids, and finally $9.11 \pm 0.7\%$ of ash with Sodium as the main component with 186.9 ± 3.3 mg/g of DM, followed by Magnesium with 13.21 ± 1.85 mg / g of MS, but also the presence of other minerals such as; iron, aluminum, copper, potassium, manganese and zinc. For pigments, chlorophyll *a* is present with a value of 10.65 ± 1.2 mg/g of dry matter, chlorophyll *b* and carotenoids with 7.03 ± 0.6 and 1.32 ± 0.14 mg/g of dry matter respectively.

Intracellular contents soluble in acetone, chloroform, ethanol, methanol, and distilled water were extracted in combination with US or PEF or just soaking in the solvent. The extracts were screened for phytochemical content and tested for antimicrobial and antioxidant activities. They were found to contain bioactive molecules such as tannins, carotenoids, flavonoids, alkaloids, chlorophylls, phenols, glycosides and reducing sugars. They inhibited the growth of *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *E. coli* to varying degrees depending on the extraction process. *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Aspergillus niger* were all sensitive to the extract obtained using chloroform.

Extraction with ethanol or acetone gave the best biological activity results overall. PEF/ethanol and PEF/acetone extracts had the greatest antioxidant power. Pulsed electric field was the best enhancer of extraction of the biologically active substances, followed by ultrasound

Pretreatment of microalgal biomass possessing rigid cell wall is a critical step for enhancing the efficiency of lipid microalgal extraction. The innovative pretreatment techniques serve as a promising processing tool to extensively enhance the release of intracellular substances from microalgae. This work focused on the application of several techniques of pretreatments on *chlorella* cell as pulsed electric field, ultrasound, freeze/thawing, and their combination to

perform lipid extraction.. The yields extraction were varied from 11.33 ± 1.6 to $15.33\pm 2.82\%$. PEF assisted method gave the highest yield extraction

The beverage samples had *chlorella* concentrations ranging from 0.5 to 1.5 g / l, the physico-chemical analyses showed different content: protein with ($1,52\pm 0,02\text{g/l}$), total sugars (82.21g / l), pH (3.285) , dry extract (8.353%), ashes (0,0225 %), chlorophyll a and b (0,831 et 0,978 mg/g) and carotenoids (0,965mg/g).

Word keys: *Chlorella sp*, characterization, activity, extraction, Ultrasound, Pulsed Electric Field, Fonctionnal beverage

ملخص:

من أكثر الدراسات عالميا هي حول الطحلب الأخضر وحيدة الخلية المصنفة معترف به عموما من قبل إ.غ.د (إدارة الغذاء والدواء) في الولايات المتحدة الأمريكية وتخضع للوائح قانون الغذاء في أوروبا. كلوريل غنية بالبروتين(47.82%م.ج) الدسم (13,23%م.ج)

يمكن معرفة الكلوريل من خلال خصائصها ، من وجهة نظر فيزيائية-كيميائية وتغذوية ، مع إعطاء النتائج التالية: 58 ± 2.02% من البروتينات ؛ 19 ± 1.1% من الكربوهيدرات مع وجود الجلوكوز والفركتوز والسكروز ، 11.8 ± 1.06% من الدهون مع غالبيتها في حمض البالميتيك بنسبة 40.12 ± 0.75% مع وجود أحماض دهنية أحادية ومتعددة غير مشبعة يمثل 31.66% من إجمالي الأحماض الدهنية ، وأخيرا 9.11 ± 0.7% من الرماد مع الصوديوم كمكون رئيسي مع 186.9 ± 3.3 مغ / من ، يليه المغنيسيوم مع 13.21 ± 1.85 مغ / من ، ولكن أيضا وجود معادن أخرى مثل ؛ الحديد والألمنيوم والنحاس واليوتاسيوم والمنغنيز والزنك. بالنسبة للأصباغ ، يوجد اليخضور بقيمة 10.65 ± 1.2 ملجم / جم من المادة الجافة واليخضور ب والكاروتينات مع 7.03 ± 0.6 و 1.32 ± 0.14 ملغ / من المادة الجافة على التوالي.

تأثير الموجات فوق الصوتية والمجالات الكهربائية النبضية على بعض الأنشطة البيولوجية (المضادة للبكتيريا والفطريات ومضادات الأكسدة) لمستخلصات الكلوريل التي تم الحصول عليها من عدة مذبيبات.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود جزيئات نشطة بيولوجيا مثل: التانينات ، الكاروتينات ، الفلافونويد ، قلويدات ، اليخضور ، الفينولات ، الجليكوسيدات والسكريات المختزلة. هذا الأخير يمنع نمو ليستيريا إينوكوا، ستافيلوكوكوس أوريوس، و أ.كولي بدرجات متفاوتة حسب تقنيات الاستخراج. أيضا ، كانت المبيضات البيضاء ، *Saccharomyces cerevisiae* ، و *Aspergillus niger* حساسة لمستخلصات الكلوروفورم. أعطى الاستخلاص باستخدام الميثانول والإيثانول والأسيتون أفضل الأنشطة. حصلت مجموعات CEP / ethanol و CEP / acetone على الأنشطة المضادة للأكسدة الأكثر إثارة للاهتمام. يمثل المجال الكهربائي النبضي أفضل معالجة مسبقة لاستخراج الجزيئات النشطة بيولوجيا ، تليها الموجات فوق الصوتية.

استخلاص الدهون من *Chlorella sp* ، بالإضافة إلى الملاحظات التي تم إجراؤها على إنتاجية الدهون وملف تعريف الأحماض الدهنية التي تم الحصول عليها لكل معالجة مسبقة مستخدمة. أظهر تطبيق حقل

كهربائي نبضي في المعالجة والدمج مع الأخير تحسناً ملحوظاً. أظهرت الولايات المتحدة ومكوناتها نتائج غير مرضية ، على الرغم من الأدبيات التي تعترف بأن هذه التقنية فعالة في الاستخراج ، وتقليل وقت الاستخراج وزيادة إنتاجية الدهون من البذور الزيتية والطحالب الدقيقة. حتى الآن ، تشير دراسات قليلة إلى التأثير السلبي لطريقة الموجات فوق الصوتية على استخراج الدهون وعلى جودة الدهون المستخرجة و / أو ثبات PUFAs.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أثناء التحاليل أن إضافة الكلوريل في عصير الفاكهة بجرعات مختلفة (0.5 و 1.5 جم / لتر) يؤثر على المعلمات الفيزيائية والكيميائية للعصير. علاوة على ذلك ، لم تتأثر الجودة البكتريولوجية بإدخال الكلوريل ؛ ترك المنتجات متوافقة مع اللوائح الجزائرية.

ستناداً إلى ستة صيغ مشروبات تم تطويرها بجرعات مختلفة من كلوريل (0.5 و 1.5 جم / لتر)، أظهر تحليل المعلومات الحسية للوحة التذوق أن المستهلك تفاعل بشكل إيجابي مع دمج الكلوريل. يبدو من النتائج التي تم الحصول عليها أن إثراء المشروبات بإدخال الكلوريل كانت عملية مشجعة تميل إلى أن تكون أكثر تطوراً.

تسمح كل هذه المعلومات بمجرد تجميعها بمعرفة أفضل عن هذه الطحالب الدقيقة ، لتكون قادرة على تكيفها واستخدامها في مجالات مختلفة ، كما أن استهلاكها في الولاية أو كونها مكوناً وظيفياً لعدة أنواع من المنتجات الغذائية من بين أمور أخرى ، يسمح بالتحسين ملفه الغذائي.

تؤكد هذه الدراسة أن الطحالب الخضراء الدقيقة *Chlorella sp* غني جداً بالمركبات ذات الاستخدامات المحتملة في علم الأدوية وفي مجال المغذيات. وتشمل هذه المركبات مثبتات الكائنات الحية الدقيقة ومضادات الأكسدة.

الكلمات المفتاحية

Chlorella sp، تحديد الخصائص ، النشاط ، الاستخلاص ، الموجات فوق الصوتية ، المجال الكهربائي النبضي ، المشروبات الوظيفية

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Introduction générale

Un des principaux challenges dont la planète fait face en ce 21ème siècle est la sécurité alimentaire mondiale qui face à une population qui ne cesse de croître avec des ressources naturelles de plus en plus limitées (Torres-Tiji et *al.*, 2022). A cet effet, la FAO (Food and Agriculture Organisation) et le Green Deal recommandent ainsi, le passage à un système alimentaire global durable et respectueux de l'environnement (Couto et *al.*, 2022). De plus, l'augmentation de la demande en aliments sains, durant et après la pandémie de la Covid 19, met l'industrie agro-alimentaire dans la nécessité d'utiliser les ressources existantes à bon escient pour faire face à cette crise (Wang et *al.*, 2023).

L'utilisation des microalgues se présente, clairement parmi les solutions durables pour palier à ces problématiques alimentaires actuelles. Les microalgues représentent une importante partie des espèces marines, elles appartiennent aux organismes autotrophes qui utilisent l'énergie lumineuse et les nutriments inorganiques (dioxyde de carbone, azote, phosphore..) en de produits à plus haute valeur ajoutée tels que les protéines, sucres et lipides, pigments. (Zhou et *al.*, 2022; Markou et Nerantzis, 2013), elles sont aussi considérées comme une ressource renouvelable de premier choix pour la production de bioénergies. Ces organismes sont consommés depuis des milliers d'années par l'homme. (Nghiem-xuan, 2019). En effet, ayant une vitesse de croissance supérieure aux végétaux terrestres et pouvant être produites dans des eaux non conventionnelles (eau de mer, eaux saumâtres ou sur des terres arides) et à grande échelle, représentant ainsi leur principal avantage, elles éviteraient ainsi la compétition avec les cultures vivrières (Liu et al, 2022). De plus, grâce à leur capacité photosynthétique, les microalgues peuvent utiliser le CO₂ de l'atmosphère ou des fumées de chaudières et participent ainsi à la réduction des gaz à effet de serre (Cheah *et al.*, 2015).

Parmi des milliers d'espèces de microalgues, la *Chlorelle* est l'une des espèces la plus cultivées depuis le début des années 60, une des plus consommées comme "novel food" ainsi qu'une des plus étudiées mondialement (Couto et *al.*, 2022). La *Chlorella* est une algue verte unicellulaire classifiée comme GRAS "Generally Recognized As Safe" par la FDA (Food and Drugs Administration) aux Etats Unis d'Amérique, et sujette à la régulation de la loi de Régulation Alimentaire en Europe "EC) No. 178/2002 du Parlement of the Européen)" (Markou, Chentir, & Tzovenis, 2021).

La *Chlorella* est riche en protéines (47.82 % MS), lipides (13.32 % MS), sucres (8.08 % MS), et des éléments minéraux comme le magnésium (Mg, 344.3 mg/100 g MS), phosphore (P, 1761.5 mg/100 g MS), calcium (Ca, 593.7 mg/100 g MS), fer (Fe, 259.1 mg/100 g MS),

Introduction générale

zinc (Zn, 1.19 mg/100 g MS), et le sélénium (Se, 0.07 mg/100 g MS) (Song et al., 2018; Tokusoglu & Uunal, 2003). Ainsi, la consommation de la *Chlorelle* présente des bénéfices potentiels sur le corps humain comme les effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cardiaques, antidiabétiques et la régulation du microbiote intestinal (Gateau et al., 2016). Des efforts et recherches considérables ont été dévoués pour l'utilisation de la *Chlorella* dans le domaine agro-alimentaire. Cependant, le coût important de la culture production, et le processus général restent jusqu'à présent des contraintes à résoudre (Loke Show, 2022). Durant les dernières décennies, avec l'augmentation des industries de cultures des microalgues, la technologie pour cultiver ces dernières a significativement gagné en maturation ainsi l'utilisation des composés bioactifs et des nutriments à partir de la *Chlorella* est devenu le but principal (Wang et al., 2023).

La *Chlorella* possède une paroi cellulaire multicouche de 100 ~ 200 nm d'épaisseur, composée de polysaccharides, protéines, et sels inorganiques, par conséquent les nutriments dans le cytoplasme ne sont pas facilement disponibles à l'extraction (Ahmed & Kumar, 2022). Les techniques d'extraction traditionnelles comme le Soxhlet, méthode de Folch, l'extraction à l'eau chaude sont utilisées pour obtenir des composés bioactifs solubles à partir de la *Chlorella*, compte tenu des inconvénients de ces techniques : utilisation de la biomasse sèche ou lyophilisée, temps d'extraction relativement long, haute température utilisée et l'utilisation de solvants toxiques, extraction non-totale des molécules ciblées et présence de molécules indésirables, ainsi que la destruction des molécules thermosensibles, elles sont graduellement remplacées par de nouvelles techniques innovantes et émergentes d'extractions, comme par exemple les Ultrasons (US) et les Champs Electriques Pulsés (CEP) (Soleimani Khorramdashti, et al., 2021, Ambrozova et al., 2014). En outre, le séchage de la biomasse algale est l'une des majeure étape de consommation d'énergie mais aussi une cause importante de la perte de composés bioactifs. (Golberg et al., 2016; Gunerken et al., 2015). Par conséquent, l'application de ces techniques d'extraction de la biomasse fraîche serait un gain de temps et d'énergie, tout en diminuant l'utilisation de solvants chlorés facilitant ainsi la libération des composés intracellulaires à des températures basses, limitant la dégradation des extraits bioactifs (Poojary et al., 2016). Ces Techniques sont de ce fait, utiles afin de faciliter l'accès aux biomolécules intracellulaires, en détruisant la paroi cellulaire tout en préservant la fonctionnalité des produits extraits et permettre une libération sélective des molécules cibles. Elles doivent également être faciles à mettre en œuvre à grande échelle, et avoir des coûts d'investissements et opératoires réduits (Zinkone, 2018). Ces techniques innovantes englobent

Introduction générale

les extractions assistées par fluide supercritique, haute pressions hydrostatiques, microondes, US et CEP.

L'objectif général de notre étude est l'extraction des bioactifs de la biomasse de la *Chlorella* fraîche par CEP, US et combinaison des deux techniques (CEP et US).

Les objectifs spécifiques sont:

- Caractériser la microalgue *Chlorella sp*, espèce prélevée dans le sud Algérien, et cultivée au niveau du laboratoire sous des conditions déterminées et contrôlées, connaître sa valeur nutritionnelle et ses spécificités, afin de pouvoir l'incorporer dans les différents produits alimentaires
- Comparer l'efficacité des ultrasons et du champ électrique pulsé sur l'extraction des composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*, puis d'effectuer un screening phytochimique des extraits ainsi que d'évaluer quelques activités biologiques des extraits obtenus (antibactérienne, antifongique et antioxydante)
- Evaluer les différents prétraitements pour l'amélioration des extractions des lipides à partir de la *Chlorella*. La macération, la congélation/décongélation (CD), les Ultrasons (US), le Champ Électrique Pulsé (CEP), en application seule ou en combinaison, ont été testés pour leur capacité à provoquer la rupture cellulaire afin de faciliter l'extraction des lipides selon une méthode modifiée de Bligh et Dyer, utilisant la biomasse de la *Chlorella sp* sous sa forme fraîche, après récolte. Le rendement des extractions a été évalué ainsi que les profils des acides gras obtenus ont été analysés par chromatographie gazeuse.
- Elaborer des jus de fruits enrichis avec différentes quantités de *Chlorella* sous forme de poudre, et d'étudier les effets de son incorporation dans l'élaboration d'un jus de fruits. Les paramètres physico-chimiques, biochimiques, microbiologiques et sensoriels sont analysés pour mettre en évidence l'impact de l'incorporation de la chlorelle sur la boisson à base de fruits.

Ce manuscrit donc s'articule autour de 2 parties, déclinées en 6 chapitres:

La première partie, présente une étude bibliographique, dans laquelle sont présentés successivement deux chapitres distincts : le premier introductif, est consacré aux généralités sur les microalgues et la chlorelle, ainsi que les aliments fonctionnels, et le deuxième décrit

Introduction générale

les techniques utilisées pour les extractions des bioatifs de la chlorelle (conventionnelles et émergentes)

La deuxième partie qui représente la partie expérimentale, est scindée en 3:

Le chapitre trois, décrit les conditions de cultures, de récolte et une étude sur la connaissance de la chlorelle par sa caractérisation, d'un point de vue physico-chimique et nutritionnel.

Le chapitre quatre quant à lui présente les effets des Ultrasons et Champs Electrique Pulsé sur quelques activités biologiques (Anti-bactérienne, anti-fongique et anti-oxydante) des extraits de lachlorelle obtenu par plusieurs solvants.

Le chapitre cinq concerne les effets des techniques citées plus haut, et de leur combinaison, sur l'extraction des lipides de *Chlorella sp*, ainsi que les observations faites sur le rendement en lipides et le profil en acide gras obtenus pour chaque prétraitement utilisé.

Enfin, le chapitre six donne les résultats de l'élaboration d'une boisson fonctionnelle, par l'enrichissement en Chlorelle sous forme de poudre lyophilisée.

En dernier lieu, les conclusions générales à ce travail rappelleront les principaux résultats obtenus lors des études réalisées sur les quatre échelles précédemment mentionnées et les perspectives induites par les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse seront développées.

PARTIE 1:PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1: LA CHLORELLE, NOVEL FOOD

Chapitre 1 : La chlorelle, Novel food

1.1. Introduction

Une grande part de la biomasse aquatique est représentée par les protistes eucaryotes; y compris les algues dont 127 000 espèces ont été identifiées (Livre Turquoise, 2011). De nombreuses autres demeurent encore non identifiées ou non étudiées. Les milieux marins, ainsi que les eaux douces ou terrestres sont colonisés par les microalgues de par leur grande capacité d'adaptation aux conditions environnementales; Etant des organismes photosynthétiques, ces microalgues présentent de nombreuses caractéristiques biochimiques intéressantes pour un grand spectre d'applications dans différents domaines à savoir: l'alimentation humaine et animale, la production d'énergie (biocarburants) et la production de molécules à hautes valeurs ajoutées pour des fins industrielles, notamment dans les domaines pharmaceutique et cosmétique. Leur diversité étant prouvée à maintes reprises, seule une dizaine d'espèces de microalgues sont cultivées à l'échelle industrielle dont trois espèces sont prédominantes : *Arthrospira*(*Spirulina*), *Chlorella* et *Dunaliella* (Benamor, 2015, Clément-Laroisière, 2012).

La première consommation fut décrite en Chine avec une cyanobactérie du genre Nostoc, puis vint la découverte de la Spiruline en 1325 ou encore *Chlorella* en 1890 (Spolaore *et al.*, 2005). Depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont été réalisées sur la capacité des microalgues à produire des molécules de hautes valeurs ajoutées via la photosynthèse, ainsi que leur pouvoir de bioaccumulation et leur affinité vis-à-vis de certains métaux lourds (Negoro *et al.*, 1991)

1.2. Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des microorganismes aquatiques unicellulaires eucaryotes de forme ellipsoïde ou ronde, elles se trouvent dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eaux douces. Elles sont souvent connues sous la dénomination de «phytoplancton» (Sumi, 2009). Elles transforment par le biais de la photosynthèse l'énergie solaire et l'eau en biomasse et oxygène. De plus, les algues sont classées selon leur taille (micro et macroalgues), selon leurs pigments, les caractéristiques de leurs parois et leurs compositions.

Les macroalgues connues par «seaweeds» sont généralement visibles à l'oeil nu, cultivées pour produire des composants d'intérêt destinés à des applications industrielles. L'existence de ces organismes est nécessaire aux écosystèmes en termes de fonction, productivité et composition (Guiry, 2008, Dawes et Mathiesen, 2008 ; Littler et Littler, 2000). Les macroalgues peuvent être subdivisées en trois groupes selon leur pigmentation : verte,

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

marron, et rouge. Actuellement, les macroalgues sont utilisées dans des procédés de transformation pour produire de l'énergie : combustion, pyrolyse et digestion anaérobie (biogaz) (Ross et *al.*, 2008). Elles sont aussi utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, pour leurs propriétés texturantes, épaississantes, gélifiantes et émulsifiantes car elles renferment des polysaccharides tels que l'alginate, l'agar-agar, les carraghénanes, le fucoïdane et le laminarine (Chouana, 2017).

Contrairement aux macroalgues, les microalgues sont de l'ordre du micromètre, algues unicellulaires, séparées ou en colonies et se développent principalement en suspension dans des solutions aqueuses (Wen et Johnson, 2009). Les microalgues présentent différentes formes : souvent sphériques (*Porphyridium*), de gouttelette (*Chlamydomonas*), de filament (*Spirulina*), de spirale (*Arthrospira*), et même d'étoile (*Staurastrum*) (Sumi 2009). Grâce à leur pouvoir d'adaptation et de survie, elles sont aptes à vivre dans plusieurs milieux, notamment eaux salées, douces, saumâtres et même dans des eaux usées. Elles peuvent également se développer sur des surfaces rigides, telles que les troncs d'arbre, les structures immergées ou les murs (Becerra Celis, 2009). Elles peuvent aussi produire des quantités importantes de lipides, de sucres et de protéines grâce à la photosynthèse.

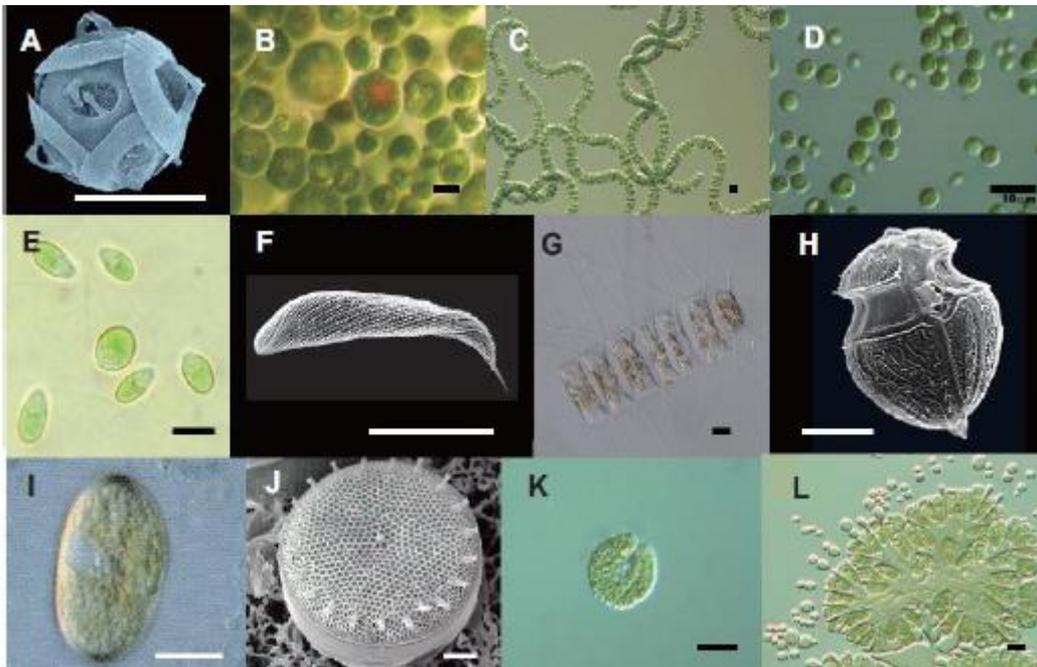


Figure 1.1 : Diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009).

A : *Gephyrocapsa* ; B : *Haematococcus lacustris* ; C : *Spirulina platensis* ; D : *Chlorella vulgaris* ; E : *Dunaliella tertiolecta* ; F : *Chaetoceros calcitrans* ; G : *Dinophysis acuminata* ; H : *Alexandrium* ; I : *Bacillariophyceae* ; J : *Raphidophyceae* ; K : *Raphidophyceae* ; L : *Botryococcus* (La longueur du trait dans chaque figure représente 10µm).

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

Un peu plus de 15 000 tonnes de matière sèche de microalgues par an sont produites à l'échelle mondiale (Tableau I.1), représentée par *Arthrospira (Spirulina) platensis* avec (~7 000 t/an) qui est l'espèce la plus cultivée industriellement, suivie (~4 000 t/an) et (~2 000 t/an) pour *Chlorella sp.* et *Dunaliella salina*, respectivement. Nous pouvons citer par la suite, les espèces dont la production est moindre, mais possédant un intérêt certain, comme: *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis sp.*, *Odontella aurita* et *Isochrysis galbana* (Spolaore *et al.*, 2006 ; Mata *et al.*, 2010). Il est à noter qu'une pléthore de molécules peuvent ainsi être produites telles que des protéines, des acides aminés, des sucres et polysaccharides, des vitamines, des antioxydants, des pigments, ou encore des acides gras polyinsaturés à longues chaînes comme le DHA ou l'EPA (Mata *et al.*, 2010)

Tableau 1.1 Production mondiale des microalgues (d'après Spolaore *et al.*, 2006)

Algue	Pays producteurs	Produits et applications
Spirulina	Chine, USA, Inde, Japon	Nutrition humaine et animale, Phycobiliprotéines, cosmétiques
Chlorella	Taiwan, Allemagne, Japon	Nutrition humaine, aquaculture, cosmétique
Dunaliella	Australie, USA, Chine	Nutrition humaine, b carotène, cosmétique

Les microalgues peuvent être utilisées dans plusieurs domaines (figure 1.2). Le principal axe de commercialisation des microalgues reste la nutrition humaine, qui peuvent être utilisées entières ou bien transformées, sous forme de complément alimentaire en raison de leur composition riche en protéines, acides gras polyinsaturés, pigments, vitamines et sels minéraux, ou comme colorant alimentaire naturel (Spolaore *et al.*, 2006), Certains pigments sont aussi utilisés comme colorants alimentaires (β -carotène, phycobiliprotéines), (Milledge, 2011). Elles peuvent être aussi utilisées pour la nutrition animale en particulier en aquaculture (Marchetti *et al.*, 2012) ou en industrie cosmétique, produits à base de molécules bioactives issues de ces micro-organismes, à savoir: produits solaires, maquillage, soins anti-âge et hydratants, ou capillaires (Spolaore *et al.*, 2006). De plus, il existe aussi la possibilité de développer de nouveaux principes actifs médicamenteux (nutraceutique) à base de microalgues (Ghosh *et al.*, 2015), ayant des propriétés antifongiques, antibactériennes, antivirales et antihistaminiques.

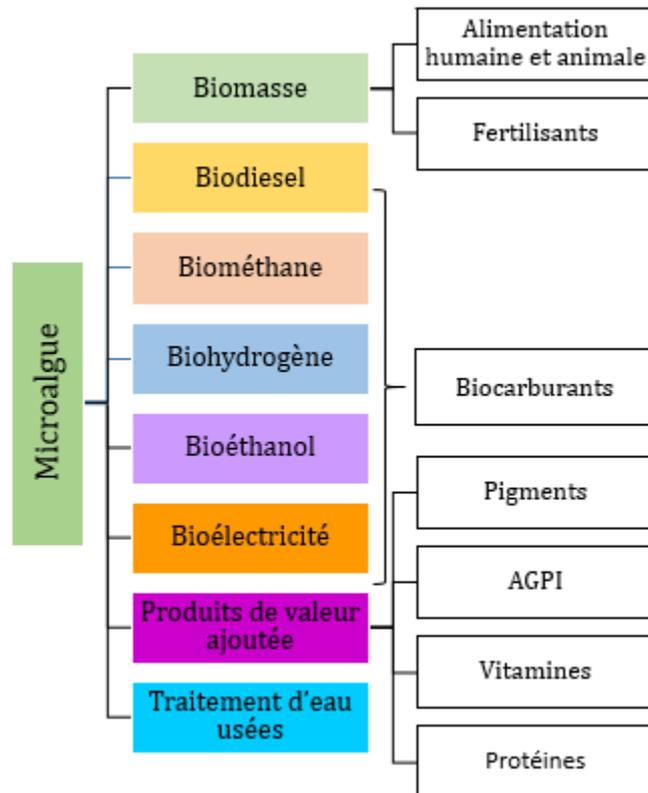


Figure 1.2 : Applications potentielles des microalgues modifié de (Enamala et al., 2018)

Enfin, dans le secteur de l'Environnement et l'énergie, on a recensé aussi l'utilisation de microalgues pour le traitement des effluents liquides, traitement des métaux, traitement des effluents gazeux ainsi que la production d'énergie (Zinkone, 2018).

1.3. La Chlorelle

1.3.1. Définition et origine

Le nom *Chlorella* provient du mot grec "*chloros*" (Χλωρός), qui signifie vert, et le suffixe latin "*ella*" se référant à sa taille microscopique. C'est une microalgue unicellulaire d'eau douce présente sur terre depuis la période précambrienne il y a plus de 2,5 milliards d'années et depuis lors son intégrité génétique est restée constante. Elle fut découverte en 1890 par un microbiologiste hollandais Martinus Willem Beijerinck. Au début des années 1900, la teneur en protéines de *Chlorella* (>55% de poids sec) a attiré l'attention des scientifiques allemands en tant que source nutritionnelle non conventionnelle. Dans les années 1950, la Carnegie Institution de Washington a repris l'étude et a réussi à développer cette micro-algue à grande échelle pour réduire les émissions de CO₂. Actuellement, le Japon est le leader mondial dans la consommation de la *Chlorella* et l'utilise entre autres pour le traitement médical.

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

1.3.2. Morphologie

La *Chlorella* est une cellule microscopique sphérique de 2 à 10 µm de diamètre et possède de nombreux éléments structuraux similaires aux plantes.

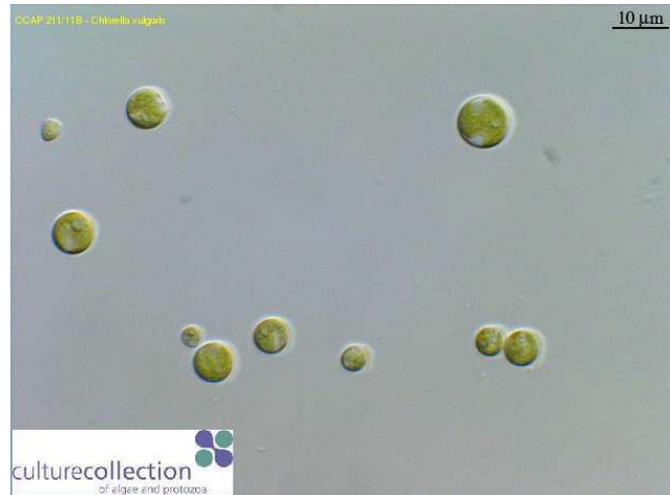


Figure 1.3 : Cellules de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B observées au microscope optique (Culture collection of algae and protozoa, Royaume-Uni)

1.3.3. Reproduction

La chlorelle est une cellule non mobile (autospore) qui se reproduit rapidement de façon asexuée. Ainsi, dans les 24 heures, une cellule de chlorelle cultivée dans des conditions optimales se multiplie par auto sporulation, qui est la reproduction asexuée la plus commune chez les microalgues. De cette manière, quatre cellules filles ayant leur propre paroi cellulaire sont formées à l'intérieur de la paroi cellulaire de la cellule mère (figures 4) (Safi et al., 2014).

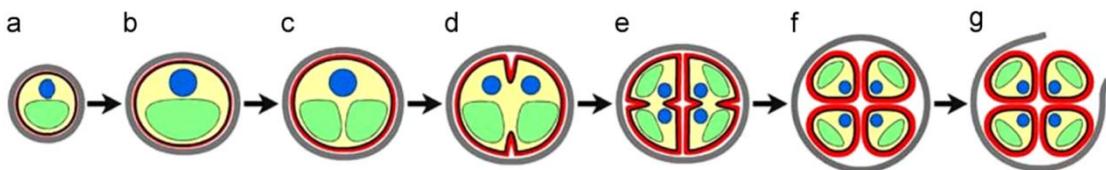


Figure 1.4 : Un schéma représentant les différentes phases de la formation de la paroi cellulaire de la cellule fille chez *Chlorella vulgaris* : a) la phase précoce de croissance cellulaire ; (b) la phase de croissance cellulaire tardive ; (c) la phase de division

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

1.3.4. Culture de la chlorelle

1.3.4.1. Conditions de la culture

Lors de la culture des micros algues, des paramètres très importants doivent être pris en compte, à savoir:

a) **Energie lumineuse**

Comme tout organisme photosynthétique, la chlorelle trouve sa source d'énergie dans la lumière, facteur indispensable à la photosynthèse, qui se produit à des longueurs d'ondes comprises entre 400 et 700 nm correspondant à la gamme du «rayonnement photosynthétiquement actif», provoquant la reproduction des cellules et augmentent ainsi la concentration cellulaire (Greque de Morais et *al.*, 2015). La lumière agit aussi sur la vitesse de croissance et aussi sur la composition de la biomasse produite. En son absence ou en excès, aucune production de matière organique est remarquée. Les conditions optimales lumineuses alternent des périodes lumineuses et d'ombre (Celis, 2010). Une exposition à la lumière artificielle, peut être utilisée pour la production du spectre de lumière correspondant à l'absorption spécifique des pigments souhaités. (Benamor, 2015)

b) **Température**

La gamme de température la plus appropriée dépend de l'espèce de microorganisme cultivé. Le changement de température affecte la composition en acides gras (AGs) des membranes cellulaires, qui assurent la stabilité et la fluidité des membranes (Richmond, 2007), ainsi que le métabolisme des AGs, en transformant de la forme insaturée vers saturée. Chez certaines espèces, une diminution de la température favorise une augmentation des AGs insaturés et vice-versa (par exemple *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* et *Botryococcus braunii*) (Sushchik et *al.*, 2002). Des changements dans le taux des pigments (l'astaxanthine, β -carotène et cantaxanthine) ont été également observés lorsque la température a augmenté. Cependant pour la Chlorelle une température de 25°C serait idéale pour sa croissance.

c) **Agitation**

Pour l'obtention de productivité importante de biomasse, l'agitation lors de la culture des microalgues, est indispensable. Cette dernière permet de mieux éclairer les cellules, de favoriser l'apport en CO₂ en améliorant le transfert gaz-liquide et d'éliminer l'oxygène produit qui pourrait être toxique à la culture. L'agitation est réalisée fréquemment en injectant le gaz, air ou air enrichi en CO₂ dans le réacteur sous forme de fines bulles, ce qui crée une

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

circulation du liquide dans le système (Converti et *al.*, 2006). Cependant, sur des cultures à faibles densités cellulaires, l'agitation n'a pas un effet significatif sur la productivité de la biomasse contrairement à celle aux densités plus importantes (Richmond, 2007; Eriksen, 2008). De plus, le débit d'injection du gaz peut endommager les cellules s'il est élevé, ce qui risquent le cisaillement des cellules par les bulles (Eriksen, 2008).

d) Dioxyde de carbone

La biomasse de microalgues est composée de 45 % à 50 % de carbone donc 1,65 et 1,8 kg est absorbé par un kilogramme de microalgue. (Doucha et *al.*, 2005).

Une injection d'air enrichi en CO₂, qui est un élément nécessaire pour la photosynthèse dans la culture, favorise la croissance des algues, à des concentrations variant entre 1 et 15% (v/v) (Skjanes et *al.*, 2007).

e) Éléments minéraux

Selon Ben Ayed, (2015)., les éléments minéraux les plus importants sont;

- L'azote est principalement utilisé pour la synthèse protéique. Chez la Chlorelle une augmentation de la concentration en azote dans le milieu entraîne une augmentation de la biomasse, de la quantité de protéines et de chlorophylle par cellule

-Le phosphore est habituellement fourni sous forme d'ortho-phosphate et joue un rôle important dans le transfert d'énergie et dans la biosynthèse des acides nucléiques des cellules. Chez la Chlorelle, le phosphate a une propriété détoxifiante. Sa présence dans le milieu de culture permet de réduire la toxicité intracellulaire des métaux par la formation des polyphosphates qui se lient aux métaux et réduisent leur toxicité en maintenant un faible niveau cytoplasmique des métaux.

-Le magnésium est un métal essentiel pour la croissance des algues, il joue un rôle important dans la photosynthèse. Le Magnésium est en effet un élément central de la molécule de chlorophylle. Il est impliqué dans l'agrégation des ribosomes dans les unités fonctionnelles et dans la formation de catalase

f) pH

Le pH dépend principalement de la concentration en carbone inorganique dans le milieu, sous forme de CO₂, acide carbonique (H₂CO₃), bicarbonate (HCO₃⁻), carbonate (CO₃²⁻). Certaines

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

espèces de *Chlorella* peuvent tolérer un pH très bas jusqu'à 3,0; mais pour d'autres un pH final élevé (11) peut inhiber la croissance (Yeh et *al.*, 2010 ; Mayo *etal.*, 1997).

1.3.4.2.Milieu de culture

Le milieu le plus utilisé pour la culture de la chlorelle est Bold's Basal Medium (BBM). C'est un milieu de sels inorganiques largement utilisé pour la culture d'algues planctoniques d'eau douce.

1.3.4.3.Techniques de culture

1.3.4.2.1.Mode de culture

D'une façon générale, il existe deux modes d'opération pour cultiver les microalgues :

- **Mode batch** : Un inoculum de microalgues est ajouté à un volume de milieu. Durant toute la culture, les éléments essentiels ajoutés vont être consommés par les algues et leurs concentrations vont diminuer dans le milieu. Quand la concentration de biomasse désirée est atteinte, la culture est arrêtée et la biomasse est récoltée (Ben Ayed, 2015).

Dans ce mode opératoire, on peut observer cinq phases de croissance.

Phase 1 « La phase de latence »: les cellules s'adaptent aux nouvelles conditions de culture.

Phase 2 « La phase d'accélération »: les cellules ont accumulé des composés intracellulaires et ont doublé leur matériel génétique. La population commence à croître via la reproduction végétative. Les cellules se divisent en deux cellules filles identiques contenant chacune la moitié du contenu de la cellule mère et elles-mêmes se diviseront ensuite en deux (Andersen, 2005).

Phase 3 « La phase exponentielle » : les cellules se multiplient très vite en observant une croissance exponentielle en fonction du temps. La vitesse de croissance de la culture est maximale. Les conditions du milieu sont optimales pour la croissance cellulaire.

Phase 4 « La phase stationnaire » : la concentration des microalgues reste constante. Un des éléments essentiels manque (lumière, azote, phosphore, carbone...) ; la vitesse de croissance diminue et compense juste la mortalité.

Phase 5 « La phase de déclin »: le taux de croissance est négatif, la majorité des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires ce qui engendre une diminution de

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

cellules viables pour la reproduction. Certaines espèces de microalgues sont aptes de se mettre en dormance cellulaire lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Elles pourront reprendre une activité métabolique lorsque les conditions seront à nouveau propices à leur développement (Richmond, 2004).

-Mode continu : L'apport de milieu de culture frais se fait continuellement dans le réacteur l'excès sera éliminé par surverse, afin que le volume de la culture reste constant. Les cultures en continu ou semi-continues ont montré plus de productivités comparés à celles en Batch (Ceron-Garcia *et al.*, 2012; Filali *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire à l'intérieur du réacteur stable. La culture est débutée en mode batch jusqu'à ce que la concentration cellulaire souhaitée soit obtenue, puis le milieu de culture est injecté en continu. Ainsi, théoriquement, la culture se trouvera continuellement en phase exponentielle de croissance (Andersen, 2005).

1.3.4.2.2. Les réacteurs de culture

Les systèmes de production de microalgues sont contrôlés afin d'obtenir des productivités élevées. Aujourd'hui, ils peuvent être divisés en systèmes de culture à ciel ouvert ou « openponds » et systèmes fermés appelés photo-bioréacteurs (Ahsan *et al.*, 2008).

De nos jours, la production de microalgues à grande échelle est surtout développée dans les systèmes à ciel ouvert. Les pays producteurs de microalgues sont Israël, les États-Unis, la Chine, la Thaïlande, le Viêt-Nam et Taïwan. La moyenne de la productivité de biomasse sèche est de 10 à 25 g m⁻² jour⁻¹, avec des concentrations de l'ordre de 0.5 g L⁻¹ (Lee, 2001; Becker, 1998).

Les photobioréacteurs, sont des récipients fermés, fabriqués en matériaux transparents pour permettre à la lumière de pénétrer à l'intérieur de la culture. Leur conception est optimisée de façon à avoir une bonne exposition à la lumière et ils permettent de contrôler tous les paramètres de culture : pH, température, oxygène, agitation etc....

Actuellement, ils existent plusieurs configurations de photo-bioréacteurs tels que les réacteurs tubulaires qui consistent en un ensemble de tubes transparents en verre ou d'acrylique. Généralement, ils fonctionnent en boucle fermée, la culture étant constamment recyclée. Le milieu de culture, le gaz carbonique peuvent être introduits en continu ou non. À la fin du cycle, la biomasse est récupérée (Richmond, 2007). Il est possible de réduire le diamètre des tubes pour maintenir le ratio surface / volume le plus élevé possible. Ce type de photobioréacteur permet une bonne agitation, il est simple et très facile à nettoyer (Wang *et al.*, 2013).

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

1.3.4.2.3. Mise en culture et maintenance

La souche mère est obtenus par transfert de l'inoculum sur gélose nutritive ; les tubes gélosés sont conservés à 4° C à l'obscurité et repiqués trimestriellement. Ils permettent l'ensemencement de milieu liquide en flacon d'Erlenmeyer (stade pré-culture), puis le passage par repiquage au dixième à des cultures en bouteilles de 1 L ou en flacons d'Erlenmeyer de 500 ml. Le contrôle sanitaire de la souche est réalisé par observation microscopique, coloration de Gram et développement sur milieu Infusion Broth de Biomérieux (IB) (Naessens, 2013).

1.3.5. Récolte

La récolte des microalgues de leur milieu de culture peut être effectuée en utilisant différentes méthodes, et cela dans le but d'une récupération et concentration efficaces de cette biomasse. Par conséquent, le choix du processus devrait être pour une récolte atteignant une concentration élevée tout en nécessitant des coûts de fonctionnement, d'énergie et de maintenance modérés. Cependant, il n'existe pas une méthode universelle vue qu'elle dépend de la nature de l'espèce microalgale et aussi du produit final, à savoir ses spécificités et ses propriétés (Barros, *et al.*, 2015).

1.3.5.1 Centrifugation

La force centrifuge permet la séparation des microalgues de leur milieu de culture. Cette technique permet d'avoir 10 fois plus la concentration initiale d'une suspension de microalgue (Sadi, 2012). Elle est connue pour sa rapidité et son efficacité à 95 %. C'est la méthode la plus courante à l'échelle industrielle car elle traite de grands volumes en peu de temps. Cependant, cette technique peut être nuisible à certaines espèces. Elle représente 20-30 % du coût total de production de biomasse qui la rend difficilement réalisable économiquement (Chen, *et al.*, 2011; Molina Grima, *et al.*, 2003).

1.3.5.2. Flocculation

La flocculation est la mise en suspension les particules qui s'agrègent pour former de grosses particules à sédimenter. Elle peut se produire naturellement (auto ou bioflocculation) dans les milieux de culture exposés au soleil, provoquée par l'assimilation du CO₂, des nitrates et des phosphates qui causent l'augmentation du pH, permettant aux cellules de se rejoindre afin de former des agrégats. La flocculation peut se faire par l'ajout d'hydroxyde de sodium qui est un produit non couteux permettant d'avoir le pH voulu et la précipitation de la biomasse (efficace à 90 %) dans un peu de temps (Vandamme, *et al.*, 2012), ou alors, d'un flocculant qui

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

peut être un polymère anionique ou cationique, synthétiques ou naturels, sinon elle peut être réalisée par l'ajout des bactéries au milieu de culture, cependant leur croissance demande une source d'énergie et peut être même des substrats organiques supplémentaire, une chose qui favorise l'incidence des contaminations bactérienne et fongique sur les microalgues (Barros et *al.*, 2015).

La floculation est considérée peu coûteuse et consomme peu d'énergie, ce qui rend cette technique de récolte une alternative attrayante, ainsi qu'elle peut être plus efficace en se combinant à la sédimentation ou à la filtration.

1.3.5.3. Sédimentation

La sédimentation par gravité est une technique de séparation, elle se base sur la densité des cellules de microalgue en suspension par une formation d'un dépôt de ces particules dans la partie inférieure d'un bassin de sédimentation, ainsi elle peut être améliorée par l'utilisation des séparateurs à lamelles. L'efficacité de ce processus est fortement liée à la taille et la densité des cellules qui influent sur la vitesse de la décantation, étant donné que les microalgues de faible densité ont tendance à ne pas être sédimenté facilement et plus rapidement, ça peut causer une dénaturation de quelques cellules. L'ajout d'un flocculant est fréquemment réalisé et considéré comme une pré-récolte pour une amélioration de l'efficacité de cette technique en terme de concentration et vitesse de sédimentation avec un taux plus élevé (Chen et *al.*, 2011; Uduman, et *al.*, 2010).

1.3.5.4. Flottation

Le phénomène de flottation des microalgues dans leurs milieux de culture peut être naturel lorsque leur teneur en lipides augmente. Ce processus permet de récupérer un concentré présentant 1 à 6 % de matière sèche, et peut être effectué par dissolution d'air dans le milieu de culture afin de créer des bulles de 10 à 100 μm , qui se lient sur les cellules et permettent le transport et la formation des flocs à la surface de milieu de culture. (Chen et *al.*, 2011). La flottation a été appliquée avec succès à la séparation des microalgues d'eau douce, telles que *Chlorella vulgaris*, et considérée comme une méthode de récolte à grande échelle prometteuse et peu coûteuse (Liu, et *al.*, 1999).

1.3.5.5. Filtration

Cette méthode implique le passage de la suspension microalgale à travers un filtre sur lequel les cellules de microalgue se concentrent constamment, et peut être de plusieurs types tel que la microfiltration, la filtration sous vide, sous pression, l'ultrafiltration et la filtration à

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

flux tangentiel. Le choix du processus approprié dépend principalement de la taille de la cellule microalgale à récolter. Néanmoins, les molécules solubles telles que les exopolysaccharides (EPS), généralement sécrétées par quelques microalgues dans les conditions de stress, génèrent le phénomène d'encrassement sur la membrane et représentent une limite majeure du processus par l'augmentation du flux et l'exigence d'élimination par un nettoyage chimique (Rossiet *al.*, 2008). Enfin, l'inconvénient majeur est le coût et la consommation d'énergie, pour le pompage de la biomasse ainsi qu'un remplacement des membranes usées (Show et Lee, 2014).

1.3.6. Composition nutritionnelle

1.3.6.1. Macronutriments

Lorsque la *Chlorelle* est séchée et réduite en poudre, elle renferme près de 42-58 % de protéines (Seyfabadi et *al.*, 2011; Servaites et *al.*, 2012; Safi et *al.*, 2013), cette quantité varie selon les espèces et les conditions de culture. La qualité nutritionnelle des protéines est déterminée par le profil en acides aminés (Safi et *al.*, 2013; Becker, 2007), qui consiste pour la chlorelle en acides aminés essentiels et non-essentiels, la comparant favorablement au profil pour la nutrition humaine proposée par la FAO (Food and Agricultural Organization) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (Ibrahim et Elbaily, 2020)

Les lipides sont présents entre 5-40% pour le genre *Chlorella* (entre acides gras essentiels et polyinsaturés), dans des conditions de culture optimales, et peuvent avoisiner les 58% avec des conditions défavorables (Stephenson et *al.*, 2009; Mata et *al.*, 2010). Ces valeurs peuvent varier à la hausse pour certaines espèces à paroi rigide, en appliquant une méthode de destruction cellulaire (Chen et *al.*, 2011)

Pour les glucides, ils varient entre 12-55% (Choix et *al.*, 2012), dont du glucose, fructose et saccharose. Son apport calorique est de 400 kcal par 100 g. La composition générale de la chlorelle en poudre (%) est représentée dans le tableau 1.2.

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

Tableau 1.2 Composition des macronutriments de la chlorelle en poudre (%MS) (Ibrahim et Elbaily, 2020; Safi et al., 2014).

Eléments	%
Protéines	42-58%
Acide aminé	(g/100g)
Glycine	1,4-2,3
Alanine	2,0-3,1
Valine	1,5-2,3
Leucine	2,1-3,0
Isoleucine	1,0-1,8
Phénylalanine	1,1-2,1
Tyrosine	0,8-1,4
Proline	0,9-1,5
Histidine	0,7-1,1
Tryptophane	0,1-0,4
Serine	1,1-1,7
Thréonine	1,3-2,0
Cystéine	0,3-0,4
Méthionine	0,5-0,8
Arginine	1,4-3,0
Lysine	1,4-2,3
Acide Asparaginique / Asparagine	2,1-3,5
Acide Glutaminique / Glutamine	3,1-5,6
Glucides	12 - 55%
Saccharose	1,25(g/100g)
Glucose	0,58
Fructose	0,06
Lipides	5-40%
Acides gras	<1 (mg/100g)
Acide alpha Linoléiques (oméga 3)	150-800
Acide Oléique	310-1300
Acide Linoléique (oméga 6)	150-800
Acide Palmitique	300-700

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

Acide Stéaridonique	60-450
Acide Stéarique	20-300
Acide Palmitoléique	40-300
Acide Laurique	1-80
Acide Myristique	50-100
Acide Arachidonique	10-15

1.3.6.2. Micronutriments

La chlorelle contient une importante quantité de vitamines et de minéraux, à hauteur 10% par rapport à son poids. D'après les données de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), il est possible de trouver dans 100 grammes de chlorelle en poudre, une variété de minéraux et vitamines comme montré dans le tableau 1.3

Tableau 1.3 Composition des micronutriments de la chlorelle en poudre (mg pour 100g de MS) (AFSSA, ;Higdonet al., 2009)

Micronutriments	Quantité en mg pour 100g de MS
Vit A	11
Vit B2	3.6
Vit B12	0.2
Vit C	30
Vit E	11
Vit K	0.5
Calcium	600
Magnésium	400
Fer	60
Potassium	2900
Sélénium	10 mg

On peut aussi retrouver:

- 1-3 % de chlorophylle, pigment responsable de la coloration verte de cette algue et situé dans les thylakoides. (Ibrahim et Elbaily, 2020) Les caroténoïdes sont aussi retrouvés dans les pigments de la Chlorelle, représentés essentiellement par le β -carotène. Ces pigments jouent le rôle d'anti-oxydants (Gouveia et *al.*, 2005).

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

- 5 % de fibre par rapport à son poids, qui est non assimilables par l'organisme, dont la cellulose. Cette dernière enveloppe les toxines, les métaux lourds, les graisses et autres substances non digérés par l'organisme et les évacue par voie naturelle.

La chlorelle contient aussi des enzymes comme des porphyrines: activateurs du métabolisme cellulaire, de la sporopollénine, qui aide à la détoxification, ce composé naturel le plus résistant au monde, uniquement dans le pollen et des algues unicellulaires, de la chlorelline qui joue le rôle d'antibiotique naturel. (Bernard, 2010)

1.3.7. Intérêt thérapeutique et contre-indication

Chlorella peut être prise seule ou en conjonction avec des médicaments. Aucun effet secondaire négatif n'a été observé lors de son utilisation (Bewicke et Potter, 2009). Elle est tout de même déconseillée pour les enfants sensibles aux moisissures (Ohkawa et *al.*, 1995) et aux personnes souffrant d'hypertension artérielle. Sans oublier, les interactions de la chlorelle interagissent avec les médicaments antiplaquettaires, anticoagulants, statines, anti-inflammatoires (Halperin et *al.*, 2003).

Evidemment, la Chlorelle revêt de multiples bienfaits thérapeutiques grâce à sa richesse en nutriments.

- Supplément à l'alimentation : par sa richesse nutritionnelle, elle reste très conseillée pour les sportifs, les enfants en croissance, les personnes convalescentes et les sujets souffrant de carences nutritionnelles.
- Régénérateur cellulaire Grâce à son facteur de croissance 'Chlorella Growth Factor' (CGF).
- Efficacité contre la fibromyalgie (Merchant et *al.*, 2000).
- Détoxifiant puissant. (Nakano et *al.*, 2005).
- Action contre l'hypertension artérielle (Merchant et Andre, 2001).
- Remède anti cancer (Wu et *al.*, 2005).
- Application de la chlorelle dans le domaine agroalimentaire: En effet, elle est riche en caroténoïdes utilisés comme colorants alimentaires, en protéines, en vitamines, en minéraux, acides aminés essentiels et possède des propriétés

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

antioxydantes (Clément-Laroisière, 2015; Gouveia *et al.*, 2008 ; Mizoguchi *et al.*, 2008).

- Application de la chlorelle dans l'alimentation animale: *Chlorella vulgaris* est aussi largement utilisée dans l'aquaculture pour nourrir les larves de mollusques et des rotifères, complément alimentaire pour les volailles pour son effet positif sur la qualité des oeufs (Clément-Laroisière, 2015, Halle *et al.*, 2009; Muller-Fuega, 2000).

- Domaine cosmétique: *Chlorella* est de plus en plus exploitée dans le domaine cosmétique (Stolz et Obermayer, 2005), grâce à son activité antioxydante (Gouveia *et al.*, 2008; Pulz *et al.*, 2004).

I.4. Les composés bioactifs de la Chlorelle

Plusieurs études ont été conduites pour enquêter sur les métabolites des microalgues pour comprendre leur nature et chercher des potentielles utilisations dans différents domaines utiles à l'homme. Le screening des extraits de microalgues ainsi que l'isolement des métabolites, est une méthodes connue pour évaluer les activités biologiques de ces composants. Les microalgues sont reconnues pour être une source de ces biocomposés d'intérêt commercial (Volk et Furkert, 2004). Ces composés actifs à partir de microalgues peuvent être soit des métabolites primaires comme les protéines, les acides gras, les vitamines et les pigments, soit, synthétisés à partir de métabolites secondaires. Ces composés pourraient avoir des activités anti-fongiques, antialgales, antivirales, anti-enzymatiques ou anti-biotiques (Volk, 2008). La majorité de ces produits (cyanovirin, acide oléique, acide linoléique, acide palmitoléique, vitamines E, B12, β -carotène, phycocyanine, lutéine, and zéaxanthine) ont prouvé des capacités antioxydantes, et anti-inflammatoires (Markou et Nerantzis, 2013; Ibanez *et al.*, 2013; Harun *et al.*, 2010; Smeets *et al.*, 2008)

Cette diversité résulte en beaucoup d'applications potentielles dans des domaines biotechnologiques, comme la production de biocomposés utilisés en agro-alimentaire, médecine, cosmétique et en pharmacologie et même dans l'industrie de l'énergie (Kolympiris *et al.*, 2014). La Chlorelle contient des substances bioactives avec des propriétés médicinales, qui durant des études expérimentales ont reporté des effets: antitumoral, anticoagulant, antibactérien, antioxydant, and antihyperlipidémiant en plus de propriétés hépatoprotectives et immunostimulantes d'hydrolyzats d'enzymes protéiques (Li *et al.*, 2013; Medina-Jaritz *et al.*, 2013, Kokou *et al.* 2012; Cha *et al.*, 2010 Plaza *et al.*, 2009). Ces hydrolats pourraient être développés dans des aliments fonctionnels avec des activités immunostimulantes, qui étaient

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

démontré in vivo (Morris et al., 2007). De plus, le mécanisme hypocholestérolémiant de la chlorelle a été étudié par Shibata et al. (2007).

Chez le genre *Chlorella*, on note la présence de plusieurs types de molécules bioactives tels que: les composés phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les phytols, les phénols, la lutéine et l'astaxanthine. (Mostafa, 2012; Costudio et al., 2012). Un des plus importants des molécules bioactives chez *Chlorella* est le β -1,3 glucan, un immunostimulateur actif qui réduit les radicaux libres et le cholestérol sanguin. L'efficacité de ce composé contre plusieurs pathologies a été prouvée dans plusieurs études (Spolaore et al., 2006).

Pléthore de composés antioxydants pourraient être responsables des activités fonctionnelles de la chlorelle comme la lutéine, α -carotène, β -carotène, acide ascorbique, et l' α -tocophérol, qui sont actifs contre les radicaux libres. Quelques uns de ces composés sont utilisés comme additifs /colorants naturels. (Plaza et al., 2009; Zhao et al., 2008). Selon Wu et al. (2007), la Chlorelle contiendrait 2 à 4 mg/g de matière sèche. La lutéine est un additif important dans le domaine alimentaire, et un puissant antioxydant, pour réduire l'incidence du cancer et prévenir la dégénérescence maculaire (Zhao et al., 2008; Park et al., 1998).

Par exemple, l'activité anti-proliférative des caroténoïdes extrait à partir *Chlorella ellipsoidea* et *Chlorella vulgaris* sur les cellules cancéreuses du colon, a été reportée par Cha et al. (2008). Il a été observé que les principaux caroténoïdes retrouvés chez *C. ellipsoidea* étaient en majorité la violaxanthine, les xanthophylles, l'antéaxanthine et la zeaxanthine comme présents en moindre quantité, alors que pour *C. vulgaris*, la lutéine représentait le composant majoritaire.

Pour les autres caroténoïdes, *Chlorella* peut accumuler la canthaxanthine and l'astaxanthine, quand elle est soumise à une forte luminosité et une addition de sel dans le milieu diminué de nutriments (Gouveia et al., Mendes et al., 1995). Ces caroténoïdes à leur tour comme les autres précurseurs de la vitamine A favoriseraient l'immunité.

Outre les caroténoïdes, d'autres composés anti-oxydants ont été décrits chez *Chlorella vulgaris*, ont démontré que les peptides purifiés extraits de cette dernière, possédaient un effet protecteur significatif sur l'ADN contre les dommages cellulaires causés par les radicaux Hydroxyl. Ces peptides représentent un potentiel contre les maladies reliées au stress oxydatif comme l'athérosclérose, maladies coronaires et le cancer (Sheih et al., 2009).

Les polysaccharides aussi ont été identifiés chez *Chlorella pyrenoidosa* (Shi et al., 2007). Les polysaccharides purifiés d'origine microalgale, tels que l'agar et le carraghénan, sont intensivement utilisés dans l'industrie (Adhikari et al., 2006). Ces composés sont reliés aux activités prouvées de la Chlorelle, citées plus haut, et ont été purifiés et développés pour la

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

création de nouvelles générations de médicament.(Mao et al, 2009; Ye et al., 2008; Adhikari et al., 2006). Les glucides extracellulaires dans les cultures de *C. pyrenoidosa* ont été représentés majoritairement par des polysaccharides hydrosolubles contenant, galactose, mannose, arabinose, xylose, ribose, fucose, and rhamnose (Maksimova et al., 2004).

En général, *Chlorella* est une bonne candidate, comme beaucoup d'autres microalgues, pour être utilisées comme source de composés bioactifs. Il est nécessaire de contrôler les conditions de culture, qui déterminent la composition finale et entière (Plaza et al.,2009).

1.5. Les Aliments fonctionnels

L'industrie agro-alimentaire est une branche très importante de l'économie nationale, jouant un rôle important dans la transformation des matières premières issues de l'agriculture. Les nouveaux produits issus d'innovations, sont très importants pour les entreprises qui souhaitent rester sur le marché et satisfaire les demandes des consommateurs. (Menrad, 2004).

En particulier, durant les dernières décennies, les demandes des consommateurs dans le domaine de la production alimentaire ont particulièrement changé. En effet, ces derniers lient l'alimentation directement à leur santé(Mollet et Rowland, 2002; Young, 2000). Ainsi, les aliments ne sont pas destinés uniquement à satisfaire la faim et apporte les nutriments essentiels mais aussi à prévenir les maladies liés à la nutrition et à améliorer le bien-être mental et physique, (Menrad, 2003; Robertfroid, 2000b).

Les innovations dans l'agro-alimentaire font références ces récentes années aux avancées scientifiques et technologiques, avec l'introduction des nouveaux aliments. Dans ce contexte, les aliments fonctionnels jouent un rôle remarquable. Il s'agit d'aliments qui offrent certains bienfaits pour la santé, devenus d'un grand intérêt pour les chercheurs dans le monde entier. (Jayalalitha et al., 2019).

1.5.1. Généralités sur les aliments fonctionnels

Le terme aliments fonctionnels a été utilisé la première fois en 1984 au Japon, suite aux résultats des relation entre nutrition, satisfaction sensorielle, fortification et modulation du système physiologique afin de définir ces produits alimentaires enrichis en constituant qui possèdent des effets physiologiques avantageux (Kwak & Jukes,2001; Hardy, 2000;). Connus sous les noms de : aliments fonctionnels, alicaments, super aliments, <<designer foods>> aux États-Unis ou «FOSHU» (Food for specified health Uses) au Japon

Pour être FOSHU, un aliment doit avoir fait la preuve de son effet physiologique ou bénéfique sur la santé. Leurs principaux objectifs sont d'améliorer les conditions générales du

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

corps humains (pré et probiotiques), diminuer les risques de certaines maladies (produits hypocholestérolémiants) et peuvent être utilisés pour guérir certaines pathologies (Side, 2006; Mark-Herbert, 2004; Menrad, 2003). Ces ingrédients doivent avoir été scientifiquement reconnus être en relation avec certaines maladies par l'office de contrôle pharmaceutique et alimentaire, FDA (Food and Drug Administration) (Ashwell, 2002).

«Aliment fonctionnel» est une expression qui a presque autant de définitions qu'il y a d'auteurs s'y référant. Ces définitions sont soit simples comme :

- Aliment qui fournit des bénéfices nutritionnels au-delà de la nutrition de base (IFIC, 1995) ;
- Aliment ou produit alimentaire commercialisé avec un message de bénéfice pour la santé (Riemersma, 1996) ;
- Aliment de tous les jours transformé en sauveur de vie potentiel par l'addition d'un ingrédient magique (Coghlan, 1996).

Soit plus élaborées :

- Aliment ou boisson dérivée de substances naturelles et consommée comme partie de la nourriture quotidienne et qui, s'il est ingéré, a des effets physiologiques bénéfiques (Hillian, 1995).
- Un aliment qui contient des composants potentiellement bénéfique incluant tous produits, composant au mode alimentaire qui peut fournir un bénéfice pour la santé au-delà de ceux dépendant des nutriments traditionnels qu'il contient (Anonyme, 1994).

À titre de définition générale, un aliment est « fonctionnel » s'il contient une composante alimentaire qui affecte une ou plusieurs fonctions précises du corps et qui produit des effets positifs. Cet effet devrait être utile au bien-être et à la santé ou permettre de réduire le risque de maladie (Domínguez Díaz *et al.*, 2020).

1.5.2. Classification des aliments fonctionnels

Les aliments fonctionnels ont été développés presque dans toutes les catégories d'aliments, même s'ils ne sont pas distribués de façon homogène. Ils sont présents principalement dans les produits laitiers, la confiserie, les boissons non-alcoolisées, la boulangerie et les produits destinés aux bébés (Kotilainen *et al.*, 2006; Menrad, 2003). Selon, Kotilainen *et al.* (2006), Spence (2006), et Sloan (2000), Ils peuvent être classifiés comme suit:

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

- Aliment fortifié avec des nutriments additionnels (Label produits fortifié) comme les jus de fruits enrichis en vitamines E, C, acide folique, zinc et calcium,
- Aliments avec addition de nouveaux nutriments ou composants, normalement absents (Label produits enrichis)comme les probiotiques et les prébiotiques,
- Aliments ou un composé délétère a été éliminé, réduit ou remplacé par un autre aux effets bénéfiques (Label produits altérés) tels que les fibres libératrices de matières grasses dans la viande et la crème glacée
- Aliment ou un des composants a été amélioré (Label effet amélioré) comme les œufs avec un taux d'oméga 3 plus important

D'après Makinen-Aakula, 2006, la classification peut être basée sur le but de ces aliments fonctionnels, comme suit:

- Aliments qui apportent du bien-être ou améliorent la santé des enfants, tels que les prébiotiques et les probiotiques,
- Aliments qui réduisent un risque de santé existant comme le taux élevé de cholestérol, ou une tension artérielle élevée,
- Aliments qui améliorent le confort de la vie, comme les produits sans lactose, et sans gluten,

1.5.3. Nouvel aliment ou "novelfood"

C'est un produit nouveau, qui se différencie des autres produits trouvés sur le marché par sa composition ou sa méthode de production, ou peut être un produit ancien dont la consommation augmente significativement (Zarba et *al.*, 2020; Hermann, 2009 ;).

D'après Zarba et *al.*, 2020, un aliment peut être considéré comme novelfood;

1. Aliments et ingrédients alimentaires présentant une structure moléculaire primaire nouvelle ou intentionnellement modifiée,
2. Aliments et ingrédients alimentaires composés de microorganismes, de champignons ou d'algues ou isolés à partir de ceux-ci.
3. Aliments et ingrédients alimentaires composés de végétaux ou isolés a partir de ceux-ci et les ingrédients alimentaires isolés a partir d'animaux, à l'exception des aliments et des ingrédients alimentaires obtenus par des pratiques de multiplication ou de reproduction traditionnelles
4. Aliments et ingrédients alimentaires auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé, lorsque ce procédé entraîne dans la composition ou dans la structure des aliments ou des ingrédients alimentaires des modifications significatives de leur valeur nutritive, de leur métabolisme ou de leur teneur en substances indésirables.

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

"Un novel food n'est pas nécessairement fonctionnel et un aliment fonctionnel

n'est pas nécessairement un novel food": on peut par exemple découvrir des propriétés fonctionnelles à un aliment de consommation traditionnelle : c'est typiquement le cas du yaourt, ou du jus de pruneaux, jus de plusieurs fruits et légumes combinés, etc. Mais quand on ajoute un ingrédient ou composé dans un aliment où ils n'y en avait pas précédemment, ou quand on utilise alors c'est un novel food

1.5.4. La chlorelle ingrédients des aliments fonctionnels

Les microalgues ont été utilisées depuis des siècles comme source d'alimentation ou comme supplément pour la santé, grâce aux divers macro et micronutriments qu'elles contiennent. Le principal intérêt est représenté par la haute teneur en protéines qui est de l'ordre de 50 à 60% de matière sèche pour certaines espèces telles que: *Arthrospira platensis* connue sous le nom *Spirulina*, *Arthrospira maxima*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil*, et *Chlorella* sp. (Nazih et Bard, 2018)

Ainsi, ces dernières années ont connu l'apparition de nouveaux produits alimentaires préparés à base de biomasse microalgale. Celle-ci est retrouvée sous forme de tablettes, capsules et sous forme liquides, mais aussi incorporée dans les pâtes alimentaires, snacks, confiseries, chewingums et boissons en tout genre, (Batista et al., 2013; Goh et al., 2009).

Parmi toutes ces espèces, on cite la chlorelle, qui est considérée comme un aliment fonctionnel et une source importante de nutriment dans plusieurs domaines, trouvée et vendue comme aliment sain, complément alimentaire et nutraceutique (Bishop et Zubeck, 2012). Elle a été utilisée contre la malnutrition infantile et la névrose (Mello-Sampayo et al., 2013). On note son utilisation dans plusieurs produits: cookies/biscuits, mayonnaise, vinaigrettes, pudding et desserts glacés, croissants et yaourts (Beheshtipour et al., 2013; Batista et al., 2012; Batista et al., 2010; Gouveia et al., 2007, Gouveia et al., 2006). De plus, *Chlorella* pourrait augmenter la viabilité des probiotiques dans les produits laitiers comme les yaourts (Hassler et al., 1998).

L'incorporation de la chlorelle dans les produits alimentaires pour améliorer la valeur nutritionnelle ainsi que les qualités sensorielles des aliments. D'après Shalaby et Yassin (2013), l'addition de *Chlorella vulgaris* a renforcé l'apparence, le goût et la texture des croissants. Ces mêmes remarques ont été observées chez Fradique et al. (2010) qui ont rapporté que les panelistes ont préféré les pâtes enrichies à des hautes concentrations (2%)

Chapitre 1 La chlorelle, Novel food

grâce à leur apparence attractive et innovante. Gouveia et *al.* (2007) ont rapporté que l'addition de *Chlorella vulgaris* aux cookies aussi avait amélioré leurs caractéristiques texturales, les molécules protéiques pourraient avoir renforcé la pâte et affecté l'absorption de l'eau, augmentant ainsi la fermeté des cookies.

Le nombre croissant des recherches reliées à la Chlorelle comme ingrédient des aliments fonctionnels, a montré ses capacité de développement dans le future. Ce marché aspire à s'expanser et rencontrer les besoins nutritionnels des consommateurs qui sont en demande constante d'aliments à bénéfices directes pour leur santé (Widyaningrum et Prianto, 2021).

**CHAPITRE 2 : MÉTHODES D'EXTRACTION
DES COMPOSÉS BIOACTIFS DE LA
CHLORELLE**

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

2.1. Introduction

L'extraction des composés bioactifs représente actuellement un enjeu principal pour les applications industrielles en général, et pour les molécules extraites à par des microalgues de manière spécifique tout particulièrement.

Un compromis nécessaire doit donc être recherché entre le coût du processus d'extraction (en termes d'énergie et de consommables) et le rendement d'extraction, afin de pouvoir appliquer les protocoles expérimentaux à l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle (Audo, 2013).

Pour les extractions, plusieurs méthodes sont utilisées, on citera d'abord les méthodes conventionnelles ou traditionnelles, telles que la macération, la congélation/décongélation. Ces techniques possèdent plusieurs inconvénients: temps d'extraction long, consommation de grandes quantités de solvants, souvent toxiques pour la santé humaine (Aouir, 2017).

Une prise de conscience progressive s'est faite dans le domaine des extractions, pour respecter l'environnement et protéger la santé humaine. C'est dans ce contexte que le concept de la chimie verte a été développé (Boulho, 2017). D'où le développement de nouvelles techniques dites innovantes ou innovatrices ou non-conventionnelles, offrant de nombreux avantages, tels qu'un temps d'extraction réduit, des taux plus importants et une moindre consommation de solvants comparé aux méthodes conventionnelles, sans altérer la qualité des molécules bioactives extraites (Grimi *et al.*, 2014). Ces techniques innovantes comprennent entre autres: Les microondes, les radiations, les hautes pressions hydrostatiques, les ultrasons et le champ électrique pulsé

2.2. Les méthodes conventionnelles

Ces techniques sont utilisées depuis de nombreuses années et ont aidé à l'extraction de molécules bioactives de toute sorte. Elles incluent l'extraction au Soxhlet, la macération, la percolation, la congélation/décongélation (Boulho, 2017).

Plusieurs facteurs entrent dans l'efficacité de ces méthodes, à savoir, le type de solvant (polarité, seul ou en mélange), l'énergie appliquée, le type d'agitation et la solubilité des composés à extraire (Awika *et al.*, 2003). Ces méthodes traditionnelles peuvent aussi utiliser des acides (l'acide formique, acétique, citrique et phosphorique). Cependant, les principaux

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

inconvénients tendent à freiner et diminuer leur utilisation, comme la forte consommation en énergie et en solvants, ainsi que le temps de traitement assez long (Kaufmann et Christen, 2002). On peut aussi citer la nécessité d'étape de purification du fait de l'obtention d'impuretés, qui à leur tour consomment de l'énergie et risquent de dénaturer les molécules sensibles. La valorisation des extraits représente à elle aussi, une des limites de ces techniques, par l'obtention de résidus toxiques

2.2.1. Macération

C'est une infusion de la matrice microalgale dans un solvant à froid. Cette technique est utilisée pour l'extraction des molécules fragiles. Cependant, elle présente de nombreux avantages, généralement longue et le rendement obtenu à la fin reste médiocre. Pour atteindre une certaine efficacité, la macération peut durer jusqu'à 10 jours, mais si le solvant est l'eau, des problèmes de contaminations bactérienne ou des phénomènes de fermentation et peuvent survenir, ce qui pourrait entraîner la dégradation des molécules dans l'extrait obtenu. Ces problèmes peuvent être évités partiellement, en utilisant des récipients fermés, à l'abri de la lumière et de préférence maintenus au réfrigérateur pour les molécules sensibles (Benamor, 2009). Le mécanisme d'action de cette technique classique est la diffusion du solvant dans la matrice, ce qui reste un facteur limitant pour certaines microalgues, notamment la Chlorelle qui possède une paroi rigide.

Les facteurs influençant l'extraction sont plusieurs, la taille des particules de la matrice, la nature du solvant, la capacité de pénétration du solvant, le temps d'extraction, la température d'extraction, l'agitation (Gelebart, 2016).

2.2.2. Congélation/Décongélation

Cette technique est souvent recommandée comme méthode simple et efficace pour l'extraction des pigments des microalgues, en appliquant plusieurs cycles de congélation/décongélation (Chittapun et *al.*, 2020). Cette technique est douce et non-dénaturante. Les cristaux formés durant la congélation, déchirent les parois et membranes relâchant ainsi le contenu cellulaire dans le milieu (Soni et *al.*, 2006).

L'application de cette technique pour l'extraction, induit une congélation de la biomasse qui cause l'expansion du volume cellulaire, puis la décongélation provoque une contraction. Avec la répétition des cycles, les membranes sont graduellement affaiblies et arrivent éventuellement à la rupture. Plusieurs facteurs affectent l'efficacité de cette technique, tels que

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

: la température de congélation, la durée de congélation, le type de décongélation (Fabre et *al.*, 2022).

Exemples d'applications par Congélation/Décongélation

Kulkarni and Nikolov, (2018) , ont développé un procédé de coextraction de protéines et caroténoïdes à partir de biomasse ayant subi une perméabilisation par un cycle de congélation/décongélation. Ce procédé a augmenté l'extraction sélective des 2composés. Cependant, il reste non applicable à l'échelle industrielle car c'est une méthode énergivore.

2.3. Extraction verte

Pendant des années les extractions des composés bioactifs à partir des microalgues, utilisaient des solvants risqués et toxiques (acétone, méthanol, diethyl éther, chloroforme, hexane) (Imbimbo et *al.*, 2020). Cependant, la nécessité de développer des procédés respectueux spécialement dans les domaines de l'alimentaire, nutraceutique, pharmaceutiques et cosmétiques, requière la conformité avec le concept de chimie ou d'extraction "verte" qui inclue la sélection de matériau brut et alternatif, avec des applications sûres, robustes, sans dénaturation et l'obtention des extraits biodégradables ainsi que la possibilités d'utilisation de sous-produits.(Clarke et *al.*, 2018; Chemat et *al.*, 2012).

Les nouveaux challenges du 21siecles sont de trouver des techniques d'extraction vertes, sans solvants, de préférence non -destructives et protégeant les consommateurs et l'environnement. L'extraction verte est un terme général pour les techniques d'extraction innovantes, respectueuses de l'environnement et non consommatrices d'énergie, qui minimisent l'utilisation des solvants conventionnels les remplaçant ainsi avec des biosolvants et /ou naturels et renouvelables pour arriver à l'obtention de composés de hautes qualités (Chemat et *al.*, 2012). Ces procédés d'extraction sont conçus pour éviter l'utilisation de solvants, obtenant des extraits et des résidus sans solvants, évitant ainsi les risques encourus sur la santé et l'environnement surtout dans l'air des exigences légales pour les produits destinés à l'alimentation qui doivent être purifiés. Enfin, si ces méthodes peuvent être aussi non-destructrices, pour que la matrice vivante à partir de laquelle on extrait les molécules, ait la possibilité pour la régénération cellulaire, ce qui réduirait les déchets obtenus à la fin des extraction (Elerssek et *al.*,2020).Ainsi, la sélection de solvants couplé à un procédé respectueux envers le principe de la chimie verte, contribue à une approche prometteuse pour l'extraction des composés bioactifs des microalgues. Les solvants verts comprennent les

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

solvants classiques tels que l'eau et l'éthanol, et le 1-butanol et l'éthyle acétate issus de source renouvelable comme les nouveaux solvants incluant les fluides supercritiques, liquides ioniques et les solvants naturels eutectiques (Hackl et Kunz, 2018; Byrne et *al.*, 2016). L'eau et l'éthanol sont hautement recommandés comme des solvants "verts" respectueux de la santé et l'environnement (Prat et *al.*, 2014)

2.4. Les méthodes innovantes

La première étape pour l'obtention des composés bioactifs à partir de la Chlorelle est l'extraction de ces molécules utilisant différentes méthodes allant des méthodes conventionnelles comme la macération et l'extraction au Soxhlet, aux techniques innovantes (Carreira-casais et *al.*, 2021). Cependant, la Chlorelle possède une paroi multicouches, correspondant à un feuillet trilaminaire composé d'une couche épaisse de sporopollenine (un biopolymère résistant), puis d'une paroi riche en mannose et chitine, puis une membrane plasmique faite de phospholipides, qui contient le cytoplasme et les organelles (Burczyk and Hesse, 1981).. En conséquence, l'application d'une technique de rupture cellulaire est préférable pour extraire les composés d'intérêt.

La destruction cellulaire peut être définie comme étant la perte d'intégrité de la paroi ou de la membrane cellulaire; elle conduit à la libération du contenu intracellulaire (Zinkone, 2018). Elle peut être divisée en plusieurs types selon Montescot (2015):

- La **perméabilisation** : la libération des composés actifs se fait après perforation de la membrane et parois cellulaire
- La **déstructuration** : parois et membranes sont rompues et libèrent des organites intacts
- La **désintégration** : les parois et membranes des organites sont décomposées et les débris cellulaires sont plus petits.

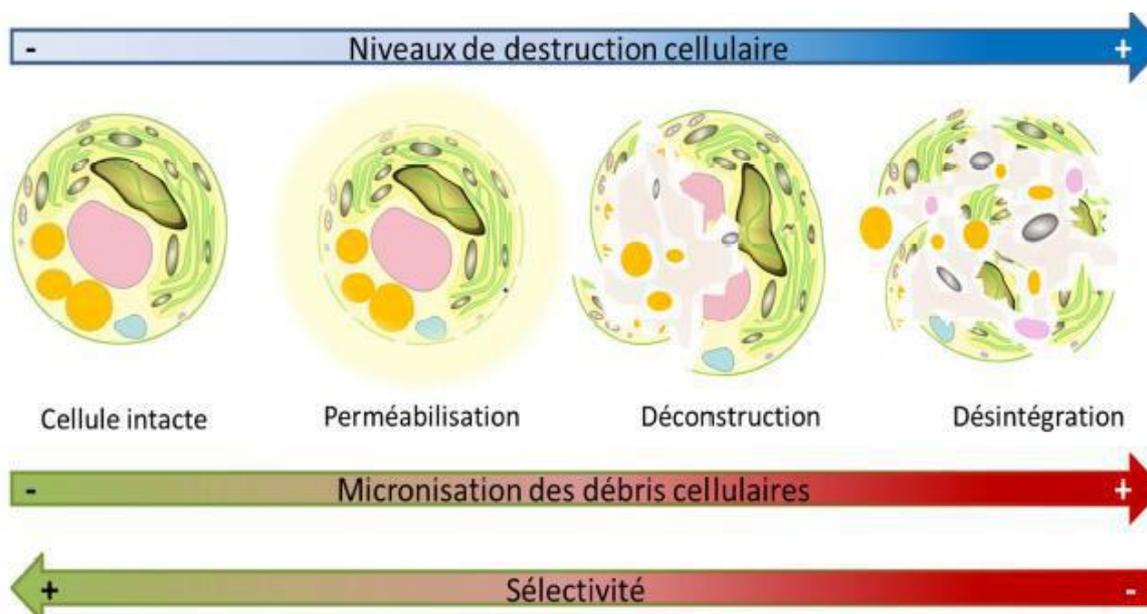


Figure 2.1 : Niveaux de destruction cellulaire (Zinkone, 2018)

Plusieurs de ces techniques comme l'homogénéisation, l'ultrasonication, les microondes, les liquides pressurisés, CO₂ supercritique ont été reportés comme efficace pour maximiser l'extraction des bioproduits comme les lipides et l'astaxanthine (Kim *et al.*, 2016); Comparées aux techniques conventionnelles, elles sont plus efficaces pour produire de hauts rendements d'extraction (Sahin *et al.*, 2019).

Cependant, le choix de ces techniques de rupture cellulaire, dépend de la souche à traiter, de sa biologie et des caractéristiques de sa paroi (Praveenkumar *et al.*, 2015). Aussi, l'efficacité de ces méthodes est significativement affectée par les conditions opérationnelles, comme la température, la pression, les conditions de la biomasse (concentrée, fraîche ou sèche, stade de croissance (Rawat *et al.*, 2011).

Les méthodes de destruction cellulaires se regroupent en 2: méthodes chimiques et enzymatiques, et les méthodes physiques.

2.4.1. Méthodes chimiques et enzymatiques

Les méthodes chimiques sont basées sur la destruction des liaisons dans la structure des membranes et parois pour entraîner la lyse cellulaire. Comme les antibiotiques, les agents chélatants (Exemple : EDTA), les chaotropes, les détergents, les solvants, les hypochlorites, les acides et les bases (Zinkone, 2018).

Pour les méthodes enzymatiques, le principe est la formation de liaisons spécifiques entre les molécules des parois et les enzymes qui sont spécifiques, ce qui cause leur lyse (Günerken *et al.*, 2015). Les principales enzymes utilisées sont les glycosidases, les glucanases, les peptidases et les lipases.

2.4.2. Méthodes physiques

2.4.2.1. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction)

Elle est utilisée pour l'extraction de composés généralement apolaires (lipides, caroténoïdes). Considérée comme éco responsable, elle consomme très peu de solvants organiques (Grosso *et al.*, 2015). Le choix du fluide supercritique se fait selon sa densité, sa viscosité, sa diffusivité, sa capacité d'échauffement et sa conductivité thermique (Boulho, 2017). Le fluide le plus utilisé est le dioxyde de carbone de par ses propriétés physico-chimiques atteignant facilement son point critique pour un couple de 79,3 bars/31,1°C, son coût et sa pureté intéressants, sa manipulation non-dangereuse, et surtout sa non-toxicité. Il est aussi non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer (Thomas, 2012). Durant le procédé, le fluide est pompé de manière continue à travers l'échantillon ou la libération des bioactifs se fait progressivement, ainsi l'échantillon est obtenu sous forme concentré après l'élimination du CO₂ sous forme gazeuse (Toribio *et al.*, 2007).

2.4.2.2. L'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)

C'est une technique d'extraction qui utilise des solvants sous de hautes pressions et à des températures situées au dessus de leur point d'ébullition, ce qui facilite leur pénétration et donc accélère l'extraction, qui se fait en plusieurs cycles ou le solvant est ajouté tout en augmentant le gradient de concentration, le rendant en contact avec la matrice pendant 5 à 10 min avec des phénomènes de désorption et de diffusion des molécules. Enfin de procédé, un flux d'azote aide à l'évacuation du solvant, et l'extrait est filtré puis récupéré (Thomas, 2012).

2.4.2.3. L'Extraction Assistée par Micro-ondes(MAE, Microwave Assisted Extraction)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques possédant une fréquence comprise entre 0,3 à 300 GHz (Camel, 2001). Le principe de l'Extraction Assistée par Microondes est basé sur l'émission d'ondes fixes à une fréquence comprise entre 0,8 et 2,45 GHz (Boulho, 2017). Selon Kaufmann et Christen (2002), deux phénomènes interviennent simultanément chauffant la matière: la conduction ionique et la rotation dipolaire, dépendants du type de solvant utilisé, et de la charge et la taille des ions présents dans la matrice.

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

- La conduction ionique est causée par la migration des ions dans un champ électromagnétique et la résistance du milieu induit des frictions libérant de la chaleur par effet Joule.
- La rotation dipolaire correspond au phénomène d'alignement/réalignement des molécules possédant un dipôle dans un champ électrique alternatif de haute fréquence.

On note la rapidité et la simplicité de la technique et la réduction des volumes de solvants avec un rendement amélioré, comme principaux avantages des MAE. Cependant, l'échantillon doit être filtré (Camel, 2001).

Quand les microondes d'environ 2,5 GHz sont appliquées sur les microalgues, une hausse locale de température est créée par interaction avec les molécules polaires ou diélectriques telles que l'eau. La rupture des parois et des membranes se fait après évaporation de l'eau cellulaire, ce qui facilite l'extraction des molécules bioactives (Günerken *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012).

2.4.2.4.L'extraction assistée par ultrasons (USAE-Ultrasound assisted extraction)

C'est une technique innovante considérée comme technologie respectueuse "clean technology" qui a gagné en popularité et en intérêt au cours de ces dernières années, compte tenu de ces avantages comme la diminution des volumes de solvants utilisés, temps d'extraction réduits, appareillages réduits et la baisse de l'impact environnemental et économique (Vazquez -Rodriguez *et al.*, 2020).

L'extraction assistée aux ultrasons, une technologie d'extraction verte, connue pour sa simplicité et son efficacité, basée sur l'application d'une onde ultrasonique sur une matrice immergée dans un milieu liquide (Chemat *et al.*, 2017). L'effet mécanique de la cavitation due aux ultrasons provoque la rupture de la membrane microalgale, la libération des composés d'intérêt et augmenter le rendement d'extraction (Tiwari , 2015).

a. Principe

La technique utilise des ondes ultrasoniques, présentant des fréquences entre 20 kHz et 10 MHz, retrouvées entre les ondes sonores et les microondes (Figure 2.1).

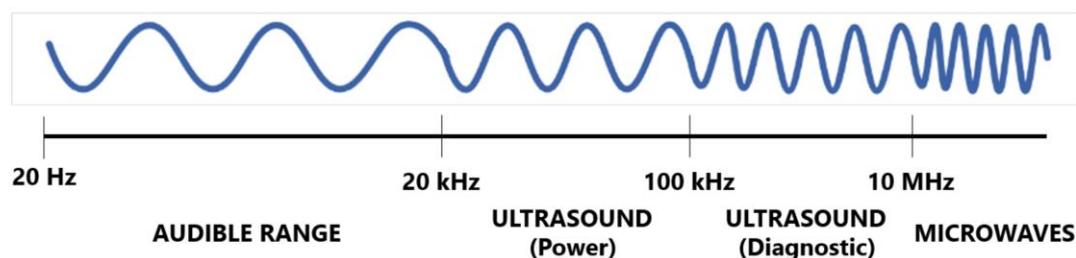


Figure 2.2 : Le spectre du son (*Carreire-Casais et al.*, 2021)

Selon Tiwari (2015), dans l'intervalle des ultrasons, 2 régions sont distinctes:

- **Ultrasons fort** (20–100 kHz), caractérisés par une forte intensité, utilisés pour les extractions et les procédés d'application,
- **Ultrasons signal ou de diagnostic** (100 kHz–10 MHz), employés comme technique de diagnostic clinique ainsi que pour le contrôle de la qualité.

Les ultrasons sont appliqués pour l'extraction selon le principe physicochimique de la cavitation acoustique, qui est un phénomène qui consiste en la formation et la croissance puis la rupture des bulles présentes dans un milieu liquide induites par les ondes ultrasoniques. La propagation de ces ondes à travers le milieu induit la formation de régions intermittentes et consécutives de hautes et basses pressions, directement proportionnelles à la fréquence utilisée (Saien et Daneshamoz, 2018; Leong et al., 2016). Après formation, ces bulles augmentent de volumes en réponse à ce changement de pression, qui conduit à leur compression et leur expansion, atteignant un volume critique puis éclatent, créant un spot chaud qui génère une augmentation de la pression.

C'est pour cela, que la cavitation acoustique est la force principale pour l'extraction assistée par ultrasons, créant 2 types d'effets: physique et chimique, selon les intervalles de fréquence utilisée durant le procédé (Kentish et Ashukkumar, 2011). Les effets physique des ultrasons sont dominés par les fréquences basses (20–100 kHz), ainsi le rayon des bulles (R) est inversement proportionnel à la fréquence (Leong et al., 2011). Les effets chimiques des ultrasons sont dominés quant à eux, à hautes fréquences entre 100 kHz et 1 MHz (Leong et al., 2016). Après la rupture des bulles, un spot localisé chaud est créé, atteignant de hautes températures (>5000 K), contribuant à la formation de radicaux libres dans l'air saturé des solvants (Ashukkumar et Mason, 2007) qui pourraient réagir avec d'autres molécules. En conséquence, le nombre des radicaux généraux dépend du volume des bulles de cavitation.

b. Mécanismes associés à la sonication:

L'implosion des bulles de cavitation proches de surfaces solides conduit à un effet de micro-jets qui génèrent plusieurs phénomènes physiques (Erosion, Fragmentation et cisaillement) causant des dommages sur la structure. L'application des ultrasons peut améliorer les rendements d'extraction d'une matrice végétale à l'aide de l'explosion des bulles en créant aussi des macro-turbulences (Tiwari et *al.*, 2015). Selon Chemat et *al.* (2017), six principaux mécanismes sont associés avec le développement des ultrasons, souvent présents simultanément et/ou séquentiellement, pouvant être combinés, afin d'améliorer le transfert de la matrice au milieu/solvant, et ainsi d'obtenir des rendements plus intéressants:

- **Fragmentation:** réduction de la taille des particules par leur collision avec les ondes, qui crée la rupture des bulles dans la solution, ainsi la surface de contact est plus grande pour le transfert des composés bioactifs.
- Erosion:** libération des structures de la matrice vers le solvant.
- Sonocapillarité:** induit la pénétration du solvant dans les canaux et les pores de la matrice (Malikh et Petrov, 2003).
- **Detexturation:** destruction de la matrice.
- Sonoporation:** conduisant une augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires pour la libération des molécules intracellulaires.
- Cisaillement:** rupture des structures cellulaires et extraction des composés bioactifs.

c. Paramètres influençant la sonication

Le rendement associé à la sonication dépend de plusieurs paramètres qui modulent l'efficacité de cette technique et l'affecte aussi pour être une procédure durable, avec le but d'atteindre la consommation d'énergie la plus basse et l'utilisation de ressources non-renouvelable. Ces paramètres peuvent être classifiés en trois groupes: la nature du produit, les paramètres de la procédures et les effets entre la matrice et le milieu (Chemat et *al.*, 2017).

- **Paramètres physiques:** ils sont attribués non seulement aux ondes ultrasoniques appliquées où les paramètres associés sont: intensité, fréquences mais aussi à l'équipement utilisé (forme et taille).
- **Paramètres du milieu:** reliés à l'espace où les ondes ultrasoniques sont transmises de la source à la matrice. Donc, la nature du solvant et ses propriétés comme la polarité qui dépendrait des molécules à extraire, ainsi que le temps d'extraction et la présence de gaz, constituent des facteurs à prendre en compte;

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

- **Paramètres de la matrice** : comme le type, la structure, pré-traitement, taille des particules, sont des facteurs influant sur l'efficacité de l'extraction. Les matrices soumises à la sonication peuvent être sous forme fraîches ou séchée, mais les formes réduites en poudre montrent plus d'efficacité (Dong *et al.*, 2017). Aussi, d'autres techniques peuvent être appliquées comme : l'élimination des matières grasses, les traitements enzymatiques, champs électrique pulsé (Ummat *et al.*, 2021).

d. Approches combinatoire des Ultrasons

Avec les techniques conventionnelles:

La ultrasons peuvent être combinés aux techniques d'extraction traditionnelles telles que la distillation, Soxhlet, et l'extraction solide-liquide. Ces techniques présentent quelques inconvénients comme: un temps d'extraction assez long, des volumes de solvants importants, des rendements bas. La sonication en amont peut agir mécaniquement pour permettre au solvant de pénétrer plus rapidement dans la matrice, et augmenter la surface de contact entre ces deux (Zheng *et al.*, 2016).

Avec les techniques innovantes non-conventionnelles:

Dans le but de développer une extraction alternative verte, à partir de la biomasse algale, les Ultrasons sont souvent combinés avec d'autres méthodes connues pour leur haute efficacité, la basse consommation de solvants, ainsi qu'un temps de traitement réduit, telles que: l'extraction par liquide pressurisé (PLAE), extraction au fluide supercritique (SCFE), extraction hydrothermale (HAE), et le champ électrique pulsé (CEP) qui restent les techniques les plus utilisées pour l'extraction des bioactifs à partir de microalgues. De plus, l'extraction enzymatique assistée (EAE) a gagné en utilisation récemment (Carreira-Casais *et al.*, 2021).

e. Avantages et inconvénients

L'extraction assistée par ultrasons est très utile pour l'extraction des biocomposés, des lors qu'elle obtient des hauts rendements sans interférer avec leur intégrité, la température étant contrôlée durant toute la procédure d'extraction. Cette technique est considérée comme verte, puisque elle requiert des volumes de solvants assez bas et n'est pas énergivore (Dey et Rathod, 2013). Sans oublier, la simplicité et l'économie de l'appareillage (Lavilla et Bendicho, 2017), elle peut être applicable pour l'extraction de tout types de bioactifs, même les composés lipophiles (Wiyarno *et al.*, 2011). De plus, elle reste très versatile, car elle est facilement combinable avec d'autres techniques pour améliorer l'extraction (Garcia-Vaquero *et al.*, 2020)

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

et aussi prévenir la dégradation de certaines molécules sensibles aux effets des ultrasons (Panda *et al.*, 2019).

Cependant, l'utilisation de bain à ultrasons, reste un challenge pour l'extraction des microalgues, comme la puissance doit être suffisante pour la cavitation, ce qui n'est pas toujours évident avec ce type d'équipement. Aussi, la position du mélange matrice-solvant reste la même dans le bain, reste un grand inconvénient, sachant que l'effet des ondes ultrasoniques varie selon les positions (Nascentes *et al.*, 2001).

f. Exemples d'applications des US

Chia *et al.*, (2019) ont reporté l'efficacité des US pour l'extraction des protéines à partir de *Chlorella vulgaris*, avec des rendements de $56.57 \pm 3.70\%$ jusqu'à $74.59 \pm 0.45\%$. Kwang *et al.* (2010) ont obtenu une augmentation du taux de lutéine et β -carotène de *Chlorella vulgaris*, en comparaison avec une macération classique. Plaza *et al.* (2012) sont arrivés à des activités fonctionnelles et antimicrobiennes des extraits de chlorelle après application des US comparé avec l'extraction aux liquides pressurisés. Dans les travaux de Kong *et al.* (2014), l'extraction de chlorophylle de *Chlorella vulgaris* a obtenu un rendement de 59% après applications des Ultrasons et ont reporté des plus importants rendements de chlorophylle *a* et *b* issus du traitement aux US comparé à l'extraction au Soxhlet mais plus faible que l'extraction aux liquides préssurisés.

g. Applications industrielles

Pour assurer la sécurité, la durabilité des méthodes d'extraction économiques et plus vertes, la conception d'une méthode efficace à grande échelle assistée par les ultrasons, nécessite une intensification du processus et de l'énergie réduction de consommation Le choix du système dépendra de la matrice et de l'application souhaitée, une sonde et un bain à haute puissance sont utilisés industriellement Les deux entreprises pour les ultrasons tels que HIELSCHER (Allemagne), REUS (France), sont les principales sociétés qui développent des ultrasons à grande échelle. Les équipements US sont limités par les volumes traités, donc des systèmes continus ou alors avec une plus grande surface rayonnante munis d'un système d'agitation et d'un système de pompage (Chemat *et al.*, 2017).

2.4.2.5. Le champ électrique pulsé (CEP- Pulsed Electric Field PEF)

Cette technique a été développée en URSS entre les années 40-50, (Zagorulko,1958; Flaumenbaum, 1949) puis en Europe en 1960 pour les jus, les extractions de composés photochimiques et l'inactivation des microorganismes (Golberg *et al.*,2010).

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

L'extraction assistée au Champs Electrique Pulsé (CEP) est une nouvelle technologie athermique qui est très utilisé pour l'obtention des biomolécules à partir de microalgues. Cette technique utilise un champ électrique externe pour induire un potentiel électrique critique au niveau de la paroi cellulaire. La taille et le nombre de pores sont directement reliés à l'intensité du champ électrique et ses pulsations. (Amiali et Ngadi 2012; Gunerken et *al.*, 2015).

Le CEP peut être considéré comme une méthode de destruction moyenne, utilisée pour la production d'énergie, permettant ainsi l'extraction de composés intercellulaires comme les pigments, les protéines, les sucres et les lipides (Goettel et *al.*, 2013; Luengo et *al.*, 2015; Parniakov et *al.*, 2015b). Cependant, son efficacité dépend fortement de conditions opérationnelles comme le type de solvants, son dosage, la température, et la conductivité (Lee et *al.*, 2017).

L'efficacité de la technique est reliée à la puissance des champs ($10-50 \text{ kV.cm}^{-1}$), la fréquence (quelques Hz), la durée des pulsations (μs - ms) et la durée totale du traitement.

Plusieurs auteurs ont suggéré l'utilisation de cette technique en étape préliminaire de l'extraction de plusieurs molécules bioactives (petites, solubles, grosses) en combinaison avec une autre méthode (Goettel et *al.*, 2013; Postma et *al.*, 2016; Lam et *al.*, 2017; Carullo et *al.*, 2018).

a. Principe

Le champs électrique pulsé est une technologie causant la perméabilisation de la membrane, en l'exposant à un champs électrique intense durant un temps court (millisecondes à microsecondes), qui doit être au-dessus d'une valeur critique pour induire l'électroporation (Amiali et Ngadi, 2012; Goettel et *al.*, 2013; Luengo et *al.*, 2015) Afin d'extraire les molécules intracellulaires, cette technique est appliquée sous forme de champs électriques de 2 à 80 kV/cm d'intensité, de manière répétée (pulsée), pendant des temps très courts (micro ou millisecondes) (Zimmermann, 1986). L'exposition des cellules à des pulsations de haute intensité de champ électrique peut altérer la structure de la cellule. A un haut voltage transmembranaire ($\sim 0.5-1 \text{ V}$), les molécules phospholipidiques se réarrangent (Frey et *al.*, 2013; Sack et *al.*, 2010) et par conséquent, la membrane perd sa fonction barrière et devient perméable, un phénomène appelé "électroporation" or "électroperméabilisation" (Ganeva et *al.*, 2003).

Pour les microalgues, les protocoles communs publiés, ont traité des cellules cultivées puis collectées à une phase de croissance exponentielle sans prétraitement. La biomasse fraîche est

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

lavée puis ajoutée à une solution tampon pauvre en sels pour réduire la conductivité afin d'éliminer l'effet joule (augmentation de température). Le CEP varie entre 2.5 to 11 kV/cm avec des temps de traitement allant de $3 \cdot 10^3$ to $26 \cdot 10^3 \mu\text{s}$ (Miyahara et al., 2013).

b. Mécanismes d'action

La perte temporaire de la semi-perméabilité d'une cellule et la lyse des membranes cellulaires peuvent être expliquées par plusieurs théories expliquant l'influence du CEP. Deux d'entre elles sont les plus répandues « la rupture diélectrique » et « l'électroporation ». (Aouir, 2017).

- **Rupture diélectrique**

Pour expliquer cette théorie, Selon Zimmermann (1986), la membrane joue le rôle d'un condensateur ou il existe des charges opposées de chaque côté de la membrane, ce qui crée un potentiel transmembranaire initial. Des mouvements ioniques transmembranaires causés par une distribution inégale de chaque côté de la membrane, créant le potentiel transmembranaire (PTM ou V). Ces mouvements sont la conséquence d'une distribution inégale, de part et d'autre de la membrane, des ions et macromolécules chargées (Turk, 2010).

Sous l'effet du CEP, selon le modèle Zimmerman et al. (1974), la membrane cellulaire qui est alors composée de deux couches lipidiques, voit alors se produire une polarisation, qui attire les deux couches en créant une compression électromécanique réduisant l'épaisseur de la membrane provoquant ainsi une perforation mécanique de la membrane (Grimi, 2009).

- **Electroporation ou electroperméabilisation**

Cette théorie est basée sur la notion de potentiel transmembranaire. Le cytoplasme possède un potentiel électrique négatif contrairement au potentiel électrique de l'espace intracellulaire. Ce potentiel physiologique naturel influence le transport des ions et des petites molécules (Grimi, 2009). Les mécanismes d'électroporation ne sont pas exactement expliqués, mais ils pourraient être expliqués par le réarrangement des lipides dans la bicouche membranaire qui forme des pores qui à leur tour augmentent la perméabilité membranaire. Lors de l'exposition de la cellule au champ électrique, les molécules lipidiques se réorientent créant des pores hydrophiles. (Zbinden et al., 2013).

D'après la littérature, les plus importants paramètres électriques qui influencent l'efficacité de l'electroperméabilisation sont la force du champ, la forme d'impulsion (exponentielle, carrée, etc.), la durée et le nombre des pulsations, et l'énergie spécifique appliquée (Saulis, 2010).

Selon les conditions électriques, la perméabilisation de la membrane, peut être réversible ou irréversible. Cette dernière est nécessaire pour arriver à la perméabilisation et arriver à extraire les composés bioactifs.

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

L'application du CEP provoque d'une part le transfert de différentes molécules comme les sucres, lipides, pigments, phénols et l'eau. Et d'autre part, le transfert et la modification de plus petites molécules et cela à des fins génétiques telles que l'ADN et l'ARN (Golberg et Rubinsky, 2013; Janositz *et al.*, 2011). De plus, le CEP a montré l'effet sur la structure de la biomasse, par la diminution de la teneur de la lignine qui aide à la déconstruction des parois cellulaires, mais le mécanisme reste inconnu (Kumar *et al.*, 2011; Navapanich et Giorgi, 2008).

L'électroporation est un phénomène qui expose la cellule durant une certaine période à une force électrique importante. Pendant cette exposition, la membrane cellulaire est temporairement déstabilisée. L'augmentation de l'intensité du champs électrique peut causer la membrane cellulaire à une électroporation réversible ou la membrane peut recouvrir sa forme initiale, ou irréversible ou les dommages sont permanents et la membrane ne revient pas à sa forme d'origine (Joannes *et al.*, 2015).

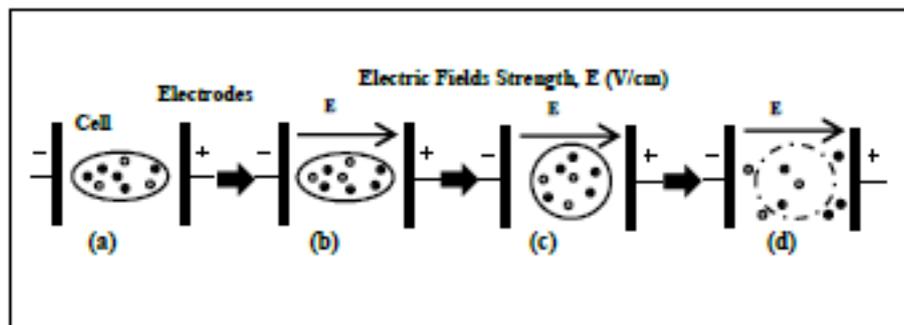


Figure 2.3 : Mécanisme de l'électroporation (Joannes *et al.*, 2015)

D'un point de vue, extractions, l'électroporation irréversible est préférable pour l'obtention des composants bioactifs comme les lipides et les protéines. La figure 2.2 illustre le mécanisme de l'électroporation sur la membrane cellulaire, en plaçant la cellule entre deux électrodes en condition statique, au potentiel 0, c'est à dire sans introduire l'électricité.

L'exposition au champ électrique induit un déséquilibre osmotique puis un enflamment de la cellule. A ce moment, les molécules de la membrane retiennent les liaisons polaires distraites par l'induction du champ électrique, aussi, il y a formation de pores dans la paroi ainsi qu'une électroporation réversible. L'augmentation du champ électrique cause la rupture de la membrane par augmentation des pores. Si la force du champs électrique est maintenue, la membrane ne peut plus revenir à sa forme initiale, causant une électroporation irréversible (Kotnik *et al.*, 2013; Zimmerman *et al.*, 1974). Aussi, si le ratio surface des pores / surface de la paroi est important, la paroi ne peut plus s'autoréparer et le dommage reste irréversible (Gnerken *et al.*, 2015).

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

Le CEP ne détruit pas seulement la paroi cellulaire, mais affecte aussi les molécules dans la cellule après augmentation de la température du milieu durant le traitement, ce qui réduit la valeur nutritionnelle, la digestibilité des protéines, la décomposition des composés fragiles et l'augmentation de l'extraction des lipides et des protéines (Sheng *et al.*, 2011; Janczyk *et al.*, 2005).

c. Equipements du système du CEP

Selon Amiali (2005), un système de traitement de champ électrique pulsé consiste en plusieurs parties (figure 2.3):

- **Générateur de CEP**; il a pour mission de transformer le courant électrique continu en discontinu (sous forme d'impulsions) (Grimi, 2009).
 - **Sourcé'alimentation** à haute tension,
 - **Condensateur de stockage d'énergie**, emmagasine l'énergie électrique lentement et la restitue à un temps bref
 - **Résistance** : pour limiter la charge de courant,
 - **Commutateur** : pour décharger l'énergie du condensateur à travers l'aliment
 - **Chambre de traitement**, transfère l'énergie à l'aliment ou à la matrice à traiter. Elle est composée généralement de deux électrodes englobant la matrice. (Qin *et al.*, 1998).
 - Elle peut être statique mais ne peut traiter qu'un petit volume à la fois, ou continu pour traiter de plus grands volumes et peut être appliquée à l'échelle industrielle. (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999).
 - Il existe 3 types de chambres de traitement, (Figure 2.4), naturelles plates pour le traitement discontinu, Cofield et Coaxiales pour le traitement continu.

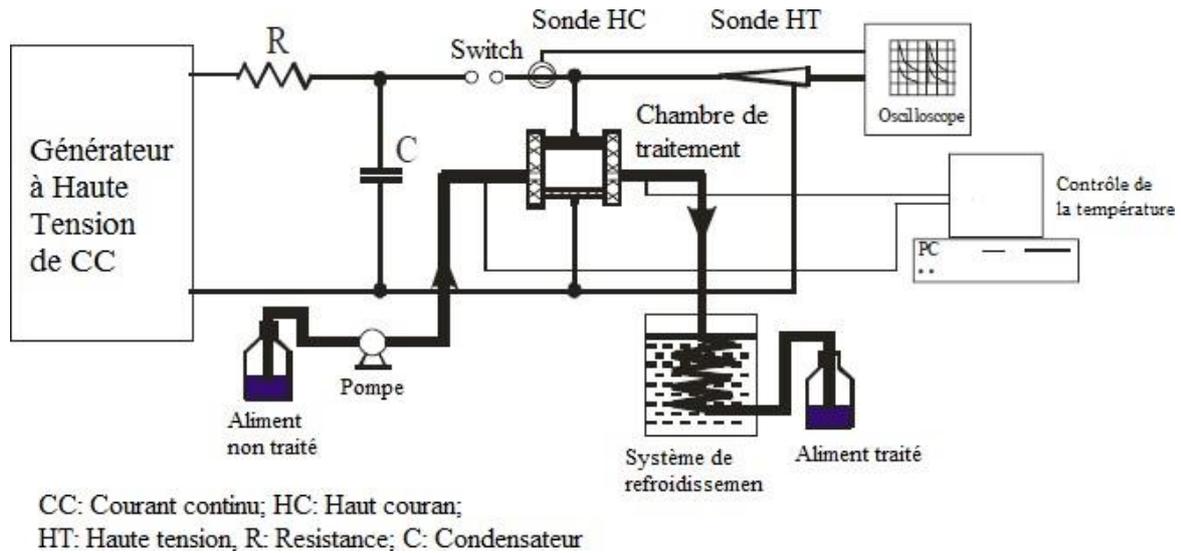


Figure 2.4 : Installation CEP (Amiali, 2005)

Les tensions maximales à travers le condensateur et celle du générateur, sont égales. Un commutateur électrique ou switch permet de décharger l'énergie (instantanément en millionième de seconde) stockée dans le condensateur à travers l'aliment contenu dans la chambre de traitement (Aouir, 2015).

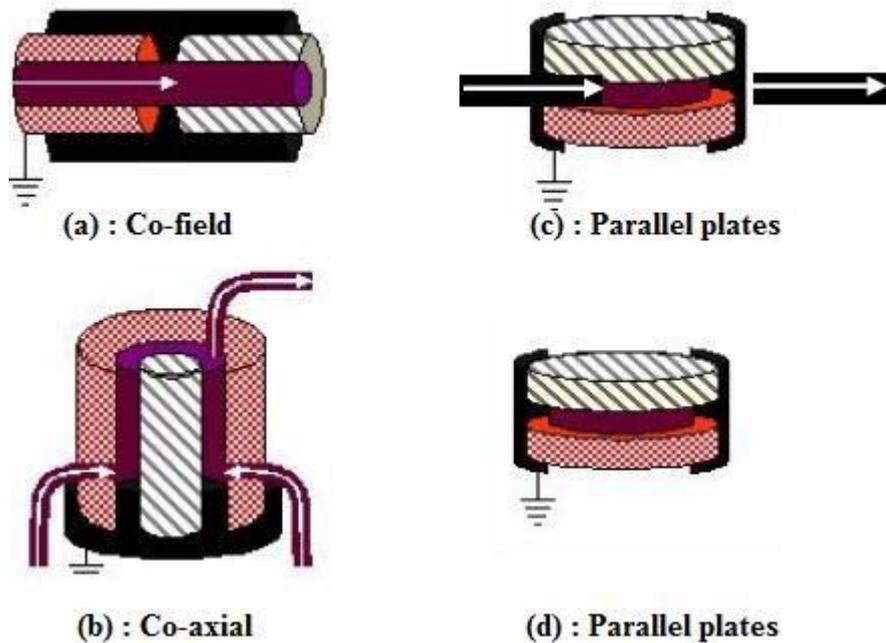


Figure 2.5 : Chambres de traitement continues (a), (b), (c) et statique (d) (FDA, 2000)

d. Paramètres influençant le CEP

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

Pour obtenir le maximum d'électroporation avec une basse consommation d'énergie, plusieurs paramètres sont à contrôler : intensité du champ électrique, temps de traitement ainsi que la température du processus. De plus, le nombre de répétitions des pulsations et la durée de l'application des pulsations (Luengo et *al.*, 2015).

D'après Grimi (2009), les principaux paramètres qui influencent le traitement au CEP:

- **Intensité du champ électrique:** Le comportement de la cellule dépend de l'intensité appliquée (E), ainsi, il existe une intensité critique qui provoque la perméabilisation cellulaire.
- **Durée du traitement et forme de l'impulsion:** La durée de traitement est définie comme étant le temps effectif de l'application du traitement. Selon le type d'installation, il existe plusieurs types d'impulsions:
 - ✓ *Rectangulaires monopolaires*, En dépit du cout onéreux de l'équipement, ce sont les impulsions les plus efficaces pour la perméabilisation et les plus rentables énergétiquement
 - ✓ *bipolaires*, provoquent un stress supplémentaire dans la cellule, ce qui peut l'endommager. Aussi, elles requièrent moins d'énergie et entraînent moins de dépôt sur les électrodes.
 - ✓ *exponentielles*, les plus utilisées pour les traitements exponentielles
- **Température au cours du traitement:** Le traitement au CEP est plus efficace avec l'augmentation de la température, Plusieurs phénomènes alors se produisent : diminution de la pression osmotique, modification de la forme cellulaire, expulsion de l'air dans l'espace intracellulaire (Aguilera, 1999). Cependant, au delà d'une certaine valeur, l'augmentation de la température a une influence négative (Lebovka, 2009).
- **Conductivité:** C'est un paramètre clé pour le bon fonctionnement du CEP, et dans l'efficacité du traitement, ainsi une conductivité importante nécessite plus d'énergie lors du passage du courant.

e. Avantages et Inconvénients

Le CEP est un procédé de désintégration doux, souvent appliqué à température ambiante et n'introduit pas d'impuretés additionnelles au procès. Aussi il aide à prévenir les changements dans le matériel désiré (Benammar et *al.*, 2011).

Sa haute efficacité ainsi que sa sécurité sont ses principaux avantages (Gateau et *al.*, 2021). Elle aiderait à diminuer l'utilisation de solvants, et à obtenir des extraits de meilleures qualités (Carullo et *al.*, 2018; Gunerken et *al.*, 2015). Ce procédé, peut être appliqué en continu, en batch et peut être appliqué à l'échelle industrielle (Goettle et *al.*, 2013). Cependant,

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

la matière à traiter doit être diluée dans une solution ou un milieu liquide. La biomasse microalgale requière un lavage et une désionisation pour augmenter la résistance électrique du milieu utilisé. L'énergie consommée et la rupture cellulaire varie dramatiquement selon la composition du milieu utilisé. Par exemple, l'augmentation de la conductivité est associée avec la libération des composés puis une augmentation locale de la température (Gnerken et *al.*, 2015).

f. Exemples d'applications du CEP

Luengo et *al.* (2015) ont reporté l'extraction de la lutéine à partir de *Chlorella vulgaris* traité par CEP avec 25 kV/cm d'intensité de champ électrique. Ils ont observé une augmentation du rendement d'extraction par 3.5 à 4.2 fois comparé au contrôle. Soto-sierra et *al.* (2020) ont observé une augmentation du rendement d'extraction des pigments à partir de la biomasse fraîche de *Chlorella vulgaris* traité par CEP: lutéine et chlorophylle : 0.1 et 3.4 fois respectivement, comparé au contrôle. Zhang et *al.* (2021) ont observés que le CEP a significativement améliorer le rendement d'extraction jusqu'à 166.67%, mais un haut voltage a causé la diminution de la qualité des extraits lipidiques. Toepfl (2006) a obtenu une augmentation de la chlorophylle et des caroténoïdes des extraits de Chlorelle, après application du CEP (15 kV/cm, 100 kJ/kg), et un rendement significatif de protéines de 27%. Aussi, Coustets et *al.* (2013) a observé une augmentation des protéines totales extraites à partir de *Chlorella vulgaris* traitée au CEP. Leonardt et *al.* (2020) ont obtenu une augmentation de l'extraction du taux de protéines de 1% après prétraitement au CEP.

g. Application du CEP à l'échelle industrielle

D'un point de vue technique, le procédé traite une grande quantité avec un écoulement important et une énergie de traitement donnée, c'est pour cela qu'il requiert des chambres de traitement contenant de grands volumes et de hautes répétitions de pulsations et de fréquences. Ce qui impose un espace et une surface d'électrodes large, ainsi qu'une amplitude des pulsation importante, causant une augmentation de l'écoulement (Bluhm, 2006).

2. 5.Extraction biomasse fraîche

L'état de la biomasse récoltée et la méthode de séchage, sont des variables à considérer pour la comparaison de méthodes de rupture cellulaire. Le séchage cause des changements morphologiques dans les cellules de la chlorelle. Le spray dring crée des granules d'approximativement 60–80 µm composés de 3000- 7000 cellules, avec un espace central.

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

Quant à la lyophilisation, elle forme des structures en feuillets de cellules fusionnées, aussi, les cristaux développés induisent le déplacement des constituants cellulaires (Lin, 1985).

Compte tenu du prix pour la déshydratation ou le séchage qui coûte 70-80% du prix final de la production des composés extraits (Kappor et Butler, 2018), la lyophilisation par exemple coûte 5 fois plus cher qu'une méthode de séchage conventionnelle (Rati, 2001). L'extraction humide ou sur biomasse fraîche a émergé comme approche alternative à l'extraction sèche (Biller et al., 2013; Schagerl et Künzl, 2007; Demirbas, 2009) et plus économique.

2.6. Extraction des Lipides à partir de *Chlorella*

Les lipides des microalgues peuvent être généralement divisés en deux large classe, basées sur la polarité des molécules; lipides neutres et polaires. Les lipides polaires peuvent à leur tour être catégorisés en phospholipides (PPL) et glycolipides (GL). Ils ont les composants principaux des membranes cellulaires et des organelles, contribuant à leur flexibilité, fluidité et leur perméabilité sélective. Quant aux Lipides neutres (NL) ils consistent en acylglycérols et acides gras libres, utilisés pour le stockage de l'énergie (Bellou et al., 2014). Les lipides sont présents sous formes de gouttelettes dans la matrice du chloroplaste et dans le cytoplasme, leur extraction vers un milieu extérieur peut être diminué ou freiné par la rigidité de la paroi cellulaire (Bradley et al., 2015). L'extraction de ces composés se fait généralement à l'aide de solvants organiques, sélectifs et solubles aux lipides, mais restent toxiques (Ranjith kumar et al., 2015), créant ainsi une problématique, à laquelle s'ajoute la difficulté de pénétration des solvants dans les cellules à paroi rigides. En conséquence, des prétraitements sont introduits pour améliorer leur diffusion et l'accessibilité des lipides (Obeid et al., 2018).

Le genre *Chlorella*, contient plusieurs espèces qui produisent des taux variables de lipides, par exemple, *Chlorella vulgaris* 14-22%, *Chlorella ellipsoidea* 4-49% and *Chlorella pyrenoidosa* 2-11.9%. En variant les conditions de culture, le rendement peut atteindre 18.9% (avec limitation d'azote) jusqu'à 22.2% de lipides (sous des conditions optimales). (Saroya et Bansal, 2018). Pour affaiblir la paroi de *Chlorella sp* et arriver à la rupture cellulaire, différentes méthodes sont utilisées à savoir: chimiques, physiques et biologiques, seules ou combinaison. Les techniques physiques ou mécaniques attaquent la paroi microalgale sur biomasse fraîche ou sèche, on peut citer: fraisage, broyage, homogénéisation à haute pression, choc osmotique, explosion à la vapeur, cavitation hydrodynamique, ultrasons, microondes et le champ électrique pulsé. Pour l'extraction des lipides, la consommation d'énergie et l'adaptation à l'échelle industrielle sont les principaux contraintes (Lee et al., 2017; Aguirre et al., 2014). L'efficacité de l'extraction dépend de la teneur en eau de la biomasse (fraîche,

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

sèche, lyophilisée), la nature et la composition du solvant et aussi de la méthode d'extraction utilisée (Balasubramanian et *al.*, 2013, Ryckeboosh et *al.*, 2011; Lee et *al.*, 2010;).

De nombreuses méthodes d'extraction par solvants organiques existent. Les plus largement utilisées pour l'extraction des lipides des microalgues sont celle basées sur les méthodes de Folch (1957) et de Bligh & Dyer (1959). Ces techniques sont reconnues comme méthodes de références d'extraction des lipides totaux.

2.6.1. Approches conventionnelles- extraction directe aux solvants

Depuis plusieurs années, l'extraction des composés actifs se fait par les méthodes conventionnelles représentées essentiellement par l'extraction au Soxhlet, la macération, la percolation.

L'extraction des lipides avec l'aide de solvants organiques est basée sur le concept d'attirer-dissoudre-attirer, c'est à dire les solvants polaires dissolvent les lipides polaires, et les solvants non-polaires dissolvent les lipides non-polaires (Ramluckan et *al.*, 2014).

De nombreux solvants comme l'acétone, benzène, chloroforme, n-héxane, méthanol, éthanol, butanol et cyclohexane peuvent dissoudre les lipides, mais le méthanol, chloroforme et l'héxane sont considérés comme les plus efficaces pour les lipides (Bundhoo, 2017). Les pré requis pour un solvant idéal sont la haute spécificité pour les lipides intracellulaires, avoir un point de fusion bas, insolubilité dans l'eau, prix intéressant, volatile et non toxique (Garoma et Janda, 2016).

L'addition d'un solvant polaire aide à l'extraction des lipides neutres, ce processus entraîne inévitablement les lipides polaires, le total est obtenu par évaporation des solvants ou par distillation (Halim et *al.*, 2012). L'efficacité de cette technique dépend du choix du solvant et des ratios employés. Selon plusieurs études, le mélange chloroforme :méthanol(avec les différents ratios utilisés) est le plus utilisé de par sa rapidité et son efficacité pour l'extraction des lipides, le ratio 1:2 (v/v) fait référence à la méthode Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959) alors que le ratio 2:1 (v/v) à la méthode Folch (Folch et *al.*, 1957). Ces méthodes ont été efficaces sur biomasse fraîche et sèche. Les principaux inconvénients de ces techniques sont la consommation importantes de solvants toxiques, le temps important et la consommation d'énergie (Venkata subhash et *al.*, 2017).

2.6.2. Méthodes non-conventionnelles/ Innovantes

2.6.2.1. Champs électrique pulsé (CEP)

Chapitre 2 Méthodes d'extraction des composés bioactifs de la chlorelle

Durant les dernières décennies, l'utilisation d'électro-technologies comme le CEP, sont des techniques prometteuses pour l'extraction des lipides. Cette technique endommage les cellules causant la perméabilisation des membranes et des mouvements électrophorétiques. Les globules gras pourraient être retenus dans les cellules après le traitement au CEP, et peuvent être extraits avec des solvants adéquats (Eing et *al.*, 2013).

Dans l'étude de Foltz (2012), il a été conclu que le CEP peut être très utile pour l'extraction des lipides à partir de microalgues (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella salina*)

Plusieurs auteurs ont démontré l'efficacité du CEP pour l'extraction des lipides en unique ou en combinaison avec d'autres techniques. Flisar et *al.* (2013) ont étudié l'extraction des lipides à partir de *Chlorella vulgaris* à l'aide du CEP en système continu, avec une chambre de forme co-field, et un espace entre les électrodes fixé de 15mm. Cette étude a obtenu approximativement 50% (0.43g de lipides/g de MS) avec un champ électrique de 2.7 kV/cm pour 21 pulsations de 100 μ s.

Dans l'étude de Han et *al.* (2019), l'effet du CEP sur l'extraction des lipides de *Chlorella pyrenoidosa* comme pré-traitement couplé avec un mélange hexane/éthanol en remplacement du mélange connu chloroforme/méthanol, le taux d'acides gras a augmenté de 8% comparé au contrôle

2.6.2.2. Ultrasons (US)

Même si l'application de la technique des Ultrasons est connue depuis quelques dizaines d'années, leur exploitation pour l'extraction des lipides est récente. Plusieurs auteurs ont utilisé les US comme prétraitement pour l'extraction des bioactifs, notamment les lipides. Araujo et *al.* (2013) a comparé 5 différents types extractions de lipides de *Chlorella vulgaris*, obtenant avec la méthode Bligh et Dyer assistée par les ultrasons (40 kHz, 29.7 W/L or 2.68 W/m²) le plus haut rendement d'extraction (52.5 % w/w). Quant à Cho et *al.* (2012) a attribué ce phénomène à la désintégration des cellules microalgales causé par l'augmentation des surfaces de contact durant le temps d'application.

PARTIE 2:
PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION GÉNÉRALE DE LA CHLORELLE

Chapitre 3 : Caractérisation générale de la Chlorelle

3.1. Introduction

Les algues sont un groupe du règne des plantes, comprenant différentes espèces, qui sont la source de nombreuses molécules bioactives. Ces composés produits par des cellules en croissance constante, incluent: les protéines, les lipides, les sucres, les enzymes, les régulateurs de croissances, les pigments, les toxines et les antibiotiques. Les microalgues offrent de nombreux avantages pour les activités biologiques, ainsi que leur croissance rapide et leur grande biodiversité. Elles sont utilisées dans plusieurs domaines; alimentaires, cosmétiques, médical, pharmaceutiques. (Ahmed, 2016).

La sélection des espèces de microalgues possédant des profils nutritionnels intéressants, est fondamental pour le développement de nouveaux produits alimentaires. Par conséquent, une caractérisation physicochimique des microalgues est une étape importante pour déterminer quelle espèce est la mieux adaptée à différentes applications et objectifs (Matos, 2017).

Par ailleurs, le marché de l'agroalimentaire connaît depuis quelques années un engouement et un intérêt croissant pour les produits alimentaires enrichis en microalgues comme les pâtes, les biscuits, les snacks, les produits laitiers, la confiserie et le domaine des boissons. Elles y sont utilisées pour leurs valeurs nutritionnelles ou comme source de coloration naturelle (Tohamy *et al.*, 2018).

La *Chlorella* est une microalgue verte d'eau douce appartenant à la classe des chlorophycées. Elle est unicellulaire eucaryote et par la voie de la photosynthèse, en présence de la lumière, le dioxyde de carbone, l'eau et une petite quantité de nutriments, produit de nombreux métabolites qui jouent un grand rôle dans les différentes industries (Ibrahim et Elbaily, 2020). *Chlorella sp* a été pendant plusieurs siècles un aliment faisant partie des habitudes alimentaires des populations d'Asie, d'Afrique et du Mexique. Cependant, sa production à l'échelle industrielle a seulement commencé au Japon dans les années 60, et actuellement est utilisée comme compléments alimentaires, vendues sous formes de capsules, tablettes ou sous forme liquide. Cette microalgue contient des composants antioxydants, des protéines de haute qualité ainsi que des acides aminés abondants, des teneurs intéressantes en lipides, des acides gras insaturés, des minéraux comme le fer et le calcium, et plusieurs types de vitamines incluant les vitamines A, B₂, B₆, B₈, B₁₂, E et K. Elle peut conférer des effets antiviraux, anti-tumoraux et hypocholestérolémiants. Aussi, elle peut intervenir sur les troubles de l'alimentation, le taux de sucres dans le sang et le temps de cicatrisation des plaies. En effet, la

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Chlorelle est reconnue comme aliment fonctionnel et thérapeutique, et est considérée comme un ingrédient prometteur dans l'industrie alimentaire.

La présente étude entreprend comme objectif principal de caractériser la microalgue *Chlorella sp*, espèce prélevée dans le sud Algérien, et cultivée au niveau du laboratoire sous des conditions déterminées et contrôlées, connaître sa valeur nutritionnelle et ses spécificités, afin de pouvoir l'incorporer dans les différents produits alimentaires

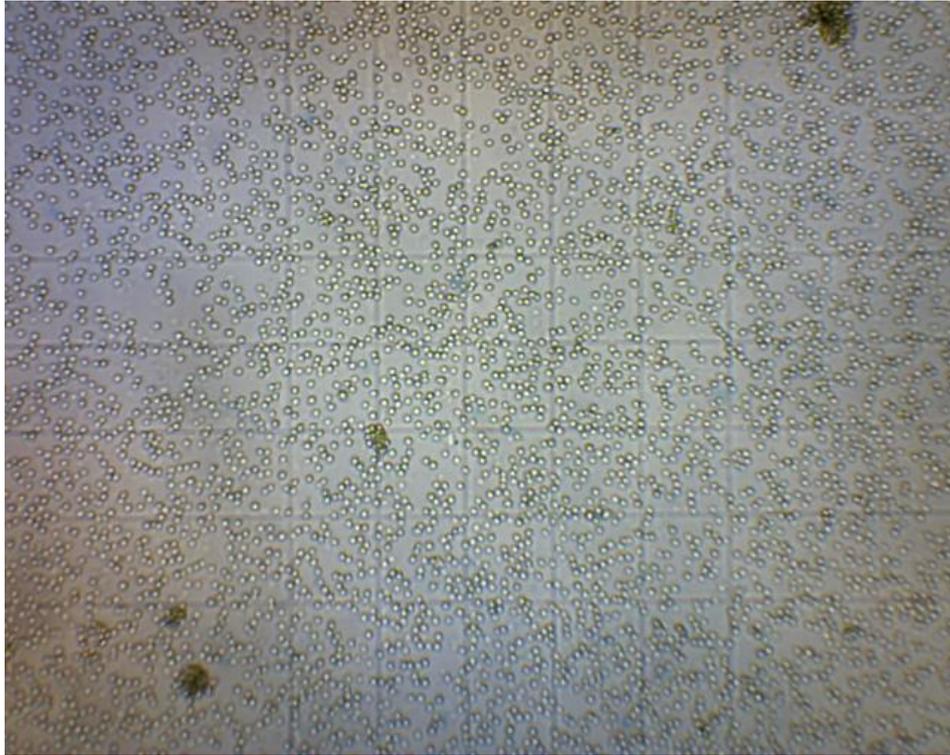
3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Matériel biologique

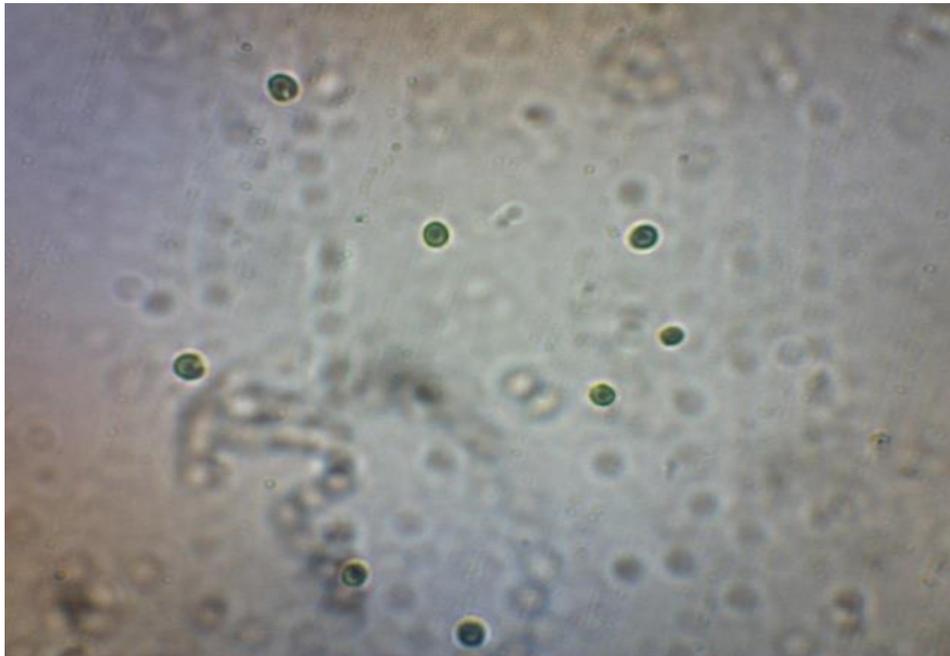
L'étude a été réalisée sur une souche de Chlorelle "*Chlorella sp*". Le prélèvement de la microalgue a été réalisé au niveau du lac d'El-Goléa situé à El Ménéea en Octobre 2011. La méthode d'isolement sur milieu solide BG11 a été adoptée (Kord et *al.*, 2012).

La culture et la récolte ont été faites au sein du laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine (LRTANH) de l'ENSA. La morphologie de la Chlorelle a été observée à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA DC7 5V) comme le montre la Figure 3.1.

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle



(a)



(b)

Figure 3.1 : Aspect de la souche étudiée vu au microscope électronique (a) : x50 , (b) x100)

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

3.2.2. Préparation du milieu de culture

Pour la culture de la Chlorelle, le milieu de culture Bold's Basal Medium(BBM) a été préparé en utilisant des solutions stock selon le Tableau 3.1. Chaque solution stock de 1-14, doit être préparée séparément pour éviter le risque de précipitations, autoclavées puis stockées à une température de 4°C (Connon, 2007).

Tableau 3.1Préparation du milieu BBM (Connon, 2007)

Solution Stock No.	Nom Chimique	Formule	Masse (g)	Eau distillée(m L)
1	di-potassium hydrogenorthophos phate	K_2HPO_4	1.875	250
2	Potassium di- hydrogenorthophosp hate	KH_2PO_4	4.375	250
3	Sulphate de Magnesium	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.875	250
4	Nitrate de Sodium	$NaNO_3$	6.250	250
5	Chloride de Calcium	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.625	250
6	Chloride de Sodium	$NaCl$	0.625	250
7	EDTA sel Hydroxide de Potassiumtetrasodium	$EDTA-Na_4$ KOH	5.000 3.100	100
8	Acide Sulphurique conc sulphate.Ferreux (C=1.84g/ml)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ H_2SO_4	0.498 0.1mL	100
9*	Acide Borique	H_3BO_3	1.142	100
10	Sulphate de Zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.353	25
11	Chloride de Manganese	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.058	25
12	Sulphate de cuivre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.063	25
13	Nitrate de Cobalt	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.020	25

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

14	Molybdate de Sodium	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.048	25
----	---------------------	---	-------	----

*Nécessite un chauffage de 50-60°C afin d'obtenir sa dissolution

Ces solutions stocks peuvent être stockées pendant 3mois à partir de la date de préparation pour les solutions 1-6, 12mois pour les solutions 7-14, ou indéfiniment si elles sont autoclavées. Cependant, si une précipitation est observée dans n'importe quelle solution, celle-ci doit être obligatoirement renouvelée.

Pour la préparation du milieu BBM, pour 1L de milieu, les solutions stocks doivent être ajoutées selon l'ordre numérique établi selon le Tableau 3.1.,comme suit: 10mL de chaque solution stock 1-6 ,1mL des solutions 7-9 , 0.1mLdes solution10-14. Une fois tous les produits chimiques regroupés, le volume est complété à 1L avec de l'eau distillée. Le récipient contenant le milieu culture est agité pendant 30minutes, pour l'homogénéiser.

3.2.3. La Culture de la Chlorelle

La culture de *Chlorella sp.*, s'est faite à partir de cellules fraîches cultivées séparément dans des conditions spécifiques selon le Tableau 3.2, avec le Bold's Basal Medium comme milieu de culture, en système semi-continu et en duplicata (Richmond, 1986).Les cultures sont dans un premier temps débutées dans des erlenmeyers avec une densité d'inoculation des cultures de 1,5 à 1,8. 10^6 cellules / mL, puis transvasé dans des récipients de 5L (Figure 3.2).

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 3.2 : Culture de Chlorella sp

(a) et (b) : Inoculums de la culture en première et deuxième phases, (c) et (d): culture finale

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Le pH du milieu a été maintenu à 8.80 ± 0.58 . La température de culture était de $27,54 \pm 0.87^\circ\text{C}$, exposé sous des tubes fluorescents à 3.98 ± 0.42 Lux avec des cycles de lumière / obscurité de 8:16h (Plaza, 2012). Une agitation en régime permanent a été appliquée en faisant barboter de l'air à l'aide d'une pompe à air (AC 9904) sans dioxyde de carbone supplémentaire pour aérer les cellules, assurant une exposition uniforme des algues à la lumière pour une croissance optimale et une valeur nutritive. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (WTW, 315i / SET, Allemagne) tandis que la conductivité a été effectuée par un conductimètre électrique (WTW, 197i, Allemagne). La pureté de la culture, l'identification et la concentration des cellules ont été calculées sur une cellule de Malassez à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA DC7 5V).

Tableau 3.2 Conditions de culture de Chlorella

Temperature (°C)	Hygrométrie (%)	Luminosité (Klx)	Conductivité (mS/cm)	pH
27.54 ± 0.87	8.43 ± 1.77	3.98 ± 0.42	0.93 ± 0.23	8.8 0 ± 0.58

3.2.4. Récolte de la biomasse

Selon la courbe de croissance, et arrivant à la phase stationnaire, après approximativement 3 semaines, la récolte est effectuée ou un volume de suspension est prélevé puis centrifugé à 4500 tours/min pendant 15 min en utilisant une centrifugeuse (SIGMA 2-15, Germany). Les culots ainsi obtenus après centrifugation, sont rincés deux fois à l'eau distillée, le mélange est homogénéisé, soumis à une centrifugation pour chaque lavage. Les surnagants sont éliminés et les culots raclés et regroupés, puis pesés à l'aide d'une balance électrique (KERN EW) et enfin conservés au frais jusqu'à utilisation ultérieure. Une fois la biomasse récoltée sous sa forme fraîche, elle est soumise à une lyophilisation à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST ALPHA 1-2). Une poudre fine de couleur vert foncé est ainsi obtenue, puis conservée dans un récipient hermétique à une température de -4°C .

3.3. Analyses biochimiques et physico-chimiques de la Chlorelle

3.3.1. Détermination de la matière sèche

Pour la solution mère, un volume de 100 ml de culture est prélevé sa densité optique à une longueur d'ondes $\lambda = 685$ nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY Genova Plus, UK). Une série de dilutions est réalisée à partir de cette solution mère: 1/2, 1/4, 1/8,

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

1/16, (50ml dans 50ml d'eau distillée). La mesure de la densité optique de chaque solution est mesurée, puis le poids sec de la Chlorelle a été déterminé par filtration à travers un papier filtre en fibres de verre (Whatman GF / F), pré-séchés à 80°C pendant une nuit dans une étuve (Memmert UNB 500) et pré-pesée par une balance (KERN EW). Les filtres contenant les microalgues obtenus sont ensuite étuvés à 80°C pendant la nuit.

Le poids sec est obtenu comme suit:

$$P(\text{Poids de la matière sèche g}) = P_1 - P_2 \quad (3.1)$$

$$P_1 = \text{Poids de filtres} + \text{matière sèche (g)} \quad (3.2)$$

$$P_2 = \text{Poids de filtres vides (g)} \quad (3.3)$$

Les analyses sont effectuées en triplicata. La courbe d'étalonnage de la lecture de l'absorbance en fonction du poids sec est établie à partir des résultats obtenus par les équations 3.1, 3.2 et 3.3..

3.3.2. Détermination du taux de cendres

L'évaluation de la teneur en cendres totales a été effectuée après incinération dans un four à moufle (Linn Electro Term, Allemagne), à une température de 450 ° pendant 48 h d'un échantillon lyophilisé de 0,5 g (Tokuşoğlu et Ünal, 2003; Reboloso Fuentes et *al.*, 2000).

3.3.3. Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines totales a été effectuée par la méthode de Kjeldahl(AOAC, 1997 ; ISO TS-17837, 2008). Une première étape de minéralisation se fait par introduction des échantillons ajoutés à l'acide sulfurique 0,1N (H₂SO₄) dans des matras, puis la minéralisation se fait à 420°C pendant 3 h. Le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ est le produit essentiel de la minéralisation.

La deuxième étape, une distillation est réalisée, en présence de (NaOH) ajouté en volume égal à celui du minéralisât, l'hydroxyde d'ammonium formé (NH₄OH) est récupéré dans un bécher de titrage contenant une solution d'acide borique. Le borate d'ammonium formé ((NH₄)₃BO₃) fait augmenter le pH de la solution.

La solution est par la suite titrée par de l'acide sulfurique 0,1N. Le volume d'acide sulfurique ajouté correspond à l'ammonium contenu dans l'échantillon de départ. Les résultats sont calculés selon les formules (3.4) et (3.5) :

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

$$NT \% = (V_1 - V_2) \times 0.14 \times 10 \times N/P(3.4)$$

$$\text{Taux de protéines } \left(\frac{\text{g}}{100\text{ml}} \right) = 5.95 \times NT \quad (3.5)$$

Avec,

V_1 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage de l'échantillon en mL

V_2 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage du blanc en mL

N : normalité de l'acide sulfurique (0,1N),

P : masse de l'échantillon de jus en g

5, 95 : facteur protéique de la chlorelle.

3.3.4. Détermination de la teneur en matière grasse

La teneur en lipides est analysée selon un protocole de Binnal et Babu(2017) où 2 ml de méthanol et 4ml de chloroforme est ajouté à 300mg de biomasse fraîche. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex (CYAN CL001,Belgique) pendant 2min. Un ml de chloroforme est ajouté par la suite, le mélange est soumis une deuxième fois à une agitation pendant 1min. 1.8ml d'eau distillée est additionné à la mixture qui est vortexée pendant 2min. Une centrifugation de 4500tr/min pendant 15min. permet de faire apparaitre 2couches (voir Figure 3.3), une couche inférieure chloroformique contenant les lipides, est filtrée à travers un papier filtre (WHATMAN No. 1) via un buchner muni d'une pompe sous vide (VAC 56863, France) vers un flacon propre préalablement pesé (W_1). Quant à la phase supérieure contenant le culot, elle est encore extraite trois fois selon les mêmes étapes citées plus haut. Les filtrats sont collectés et regroupés et évaporés à l'air libre. Le poids final du tube contenant les lipides est pesé (W_2). La teneur en lipides est calculée en% de matière sèche selon la formule suivante :

$$W \text{ poids de lipides (g)} = W_2 - W_1(3.6)$$

$$W_1 = \text{poids des tubes vides (g)} \quad (3.7)$$

$$W_2 = \text{poids des tubes} + \text{poids des lipides (g)} \quad (3.8)$$



Figure 3.3 : Les couches obtenues durant l'extraction des lipides

3.3.5. Détermination du profil en Acides Gras

Le profil en acides gras de la matière grasse extraite selon les étapes décrites dans la section 2.4.4, a été déterminé par chromatographie en phase gazeuse (GC, Chrompack CP9002, Pays-Bas).

Les acides gras sont préalablement transformés en esters méthyliques d'acides gras correspondants (FAME) par méthylation selon la méthode de Wolf (1968), qui consiste à ajouter 0,5 mL de méthanol et 0,5 % d'acide sulfurique à 0,2 g de matière grasse, sceller les tubes puis porté à 140°C dans un bain marie à sec pendant 2 heures. (Aouir et *al.*, 2017). Les conditions opératoires sont détaillées en Annexe 01.

3.3.6. Détermination des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par colorimétrie à 483 nm par la méthode de Dubois et *al.* (1956), selon le protocole de Takache et *al.* (2010) après hydrolyse de l'échantillon avec de l'acide sulfurique (98%) en présence du phénol (50g/l). Le D-glucose est utilisé comme standard (le protocole d'analyse des sucres totaux est détaillé en Annexe 02).

La teneur en sucres totaux est calculée selon la formule suivante

$$ST\% = \frac{X \cdot FD \cdot 10^3}{10^6} \times 100 \times \frac{100}{(100-H)} \quad (3.9)$$

X : Concentration de sucres sur la courbe d'étalonnage en gramme.

FD : Facteur de dilution.

10^3 : Facteur de conversion en gramme.

H : La teneur en eau, exprimée en pourcentage massique de la poudre végétale.

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

3.3.7. Identification des sucres

L'identification des sucres chez *Chlorella sp.* a été effectuée par chromatographie en phase liquide, effectué au niveau du laboratoire central de la police scientifique (LCPS, Chateau neuf, Alger). Les sucres ont été extraits selon la méthode décrite par Pellegrini et *al.* (2018), où un échantillon de 500mg de Chlorelle lyophilisée a été soumis à une extraction par ultrasonication pendant 30 min avec 5 ml d'eau ultra pure, puis centrifugé à 12 000 tr/min pendant 10 min et enfin filtré à travers un filtre en nylon de 0,45 µm de porosité (Filter-Lab®).

Les sucres ont été déterminés par HPLC dont les conditions opératoires sont détaillées dans l'Annexe 03. Des courbes de calibrations de 0-20, 0- 20, 0- 15 mg/ml) ont été réalisées à partir des solutions étalon mères de fructose, glucose et saccharose, respectivement.

Chaque composé a été identifié en comparant les temps de rétention avec des standards de référence et des concentrations inconnues ont été calculées au moyen d'une équation de courbe d'étalonnage standard. Les concentrations en sucre ont été rapportées en g/100 g d'échantillon.

3.3.8. Détermination des acides organiques

L'analyse a été effectuée au niveau du laboratoire central de la police scientifique (LCPS, Chateau neuf, Alger). Les acides organiques ont été extraits par HPLC selon la méthode décrite par Pellegrini et *al.* (2018). Ces composés ont aussi été déterminés par HPLC, dont des conditions détaillées en annexe 04. Des courbes de calibrations entre 0- 0.2, 0- 1, 0- 10 mg/ml ont été réalisées à partir des solutions étalon mères d'acides fumarique, oxalique, tartrique, respectivement. Chaque composé a été identifié en comparant les temps de rétention avec ceux des standards et des concentrations inconnues, calculées au moyen d'une équation de courbe d'étalonnage. Les concentrations en sucre ont été rapportées en g/100 g d'échantillon, tandis que celles en acide organique les dosages des échantillons ont été rapportés en mg/g

3.3.9. Dosage des éléments minéraux et des métaux lourds

L'analyse a été faite au niveau du laboratoire central de la police scientifique (LCPS, Chateau neuf, Alger).

Minéralisation et mise en solution : 500 mg de Chlorelle lyophilisée, est introduit dans un creuset en porcelaine, placé dans un four à moufle à une température augmentant progressivement de 200 à 450 °C. L'échantillon subit une calcination pendant 6h jusqu'à dégagement de fumée noire, indiquant ainsi la fin de l'incinération. Une digestion par 2 ml

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

d'acide nitrique (HNO₃), additionné de 02 gouttes de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Une évacuation à sec sur plaque chauffante à 300°C est effectuée, suivie d'une filtration de la mixture à l'eau déminéralisée, obtenant ainsi un filtrat recueilli dans une fiole de 25 ml. Ce filtrat constitue la solution mère à partir de laquelle la détermination des éléments est effectuée ultérieurement. Les éléments Na, K, Fe, Zn, Ca, Mg, Mn, Cu et Al sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique utilisant un spectromètre d'absorption atomique mode flamme : (Analyst 800 PERKIN ELMER) et le Phosphore par colorimétrie. La préparation des gammes d'étalonnages est détaillée en Annexe 05.

3.3.10. Détermination des pigments

Un volume de culture de 0,1 -à 1 ml dépendamment de la densité cellulaire de la culture, est transvasé dans des tubes en verre (DURAN, SCHOTT MAINZ, JENAER Glas), centrifugé à 4500 tr/min pendant 10min. Le surnageant est d'abord éliminé, et le culot est additionné à 1ml de méthanol. Le mélange est soumis à une agitation au vortex jusqu'à dissolution du culot dans le solvant, puis gardé dans l'obscurité à 4°C pendant 20minutes. Une centrifugation est effectuée par la suite à 4500 tr/min pendant 10min, le culot obtenu, composé de méthanol est recueilli. Ce culot est soumis à plusieurs extractions jusqu'à éclaircissement de la couleur du vert foncé vers le blanc.

Les surnageants obtenus après centrifugation sont regroupés et analysés pour leur teneur en pigments par spectrophotométrie UV-visible, l'absorbance est mesurée à différentes longueurs d'ondes (470, 653 et 666nm) par un spectrophotomètre (JENWAY GenovaPlus, UK). Les teneurs en pigments sont calculées à l'aide de la formule de Wellburn (1994).

$$\text{Chlorophylle}_a \left(\text{Chl}_a \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de MS} \right) = (15.65 \times A_{666}) - (7.34 \times A_{653}) \quad (3.10)$$

$$\text{Chlorophylle}_b \left(\text{Chl}_b \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de MS} \right) = (27.05 \times A_{653}) - (11.21 \times A_{666}) \quad (3.11)$$

$$\text{Caroténoïdes}_T \left(\text{Car}_T \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de MS} \right) = \frac{(1000 \times A_{470}) - (2.86 \times \text{Chl}_a) - (129.2 \times \text{Chl}_b)}{221} \quad (3.12)$$

3.4. Analyses microbiologiques

Pour évaluer sa qualité, la biomasse de la Chlorelle lyophilisée est soumise à des analyses microbiologiques,

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

3.4.1. Germes mésophiles aérobies totaux (GMAT)

La recherche et le dénombrement des germes mésophile aérobies totaux est effectuée par transfert de 0,1 mL des différentes dilutions décimales (10^{-2} jusqu'à 10^{-5}) dans les boîtes de Pétri sur lesquelles 15 mL du milieu de Plate Count Agar (PCA) sont versés. Une fois solidifiée, une deuxième couche de gélose est versée sur la première. L'incubation des boîtes de Pétri se fait à 30 °C pendant 72 heures. La lecture est effectuée seulement sur les colonies blanchâtres situées entre les 2 couches de PCA. On retient pour le dénombrement, un nombre compris entre 30 et 300 colonies.

3.4.2. Flore fongique (FF)

La flore fongique est représentée par les levures et les moisissures. Cette analyse est effectuée selon la norme française NF XP-OS-059-October 1996 (AFNOR, 1996). Pour le dénombrement des levures et moisissures, l'Oxytetracycline Glucose Agar (OGA) est utilisé comme milieu de culture. L'inoculation se fait avec 0,1 ml des dilutions décimales étalé à la surface de la gélose. L'incubation s'effectue pendant 5 jours à 25 °C, seules les boîtes contenant moins de 150 colonies seront retenues. Des colonies blanchâtres de petites tailles seront observées pour les levures, et des colonies cotonneuses filamenteuses pour les moisissures.

3.4.3. Coliformes totaux (CT)

La recherche des coliformes totaux est effectuée d'après la norme NF V08-050-Avril 2009, où 1 ml d'une dilution décimale est prélevé puis ensemencé sur le milieu désoxycholate Lactose Agar (1%), les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures.

3.5. Analyse statistique

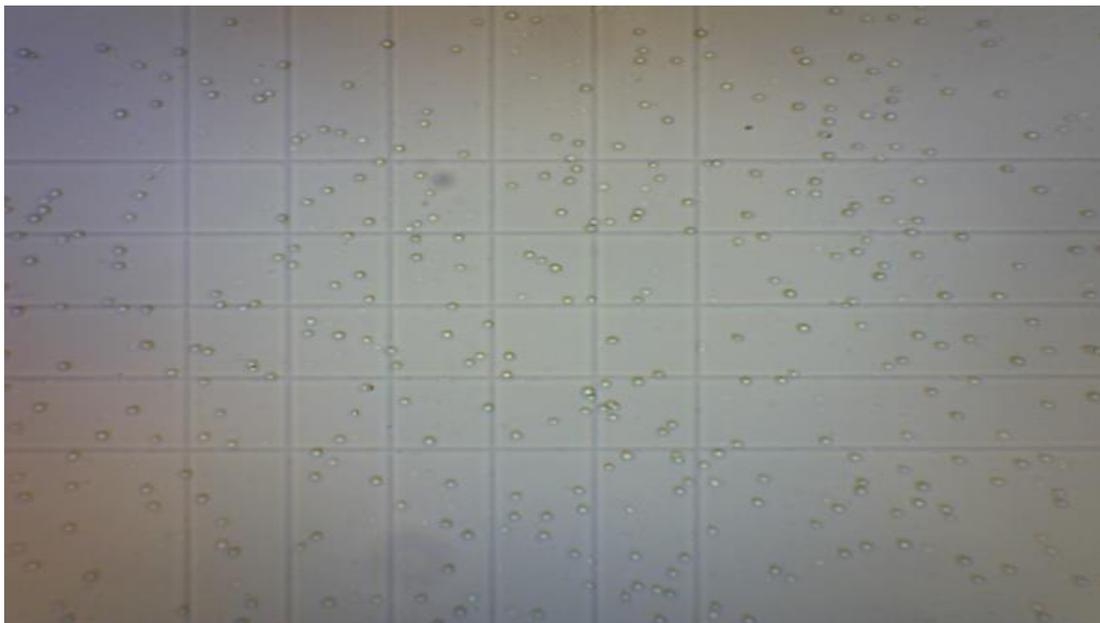
Les analyses ont été effectuées en triplicata et les valeurs sont présentées et exprimées en valeur moyenne \pm écart-type. L'analyse de la variance (ANOVA) ainsi que le test de Turkey ont été réalisés en utilisant le logiciel R version 3.0.2 (R Core Team, 2013). Les différences avec une probabilité <0.05 ont été considérées comme significative.

3.6. Résultats et Discussion

3.6.1. Morphologie et Courbe de croissance

Les cellules de *Chlorella sp.* ont été observées au microscope. La Figure 3.4, montre une structure monocellulaire, de cellule sphérique de couleur verte brillante.

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle



(a)



(b)

Figure 3.4 : *Chlorella sp* à deux stade de croissance (a: phase de latence, b: phase exponentielle)

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

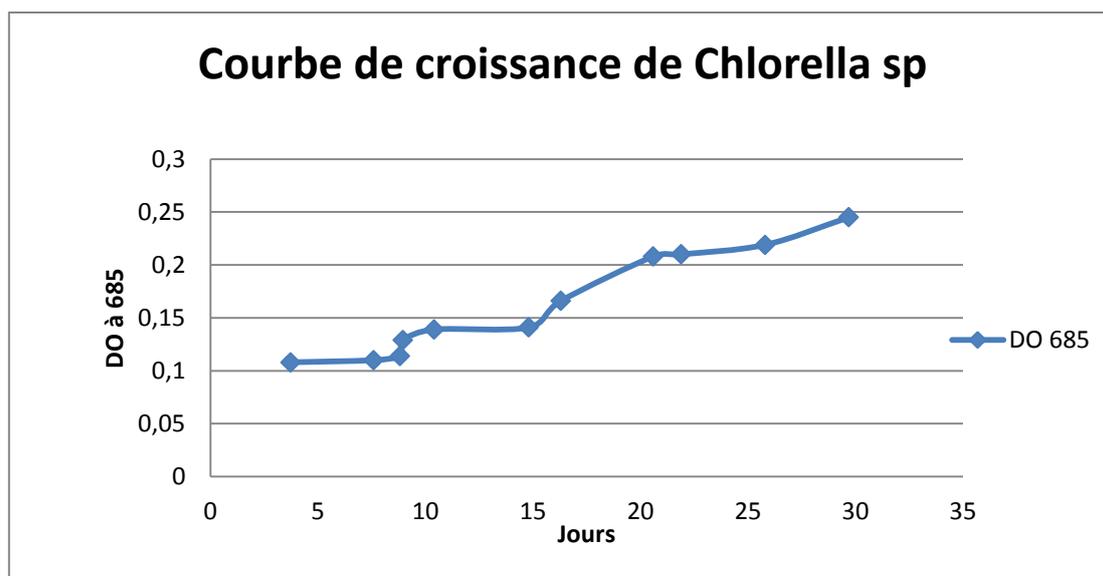


Figure 3.5 : Courbe de croissance de *Chlorella sp*

Dans cette étude, la Chlorelle a été cultivée pendant plus de trois semaines. Le taux de croissance est exprimé en évolution de la DO à 680nm par rapport au temps(Figure 3.5). On remarque que les cellules de chlorelle passent par une phase de latence, pour d'adaptation et d'acclimatation dans leur nouveau milieu nutritif; de ce fait, leur croissance est très faible. Cette phase de latence a une durée de 9 jours. Au delà de cette période, on remarque, que la croissance des cellules de Chlorelle. Dépassant, la période d'adaptation, on note une augmentation significative de la croissance correspondant à la phase de croissance exponentielle. Dans cette phase, les cellules ont accumulé suffisamment de composés intracellulaires et ont doublé leur matériel génétique. La population par suite va commencer à croître grâce à la reproduction végétative. Les cellules se divisent donc en deux cellules filles identiques contenant chacune la moitié du contenu de la cellule mère et qui par la suite se diviseront elles-mêmes en deux (Laroisière, 2014). A partir du jour 15, on remarque que la vitesse de croissance de la culture reste constante et maximale, ce qui correspond à la phase stationnaire; Les conditions du milieu sont optimales pour la croissance cellulaire. La quantité moyenne des constituants cellulaires ainsi que l'évolution de la population sont constantes au jour 30.

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

3.6.2 Composition physico-chimique de la chlorelle

3.6.2.1. Profil nutritionnel de la chlorelle

Le genre *Chlorella* connaît plus de 70 souches différentes, ayant des capacités d'adaptation aux variations des conditions de leur milieu de vie (Kessler, 1976). La Chlorelle fait partie des espèces microalgales à hautes potentialités et susceptibles d'exploitation surtout dans le secteur agro-alimentaire. Toutefois, sa valorisation, est une étape à l'aval des procédés d'une batterie d'analyses faite pour la connaissance de la composition biochimique de la Chlorelle et de son profil nutritionnel. Dans cette perspective, les résultats de l'analyse de la biomasse dans notre étude sont exprimés sur 100 g de poids sec (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 Composition physico-chimique de la Chlorelle

Caractéristiques	Teneur
Matière sèche (%)	25±0.91
Glucides (%)	19±1.1
Protéines (%)	58±2.02
Lipides (%)	11.8 ± 1.06
Cendres (%)	9,11±0.7
Valeur énergétique (kJ)	2680,43
Valeur énergétique (kcal/100g)	640,64

- Pour la teneur en matière sèche (MS), la Chlorelle analysée a révélé une teneur de 25±0.91%; Ce qui corrobore le résultat obtenu par Tokuşođlu et Ünal (2003) dont le pourcentage en Matière Sèche était de 20.61%.

3.6.2.2. Evaluation de la teneur en glucides

Le dosage des sucres de *Chlorella sp.* dans le présent travail révèle une teneur avoisinant les 19±1.1%. Nos résultats corroborent ceux rapportés par Templeton et al. (2012) et Piquemal, (1990) qui ont observé respectivement, 20.5 et 21%, chez *Chlorella vulgaris*. Cependant, Notre résultat est différent de ceux rapportés par Vladimirova et al. (1979) avec 31,8% notée chez *C.pyrenoïdosa*. Cependant, Aaronson et al. (1980) ont observé seulement 2% pour la même espèce. Par contre, Trubachev et al. (1976) ont reporté 12-17 % chez *Chlorella vulgaris*,. Par ailleurs, 15 et 6,6%, ont été notés chez *C.ellipsoidea Sk et C. spp 37* (Tokuşođlu et Ünal, 2003;

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Zhukova *et al.*, 1969). D'autres chercheurs, Belkoura *et al.* (1997), ont rapporté chez *C. sorokiniana* la MS était entre 19,9 et 38,6 % MS. Ces différences peuvent être expliquées par les facteurs environnementaux (température et intensité lumineuse) sur la synthèse des composants; l'accumulation des composés glucidiques qui s'accroît à des températures et des intensités lumineuses relativement élevées, et dès lors le métabolisme cellulaire tend à l'accumulation des composés glucidiques, sous forme d'amidon, de paramylon, ou d'autres polysaccharides,(Belkoura *et al.*,1997 ; Robinson *et Walker*, 1981). Par ailleurs, la composition du milieu de culture et la teneur en azote, le pH, la luminosité et la photopériode, peuvent aussi faire varier la teneur en glucides contenu dans les microalgues Belkoura *et al.*, 1997; Arad *et Simon-Berkovitch*, 1993 ; Harrison *et al.*, 1990)

Pour la caractérisation des sucres, dosés par HPLC, le profil obtenu en sucres simples est représentés par la figure 3.6 ,et leur teneur est montrée dans le tableau 3.4.

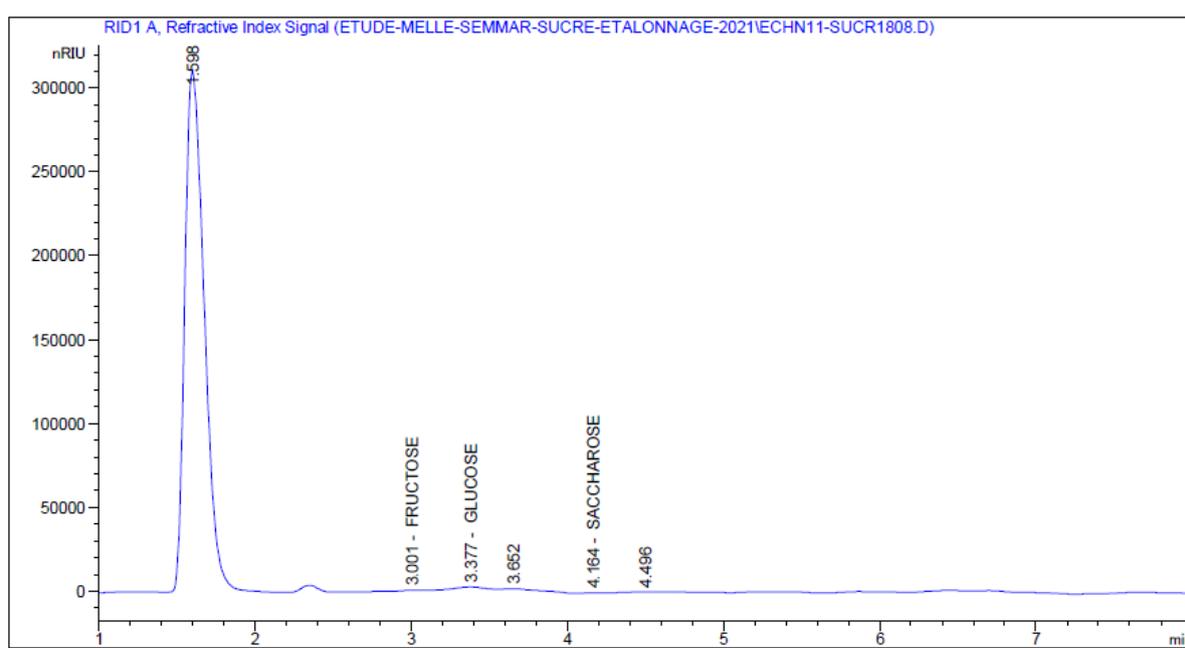


Figure 3.6 : Chromatogramme en sucres simples de la Chlorelle analysé par HPLC

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Tableau 3.4 Teneur des sucres simples identifiés

Sucres	Teneur en mg/g
Glucose	4,87±0.1
Fructose	4,82±0.08
Saccharose	0,42±0.03

D'après le chromatogramme, seulement 3 types de sucres ont été identifiés, le glucose et le fructose avec des teneurs de 4,87±0.1 et 4,82±0.08 mg /g de MS, suivi par le saccharose avec seulement 0,42±0.03 mg /g de MS. Templeton et *al.* (2012), ont noté pour *Chlorella vulgaris*, les mêmes teneurs en glucose (4.8 ±0.1 mg/g) mais seulement 0.3 ±0mg/g de fructose ont été trouvés. Ces deux espèces ont montré la présence de nombreux monosaccharides tels que: glucose, rhamnose, arabinose, mannose. De plus, Souza et *al.* (2017) ont obtenu du glucose comme composé majoritaire détecté pour les sucres chez *Chlorella sp* et *Chlorella sorokiniana*. Le profil des monosaccharides obtenu pour les deux espèces comprend entre autres: le glucose, galactose, rhamnose, xylose, mannose. Les différences dans la teneur en glucose peut être expliquée généralement par la durée de la récolte.. Si la culture est prolongée jusqu'à la phase stationnaire pour stimuler la synthèse et l'accumulation des sucres, l'amidon en particulier (Dragone et *al.*, 2011)

3.6.2.3. Evaluation de la teneur en protéines

La teneur en protéines trouvée pour la chlorelle, représente environ 58±2.02% de MS. Ces résultats corroborent avec ceux trouvés par Barka et Blecker(2016), Becker(2007) avec 58% de teneur en MS pour *Chlorella vulgaris*, et ceux de Belkoura et *al.*,(1997), Aaronson et *al.*(1980)avec60 % environ de MS pour la même espèce. Par ailleurs, Aaronson et *al.*(1980) ont observé une teneur de 57% chez *Chlorella pyrenoidosa*. Ursuet *al.* (2014) et Trubachev et *al.* (1976) ont rapportés des teneurs de 53% et 51 -58%, respectivement pour *Chlorella vulgaris*. Cependant, nos résultats d'une autre part, diffèrent de ceux reportés par Slocombe et *al.*(2013) avec 6,87% pour l'espèce *Chlorella spaerckii*. Belkoura et *al.* (1997) ont observé seulement 26,9% chez *Chlorella vulgaris*. Phukan et *al.* (2011) et Tokuşoğlu et Ünal (2003) ont trouvé des teneurs en protéines de 43,22% et 47.82% de MS pour la même espèce. Ces différences dans les valeurs obtenues comparés à la littérature, peuvent être expliquées dans par les conditions culturales (en particulier de la température du milieu de culture) et du stade de croissance de la culture.

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Ces valeurs obtenues restent plus importantes que la teneur des protéines contenues dans certaines sources animales ou végétales conventionnelles, tels que : le lait écrémé en poudre (36%), la farine de soja (37%), poulet et poissons (24%), bœuf (22%) et arachides (26%) (Barka et Blecker, 2016 ; Moorhead *et al.*, 2011). En effet, le profil d'acides aminés de presque toutes les algues se compare favorablement avec celui d'autres protéines alimentaires. Comme les cellules sont capables de synthétiser tous les acides aminés, elles peuvent fournir les acides aminés essentiels pour les humains, comme c'est le cas pour la Chlorelle qui possède une teneur élevée en protéines et une composition en acides aminés équilibrée (Buono *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2013, Ryu et Kim, 2013 ; Guil-Guerrero *et al.*, 2004).

3.6.2.4. Evaluation de la teneur en lipides et profil en acides gras

Les lipides sont des composants importants des membranes et parois cellulaires, et représentent une part très importante de la biomasse algale. La teneur des lipides dans ce présent travail a révélé en moyenne de 11.8 ± 1.06 %. Ces résultats sont identiques avec ceux rapportés par Krishnan *et al.* (2019), Amin *et al.* (2019) et Hosseiniz and *et al.* (2017) qui ont obtenu 10.9 % ,10.7% and 10.63%, respectivement de rendement des lipides totaux à partir de *Chlorella sp* par la méthode conventionnelle de Bligh et Dyer. Nos résultats sont aussi similaires à ceux obtenus par Tokuşoğlu et Ünal (2003) avec une teneur de 13,32% pour *Chlorella vulgaris* Par ailleurs, Matos *et al.* (2016) et Abdo *et al.* (2015) ont reporté 12% des lipides totaux chez *Chlorella vulgaris*. Cependant, les teneurs en lipides de notre études ont différents de ceux observé dans les travaux de Phukan *et al.* (2011) ou 28% des lipides ont été recensés; Contrairement à ceux obtenues par Aaronson *et al.*(1980) avec 26%, Materassi *et al.* (1980) et Trubachev *et al.* (1976) avec des teneurs variant entre 15-27% et 14-22% respectivement, pour le genre *Chlorella*. Toutefois,, Belkoura *et al.* (1997) ont rapporté des teneurs en lipides chez *Chlorella sorokiniana* oscillant entre 13,2 et 24,8 % de matière sèche. La composition de la biomasse algale dépend des conditions de culture et d'autres facteurs complexes, et peut aussi varier à l' intérieur de la même espèce(Amin *et al.*, 2019). En effet, des variations inter-espèces considérables peuvent être observées, allant de 1 à 70 % de la matière sèche (Belkoura *et al.*, 1997 ; Borowitzka, 1988). Ces variations peuvent être dues aux particularités métaboliques de chaque espèce d'une part et d'une autre part à l'influence des paramètres de production des lipides par les microalgues est conditionnée par plusieurs paramètres tel que : la température, l'intensité lumineuse, la concentration en CO₂ du milieu de culture, et de sa composition, et peut être stimulée par le stress environnemental (Feng et Zhang, 2011).

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Les microalgues de par leur teneur intéressante en lipides, peuvent représenter une source prometteuse de production, ayant un plus haut rendement 7-31 fois plus élevé que les plantes terrestres (Demirbas et Demirbas, 2011).

Le profil en acides gras analysés par chromatographie en phase gazeuse est représenté dans le tableau 3.5, et les proportions des acides gras saturés, mono et polyinsaturés sont représentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.5 Profil des acides gras de la chlorelle obtenu par CPG

Acide gras	Dénomination	Teneur en %
C12:0	Acide laurique	0,81±0
C14:0	Acide myristique	1,17±0,14
C16:0	Acide palmitique	40,12±0,75
C16:1ω7	Acide palmitoléique	3,91±0,13
C17:0	Acide margarique	0,80±0,03
C18:0	Acide stéarique	17,34±0,02
C18:1ω9	Acide oléique	17,67±0
C18:2ω6	Acide linoléique	6,17±0,09
C18:3ω3	Acide linoléique	0,96±0,14
C20:0	Acide arachidique	0,65±0,14
C20:1ω9	Acide gondoïque	2,95±0,78
C22:0	Acide béhénique	1,14±0

Tableau 3.6 Proportion des acides gras saturés, mono et polyinsaturés

Acides gras	%
AGS	62,04
AGMI	24,53
AGPI	7,13
(MUFA+PUFA)/SFA	0,51
ω3	0,96
ω6	6,17
ω3/ω6	0,15
ω9	20,62

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Le profil en acide gras a montré des concentrations intéressantes d'acide palmitique (C16:0) avec $40.12 \pm 0,75\%$ représentant le composant majeur, suivi par l'acide oléique (C18:1), l'acide stéarique (C18:0) avec 17.67 ± 0 et $17.34 \pm 0,02 \%$, respectivement; tandis que les acides Linoléique (C18:2) et Palmitoléique (C16:1) sont présents avec $6.17 \pm 0,09 \%$ et $3.91 \pm 0,13\%$, respectivement.

Ces résultats sont en accord avec le profil obtenu par Jay et al. (2018) et Sharmin et al. (2016), qui reportent l'abondance des composés C16 et C18, ou l'acide palmitique est l'acide gras primaire retrouvé. Yang et al. (2016) ont reporté que les lipides avec des teneurs en acides palmitique and oléique peuvent être utilisés pour la production de biodiesel de bonne qualité.

Le profil a montré que les acides gras saturés (AGS) ont été les acides gras prédominants dans tous les échantillons, suivis par les acides gras monoinsaturés (AGMI) puis par les acides gras polyinsaturés (AGPI). Dans l'échantillon sans traitement, 62.04% pour les AGS, 24.53% AGMI, et 7.13 % AGPI ont été observés. Ces résultats corroborent ceux reportés par Shanmugam et al. (2020). Cependant, moins de 30% de AGS et au delà de 20% des AGPI ont été retrouvés chez *Chlorella vulgaris* dans les travaux de Matos et al. (2016), Khoeyi et al. (2011), Tükösüglü and Unal (2003) avec .La composition des acides gras peut être partiellement attribuée à la phylogénétique et au génome des microalgues. Elle peut dépendre aussi des conditions de culture et de la phase de croissance lors du temps de récolte (Matos et al., 2019, Ferreira et al., 2017; Rismani & Shariati, 2017).

3.6.2.5. Evaluation de la teneur en cendres et composition en éléments minéraux

La détermination de la teneur en cendres permet de quantifier la composition minérale générale de l'échantillon incinéré. Dans ce présent travail, elle représente $9,11 \pm 0,7\%$ pour *Chlorella sp.* Toutefois, ce résultat reste plus important que ceux trouvés par Greque de Morais et al. (2015) avec 5% et Phukan et al. (2011) avec 5,93%. Jabeen et al. (2020) ont aussi obtenu 5.3% en teneur en cendres pour *Chlorella vulgaris*. Par ailleurs, Schuler et al. (2020) ont obtenu des teneurs en cendres variant entre 5.4 ± 0.5 et $12.7 \pm 0.4 \%$, pour la même espèce. La teneur en cendres des micro-algues peut varier considérablement d'une espèce à l'autre et également selon la localisation géographique et la saison.

La composition en éléments minéraux est déterminé par SAA sur un échantillon de *Chlorella sp* incinéré (Tableau 3.7).

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Tableau 3.7 Teneur en éléments minéraux en mg/g de MS

Eléments minéraux	Quantité en mg/g de MS
Ca	0,568± 0,02
Al	0,412 ± 0,01
Cu	1,379± 0,17
Fe	1,583±0,00
K	0,504±0,1
Mg	13,21±1,85
Mn	0,004±0,00
Na	186,9±3,3
Zn	0,839±0,02

Le profil en éléments minéraux montre la présence de nombreux éléments minéraux, avec le Sodium comme composant majoritaire avec une concentration de 186,9±3,3 mg/g de MS, suivi par le Magnésium (13,21±1,85 mg/g de MS).

Tokuşoğlu et Ünal (2003), ont obtenu des teneurs différentes en éléments minéraux pour *Chlorella vulgaris*: P (17,61 mg /g de poids sec) , Na (13,46 mg), K (7,49 mg), Ca (5,93 mg), Mg (3,44 mg) et Fe (2,59 mg); les autres teneurs en minéraux comprenaient Mn (2,09 mg), Zn (1,19 mg), Se (0,07 mg), Cu (0,06 mg) et Cr (0,02 mg). Par ailleurs, Sukoyo et *al.* (2019) ont noté la présence de Na (15.99 %), Ca (1.64 %), Mg (14,42 %) .Ces différences peuvent être expliquées par les conditions et le milieu de culture ainsi que selon les espèces utilisés.

3.6.2.6. Evaluation de la teneur en pigments

La détermination des teneurs en pigments, comprenant la Chlorophylle *a* et *b*, ainsi que les caroténoïdes, sont représentés dans le tableau 3.8

Tableau 3.8 Teneur en pigments de *Chlorella sp.*

Pigments	Teneur (mg/g de matière sèche)
Chlorophylle <i>a</i>	10,65±1.2
Chlorophylle <i>b</i>	7,03±0.6
Caroténoïdes	1,32±0.14

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

La chlorophylle *a* est présente dans la Chlorelle avec une valeur de $10,65 \pm 1.2$ mg/g de matière sèche. Quant à la chlorophylle *b*, sa teneur est de $7,03 \pm 0.6$ mg. Ceux-ci diffèrent des résultats obtenus par El Sheekh et Fathy (2009), qui ont obtenus des teneurs plus basses en Chlorophylle *a* de 4,481mg/g, des teneurs similaires en Chlorophylle *b* de 7,03 mg/g, et des teneurs élevées en caroténoïdes (6,06 mg/g).r. Khalil et al. (2009), ont rapporté des valeurs proches pour la Chlorophylle *a* avec 9mg/g de MS, mais seulement 4.5mg/g de MS pour la Chlorophylle *b*, et des valeurs plus importantes pour les caroténoïdes totaux (3.5mg/g de MS) chez *Chlorella ellipsoidea*. Des valeurs plus basses pour Safafar et al. (2016) qui ont obtenu pour *Chlorella vulgaris* des teneurs maximales de $0,032 \pm 0.01$ mg/g MS en chlorophylle et $1,013 \pm 0.107$ mg/g MS pour les caroténoïdes, et pour *Chlorella pyrenoidosa* 0.145 mg/g MS ont été notés pour les teneurs en Chlorophylle *a*, et $0,17 \pm 0,03$ mg/g MS pour les caroténoïdes. Par ailleurs, Dineshkumar et al. (2017), ont reporté des valeurs de 32.76 ± 0.78 pour les chlorophylles totaux, et 29.63 ± 0.79 pour les caroténoïdes totaux. Enfin, Pozzobon et al. (2021) ont rapporté des teneurs plus élevées avec 15 à 18 mg/g MS pour la Chlorophylles *a*, et des valeurs similaires pour la Chlorophylle *b* et les caroténoïdes totaux de 6 à 8 mg/g MS et 2.5mg/g MS, respectivement.

La chlorophylle *a* est le principal pigment photosynthétique des micro-algues suivi de la chlorophylle *b*, et peuvent représenter 1-2% de la masse sèche (Safi et al., 2016). Les températures de culture affectent les processus métaboliques et la composition biochimique des cellules, (Aouir et al., 2017; Kumar et al., 2011 ;Richmond, 2004). Quant à la biosynthèse des caroténoïdes, elle est dépendante des espèces et régulée par l'âge, et du stress imposé: comme variation de la salinité, de température, de concentration en métaux lourds et surtout de l'intensité lumineuse (Gouveia et al., 1996).

3.6.2.7. Evaluation de la teneur en acides organiques

La teneur en acides organiques contenue dans la poudre de Chlorelle lyophilisée, analysé par HPLC, les teneurs en acides organiques majoritaires sont notées dans le Tableau 3.9.

Tableau 3.9 Teneur des acides organiques majoritaires

Acides organiques	mg/g de MS
Tartrique	$13,80 \pm 1,03$
Fumarique	$0,38 \pm 0,02$
Oxalique	$0,28 \pm 0,01$

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Les analyses des acides organiques ont montré la présence de trois acides; tartrique majoritaire avec $13,80 \pm 1,03$ mg/g de MS, fumarique et oxalique en moindre proportions avec $0,38 \pm 0,02$ et $0,28 \pm 0,01$ mg/g de MS..

Chez les végétaux, les acides organiques constituent des stocks transitoires de carbone fixe dont l'accumulation est associée au temps de conversion transitoire des intermédiaires des cycles et voies métaboliques. Leur nature transitoire fait en sorte qu'ils peuvent être reconvertis en glucides ou encore faire l'objet d'une oxydation finale et produire du CO₂ et de l'H₂O (Igamberdiev et Bykova, 2018).

3.6.3. Analyses microbiologiques

Les résultats bactériologiques représentés dans le Tableau 3.10, indiquent la conformité de la poudre de Chlorelle lyophilisée. On remarque aussi que, la poudre de la Chlorelle est moins contaminée que la biomasse fraîche. Ceci est convenable, car, l'incorporation possible de *Chlorella* dans des produits alimentaires, cas des boissons dans ce travail présent se fait sous forme de poudre séchée.

Tableau 3.10 Dénombrement de la microflore de la chlorelle

Type de biomasse	Germes mésophiles aérobies totaux (UFC/g)	Flore fongique (UFC/g)	Coliformes totaux (UFC/g)
Fraîche (culture)	266	52	152
Sèche (poudre lyophilisée)	175	<10	<10
Normes françaises	10×10^4	<10	<10

La biomasse de la Chlorelle sous sa forme fraîche montre quelques contamination, comme de la flore fongique et les coliformes totaux, cela peut s'expliquer par les manquements des conditions de culture qui convient à rajouter du milieu, échantillonner et analyser quotidiennement pour évaluer les différents paramètres de la culture: pH, conductivité, densité cellulaire, contamination de la culture etc., et aussi à la forte teneur en eau de la

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

masse fraîche, qui est propice au développement de plusieurs types de germes. Au contraire, les analyses de la biomasse sèche (lyophilisée) ont été conformes, ce qui peut s'expliquer par le traitement à froid appliqué à de très basses températures, dans des conditions aseptiques, en éliminant l'eau, et donc son activité, pour éviter la prolifération des germes.

Afin d'obtenir une Chlorelle ayant une qualité microbiologique satisfaisante, il serait intéressant d'appliquer les règles d'hygiène, tout au long des étapes de culture, pendant la récolte et le stockage. Ce qui permettra à la poudre de chlorelle d'être conforme selon les normes microbiologiques appliquées. (Aouir et *al.*, 2017)

Chapitre 3 Caractérisation générale de la Chlorelle

Conclusion

D'une part, les microalgues représentent une source durable et renouvelable, intéressante pour plusieurs molécules bénéfiques pour les être vivants, leur richesse en protéines reste la spécificité dont plusieurs domaines se penchent pour pouvoir l'orienter pour l'alimentation humaine. D'autre part, l'augmentation de la population mondiale et les prévisions d'un apport insuffisant en protéines ont conduit à rechercher de nouvelles sources de protéines alternatives efficaces ; la biomasse des micro-algues semble être un bon candidat à cette fin.

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques qui produisent une variété de composés tels que les protéines, l'amidon, la cellulose, les lipides, les métabolites secondaires, y compris les pigments antioxydants et les molécules pharmaceutiques potentielles (Gracia et al., 2015 ; Hu et al., 2013). Cependant, la culture optimale de *Chlorella sp.* a attiré l'attention en tant que l'un des plus grands producteurs de biomasse dans l'environnement marin, et a été signalé comme une source non conventionnelle de protéines. *Chlorella sp.* est l'une des microalgues les plus utilisées comme additifs pour améliorer les teneurs nutritionnelles des aliments conventionnels. Ainsi, elle améliore la santé humaine, car elle est connue pour être une source riche en protéines, lipides, fibres, vitamines essentielles et minéraux. Aussi, elle contient des molécules bioactives qui nécessitent d'être caractérisées et leur effet sur les activités biologiques analysée: effet antibactérien, antifongique, antioxydants...

Toutes ces informations permettent une fois regroupées une meilleure connaissance de cette microalgue, pour pouvoir l'adapter et l'utiliser dans différents domaines, et sa consommation en l'état ou étant un ingrédient fonctionnel pour plusieurs types de produits alimentaire entre autre, permettrait d'améliorer son profil nutritionnel.

**CHAPITRE 4: EFFETS DES US ET DU CEP SUR
LES EXTRACTIONS PAR SOLVANTS DE
COMPOSÉS BIOACTIFS A PARTIR DE
CHLORELLA SP**

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

Chapitre 4 : Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

4.1. Introduction

L'augmentation constante des consommateurs pour des additifs alimentaires issues de produit naturel, a poussé les recherches à se diriger vers les composés utiles de la lithosphère (sol et végétaux) ainsi que dans l'hydrosphère particulièrement les produit halieutiques, notamment les poissons et les algues.

En Effet, les algues retrouvées dans les eaux douces et marines contiennent pléthores de composés bioactifs incluant les protéines, enzymes, acides aminés, lipides, sucres, vitamines, minéraux, composés phénoliques, flavonoïdes et pigments, avec des activités biologiques différentes (Manchu et *al.*,2015; Uma et *al.*,2011; Wijesekara *et al.*, 2010;). Certaines algues et microalgues sont même proposées comme aliments fonctionnels ou produits nutraceutiques indispensable à santé humaine (Annamalai et *al.*,2014; Wang et *al.*,2010). En plus de leurs valeurs nutritionnelles élevées, ces algues possèdent des propriétés antibiotiques, antifongiques, antivirales, antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-tumorales. Ces activités sont associées à la présence des composés phénoliques et flavonoïdes (Adhoni et *al.*, 2016; Salvador et *al.*, 2007;Diker et *al.*, 1991) .

Certaines microalgues comme la *Chlorella*, un composé vert formé par des cellules sphériques non-flagellées de 2–8 µm de diamètre (Pradhan et *al.*,2014), présent sous forme de cellules individuelles en colonie, considérée comme une excellente source de composés bioactifs (Amaro et *al.*,2011; Kitada et *al.*,2009). Ces dernières peuvent être extraites par des méthodes conventionnelles à savoir l'extraction par soxhlet et/ou par macération. Cependant, plusieurs inconvénients entravent l'extraction, comme la qualité de l'extrait ainsi que la quantité des solvants utilisés (Grosso et *al.*, 2015). Toutefois, afin d'éviter ces problématiques des techniques non-conventionnelles, innovantes et émergente peuvent être utilisées comme alternative pour faciliter l'extraction de ces biocomposés et l'obtention d'un extrait pur, comme l'utilisation des ultrasons (Zou et *al.*,2013) et les champs électriques pulsés (Luengo et *al.*,2015)..

Un prétraitement de la biomasse microalgale possédant une paroi cellulaire rigide, comme pour la Chlorelle par ces techniques ,est une étape critique dans l'efficacité de l'extraction des composés d'intérêt présents dans le cytoplasme ou dans les organelles. Plusieurs microalgues possèdent une paroi cellulaire rigide qui protège les organelles, en conséquence, les molécules

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

intracellulaires sont par cet effet, difficiles à libérer et/ou extraire. Ces parois jouent le rôle de barrière protectrice, et de restriction d'entrée des solvants organiques limitant ainsi l'extraction des composés bioactifs (Buchmann et *al.*, 2019).

La sonication (Ultrasons) est l'une des technologies les plus utilisées dans l'extraction de ces biocomposés. Les extractions assistées par Ultrasons (US) sont produits par des sonicateurs, qui produisent des ondes à une fréquence supérieure à 16 kHz (Buchmann et *al.*, 2019). Ces ultrasons produisent des effets de cavitation qui provoquent la rupture des membranes cellulaires, causée par la pression générée, ainsi qu'une augmentation localisée de la température (Chittapun et *al.*, 2020 ; Scherer et *al.*, 2019). Les ultrasons provoquent des cavitations et des bulles qui en éclatant génèrent des ondes acoustiques qui déstructurent et/ou rompent la membrane cellulaire, et par conséquent, le contenu cellulaire est libéré (Bernaerts et *al.*, 2018).

L'extraction assisté par Champs Electrique Pulsé (CEP) est aussi une autre technique largement utilisée pour induire la perméabilisation des membranes cellulaire par un phénomène appelé "électroporation" (Kong et *al.*, 2014). Le traitement par CEP consiste à l'application d'impulsion de courte durée de champ électrique variant de 20 à 80 kV/cm. A une certaine intensité critique, l'électroporation se produit par l'apparition de micropores. Une augmentation du nombre de pulsations induit la lyse cellulaire et par conséquent le contenu intracellulaire est récupéré. (Luengo et *al.*, 2015; Cesaro et *al.*, 2014; Kong et *al.*, 2014,).

L'objectif de cette étude, est de comparer l'efficacité des US et des CEP sur l'extraction des composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Matériel biologique

L'étude a été réalisée sur une souche de chlorelle *Chlorella sp.*, cultivée, récoltée comme décrit dans le chapitre 3. section 3.2.

4.2.2. Screening phytochimique

4.2.2.1. Préparation des extraits

10 g d'algue fraîche sont mélangés avec 100ml de solvants: eau, méthanol, éthanol, acétone, chloroforme (rapport 1/10) (Annamalai et *al.*, 2014), Ces suspensions ont ensuite été sujettes à l'un des traitements décrits ci-dessous. Tous les produits chimiques utilisés pour la préparation des extraits et le dosage des composés par la suite, ont été de grade analytique, obtenus de la compagnie Chemopharma company (France).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

Les mélanges algues/solvants seront en trois groupes :

-Macération: Mélange sans traitement , macération directe.

Les suspensions sont incubées dans des tubes à essai, laissées à macérer pendant 18 heures, puis homogénéisées et centrifugées grâce à une centrifugeuse (SIGMA 2-15, Germany) à 4500 tr/min pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu (premier extrait) est conservé à 4°C à l'obscurité jusqu'à analyse. Le culot est resuspendu dans la même quantité de solvant, mélangé et laissé encore sous macération. L'opération est répétée jusqu'à ce que le culot devienne incolore (sauf pour le cas de l'eau ou le culot reste vert). Les surnageants sont regroupés (par type de solvants), concentrés au rotavapor R-210 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) et stockés au réfrigérateur jusqu'à analyse.

-Prétraitement aux Ultrasons:

Le matériel utilisé pour ce prétraitement est un sonicateur Wiseclean WUC-D06H avec une énergie de 250 watts. Il est composé d'un simple bain aux dimensions de 29 cm x 15 cm x 15.6 cm, capable d'opérer à une fréquence maximale de 40 kHz. Après plusieurs tests préliminaires, de 10, 20, 30, et 40 kHz pour un temps de traitement de 5, 10, 15, 20, 25, et 30 min. La combinaison de 40 kHz pendant 20 min a été retenue, étant donné que celle-ci a donné les meilleurs résultats. Le temps de 20 min était le temps d'extraction optimum donnant le maximum de rendement obtenu.

La biomasse fraîche de la *Chlorella* a été suspendue dans chaque solvant (eau, méthanol, éthanol, acétone, chloroforme) de 0.1% m/v et soumise à un traitement d'US dans des tubes à essai de 10ml, immergés dans un bain d'eau, puis traitée pendant 20 min à une fréquence de 40 kHz, à une température contrôlée de 30°C. L'énergie utilisée pour le traitement de 10ml pendant un temps de 20 minutes a été calculée à 0.21 kJ/L.

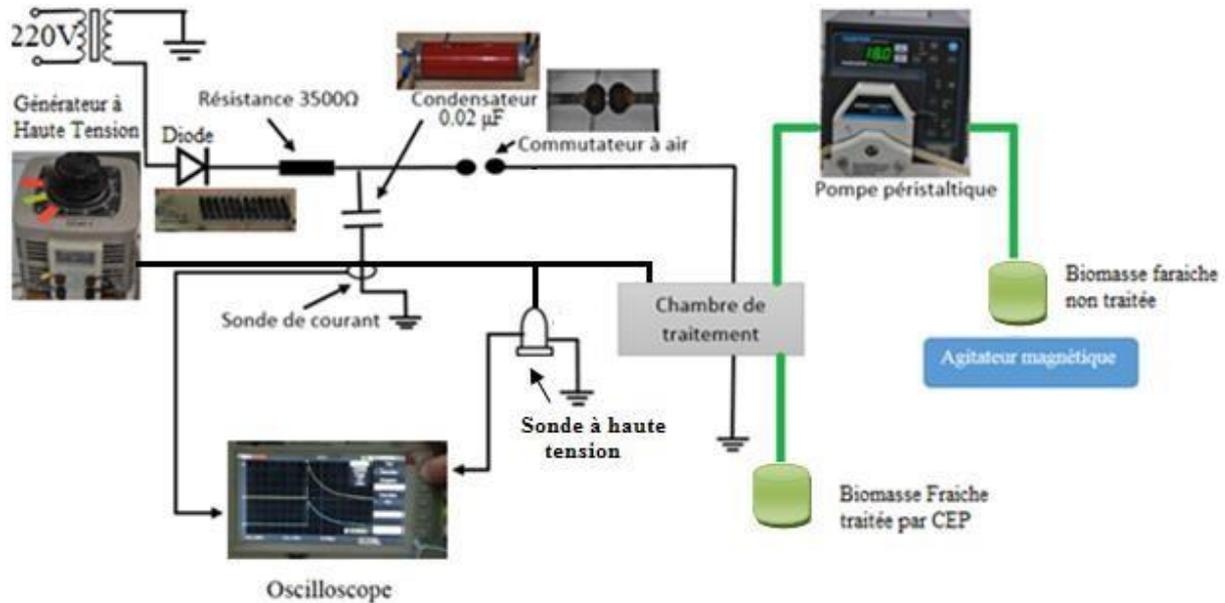
Les échantillons sont par la suite soumis à la macération comme décrit plus haut

- Prétraitement au Champ Electrique Pulsé:

La conductivité électrique (EC) est un paramètre crucial à considérer dans l'application de la technique par CEP, car elle détermine le taux d'électro-perméabilisation et d'électrofusion des cellules. Si la conductivité est trop importante, le champ électrique généré sera trop bas causé par un courant électrique élevé (Amiali et al., 2006), par conséquent influence l'efficacité du traitement. Tous les extraits de la *Chlorella* ont été conduits selon la même procédure décrite

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

par Aouir et *al.*, (2015) dans laquelle 10 g de biomasse fraîche a été lavée à deux reprises avec de l'eau distillée, puis suspendu dans 1,000 mL de tampon phosphate de sodium (0.025M, pH 5.8) afin d'obtenir une conductivité initiale de 1.877 mS/cm. Le traitement par CEP de la microalgue a été réalisé en utilisant un générateur de champ électrique pulsé de 10kV. La tension à la sortie du générateur à haute tension est alors redressée par des diodes (12 diodes de 1 kV chacune) pour charger un condensateur. La capacitance (C) des condensateurs de



décharge est de de 0,02 μF comme décrit dans la figure 4.1.

Figure 4.1: Circuit électrique d'une installation d'un traitement par CEP en continu. (Aouir et *al.*, 2015)

La Chlorelle dans le tampon est traitée de façon continue dans une chambre de traitement de type Cofield avec un débit de 0.4 mL/s. L'espace entre les électrodes était de 0.1 cm, l'intensité du champ électrique était fixée à $42.2 \pm 2.5 \text{ kV/cm}$ et le nombre de pulsations totales n est calculé selon l'équation (4.1):

$$n = (f \cdot V) / Q \quad (4.1)$$

Où;

Q , :débit (mL/s),

f :fréquence de la pulsation(Hz),

V : volume de la chambre de traitement (mL).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

La fréquence des pulsations a été maintenue à environ 400 ± 5 Hz, et un temps de pulsation constant (τ) de $28.3 \mu\text{s}$, vérifié à l'aide d'un oscilloscope digital (SIGLENT, SDS 1102 CHL, China). Le temps de traitement total (t) a été de 1,220 second calculé selon l'Equation 4.2.

$$t = n \cdot \tau \quad (4.2)$$

Le Voltage ainsi que le courant électrique traversant la chambre de traitement ont été mesurés à l'aide d'une sonde à haute tension de type A Tektronix P60151000:1 (Beaverton, OR, USA) et un transformateur (model 410, PEARSON Electronics Inc., PaloAlto, CA, USA).

L'énergie par pulsation (W_{pulse}) [KJ] ainsi que l'énergie totale (W_{spec}) [KJ/mL] ont été calculés selon les équations 4.3 et 4.4.

$$W_{\text{pulsations}} = \frac{1}{2} \cdot V^2 \cdot C \quad (4.3)$$

(3)

$$W_{\text{energie}} = \frac{f}{\dot{v}} \cdot W_{\text{pulse}} \quad (4.4)$$

Où: V^2 : Voltage (volt) ;

C : Capacitance (μF),

f : Fréquence (s^{-1}),

\dot{v} , le volume ($\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$).

L'énergie totale utilisée pour le traitement a été calculé à 0.178 kJ/L .

L'expérimentation a été performée en triplicata. Tous les échantillons ont été centrifugés après les prétraitements, lavés deux fois à l'eau distillée pour éliminer le tampon, puis l'extraction a été appliquée selon la section.

4.2.2.2. Tests phytochimiques

- **Tanins:** $70 \mu\text{L}$ de l'extrait sont rajoutés à 5 ml d'eau distillée, puis par quelques gouttes de FeCl_3 à 1%. La présence de tanins sera indiquée par la coloration vert noirâtre. (Rajeundran et al., 2014).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

- **Terpènes:** 100 µL de chaque extrait sont additionnés à 40 µL de chloroforme. Le mélange est agité; puis quelques gouttes de H₂SO₄ concentré sont ajoutées. La présence d'un anneau marron indiquera la présence de terpènes (Rajeundran et *al.*, 2014) .

- **Caroténoïdes:** Dans 100 µL d'extrait, on ajoute 100 µL d'HCl et H₂SO₄. L'apparition d'une coloration vert-bleu, donnera un résultat positif.

- **Stéroïdes:** Dans 100 µL d'extrait, on ajoute 400 µL d'anhydride acétique puis quelques gouttes de H₂SO₄ concentré. Si il y a présence de stéroïdes, une coloration marron apparait (Rajeundran et *al.*, 2014) .

- **Saponines:** Dans 100 µL d'extrait, on ajoute quelques gouttes de FeCl₃ à 1%. La présence des saponines sera marquée par l'apparition de mousse (Rajeundran et *al.*, 2014).

- **Flavonoïdes:** Dans un extrait de 100µL on rajoute le même volume d'acétate de plomb à 10%. La présence des flavonoïdes donnera une coloration vert jaunâtre (Boukri; 2014).

- **Alcaloïdes:**

méthode 1: Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCL 1% à 1ml de chaque extrait. La mixture est chauffé dans un bain marie (Memmert, WNB7), puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume de 3mL est traité par le réactif de Mayer et un, autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

méthode 2: Dans 2ml d'extrait, on additionne 0.2 ml d'HCl dilué; puis 1ml du réactif de Dragendorff. Un précipité brun orangé donnera un résultat positif.

- **Glycosides:** A 100 µL d'extrait, on ajoute 100 µL de pyridine aqueuse, puis quelques gouttes de sodium nitroprusside. Le résultat sera positif, si la couleur tourne au rose.

- **Sucres réducteurs:** Dans cette analyse on introduit 1ml d'extrait dans un tube à essai, puis on ajoute 2ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), l'ensemble est incubé pendant 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

4.2.3. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué selon le Protocole modifié de Dantas (2015). Un volume de (50 µL) de chaque extrait est mixé avec 1ml d'eau et 500µL de réactif phénolique Folin– Ciocalteu. Ensuite, 2.5 mL de Na₂CO₃ à 20% sont ajoutés au mélange, puis incubés à une température ambiante à l'obscurité pendant 45minutes. L'absorbance est calculée contre un blanc, mesurée à 735 nm. L'acide gallique (0.05–0.3 mg/mL) a été utilisé pour préparer la courbe étalon (voir Annexe 07) selon l'équation 4.5.

$$y = 0.008x + 0.084 \quad (4.5)$$

$$R^2 = 0.957$$

Les valeurs sont exprimées en mg équivalents d'acide gallique par g de Matière sèche.

4.2.4.. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon le Protocole modifié de Zhishen(1999). Un volume de 250 µL de chaque extrait ou de solution standard est mixé avec 1.25 mL d'eau et 75 µL d'une solution NaNO₂ à 5% (m/v).. Après 6 min, 150 µL de solution de AlCl₃ H₂O à 10% sont ajoutés. Après 5min sous agitation, 0.5 mL de NaOH 1 M sont additionnés puis le volume total est complété à 2.5 mL avec de l'eau distillée. L'absorbance est mesurée contre un blanc à 510 nm. Catéchine (+) a été utilisée pour obtenir la courbe étalon (0.05–0.5 mg/mL) (Annexe 08) selon l'équation 4.6:

$$y = 0.001x + 0.03 \quad (4.6)$$

$$R^2 = 0.977.$$

Les résultats sont exprimés en mg équivalents catéchine (CE)/g d'extrait en MS.

4.2.5. Détermination de la teneur en Chlorophyll a and b et des Caroténoïdes totaux

L'absorbance de chaque extrait a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY (UK) Genova Plus), à une longueur d'onde de 470 nm, 653 nm et 666 nm contre un blanc composé du solvant à l'état pur. Le calcul des concentrations de chlorophylles *a* et *b* et des caroténoïdes totaux a été réalisé en utilisant les équations 4.7, 4.8 et 4.9 (Wellburn, 1994).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

$$Chl_a = 15.65 \times (A_{666}) - 7.34(A_{653}) \quad (4.7)$$

$$Chl_b = 27.05 \times (A_{653}) - 11.21(A_{666}). \quad (4.8)$$

$$Car T = \frac{(1000 \times (A_{470}) - 2.86 \times Chl a - 129.2 \times Chl b)}{221} \quad (4.9)$$

4.2.6. Activités anti-bactériennes

L'activité anti-bactérienne des différents extraits obtenus est testée sur les bactéries suivantes: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Listeria innocua* ATCC 74915, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922. Cette activité a été effectuée par la technique de la diffusion des disques. Les micro-organismes sont repiqués sur milieu TSA puis incubés à 37°C pendant 18H, puis dilués dans une solution à l'eau physiologique jusqu'à obtention d'une DO₆₂₅ comprise dans un intervalle de [0.08 et 0.1]. Cette solution microbienne a été ensuite étalée sur milieux gélosés Muller-Hinton à raison de 10 µl par boîte.

Des disques de papier d'environ 6 mm de diamètre déposés sur les boîtes de pétri contenant des milieuxensemencés par les micro-organismes tests, reçoivent 20 µl d'une solution antimicrobienne à tester (extraits des mélanges solvants/algues avec ou sans traitement), la diffusion a été faite à l'obscurité pendant 20 minutes. Les boîtes de pétri ont été ensuite mises au repos pendant 2 heures avant d'être incubées à 30°C pendant 24 h. Les lectures des zones d'inhibitions ont été effectuées par mesure des zones sans croissance autour des disques..

Un test positif a été effectué en utilisant un antibiotique "l'Ampicilline" à 10 µl, ainsi qu'un test négatif comprenant seulement le solvant pur afin d'éliminer son susceptible effet antimicrobien.

4.2.7. Activités antifongiques

Les espèces fongiques utilisées sont: *Saccaromyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC ; Ces levures et moisissures ont été repiquées sur milieu Sabouraud pendant 48H à 30°C avant d'être utilisées. Ces activités ont été réalisées selon les mêmes étapes utilisées dans la section 4.2.6.

4.2.8. Activités anti-oxydantes

4.2.8.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.(1,1-diphenil-2-picrylhydazyl)

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

La mesure de l'activité anti-oxydante a été réalisée selon la méthode décrite par Kitada et al. (2009). Brièvement, 0.4ml du réactif de DPPH- méthanol (0.05mM) est mélangé avec 0.2ml d'extrait). Chaque mélange a été agité vigoureusement, et laissés à incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 30minutes. L'absorbance est calculée, avant et après l'ajout du réactif DPPH, à une longueur d'onde de 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (JENWAY GenovaPlus, UK).

Les solvants utilisés dans les contrôles négatifs sont : méthanol, éthanol, acétone, chloroforme, et l'eau (Grade Analytical). Quant aux standards utilisés comme agents antioxydants ou contrôles négatifs sont: Hydroxytoluène butylé (BHT), Quercétine, Catéchine, en concentration de (0.1 mg/ml). L'activité antioxydante est exprimée en concentration d'inhibition, définie comme étant la concentration en extrait nécessaire pour provoquer une diminution de l'absorbance du radical DPPH. La capacité de piégeage du radical DPPH a été calculée en utilisant l'équation 4.10.

$$\text{DPPH}(\% \text{ d'inhibition}) = \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100 \quad (4.10)$$

Où A_t : l'absorbance des extraits après 30 minutes

A_0 : l'absorbance de la solution méthanolique de DPPH

4.2.8.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS+ ou 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

La mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS+ a été réalisée selon un protocole modifié de Re et al.(1999). La solution de 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diluée 50fois dans de l'éthanol à 96% avec une absorbance à 734 nm =0.65–0.75, a été mélangée avec la moitié du volume de l'échantillon. Après 15 minutes à température ambiante, l'absorbance à 734 nm de longueur d'onde a été calculée. La neutralisation de l'ABTS a été calculée selon l'équation (4.11).

$$\text{Neutralisation} (\%) = \frac{\text{absorbance initiale} - \text{absorbance finale}}{\text{absorbance initiale}} \times 100 \quad (4.11)$$

Les solvants utilisés dans les contrôles négatifs sont: méthanol, éthanol, acétone, chloroforme, et l'eau (grade Analytical). Quant aux standards utilisés comme agents antioxydants ou contrôles négatifs sont: Hydroxytoluène butylé (BHT), Quercétine, Catéchine, en concentration de (0.1 mg/ml).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

4.2.9. Analyse statistique

Les valeurs obtenues sont présentées en moyennes \pm Ecart type sur des analyses effectuées en triplicata. Une Analyse de la variance à une variable (ANOVA) a été effectuée ajoutée à un test de Turkey. Les Différences avec une probabilité <0.05 sont considérées comme significatives. Toutes les analyses ont été performées à l'aide du logiciel statistique R version 3.0.2 (R Core Team, 2013).

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Screening phytochimique

Les extraits de *Chlorella* ont montré des couleurs allant du vert clair au vert foncé, suggérant la présence de composés phytochimiques. La capacité des différents solvants d'extraire les tannins, terpenoïdes, caroténoïdes, stéroïdes, saponins, flavonoïdes, alcaloïdes, glycosides et les sucres réducteurs à partir de la biomasse fraîche est résumée dans le tableau 2.1.

L'extrait aqueux n'a montré aucune présence de caroténoïdes, terpenoïdes ou de stéroïdes, et saponins. Des résultats similaires ont été rapporté dans la littérature, à l'exception des glycosides, qui ont été rapporté absents contrairement à cette études ou ils sont présents dans l'extrait aqueux (Geetha et *al.*, 2010). Dans d'autres études, à l'instar de ceux de Anchang et *al.*, (2016); Adhoni et *al.*, (2016), qui ont reporté la présence des saponins et des stérols chez *Chlorella vulgaris*, alors que les tanins ont été notés absents. Rajendran et *al.*, (2014) ont remarqué la présence des saponins, flavonoïdes et des alcaloïdes chez *Chlorella spp*. Quant à l'étude de Annamalai et *al.*, (2014)., qui note l'absence des tannins et des alcaloïdes pour la même espèce

La présence des composés phytochimiques dans les extraits dépend de plusieurs facteurs: la polarité, le pH, le temps d'extraction, de la température et de la méthode d'extraction. Aussi, leur présence dans la biomasse microalgale pourrait dépendre des conditions de culture et la phase de croissance de la microalgue (Dantas et *al.*, 2015; Annamalai et *al.*, 2012; Epko et *al.*, 2009).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

Tableau 4.1 Screening Phytochimique des extraits de *Chlorella sp*

Groupe Chimique	Solvants				
	Eau	Méthanol	Ethanol	Acétone	Chloroforme
Tannins	+	+	+	+	+
Terpènes	-	-	-	-	-
Caroténoïdes	-	+	+	+	+
Stéroïdes	-	-	-	-	-
Saponins	-	-	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	+	+	+
Glycosides	+	+	+	+	+
Sucres réducteurs	+	+	+	+	+

+: présence ; -: absence

4.3.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur des polyphénols extraits par macération seule ou après prétraitement aux ultrasons ou aux champs électriques pulsés, est détaillée dans la figure 4.2.

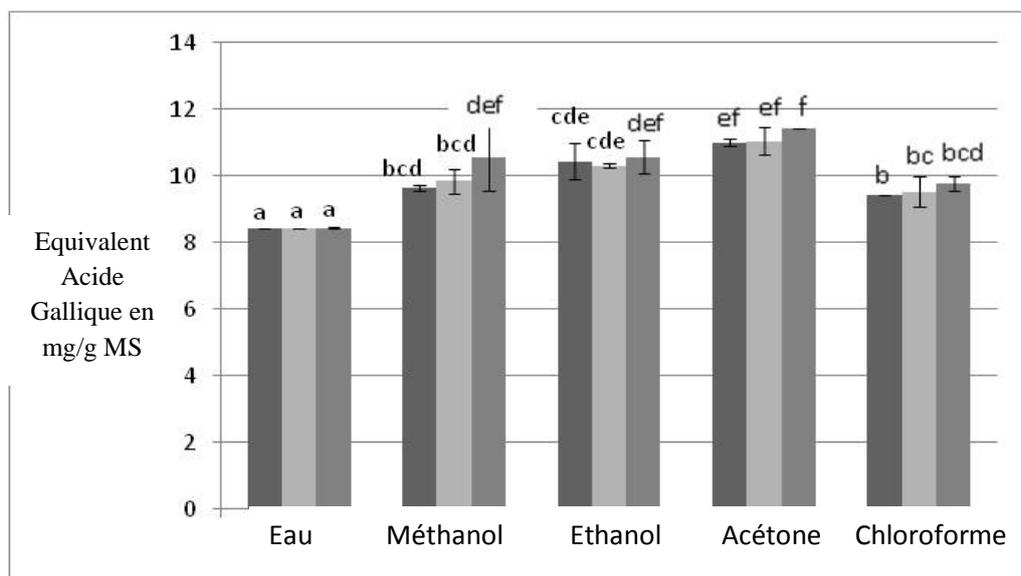


Figure 4.2 : Détermination de la teneur en polyphénols totaux, macération (noir), ultrasons (gris clair), Champ Électrique Pulsé (gris foncé) *a, b, c, d, e, f, g, h* – les mêmes lettres signifient qu'il n'y a pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

L'eau a été le solvant le moins efficace dans l'extraction des polyphénols même en combinaison avec les méthodes par CEP et US, avec des valeurs 8.42 et 8.41 ± 0 mg Eq acide gallique /g de MS pour les extraits aqueux sans prétraitement et ceux traités par US respectivement, et 8.43 ± 0.01 mg Eq acide gallique /g de MS. Le CEP a donné des effets significatifs avec les solvants : méthanol avec 10.54 ± 1 mg/g de MS Eq AG, l'éthanol avec 10.56 ± 0.5 mg Eq AG /g de MS et l'acétone avec 11.46 ± 0 mg Eq AG /g de MS. La combinaison des traitements (CEP et US) a induit une électroporation et par conséquent une rupture des parois et des membranes cellulaires provoquant ainsi la lyse cellulaire (Qin et al., 2014). De ce fait, ceux-ci facilitent la pénétration des solvants et la solubilisation des composés bioactifs (Luengo et al., 2015).

Les résultats obtenus dans notre étude diffèrent des valeurs rapportées par El fayoumi (2020), El makawy et al. (2016), Choochote et al. (2013) et Hajimahmoodi et al. (2009), respectivement 25mg, 39.4 mg, 29.1 mg et 19.15mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de *Chlorella* en suspension dans l'éthanol. Concernant les extraits aqueux de *Chlorella vulgaris*, les valeurs des phénols totaux rapportés dans la littérature varient entre 3.45 mg/g à 108.66 mg/g (Ahmed et al., 2016; Dantas et al., 2015), alors que pour les extraits méthanoliques les taux sont de 220 mg d'équivalent d'acide gallique par g de *Chlorella vulgaris* et 150 mg d'équivalent d'acide gallique par gr de *Chlorella reinhardtii* (Jayshree et al., 2016). En effet, la teneur en phénols totaux peut différer selon l'espèce algale. Par exemple, la teneur est de 22.94 à 39.34 mg équivalent acide gallique par gr de *Nannochloropsis gaditana*, *Phaedactylum tricornutum*, *Nannochloris* spp. et *Tetraselmis suecica* (Haoudjar et al., 2019) et de 11.15 mg par gr pour *Euglena tuba* (Chaudhuri et al., 2014) et de 0.287 mg par gr pour *Spirulina platensis* (Seghiri et al., 2019). Malgré la concentration des composés anti-oxydants varie selon les espèces algales, la teneur extraite dépend en majorité du type de solvant et de la méthode de l'extraction (Manivannan et al., 2012).

4.3.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Dans le cas des flavonoïdes, le choix du solvant et l'application de prétraitement a donné des résultats plus significatifs, (Figure 4.3). L'éthanol est apparu comme étant le meilleur solvant étant donné qu'il a obtenu un plus grand taux d'extraction (42.18 ± 0.01 mg Eq catéchine/ g de MS pour la combinaison éthanol/CEP). Les solvants acétone et méthanol ont aussi montré

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

leur efficacité en combinaison avec les prétraitements en donnant des valeurs satisfaisantes avec des maximum pour les combinaisons méthanol/CEP et acétone/CEP avec 42.12 ± 0 et 42.14 ± 0.005 mg d'Eq catéchine par gramme de MS respectivement. Quant au chloroforme, il représente le solvant le moins efficace malgré une légère amélioration avec les extraits prétraités.

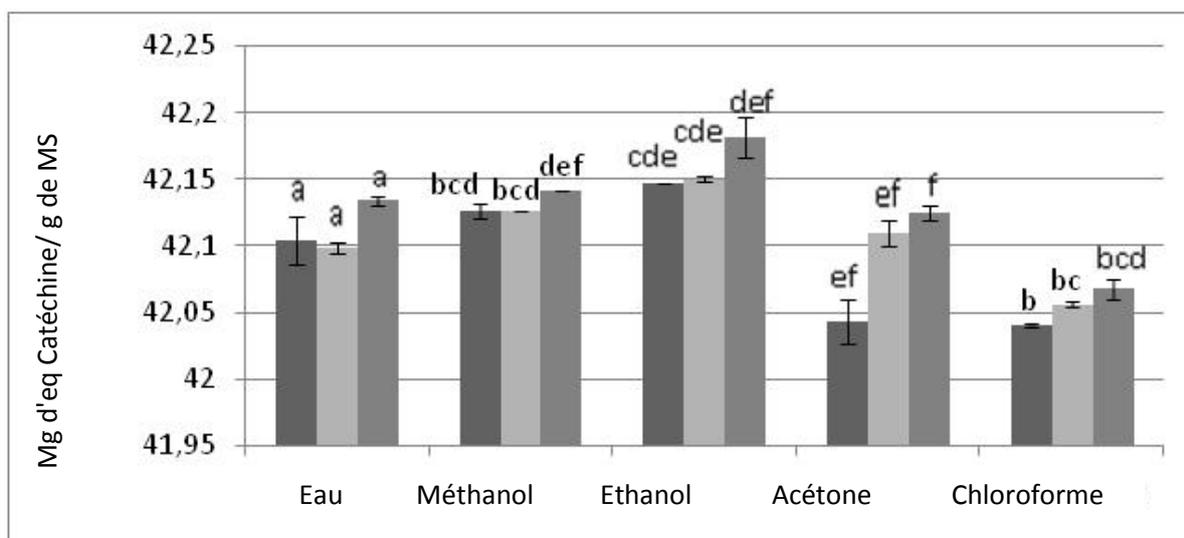


Figure 4.3 : Flavonoïdes extraits de la biomasse de *Chlorella*: macération (noir), ultrasons (gris clair), Champ Electric Pulsé (gris foncé) (a, b, c, d, e, f, g, h – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$)).

Des concentrations des flavonoïdes proches de celles obtenues dans notre étude (environ 33 mg d'équivalent catéchine par g de MS) ont été reportées pour les extraits de *Chlorella vulgaris* (El fayoumi et al., 2020; Hosikian et al., 2010). De plus, des petites teneurs ont été extraites à partir d'*Amphora spp.* en utilisant de l'éthanol (17.69 mg/g) et de l'eau (4.27 mg/g) comme solvants d'extraction.

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques, potentiellement antioxydants et piègeurs des radicaux libres (Kahkonen et al., 1999, Nijveldt et al., 2001). Différentes classes de flavonoïdes sont retrouvées dans les microalgues: isoflavones, flavanones, et flavonols

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

(Klejdus et al., 2010), montrant que les métabolites secondaires ne sont pas limités aux plantes terrestres (Annamalai et al., 2014).

4.3.4. Teneur des pigments

4.3.4.1. Chlorophylle a and b

La chlorophylle est un composé bioactif très utile, qui peut être extrait à partir des microalgues. Elle est souvent utilisée comme colorant utilisé comme antioxydant (Hosikian et al., 2010). Les Figures 4.4 et 4.5 montrent des teneurs de chlorophylles *a* and *b* extraites de *Chlorella*. Le rendement des deux types de chlorophylle a augmenté avec l'application d'un traitement physique, essentiellement pour la chlorophylle *b* utilisant le CEP comme prétraitement. En effet, l'électroporation pourrait accroître l'extraction de ces pigments. Selon les résultats obtenus, l'éthanol est le meilleur solvant pour l'extraction de la chlorophylle *a*, alors que pour la chlorophylle *b*, les meilleurs rendements ont été obtenus par l'extraction au méthanol et à l'acétone.

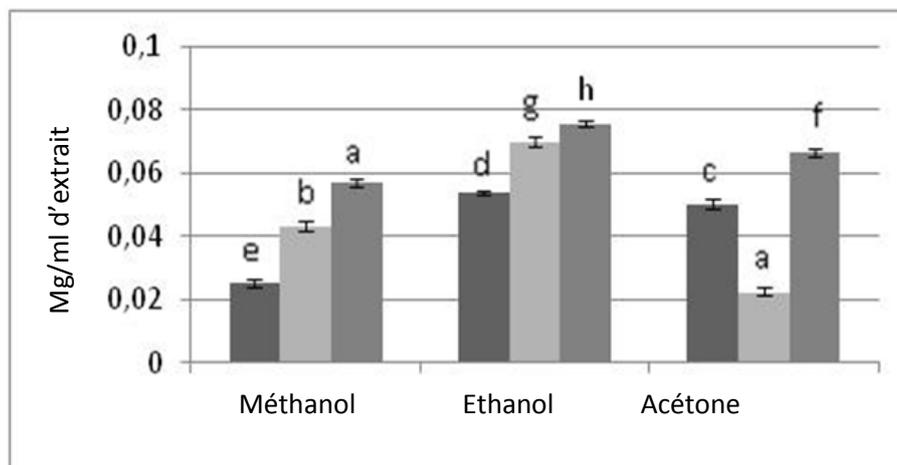


Figure 4.4 : Chlorophylle a extraite de la biomasse de *Chlorella*: macération (noir), ultrasons (gris clair), Champ Electrique Pulsé (gris foncé). *a, b, c, d, e, f, g, h* – les mêmes lettres signifient qu'il n'y a pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

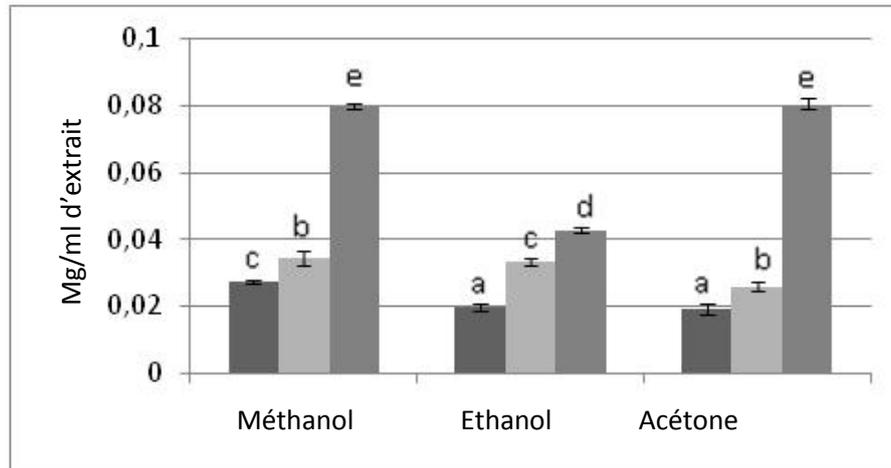


Figure 4.5 : Chlorophylle b extraite de la biomasse de *Chlorella*: macération (noir), ultrasons (gris clair), Champ Electrique Pulsé (gris foncé) *a, b, c, d, e, f, g, h* – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

Dans d'autres études, l'extraction aux solvants à deux phases en combinaison avec le CEP a permis l'extraction des pigments de *Nannochloropsis spp*, obtenant ainsi de hauts rendements sans dégradation des protéines (Paniakov et al., 2015). Le CEP est largement reporté pour son efficacité dans l'amélioration de l'extraction des pigments microalgale (; Lebovka et al., 2011; Vorobiev et Lebovka, 2008 ; Raso et Heinz, 2006). Ceci est attribué à l'accroissement de la perméation des solvants après électroporation (Paniakov et al., 2015) . Une augmentation de la conductivité électrique (Force ionique) du milieu mène à une perméabilisation plus rapide des cellules . En effet, la conductivité augmente le courant électrique à travers la suspension et par conséquent, une énergie appliquée plus élevée aux cellules (Rego et al., 2012).

4.3.4.2. Caroténoïdes Totaux

Durant les dernières années, le rôle des caroténoïdes a été mis en évidence, comme antioxydants avec des effets bénéfiques sur la santé humaine, spécialement pour la prévention des maladies chroniques, particulièrement certains cancer, les maladies cardiovasculaires et la perte de l'acuité visuelle (Fiedor and Burda, 2014; Krinsky et al., 2004; Johnson, 2002;). La teneur des caroténoïdes extraits de *Chlorella* est montrée dans la Figure 4.6. , donnant des

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

teneurs plus importantes pour le CEP pour l'éthanol et l'acétone avec 0.035 ± 0.01 et 0.034 ± 0.01 mg/ml d'extrait.

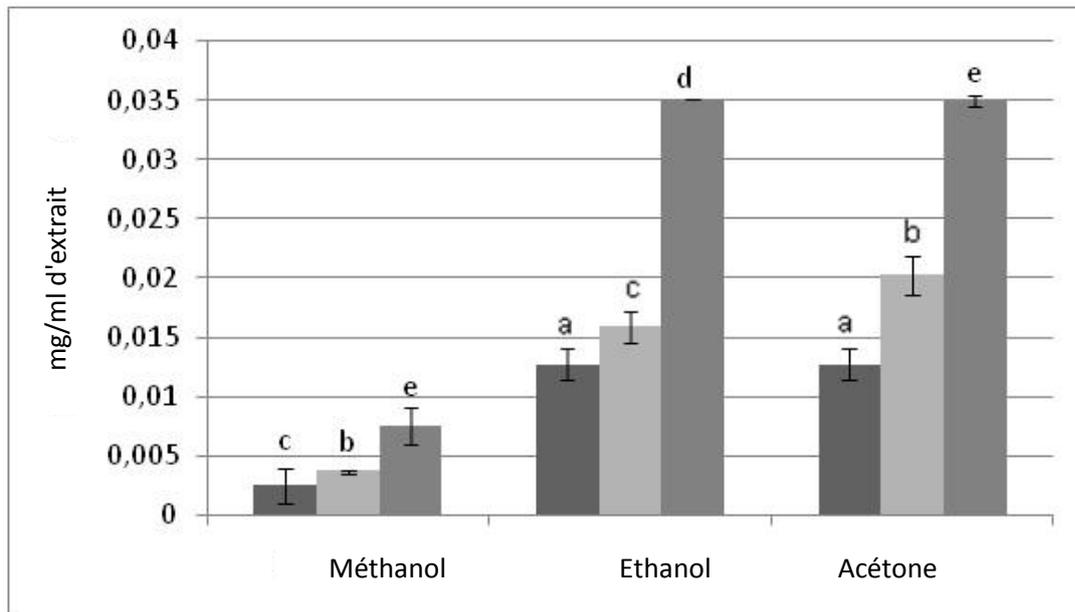


Figure 4.6 : Caroténoïdes extraits de la biomasse de *Chlorella*: macération (noir), ultrasons (gris clair), Champ Electric Pulsé (gris foncé) a, b, c, d, e, f, g, h – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

Dans ce cas, le traitement au CEP a amélioré considérablement l'extraction indépendamment du solvant utilisé. Il est noté que le méthanol a enregistré de faible résultat comparé à l'éthanol et à l'acétone. Des résultats similaires obtenus par Campenni et *al.*(2012) où 0.057 à 0.062 mg/g des caroténoïdes extraits de la *Chlorella protothecoides* ont été rapporté. Par ailleurs, Plaza et *al.*(2012), ont rapporté la supériorité de l'acétone par rapport à l'éthanol pour l'extraction des caroténoïdes de la *Chlorella vulgaris*.

Plusieurs études ont démontré que le CEP accroît le rendement de l'extraction des composés bioactifs tels que les colorants sans avoir recours à l'utilisation des solvants organiques. La perméabilisation de la membrane cellulaire provoquée par ce traitement faciliterait la perméation du solvant dans le cytoplasme et de là dissout les pigments (Luengo et *al.*, 2015). Le CEP a été la méthode la plus efficace pour l'extraction des caroténoïdes, ce qui corrobore les résultats de plusieurs études. En effet, l'extraction de la chlorophylle et des caroténoïdes en suspension dans l'éthanol chez *Spirulina* et la *Chlorella* peut ainsi être améliorée (Toepfl, 2006), jusqu'à 200%, et de 4 fois plus dans le cas de la lutéine (Luengo et *al.*, 2015).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

4.3.5. Evaluation de l'Activité antibactérienne des différents extraits

Les activités antibactériennes des extraits de *Chlorella* sont résumées dans le tableau 4.2.

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

Tableau 4.2 Activités antimicrobiennes des extraits de *Chlorella sp* exprimées en diamètres d'inhibition en (mm)

Microorganismes	Traitement	Solvants utilisés pour l'extraction					STD
		Eau	Méthanol	Ethanol	Acétone	Chloroforme	
<i>S. aureus</i>	Macération	6 ± 0 ^a	10.5 ± 0.7 ^{ab}	6 ± 0 ^a	6 ± 0 ^{ab}	6 ± 0 ^a	23.5 ± 0.7
	US	11.5 ± 0.54 ^{ab}	15.33 ± 0.57	20 ± 0	13 ± 0 ^{abc}	10 ± 0 ^{ab}	
	CEP	15.33 ± 0.57 ^{abc}	19.66 ± 0.57	24 ± 1.41	21.5 ± 0.71	24.66 ± 0.57	
<i>E. coli</i>	Macération	6 ± 0 ^a	19.25 ± 0.95 ^{cd}	21 ± 0 ^d	17.66 ± 1.25 ^c	6 ± 0 ^a	20.2 ± 0.57
	US	11.5 ± 0.54 ^b	19 ± 1 ^{cd}	20.25 ± 0.5 ^d	19 ± 1.09 ^{cd}	6 ± 0 ^a	
	CEP	11 ± 0 ^b	20.2 ± 0.44 ^{cd}	20 ± 1.41 ^{cd}	22.17 ^d	6 ± 0 ^a	
<i>P. aeruginosa</i>	Macération	9.5 ± 0.7 ^a	16.5 ± 0.57 ^{def}	15.33 ± 0.57 ^{def}	13 ± 0 ^{bcde}	11.66 ± 0.57 ^{abc}	9 ± 0
	US	10.5 ± 0.7 ^{ab}	16 ± 1 ^{efg}	17.5 ± 0.7 ^{efg}	12.33 ± 0.57 ^{abcd}	8.5 ± 0.7 ^a	
	CEP	11 ± 0 ^{ab}	19.66 ± 0.57 ^{gh}	20.5 ± 0.57 ^{fgh}	16.33 ± 0.57 ^{defg}	22 ± 0 ^h	
<i>L. innocua</i>	Macération	6.75 ± 0.95 ^a	11.33 ± 0.57	10.75 ± 0.5 ^{bc}	10.2 ± 0.44 ^b	30 ± 0 ^f	20.5 ± 0.7
	US	7.8 ± 0.44 ^a	11 ± 0.81 ^{bcd}	11.25 ± 0.95 ^{bcd}	12.5 ± 0.7 ^{bcde}	36 ± 0 ^g	
	CEP	13.75 ± 0.95 ^c	13.66 ± 0.57 ^{de}	11.5 ± 0.57 ^{bcde}	12.66 ± 0.57 ^{cde}	40 ± 0 ^h	
; <i>B. cereus</i>	Macération	6 ± 0 ^a	16 ± 0 ^{bc}	12.66 ± 0.57 ^b	15.5 ± 0.7 ^{cd}	15.5 ± 0.7 ^{bc}	23 ± 0
	US	8 ± 1 ^a	17 ± 0 ^{cde}	20.5 ± 0.7 ^{efg}	18 ± 0 ^{cde}	19 ± 1.41 ^{cdef}	
	CEP	8 ± 1 ^a	20 ± 0 ^{efg}	23 ± 1.41 ^g	20 ± 0 ^{defg}	22 ± 0 ^{fg}	

US : ultrasons; CEP : Champs Electrique Pulsé; STD: Standard

a, b, c, d, e, f, g, h – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

Les diamètres d'inhibition obtenus avec *Staphylococcus aureus* ont été plus larges en association avec les traitements physiques ($p < 0.05$), et l'effet du CEP a été noté généralement comme élevé. L'effet associé aux solvants est marqué par le chloroforme et l'éthanol avec 24 mm de diamètre d'inhibition, suivis par l'acétone et le méthanol avec 21.5 et 15.33 mm, respectivement. En combinaison avec les ultrasons, l'extrait éthanolique a obtenu les zones d'inhibition relativement élevées (20 mm de diamètre). Cependant, les zones d'inhibition associées à l'extrait aqueux étaient comparativement plus faibles. Ces résultats suggèrent que les solvants de polarité moyenne à élevée est meilleure pour l'extraction des composés antibactériens des microalgues. .

Pour *Escherichia coli*, les diamètres d'inhibition ont varié entre 6 à 22 mm, avec de plus larges zones obtenues pour les traitements combinés éthanol/US, éthanol/macération et acétone/CEP. Il a été noté que le chloroforme a montré une des diamètres d'inhibition importantes, en macération en inhibant *Listeria innocua* et en combinaisons, chloroforme/CEP et éthanol/PEF avec des zones plus importantes contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus* respectivement,.

Plusieurs auteurs ont reporté les effets inhibiteurs des extraits de *Chlorella* sur ces espèces bactériennes, obtenant des zones d'inhibition similaire à nos résultats, dans un intervalle de diamètre entre 8 et 38 mm (Adhoni et al., 2016; Syed et al., 2016; Fadoul et al., 2014; Annamalai et al., 2012). Les composés qui pourraient être responsables des effets directs sur la croissance bactériennes ont: les composés phénoliques, les polyphénols, les acides gras, les lipides, les pigments et les sucres (Pradhan et al., 2014; El Bakhy et al., 2008). Par ailleurs, les flavonoïdes, triterpénoïdes, amides, et les alcaloïdes seraient aussi responsables d'affecter la croissance des bactéries et leur métabolisme (Ghasemi et al., 2004, Yu et al., 2009).

Les pigments comme les chlorophylles *a* et *b* et les caroténoïdes peuvent aussi être des inhibiteurs de croissance bactérienne (Jaya et al., 2007; Mahanom et al., 1990). Les résultats obtenus dans cette étude montrent clairement que les prétraitements augmentent l'extraction des substances antibactériennes de *Chlorella*. La structure des parois cellulaires et leur composition influencent l'efficacité de la méthode de rupture cellulaire (Günerken et al., 2015) et augmente la libération des composés bioactifs des microalgues.

Les parois cellulaires des microalgues peuvent être divisées en deux groupes: basse et haute résistance. Selon Dunker and Wilhelm (2018), les parois de *Chlorella* appartiennent à cette dernière. Cependant, la sonication est convenable aux espèces possédant des parois moins résistantes (Alhattab et al., 2019), étant donné que dans la présente étude, le CEP apparaît

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

comme étant plus efficace que les US pour la rupture des cellules de *Chlorella*. De plus, le transfert de masse est augmenté par la chaleur qui dégrade les composés d'intérêt et dénature les protéines. Les technologies innovantes comme les hautes pressions hydrostatiques (HHP), les US et le CEP ont été utilisées pour améliorer le transfert de masse tout en évitant les effets thermiques indésirables (Weltin-Chanes et al., 2003). Cependant, il est évident que les traitements physiques appliqués dans cette étude affectent les activités antibactériennes des différents extraits à des degrés considérables; menant à des réponses variant selon l'espèce bactérienne.

4.3.6. Evaluation de l'Activité antifongique des différents extraits

L'inhibition de la croissance de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevesiae*, et *Aspergillus niger*, est regroupée dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Activités antifongiques des extraits de *Chlorella sp* exprimées en diamètres d'inhibition en (mm)

Microorganismes	Traitement	Solvants utilisés pour l'extraction					STD
	physique	Eau	Méthanol	Ethanol	Acétone	Chloroforme	
<i>C. albicans</i>	Soaking	6 ± 0 ^{ab}	20.2 ± 0.44 ^{cd}	25.5 ± 0.7 ^{cd}	20.33 ± 1.03 ^c	AC	21.5 ± 0.7
	US	8 ± 0 ^{ab}	21.66 ± 1.15 ^c	22.33 ± 1.15 ^c	20.25 ± 0.5 ^b	AC	
	PEF	8 ± 0 ^{ab}	29 ± 0 ^{cd}	29 ± 0 ^d	23.33 ± 0.57 ^{cd}	AC	
<i>S. cerevisiae</i>	Soaking	6 ± 0 ^b	20 ± 1 ^c	26 ± 1.41 ^d	23.25 ± 0.5 ^{cd}	AC	20.5 ± 0.7
	US	8 ± 0 ^b	20.5 ± 0.57 ^c	25.5 ± 0.7 ^d	23.25 ± 0.57 ^{cd}	AC	
	PEF	8 ± 0 ^b	23.6 ± 1.5 ^c	26.5 ± 0.7 ^d	24.75 ± 0.95 ^{cd}	AC	
<i>A.niger</i>	Soaking	8 ± 0 ^a	19 ± 1.15 ^{de}	21 ± 1.41 ^{de}	12 ± 0 ^c	AC	20.66 ± 0.57
	US	8 ± 0 ^a	18.5 ± 1 ^d	18.66 ± 1.15 ^d	13 ± 0 ^c	AC	
	PEF	8 ± 0 ^a	21 ± 0 ^{de}	14 ± 0 ^c	24.75 ± 0.95 ^f	AC	

US : ultrasons; CEP : Champs Electrique Pulsé; STD: Standard, AC: aucune croissance *a, b, c, d, e, f, g, h* – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

De très forts inhibiteurs des champignons auraient été extraits par le chloroforme, alors que l'eau ne contiendrait pas de substances antifongiques. Les combinaisons méthanol/CEP et éthanol/CEP ont obtenu une grande inhibition sur *Candida albicans*. Pour *Saccharomyces cerevesiae*, les prétraitements n'ont pas montré un effet significatif sur l'inhibition de l'activité

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

fongique. L'éthanol et l'acétone sont apparus comme meilleurs pour l'extraction des substances anti-fongiques. Par ailleurs, pour *Aspergillus niger*, la plus importante inhibition a été obtenue avec la combinaison acétone/CEP.

L'extrait de *Chlorella* a été rapporté par plusieurs auteurs comme un inhibiteur de croissance puissant de *Candida albicans*, avec des diamètres d'inhibition similaires à ceux obtenus dans cette étude (Ahmed et al., 2016). Les extraits de *Chlorella vulgaris* ont donné une inhibition assez remarquable pour *A. niger* and *C. albicans* (Ghasemi et al., 2004). Dans l'étude d' Amaro et al. (2011), l'activité anti-fongique a été observée seulement pour les extraits méthanoliques, alors que Salem et al. (2014) ont conclu que les extraits méthanoliques n'ont pas inhibé *Aspergillus fumigatus* (RCMB 02564), *Candida albicans* (RCMB 05035), *Geotrichum candidum* (RCMB 05096) et *Trichophyton mentagrophytes* (RCMB0925). Ces résultats contradictoires pourraient être dus aux différences des espèces algales.

Nous avons obtenu des effets inhibitoires importants, comparés aux diamètres d'inhibition de moins de 6mm observés par Adhoni et al. (2016) pour les extraits de *Chlorella vulgaris* par rapport à *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Plusieurs auteurs ont étudié l'inhibition de la croissance fongique des extraits de microalgues, incluant au moins un pathogène (Vehapi et al. 2018, De Morais et al. 2015; Salem et al. 2014; Amaro et al. 2011; Abo-State et al. 2015). Les composés bioactifs dans ces extraits pourraient être simultanément antibactériens, antifongiques, antiviraux, et antioxydants (Pérez et al., 2016).

En conclusion, le CEP a été le traitement le plus efficace pour améliorer l'extraction aux solvants des substances antimicrobiennes à partir de *Chlorella sp*.

4.3.7. Evaluation de l'Activité antioxydante des différents extraits

Les activités antioxydantes des différents extraits obtenus par plusieurs solvants, à l'aide des traitements physiques sont représentées dans le tableau 4.4.

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

Tableau 4.4 Activité antioxydante exprimée en % d'inhibition

	DPPH			ABTS		
	Macération	US	CEP	Macération	US	CEP
Eau	35,85±1,56	44,06±0,66	67,02±0,67	44,44±0 ^b	44,72±1,02 ^b	52,92±1,3 ^b
Méthanol	38,70±0,29	33,33±0	48,26±0,01	37,29±0,29 ^b	48,35±0,75 ^b	50,65±0,92 ^b
Ethanol	41,46±0,39	66,43±0,32	84,41±0,28	47,32±1,31 ^b	71,44±0,02 ^c	80,60±0,34 ^{cde}
Acétone	78,01±0,9	79,45±0	82,01±0,83	91,37±0,81 ^{cde}	95,41±0,88 ^e	96,95±1,29^e
Chloroforme	6,59±0,1	8,09±1,4	10,00±1,37	6,59±0,2 ^a	8,07±1,6 ^a	10,35±0,7 ^a
Quercétine	26,44±1,4			43,49±1,33		
Catéchine	29,66±0,03			57,27±1,22		
BHT	47,23±0,02			37,61±1,13		

US : ultrasons; CEP : Champs Electrique Pulsé; *a, b, c, d, e* – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

En général, les extraits de la biomasse fraîche de *Chlorella* sujette aux US ou au CEP, possèdent une activité antioxydante considérable comparé à ceux obtenu sans traitements ($p < 0.05$). Les combinaisons CEP/éthanol et CEP/acétone ont représenté une importante efficacité comparée aux autres traitements.

Ces résultats corroborent à ceux reportés par El fayoumi *et al.* (2020) où la décoloration du DPPH était de 85.62% avec les extraits de *Chlorella vulgaris*. Cependant, les valeurs pour *Chlorella spp.* ont été de 78% pour l'acétone et seulement et de 18%, 10%, et 3%, respectivement, pour l'éthanol, le chloroforme et le méthanol (Rajendran *et al.*, 2014). Par ailleurs, 50% d'inhibition ont été observé pour les extraits aqueux et méthanoliques de *Chlorella spp* après traitement aux US (Stirk *et al.*, 2020). L'activité antioxydante de *Chlorella vulgaris* a avoisiné les 68.5% pour les extraits aqueux (Dantas *et al.*, 2015) et 0.74% pour les extraits éthanoliques prétraités aux US (Wang *et al.*, 2010). Cette variabilité est attribuée aux espèces algales, au choix du solvant et à la méthode d'extraction. En plus, les fortes activités observées dans cette étude pourraient être dues aux concentrations des phénols et des flavonoïdes dans les différents extraits (Dash et Padhi, 2012; Ahmed *et al.*, 2016). Leur présence pourrait contribuer à capter les radicaux libres de manière individuelle ou en action synergique (Klejdus *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les extractions aux solvants assistées aux US et au CEP, particulièrement ce dernier, augmentent le rendement des composés bioactifs à partir de la biomasse fraîche des microalgues. De nombreuses recherches ont examiné les traitements physiques afin d'accroître le rendement des biocomposés tels que les antioxydants des algues (Stirk *et al.*, 2020; Grimi *et al.*, 2014; Halim *et al.*, 2013; Gerde *et al.*, 2012; Barba *et al.*, 2012;).

Chapitre 4 Effets des us et du cep sur les extractions par solvants de composés bioactifs à partir de *Chlorella sp*

4.4. Conclusion

La présente étude confirme que la microalgue verte *Chlorella sp.* est très riche en composés bioactifs à utilisations potentielles en pharmacologie et dans le domaine des nutraceutiques. Ces composés incluent des inhibiteurs de microorganismes et des antioxydants. L'extraction aux solvants assistée aux US et au CEP est accrue comparée à une macération simple.

L'acétone et l'éthanol sont des solvants utiles pour l'obtention des extraits donnant des résultats importants dans différents tests d'activités biologiques. Cependant, l'éthanol pourrait être le plus approprié car il possède le statut "reconnu comme sécuritaire" (GRAS: Generally Recognized As Safe). Les futurs travaux devraient identifier les composés algaux qui sont directement responsables des activités antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes

**CHAPITRE 5:EFFETS DES ULTRASON, DU
CHAMP ELECTRIQUE PULSÉ ET DE LA
CONGÉLATION/DÉCONGÉLATION SUR LE
PROFIL LIPIDIQUE DE *LACHLORELLA SP***

Chapitre 5 : Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de *Chlorella sp*

5.1. Introduction

Les microalgues sont reconnues pour être une importante source de lipides et particulièrement les acides gras essentiels (AG) et des lipides à intérêt potentiel pour le développement de nouveaux produits fonctionnels (Spolaore et al., 2006 ; Radwan, 1991). Ces microorganismes peuvent directement produire des acides gras polyinsaturés (AGPI) et peuvent être utilisés pour la consommation humaines et animales (Kassis et al., 2010; Mata et al., 2010; Atalah et al. 2007;). Les AGPI sont reconnus à leur tour pour prévenir le développement de certaines maladies chroniques comme le cancer, les maladies cardiaques et peuvent être utiles pour améliorer les conditions des patients atteints de maladies inflammatoires, tels que l'arthrite, en réduisant les niveaux de triglycérides ainsi que diminuer la pression artérielle (Hibbeln et al., 2006). En conséquence, les AGPI et leurs dérivés et analogues sont d'importants nutraceutiques pouvant être impliqués dans les industries agro-alimentaires (Barba et al., 2012; McClements et al., 2009;). L'inconvénient majeur pour extraire ces AGPI est la paroi rigide qui agit comme barrière limitant l'extraction de ces composés intracellulaires (Bernaerts et al., 2018; Kim et al., 2016). Plusieurs recherches se sont basées sur le développement de méthodes pour l'extraction à partir de la biomasse algale fraîche sous forme de pâte plutôt que d'utiliser une biomasse séchée ou lyophilisée (Biller et al., 2013; Cho et al., 2013; Lee et al., 2013), englobant un rendement optimal tout en baissant la consommation d'énergie, réduisant les coûts et les purification ultérieures (Subhash et al., 2017; Chatsungnoen et Chisti 2016; Kim et al., 2016). En général, l'extraction des lipides à partir de la biomasse fraîche est préférable pour des applications industrielles (Halim et al., 2014; Yap et al., 2014).

Les extractions conventionnelles à l'aide de solvants organiques telles que le mélange chloroforme– méthanol 2:1 (v/v), macération, percolation et soxhlet, ont souvent été utilisées pour l'extraction des lipides à partir des espèces de microalgues (Barba et al., 2014). Cependant, ces techniques impliquent l'utilisation de larges quantités de solvants et induisent le risque de dénaturation ou la transformation des molécules d'intérêt (Wang et al., 2006).

Par conséquent, les prétraitements visent à affaiblir et parfois à rompre les parois cellulaires ce qui permettrait la libération des composés intracellulaires dans le milieu liquide (Concas et al., 2015). Les techniques de rupture cellulaire communément utilisées sont: l'hydrolyse

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de *Chlorella sp*

chimique, congélation/décongélation, hautes pressions hydrostatiques, fraisage, ultrasons, microondes et le champ électrique pulsé (Zhang et al., 2020). La congélation/décongélation est une méthode souvent recommandée comme la plus simple et efficace et largement utilisée pour la lyse cellulaire. Toutefois, la sonication est l'une des technologies les plus employées car ne nécessite pas de solvants chlorés et aucun équipement compliqué. Le principe général de la technique des ultrasons (US) est les ondes formées à l'intérieur des cellules et les bulles de cavitation qui en se rompant génèrent des ondes de choc qui à leur tour provoquent la rupture des parois cellulaires (Cesaro et al., 2014; Geciova et al., 2002). L'application des US réduit la quantité des solvants d'extraction et la consommation d'énergie comparée aux méthodes conventionnelles (Chemat et al., 2011). Par contre, le champ électrique pulsé (CEP) est une technique basée sur l'application de courtes pulsations électriques (allant de quelques nanosecondes à quelques millisecondes) à haut voltage (de 100V/cm jusqu'à 80 kV/cm) sur un produit placé entre deux électrodes; la polarisation de la membrane mène à la perméabilisation et la rupture des tissus cellulaires (Toepfl et al., 2014). Ainsi, les procédés de transfert de masse et de chaleur peuvent provoquer des changements indésirables dans la qualité nutritionnelle des produits à traiter (Barbosa-Cánovas et Altunakar, 2006). Toutefois, Il a été reporté que le CEP appliqué sur la biomasse fraîche est plus économique et prometteur comparé aux extractions lipidiques des biomasses sèche (Ibn Azmi et al., 2020).

L'objectif de cette étude, est l'évaluation de différents prétraitements pour l'amélioration des extractions des lipides à partir de *Chlorella*. La macération, la congélation/décongélation (CD), les Ultrasons (US), le Champ Electrique Pulsé (CEP), en application seule ou en combinaison, ont été testés pour leur capacité à provoquer la rupture cellulaire afin de faciliter l'extraction des lipides selon une méthode modifiée de Bligh et Dyer (Binnal et Babu, 2017). L'étude a été effectuée utilisant la biomasse de *Chlorella sp* sous sa forme fraîche, après récolte. Le rendement des extractions a été évalué ainsi que les profils des acides gras obtenus ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse.

5. 2. Matériel et méthodes

5.2.1. Espèces/ Conditions de Culture / Récolte

L'espèce utilisée est la même décrite dans la section 3.2. du chapitre 3, cultivée et récoltée selon les conditions et les étapes décrites dans la même section.

5.2.2. Extraction des Lipides

La biomasse fraîche obtenue a été divisée en plusieurs portions pour les prétraitements.

- **Sans prétraitement (SP)** ou Extraction par solvant les composants bioactifs sont directement extraits à partir de la biomasse fraîche.

La biomasse prétraitée a été sujette à une procédure d'extraction des lipides dans le but d'effectuer les effets des techniques et de leur combinaison sur la quantité des lipides obtenue. La teneur des lipides a été évaluée par une méthode modifiée de Bligh and Dyer (Binnal et Babu, 2017), où 2ml de méthanol, et 4ml de chloroforme sont ajoutés à la biomasse fraîche (300 mg). Le mélange a été mixé à l'aide d'un vortex (Cyan CL001, Belgium) pendant 2min pour homogénéiser la solution. Par la suite, 1ml de chloroforme a encore été ajouté puis le mélange est vigoureusement agité pendant 1 min. Enfin, 1.8 ml d'eau distillée a été ajouté à la mixture puis mélanger au vortex pendant 2min, obtenant à la fin de la procédure, une solution avec 2couches. Cette dernière a été centrifugée 2fois à 3500tr/min pendant 15minutes pour séparer les 2couches. La couche supérieure chloroformique contenant les lipides a été filtrée en utilisant l'appareillage Buchner à travers du papier filtre Whatman No. 1 vers une fiole en verre pesée au préalable (P_1). La couche restante est encore extraite 3fois. Toutes les phases de chloroforme sont regroupés (P_2), puis le solvant est évaporé.

La teneur en lipides P (g) est calculée à l'aide de l'équation (5.1).

$$P = P_2 - P_1 \quad (5.1)$$

Après l'élimination du solvant, le rendement des lipides (%) est déterminée de façon gravimétrique utilisant l'équation (5.2).

$$\text{Rendement en lipides} = \frac{\text{poids des lipides}}{\text{poids de la biomasse}} \times 100 \quad (5.2).$$

- **Congélation/Décongélation (CD)**: La biomasse fraîche obtenues après centrifugation a été sujette à une congélation à (0°C) pendant 24heures, puis laissée à décongeler à température ambiante (20°C).

-Prétraitement aux Ultrasons (US)

Le sonicateur (Wiseclean, Wisd, WUC-D06H) utilisé pour assisté l'extraction, est un simple bain aux dimensions 29 x 15x 15cm³, avec une capacité de 6 cm³, délivrant une fréquence maximale de 40 kHz. Les conditions optimales des paramètres appliqués ont été de 40 KHz pendant 20 min, choisis après des essais préalables de combinaisons de traitements à différentes fréquences et différents temps, variant entre 10 et 40 kHz (Δ kH = 10 kH) et 5 à

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de *Chlorella sp*

30min ($\Delta t = 5$ min), respectivement. L'échantillon frais de 300mg est dilué dans 5ml d'eau distillée, puis soumis aux ultrasons selon les conditions optimales. Enfin, l'extraction a été effectuée selon les étapes décrites plus haut

- Prétraitement au Champ Électrique Pulsé (CEP)

Une quantité de 10 g de la biomasse fraîche obtenue après centrifugation, puis rincée 2fois avec de l'eau distillée, enfin suspendu dans 1L de tampon phosphate de sodium (0.025M, pH 5.8) afin d'obtenir une conductivité électrique initiale de 1.877 mS/cm.

Le prétraitement de *Chlorella sp* a été appliqué à l'aide d'un système de CEP, décrit dans le chapitre 4 précédent dans la section 4.2.2.1

La biomasse a été prétraitée 3fois, centrifugée pour éliminer le tampon, lavée 2fois à l'eau distillée. Enfin, une quantité de 300mg a été soumise à l'extraction par solvant.

-Combinaison CEP/US. La biomasse obtenue après le prétraitement au CEP, a été diluée dans de l'eau puis traitée aux US, selon les mêmes conditions décrites précédemment dans partie ultrasons(US).

- Combinaison CEP/ CD. La biomasse prétraitée au CEP, a été soumise à un cycle de congélation/décongélation

- Combinaison CD / US. Une quantité de biomasse fraîche ayant subi un cycle de congélation/décongélation, a été traitée aux US par la suite.

-Combinaison CEP/CD/US. La biomasse fraîchement récoltée, a subi d'abord un traitement au CEP. Après élimination du tampon et lavage, la biomasse a été congelée puis décongelée, puis traitée aux US.

Les extractions pour tous les échantillons après les différents prétraitements, seuls ou en combinaisons, sont effectuées selon les étapes décrites plus haut dans la section extraction par solvant.

5.2.3. Caractérisation des acides gras

Le profil des acides gras de *Chlorella* est déterminé par chromatographie en phase gazeuse (GC, CHROMPACK CP 9002, Paysbas) sous des conditions spécifiques. Une méthylation est appliquée pour convertir les acides gras en estersméthyliques d'acides gras correspondants (FAME) selon la méthode de Wolf, (1968) qui consiste à mettre 0,2 g de matière grasse extraite précédemment selon les différentes techniques énumérées dans des tubes à sceller, ensuite 0,5 mL de méthanol à 0,5 % d'acide sulfurique sont ajoutés. Enfin, porter les tubes à sceller à 140°C dans un bain à sec pendant 2 heures. La séparation des FAME est conduite à

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de *Chlorella sp*

l'aide d'une colonne de chromatographie capillaire (DB-23, 50% Cyanopropyl, 30 m x 0.32 mm ID; épaisseur 0.25 μm). Les méthylesters sont injectés (SPLIT 1/100 injector) et détectés à l'aide d'un détecteur FID à une température de 250°C. Un mélange de standards de FAME (99% de pureté obtenus de GLC, sigma Co.) a été utilisé pour l'identification des acides gras majeurs.

5.2.4. Analyses statistiques

Les valeurs obtenues sont présentées en moyennes \pm Ecart type sur des analyses effectuées en triplicate. Une Analyse de la variance à une variable (ANOVA) a été effectuée ajoutée à un test de Turkey. Les Différences avec une probabilité < 0.05 sont considérées comme significatives. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel statistique R version 3.0.2 (R Core Team, 2013).

5.3. Résultats et Discussion

5.3.1. Rendement de l'extraction

Chlorella sp a été utilisée pour l'étude de sa teneur en lipides et la composition en acides gras, après avoir été soumise à des différents traitements: Ultrasons (US), Champs Électrique Pulsé (CEP), Congélation-Décongélation (CD), et les combinaisons CD/US, US/CEP, CEP/CD, CEP/CD/US. Les résultats sont montrés dans la Figure 5.1

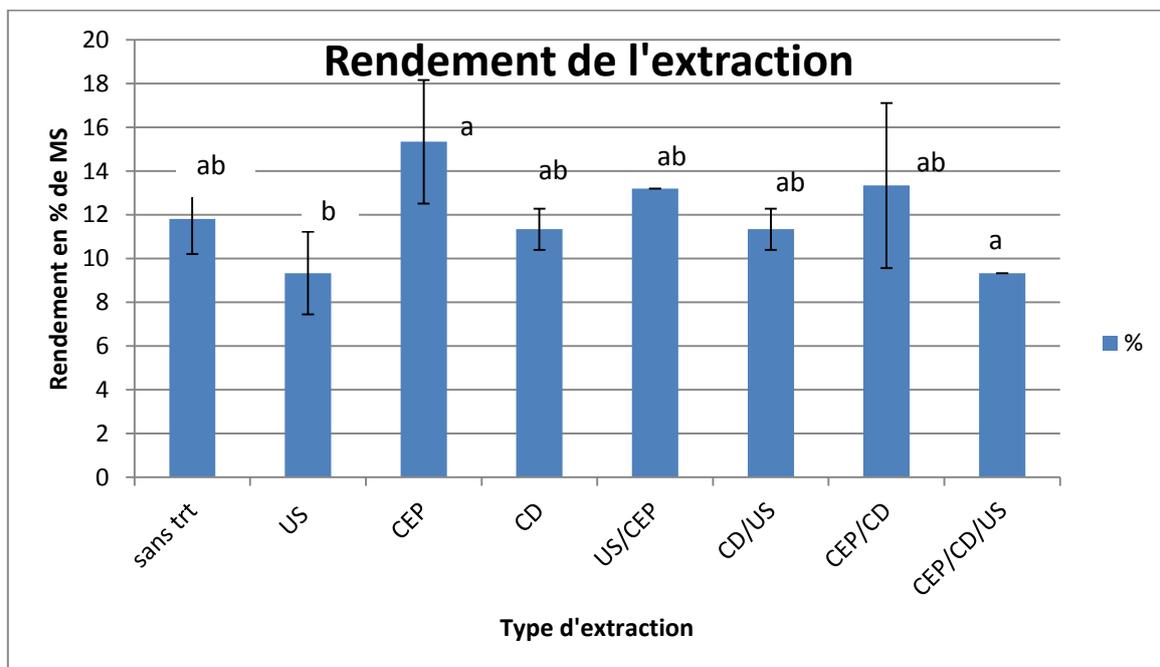


Figure 5.1 : Rendement de l'extraction des Lipides

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de *Chlorella sp*

Selon la Figure 5.1 qui montre le rendement d'extraction des lipides totaux de la microalgue *Chlorella sp* a varié de 9.3 à 15.33 %. L'extraction des lipides sans aucun traitement, avec une simple macération, a donné seulement 11.8% de rendement. Ces résultats corroborent à ceux reportés par Krishnan et al. (2019), Amin et al. (2019) et Hosseinizand et al. (2017) qui ont obtenu 10.9, 10.7 et 10.63%, respectivement de rendement des lipides totaux à partir de *Chlorella sp* par la méthode conventionnelle de Bligh et Dye. Par ailleurs, Matos et al. (2016) et Abdo et al. (2015) ont rapporté 12% des lipides totaux chez *Chlorella vulgaris*. Nos résultats sont différents de ceux observés dans les travaux de Phukan et al. (2011) où 28% des lipides ont été recensés. Ce qui reste différent des teneurs obtenues par Aaronson et al. (1980) avec 26%, Materassi et al. (1980) et Trubachev et al. (1976) avec des teneurs variant entre 15-27% et 14-22%, respectivement pour le genre *Chlorella*. Par ailleurs, Belkoura et al. (1997) ont rapporté des teneurs en lipides chez *Chlorella sorokiniana* oscillant entre 13,2 et 24,8 % de matière sèche.

La composition de la biomasse algale dépend des conditions de culture et d'autres facteurs complexes, et peut aussi varier à l'intérieur de la même espèce (Amin et al., 2019). Un rendement d'extraction de 11.33% a été obtenu après l'application de la congélation/décongélation. Cette baisse de rendement observée pourrait être due à la température de la congélation, qui a causé la formation de cristaux qui ont déshydraté l'échantillon. Ce processus pourrait avoir causé des dommages sur la membrane cellulaire rendue plus poreuse après augmentation du volume de l'eau après congélation, cependant, la paroi cellulaire n'est pas encore rompue (Lee et al., 2017; Guldhe et al., 2014; Lee et al., 2012;).

L'application des ultrasons (US) a donné le rendement le plus bas comparé au contrôle (macération simple) (9.33 % contre 11.8%). De plus, le rendement d'extraction peut aussi être observable pour tous les prétraitements en combinaison avec les Ultrasons: CEP (15.33%) contre US/ CEP(13.2%), CEP/CD (13.33%) contre CEP/CD/US (9.33%).

Nos résultats sont dans les mêmes optiques que ceux rapportés par Prommuak et al. (2012) qui ont aussi obtenu une réduction en rendement d'extraction des lipides chez *Chlorella vulgaris* observé après sonication. Mais, restent différents des travaux de Rokicka et al. (2020), Tantichantakarum et al. (2019), Araujo et al. (2013) et Zheng et al. (2011) qui ont reporté chez *Chlorella vulgaris*. des rendements d'extraction des lipides assistée par US plus de 26.26 ; 15; 52.5 et 15%, respectivement. De nombreux auteurs tels que Cravotto et al. (2008), Lee et al. (2010), Ranjan et al. (2010), Prabakaran and Ravindran (2011) et Adam et

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de *Chlorella sp*

al. (2012) aussi ont observé une augmentation des rendements d'extraction des lipides après sonication comparé aux méthodes conventionnelles.

Il a été démontré que la rupture des bulles générées par les ondes ultrasoniques causent un échauffement local qui accélère le phénomène de dégradation. En conséquence, la baisse des rendements obtenus dans ce travail pourrait être due à l'augmentation des temps d'exposition dans les différentes méthodes, associée à la dégradation des lipides pendant la combinaison des traitements (Nogueira et *al.*, 2018, Jaechke et *al.*, 2017). Aussi, d'après Naghdi et *al.* (2016), l'exposition prolongée à la sonication, peut produire des radicaux libres qui pourraient détériorer la qualité des lipides par phénomène d'oxydation.

Ces différences pourraient aussi être expliquées par le choix du milieu utilisé dans la sonication, qui est l'eau dans cette étude, qui possède une basse viscosité comparée aux autres solvants. La préoccupation principale pour le prétraitement aux US est la sélection des paramètres (fréquence, énergie consommée, temps de traitement). Une augmentation significative dans la température, une dénaturation des protéines et la formation de mousse, sont remarqués après une intense sonication (Matrinez - guerra et *al.*, 2014; Ma et *al.*, 2014; Adam et *al.*, 2012). Par ailleurs, Yao et *al.* (2015) ont montré un effet de rupture cellulaire après une sonication dépassant les 5 minutes de traitement.

Le prétraitement au CEP de *Chlorella sp*, a significativement amélioré le rendement d'extraction obtenant entre 9.33 et 15.33% comparé au contrôle (Macération simple) avec 11.8%. En effet, un rendement maximum de 15.33% a été observé avec l'application du CEP, suivi par la combinaison CEP/CD avec (13.33%), indiquant l'efficacité du CEP comme méthode pour la rupture cellulaire. Les résultats obtenus pour l'application du CEP, corroborent à ceux reportés par Canelli et *al.* (2022), Leonhardt, (2020), Guo et *al.* (2019), Kempkes et *al.* (2015), Eing et *al.* (2013), Zbinden et *al.* (2013) qui aussi ont observé une augmentation significative dans l'extraction des lipides. D'autres auteurs ont conclu que le CEP peut être une technologie utile pour améliorer et augmenter le rendement des lipides extraits des espèces de microalgues (Silve et *al.*, 2018a; Foltz, 2012; Flisar et *al.*, 2014; Sheng et *al.*, 2011),

Le traitement au CEP induit la perméabilisation des membranes, qui pourrait avoir facilité la pénétration des solvants (Silve et *al.*, 2018). Bien que cette technologie ait prouvé la facilitation de l'extraction, indiquant un effet potentiel sur la paroi cellulaire, la desintégration des microalgues en raison de l'augmentation de surface de contact durant le prétraitement

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélationsur le profil lipidique de *Chlorella sp*

causant ainsi l'amélioration de l'extraction des composés intracellulaires (Cho et *al.*, 2012, Martinez guerra et *al.*, 2014). Toutefois, il reste incertain comment l'extrahibilité des lipides peut être améliorée si la paroi cellulaire peut agir en tant que barrière. Sa dégradation par des enzymes endogènes autolytiques après un traitement au CEP pourrait par la suite faciliter l'interaction des solvants. Comme un phénomène d'autolyse qui pourrait accélérer la perméabilisation de la membrane cellulaire après l'application du CEP (Silve et *al.*, 2018), le CEP accroît l'extrahibilité des lipides en déclenchant la dégradation autolytiques de la cellule. (Canelli et *al.*, 2022).

De nombreuses espèces de microalgues possèdent un taux élevé de lipides entre 20–50% de MS. L'espèce de *Chlorella* utilisée dans cette étude a observé seulement 11.8% pour l'extraction conventionnelle. Cependant, il est possible d'augmenter le taux de concentration de la teneur en lipides en optimisant les facteurs de croissances comme le contrôle du niveau d'azote, l'intensité lumineuse, la température, et la concentration en CO₂ (Battacharya et *al.*, 2016). Selon Araujo et *al.*, (2013) la modulation de la salinité du milieu de croissance peut être utilisé pour atteindre un rendement lipidique plus important

5.3. 2. Profil en acides gras

Les résultats présentés dans le tableau 3.1 et la figure 3.2 montrent les profils en acides gras extraits (Annexe 09) pour chacune des méthodes utilisées seule ou en combinaison, appliquées en prétraitement avant extraction. Des différences significatives ($p < 0.05$) ont été observés dans la variabilité des FAME.

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la chlorella sp

Tableau 5.1 Profils des acides gras obtenus après prétraitements

AG	Dénomination	ST	CEP	US	CD	CD/US	CEP/CD	CEP/US	CEP/CD/US
C12:0	Acide Laurique	0,81	0,17	0,97	0,72	4,85	0,57	0	8,28
C14:0	Acide Myristique	1,17	0,54	0,73	0,86	0,775	0,58	5,4	
C16:0	Acide palmitique	40,12	25,21	35,74	43,20	48	29,98	37,63	35,525
C16:1ω7	Acide Palmitoléique	3,91	4,35	1,80	6,32	7,46	8,52	1,14	6,785
C17:0	Acide Margarique	0,80	2,6	2,28	0,76	1,24	0,92	1,625	1,55
C18:0	Acide Stéarique	17,34	5,045	16,35	16,99	16,2	7,52	15,1	7,32
C18:1ω9	Acide Oléique	17,67	35,94	5,75	4,80	5,975	11,18	7,08	10,31
C18:2ω6	Acide Linoléique	6,17	29,54	10,03	4,05	5,65	25,48	9,63	21,765
C18:3ω3	Acide Linoléique	0,96	6,88	4,16	5,34	1,82	10,25	1,03	8,215
C20:0	Acide Arachidique	0,65	0,16	1,3	0,46	1,72	0,17	3,30	
C20:1ω9	Acide Gondoïque	2,95	0	2,35	0,52	0,68	0,31	0,98	
C22:0	Acide Béhénique	1,14	0,0006	0,00004	0,004	0,00025	0,001	2,31	0,0065

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la chlorella sp

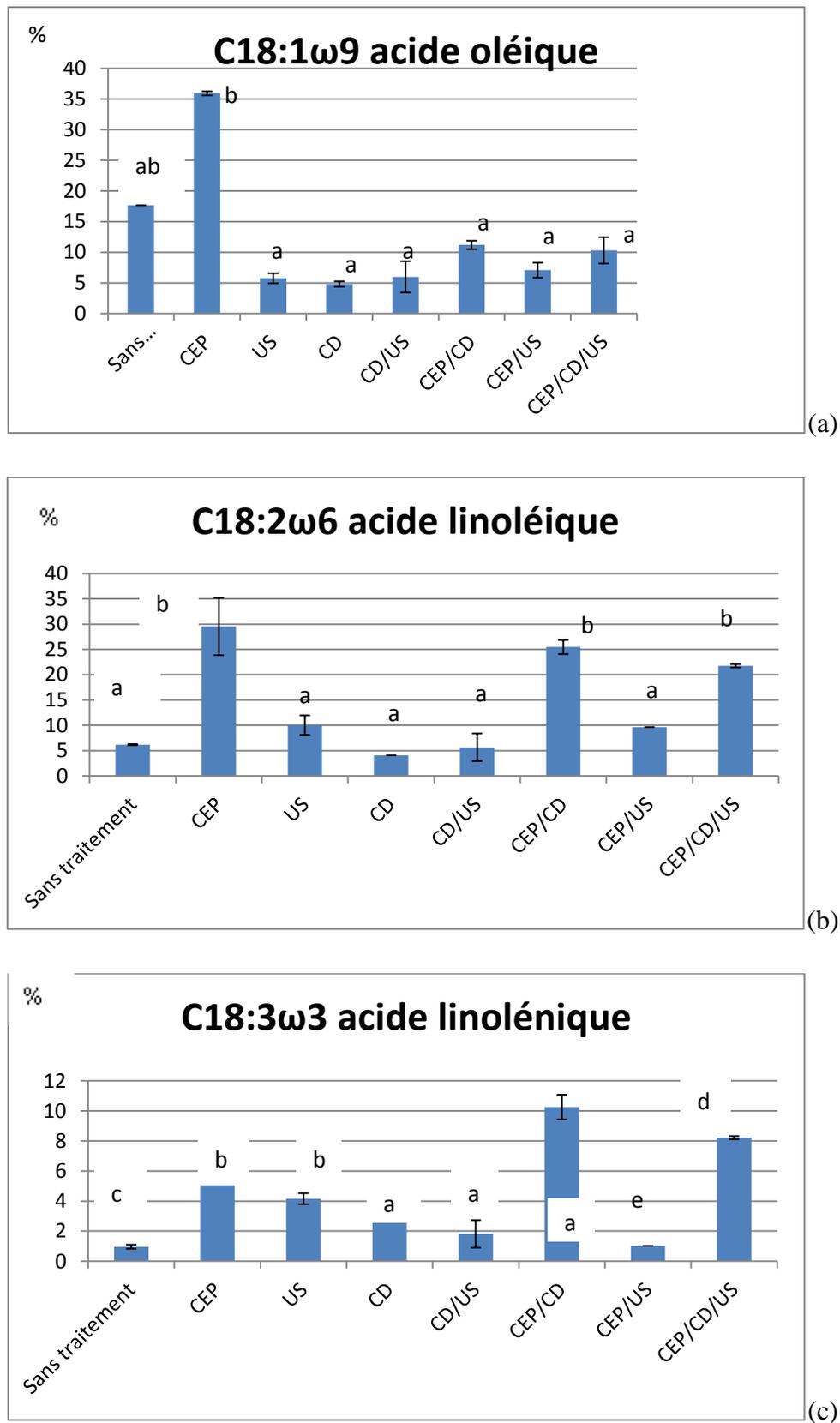


Figure 5.2 : Variation des teneurs des acides gras (Oléiques, linoléique, linoléique) selon les prétraitements et leur combinaison (%); *a, b, c, d, e, f, g, h* – les mêmes lettres signifient qu'il n'y pas de différences statistiques entre les échantillons ($p \leq 0.05$).

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la *Chlorella sp*

Ces résultats montrent que toutes les méthodes de prétraitement utilisées dans cette étude ont considérablement augmenté le rendement d'extraction des acides gras C16 et C18. En plus, de la production des acides gras insaturés spécialement oméga 3, 6 et 9 de la *Chlorella sp*.

Pour la biomasse non-traitée, le profil en acide gras a montré des concentrations intéressantes d'acide palmitique (C16:0) avec 40.12% représentant le composant majeur, suivi par l'acide oléique (C18:1), l'acide stéarique (C18:0) avec 17.67 et 17.34 %, respectivement; tandis que les acides Linoléique (C18:2) et Palmitoléique (C16:1) sont présents avec seulement 6.17 et 3.91%, respectivement.

Ces résultats corroborent avec le profil FAME obtenu par Jay et al. (2018) et Sharmin et al. (2016), où l'acide palmitique et les composés C16 et C18 sont les plus abondants. Yang et al. (2016) ont reporté que les lipides avec des teneurs en acides palmitique et oléique peuvent être utilisés pour la production de biodiesel de bonne qualité.

Le CEP a des effets positifs sur la quantité des acides gras et de leur qualité. Une amélioration remarquable dans le profil des acides gras a été notée, par la réduction de la teneur en acide palmitique (40.125% contre 25.21%), alors qu'une augmentation significative en composés C18 a été observée. Le résultat obtenu pour la biomasse fraîche prétraitée au CEP indique que cette méthode est efficace pour la rupture cellulaire. Plusieurs recherches ont reporté des résultats très similaires après l'application du CEP chez *Ankistrodesmus falcatus* et *Synechocystis* PCC 6803 et noté des profils: (C16:0, C16:1, C16:2, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C22:0), avec une prédominance du C18:1 et une augmentation significative du C18:3 (Zbinden et al., 2013; Sheng et al., 2011). Une autre étude a observé une augmentation des FAME extraits après CEP, de 8% comparé au contrôle pour des échantillons de *Chlorella pyrenoidosa* (Han et al., 2019). Ces modifications pourraient être attribuées à une réduction de la taille des globules de gras après le traitement au CEP qui peut influencer l'extraction des lipides. De plus, en raison de l'augmentation du nombre des pores ainsi que leur diamètre par le champ électrique, le rapport entre la surface cellulaire et la surface des pores diminue, ce qui mène à une meilleure pénétration du solvant et par conséquent permet à l'amélioration des rendements d'extractions (Han et al., 2019; Goettel et al., 2013).

Ainsi, les acides gras saturés, les monosaturés et l'acide linoléique (C18:2), sont présents en plus grande quantité après ce traitement de rupture cellulaire. (Concas et al., 2015). Un profil d'acides gras différent a été observé après le traitement aux US comparé à celui obtenu par simple macération: une diminution de l'acide palmitique (40 contre 25.745 %), et un changement pour l'acide palmitoléique (3.91 contre 1.8%) et l'acide oléique (17.67 contre

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la *Chlorella sp*

5.7%). Néanmoins, une augmentation dans les teneurs des acides linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3) a été observée de 6.175 à 10.04%, et de 0.96 à 4.14%, respectivement. En conséquence, on peut conclure dans cette étude, que l'oxydation des acides gras polyinsaturés est possiblement arrivée sous l'effet des Ultrasons, probablement pour les raisons suivantes: l'intensité des ultrasons a été importante et a duré pendant 20 minutes, et le radical libre (ROO.) qui aurait pu être libéré dans le milieu, pourrait avoir réagi avec les acides gras polyinsaturés. De nombreuses études ont démontré que la rupture des bulles générée par les ondes ultrasoniques, cause une augmentation intense de la température locale, ce qui accélère le processus de dégradation (Jaeschke et al., 2017). Nos résultats sont très similaires de ceux rapportés par Abdo et al. (2015), ou chez *Chlorella vulgaris*, un maximum de concentration de 6.37% et 21.17% pour les oméga 6 et oméga 3, respectivement ; alors que les oméga 9, n'ont pas été détectés. D'autres auteurs ont mentionné que les composants majeurs extraits à partir de *Chlorella sp.* récoltée par centrifugation, ont été l'acide palmitique (C16:0), l'acide oléique (C18:1) et l'acide linoléique (C18:2), suivis par l'acide stéarique (C18:0) et l'acide linoléique (C18:3) ainsi que des petites quantités d'acide palmitoléique (C16:0). En conséquence, les acides palmitique (C16:0), palmitoléique (C16:1), stéarique (C18:0), et l'acide linoléique (C18:2) ont été reconnus comme les acides gras les plus communs présents chez *Chlorella vulgaris* (Ahmad et al., 2014; Kim et al., 2012).

Pour l'extraction assistée aux US, les résultats obtenus sont proches de ceux obtenus par Ma et al., (2014) qui ont observé une diminution des acides palmitique et palmitoléique après sonication de la biomasse de *Chlorella ssp.* Aussi, Adam et al., (2012), ont remarqué une différence significative des teneurs en AGMI et AGS, et particulièrement des composants C16 et C16:1n7 après l'extraction assistée aux US. Une diminution de ces composants a été remarquée avec une augmentation de la température, induite par l'effet joule, qui par conséquent entraîne la destruction des composants sont détruits. Par ailleurs, nos résultats sont différents des travaux de Prabakaran and Ravindran (2011) et Cravotto et al., (2008) qui n'ont observé aucune différence significative après la sonication de *Chlorella vulgaris*.

D'après Pingret et al., (2014), cette baisse peut être attribuée à l'oxydation des lipides due à la forte activité et la capacité d'oxydation des radicaux libres (OH₂) générés durant l'exposition aux ultrasons. Patel et al. (2020) et Ali et Watson (2015) ont conclu que la composition des acides gras extraits de la biomasse des microalgues, diffère selon les espèces ainsi que des méthodes de prétraitements utilisées.

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la *Chlorella* sp

3.3. Variation des proportions AGMI, AGPI, AGS

Les proportions des acides gras saturés, mono et polyinsaturés, sont regroupées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 Proportions AGMI, AGPI, AGS (%)

Acides gras	Macération	CEP	US	CD	CD/US	CEP/CD	CEP/US	CEP/C D/US
AGS	62,04	33,72	57,38	63,01	72,78	39,74	65,37	52,68
AGMI	24,53	30,29	9,91	11,65	14,11	20,01	9,2	17,09
AGPI	7,13	36,42	14,19	9,39	7,4	35,74	10,66	29,98
(AGMI+AGPI)/AGS	0,51	2,27	0,42	0,33	0,29	1,40	0,30	0,89
W3/W6	0,15	0,23	0,41	1,31	0,32	0,40	0,10	0,37

AGS: Acides Gras Saturés; **AGMI:** Acides Gras Mono Insaturés; **AGPI:** Acides Gras Polyinsaturés

Le profil a montré que les acides gras saturés (AGS) ont été les acides gras prédominants dans tous les échantillons, suivis par les acides gras monoinsaturés (AGMI) puis par les acides gras polyinsaturés (AGPI). Dans l'échantillon sans traitement, 62.04% pour les AGS, 24.53% en AGMI, et 7.13 % en AGPI ont été observés. Ces résultats corroborent à ceux rapportés par Shanmugam et al. (2020) mais restent différents de ceux observés par Matos et al. (2016), Khoeyi et al. (2011), Tukosuglu and Unal (2003) avec *Chlorella vulgaris* avec moins de 30% de AGS et au delà de 20% des AGPI ont été retrouvés.

La composition des acides gras peut être partiellement attribuée à la phylogénétique et au génome des microalgues. Elle peut dépendre aussi des conditions de culture et de la phase de croissance lors du temps de récolte (Matos et al., 2019; Ferreira et al., 2017; Rismani et Shariati, 2017).

Pour les échantillons traités par CEP, des proportions différentes ont été trouvées, avec une baisse des AGS (33.72%), et une augmentation des AGMI et AGPI avec 40.29 et 36.42%, respectivement. Ces résultats obtenus sont différents de ceux reportés par Han et al. (2018), qui ont comparé la composition des acides gras obtenue après application des US et des CEP, comparé à un contrôle. Ces auteurs ont noté une légère augmentation pour les AGS de 43.91 à 45.89%, et les AGPI de 19.02 à 22.11 %, ainsi qu'une baisse dans la teneur des AGMI. Les

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la *Chlorella* sp

échantillons soumis aux US ont montré des résultats complètement différents obtenant 57.38 % pour les AGS, 9.91 pour les AGMI et 14.19 % pour et les AGPI.

Un changement notable avec tous les prétraitements incluant les US a été reportés dans notre étude. Nos résultats corroborent à ceux reportés par Han et *al.* (2018), qui ont noté une baisse dans les AGS de 43.91 à 40.05%, et les AGMI de 37.08 à 32.7 %, et une augmentation pour les AGPI de 19.02 à 27.25%, comparé à un contrôle. Li et *al.* (2004) ont étudié l'extraction des lipides des graines de soja, assistée par les US, et ont trouvé un décroissement dans les teneurs des acides gras insaturés susceptibles à l'oxydation, et un accroissement pour les AGS, plus stables. Ceci est peut être du à la rupture des cellules et la dégradation des acides gras (Borges et *al.*, 2016).

Le plus haut pourcentage des oméga 3 a été détecté pour la combinaison CEP/CD, et pour les oméga 6 et 9 c'est le prétraitement au CEP. qui a obtenu le meilleur rendement. Le meilleur ratio (AGMI+AGPI)/AGS égale à 2.27 a été calculé après le prétraitement de CE. Pareillement dans les travaux de Abdo et *al.*(2015), le plus haut pourcentage obtenu pour les oméga 3 a été détecté chez *Chlorella vulgaris* avec (21.17%).

L'équilibre des acides gras omégas est très important à considérer. Le ratio omega-3:omega-6 est devenu un modèle pour jauger l'équilibre des matières grasses dans les régimes alimentaires (Harris, 2006). Des régimes avec un ratio omega-3/omega-6 supérieur à 1:10 sont non recommandés. Dans cette étude, les ratios obtenus varient entre 0.15 et 1.31, le maximum obtenu après congélation/décongélation, ce qui reste non recommandé. pour l'alimentation humaine.

Chapitre 5 Effets des ultrasons, du champ électrique pulsé et de la congélation/décongélation sur le profil lipidique de la *Chlorella sp*

4.4. Conclusion

Des approches d'extraction différentes ont été testées pour l'extraction des lipides de la biomasse fraîche de *Chlorella sp*. L'application du CEP en prétraitement et la combinaison avec ce dernier, a montré une amélioration significative dans l'extraction..... Les US et leur combinaison ont montré quant à eux des résultats non satisfaisants, en dépit de la littérature qui reconnaît cette technique comme efficace pour les extractions, en réduisant le temps d'extraction et en augmentant les rendements des lipides à partir de graines oléagineuses et de microalgues. À ce jour, rares sont les études qui reportent l'effet négatif de la méthode des ultrasons sur l'extraction lipidique et sur la qualité des lipides extraits et/ou la stabilité des AGPI.

Enfin, l'amélioration de l'extraction des lipides doit être suivie par l'application de solvants verts et renouvelables, durables et non-toxiques. Généralement reconnus comme SAFE (GRAS), pour remplacer les solvants toxiques comme le méthanol et le chloroforme.

**CHAPITRE 6: ELABORATION D'UNE BOISSON
FONCTIONNELLE
-JUS DE FRUITS ENRICHIS EN CHLORELLE -**

Chapitre 6 Elaboration d'une boisson fonctionnelle -Jus de fruits enrichi en chlorelle -

6.1. Introduction

Les jus de fruits sont des boissons riches en éléments nutritifs et en raison de leur goût sucré et acidulé, leur couleur attirante rappelant les fruits utilisés, ainsi que leur valeur nutritive, ils possèdent la plus haute acceptabilité parmi tous les autres types de boissons. Leur consommation liée à l'apport de fruits et légumes conseillés par l'OMS, va être liée à la prévention de nombreuses maladies ; en raison de la présence de nombreuses molécules bénéfiques (Rivera et Cabornida, 2008). De plus, une variété de vitamines, minéraux peuvent être ajoutés aux jus durant le procédé de fabrication pour l'amélioration de leur valeur nutritionnelle.

Le secteur agroalimentaire est en constante expansion notamment dans le secteur des boissons; en croissance constante pour pouvoir répondre aux demandes des consommateurs en quête de nouveaux produits entre nouveaux goûts et bénéfiques pour la santé. D'où l'utilisation de d'ingrédients fonctionnels pourrait améliorer leurs profils texturaux et sensoriels ainsi que nutritionnels. Ces ingrédients procurent de nombreux avantages physiologiques, nutritionnels et énergétiques (Propriétés antihypertion, antioxydante, anti-inflammatoire..) (Goldberg, 1994).

La tendance de ces dernières années est l'avènement des produits naturels dit 'Healthy' ayant des avantages nutritionnels. On cite les produits dérivés à base de macro et microalgues, étant l'ingrédient star, source de composés bioactifs, tels que les pigments et les acides gras essentiels et de nombreuses autres à haute valeur commerciale.

La *Chlorella* est connue comme un aliment traditionnel et a depuis l'antiquité été utilisée pour la médecine alternative. Elle possède de nombreux avantages pour la santé, en aidant à combattre plusieurs troubles: les ulcères gastriques, la constipation, l'anémie, l'hypertension, le diabète, la malnutrition infantile et la névrose (Yamaguchi, 1997).

Cette microalgues est également une source précieuse de pigments naturels, comme les caroténoïdes, et peut être utilisée comme colorant naturel dans l'industrie agroalimentaire. Sans oublier les acides gras polyinsaturés et sa forte teneur en protéines qui lui confèrent une capacité d'incorporation parfaite pour les nouveaux aliments dits fonctionnels.

Les jus de fruits élaborés doivent être évalués pour leur qualité, et ses différentes composantes, sensorielle par son aspect visuel, ses caractéristiques olfactifs et gustatifs; physicochimiques

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

et microbiologiques, en plus des objectifs nutritionnels d'ingrédients fonctionnels pourrait changer ces paramètres, par conséquent, l'impact de ces changements doit être étudiés afin de prédire l'acceptation par le consommateur des nouveaux produits formulés et développés.

L'objectif général de cette étude est de préparer des jus de fruits enrichis avec différentes quantités de *Chlorella* sous forme de poudre, et d'étudier les effets de son incorporation dans l'élaboration d'un jus de fruits. Les paramètres physico-chimiques, biochimiques, microbiologiques et sensoriels sont analysés pour mettre en évidence l'impact de l'incorporation de la chlorelle sur la boisson à base de fruits.

6.2. Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire de Technologie Alimentaire et de Nutrition humaine, à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El harrach, Alger. Il s'agit d'élaborer deux types de boissons ; la première à base de trois fruits: fraise, orange et pêche ; la deuxième à base de citron et menthe ; les deux boissons sont enrichies en chlorelle incorporée à différentes doses.

6.2.1. Méthodologie

Plusieurs essais d'incorporation ont été effectués avec des doses différentes des matières premières pour les deux boissons, avant de choisir une combinaison de tous les composés pour chaque boisson, enrichies par différentes quantités de chlorelle. Ces deux boissons ont été soumises à une analyse sensorielle hédonique par un panel de dégustation.

Ensuite, des analyses physicochimiques et microbiologiques ont été effectuées pour garantir la conformité des boissons élaborées, selon les normes algériennes et internationales.

Pour l'élaboration de ces boissons, plusieurs étapes sont suivies. D'abord, les matières premières sont préparées: Chlorelle, citron, menthe, purée de fraise, concentré d'orange et purée de pêche pour l'élaboration des deux boissons; Ensuite, la poudre de chlorelle est ajoutée aux boissons élaborées. Puis, une analyse sensorielle effectuée pour valider une formule par type de boissons. Une fois les données traitées, les boissons choisies par les dégustateurs sont soumises à des analyses physicochimiques et microbiologiques. Par la suite, pour évaluer l'altération des boissons dans le temps, un test de stabilité est appliqué. Enfin, le prix de revient est évalué.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

6.2.1.1. Matières premières

- Chlorelle : sous forme de poudre lyophilisée, cultivée et récoltée au niveau du laboratoire du département technologie alimentaire à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) El Harrach-Alger.

- Fruits: Citron : Femminello, (ESS= 7° Brix) , Menthe verte , Fraise : Camarosa (EST= 9° Brix) achetés au marché local de Beni Messous, (L'extrait sec soluble (ESS) est calculé à l'aide d'un réfractomètre ATAGO AUTOMATIC).

- Concentré et purée : orange (66° Brix) et pêche (30° Brix) : fourni par SARL ZINE FOOD, RAMY, Alger. (Provenance: Brésil)

-Eau traitée : avec un pH de 7,476, fournie par SARL ZINE FOOD, RAMY, Alger.

6.2.2.2. Elaboration des boissons

Pour la boisson citron-menthe, d'abord, les fruits sont lavés soigneusement, pour éliminer les résidus de terre. Puis, ils sont triés et équetés, afin d'éliminer les fruits altérés. Les citrons sont pressés jusqu'à l'obtention d'un jus pur. La menthe est par la suite broyée avec ce jus de citron.

Pour la boisson cocktails de fruits, la purée de fraise est obtenue après broyage jusqu'à l'obtention d'une purée homogène, puis cuite, jusqu'à l'obtention d'une purée dense.

Les deux boissons formulées sont :

Boisson 1 : Citron et menthe.

Boisson 2 : Fraise, orange et pêche.

Des quantités précises des purées, du concentré et du jus de citron ont été pesées A l'aide d'une balance électronique (KERN EW). Le mélange de ces ingrédients est homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique (STUART), puis l'ajout de l'eau complète la préparation au volume désiré.

Après plusieurs essais, pour la boisson 1 une teneur de 28% de citron avec 9°Brix a été choisie et 50% de fruits avec 8,5°Brix, sont sélectionnés pour la boisson 2. L'extrait soluble totale est corrigé par l'ajout de sucre (100 et 35g pour les boissons 1 et 2, respectivement)

D'après le rapport de la quatrième session du groupe intergouvernemental spécial du Codex sur le jus de fruits et de légumes, une valeur minimale de 8,00 °Brix corrigée en fonction de l'acidité pour les jus de lime et de citron.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Les additifs sont utilisés pour finaliser les boissons:

- émulsifiant et conservateur : la pectine et l'acide citrique, pour les 2boissons.

-arôme et colorant (rouge ponceau), pour boisson 2.

Ensuite, les boissons sont soumises à une pasteurisation (95°Cpendant 3 min), puis refroidies.

Après, la chlorelle est ajoutée dans des conditions aseptiques, à des doses différentes comme présenté dans le tableau 6.1, puis une deuxième pasteurisation est effectuée (75°Cpendant 15 s) . Les boissons sont enfin refroidies dans un réfrigérateur à 4°C.

Une analyse sensorielle des deux boissons pour évaluer l'acceptabilité des boissons par les dégustateurs, a été effectuée au niveau du Département de technologie alimentaire de l'ENSA, avec l'aide des étudiants et le personnel de différentes tranches d'age, ce qui a permis de sélectionner les boissons les plus appréciées par le panel, et de continuer les analyses sur celles-ci.

Le tableau 6.1 représente les différentes doses incorporées dans les deux boissons.

Tableau 6.1 Les différentes doses incorporées dans les 2 types de boissons

Boissons	Citron -menthe			Cocktail(Fraise+orange+pêche)		
	formule a	formule b	formule c	formule d	formule e	formule f
Chlorelle (g / l de jus)	0	1,5	2	0	1,5	2
Eau	Quantité suffisante pour 1 litre					
Sucre (g)	100	100	100	35	35	35
Degré Brix	9	9	9,3	8,5	8	8

6.2.2. Analyse sensorielle

Le choix de la meilleure formule est basé non seulement sur les qualités nutritionnelles mais aussi les qualités organoleptiques, ce qui nous a amené à réaliser l'analyse sensorielle qui permet d'appréhender les différentes propriétés organoleptiques (gustatives, olfactives, visuelles et, parfois, auditives) d'un produit.

L'analyse sensorielle des boissons obtenues a été réalisée par un panel de dégustateurs composé d'étudiants et de personnel enseignant et administratif de l'ENSA.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Le test hédonique est basé sur l'appréciation des dégustateurs, de différents critères : caractéristiques visuelles, olfactives, gustatives ainsi qu'une note générale pour la qualité d'ensemble. Les échantillons présentés aux dégustateurs, se font de façon monadique, dans des gobelets transparents et en quantité suffisantes, puis ces derniers doivent répondre et remplir une fiche de dégustation (Annexe 09). Les données sont filtrées et traitées afin d'obtenir les évaluations des dégustateurs.

6.2.3. Analyses physicochimiques des boissons

6.2.3.1. Détermination de la matière sèche

L'extrait sec total ou matières sèches totales est l'ensemble de toutes les substances qui, dans des conditions physiques déterminées, ne se volatilisent pas. Ces conditions physiques doivent être fixées de telle manière que les substances composant cet extrait subissent le minimum d'altération (OIV-MA-AS2-03A).

Les capsules sont remplies d'un poids déterminé, pesées avant et après ajout du produit, puis mises dans une étuve à une température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à poids constant.

$$P (\text{Poids de la matière sèche en } g) = P_1 - P_2 \quad (6.1)$$

$$P_1 (g) = \text{Poids des capsules} + \text{matière sèche} \quad (6.2)$$

$$P_2 (g) = \text{Poids des capsules vides} \quad (6.3)$$

6.2.3.2. Détermination de l'extrait soluble total (AFNOR; NF05-10, 1996)

L'extrait sec soluble est la fraction de saccharose dans un liquide ; c'est-à-dire le pourcentage de matière sèche soluble. L'extrait sec soluble d'un jus de fruits représente la concentration en substances glucidiques.

L'extrait soluble total a été déterminé par un réfractomètre (Atago Automatic, Japon). Le réfractomètre a été réglé à une température de 20°C . La concentration est exprimée en degré Brix ou en pourcentage de masse

Une goutte de l'échantillon préalablement homogénéisée, est déposée à la surface de prisme. Le réfractomètre est orienté vers une source de lumière.

6.2.3.3. Mesure du pH (AFNOR; NF05-108, 1996)

Le pH est la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans le produit objet de la mesure. La détermination du pH par la méthode potentiométrique, est réalisée à l'aide d'un pH-mètre. La valeur du pH est affichée sur le pHmètre (Hanna, Italie) étalonné au préalable, par une solution tampon ; après immerger l'électrode dans un volume suffisamment important.

6.2.3.4. Détermination de la densité optique (Maydav et al., 1977)

Un volume de 50 ml du jus est d'abord centrifugé (SIGMA 2-15, Germany) à 2300 tr/mn, 25 ml du surnageant sont dilués avec 25 ml d'éthanol à 95%, puis le mélange est filtré à travers un papier filtre.

La détermination de la densité optique du filtrat se fait à 420 nm par un spectrophotomètre (JENWAY GenovaPlus, UK).

6.2.3.5. Détermination de l'acidité titrable (AFNOR. NF V 05-101)

Elle représente l'ensemble des acides minéraux et organiques libres présents dans le matrice analysée. Le titrage potentiométrique se fait par une solution de NaOH à 0,1N. 10 ml de l'échantillon sont agités; puis 2 gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées. Par la suite. Le titrage se fait par le NaOH, jusqu'à l'apparition d'une couleur rose.

Acidité est exprimée en gramme par litre selon la formule suivante :

$$\text{Acidité } \left(\frac{g}{l} \right) = V \times 0.64 \quad (6.4)$$

Avec :

V : volume de NaOH

0.64 : Coefficient d'acidité

6.2.3.6 Détermination du taux de cendres

Les cendres totaux ont été déterminées par incinération dans un four à moufle (Linn Electro Term, Allemagne), d'un volume de jus de fruit de à 450 °C pendant 48 h (Tokuşoğlu et Ünal, 2003;Reboloso Fuentes et *al.*, 2000).

6.2.3.7. Détermination des pigments

D'abord, une centrifugation (SIGMA 2-15, Germany) à 4500 tr/min pendant 10min) d'une quantité de culture (0,1 - 1 ml) est effectuée dans des tubes en verre (DURAN, SCHOTT MAINZ, JENA^{ER}Glas). La quantité de culture à prendre dépend de la densité cellulaire de la culture. Puis, le surnageant est retiré et 1ml de méthanol est ajouté. Le tout est gardé dans l'obscurité à 4°C. Plusieurs extractions sont effectuées jusqu'à extraction complète (le culot doit être blanc). Les surnageants sont regroupés après centrifugation et pour chaque extraction. A ce stade, l'absorbance du surnageant est mesurée à des longueurs d'ondes de 470, 653 et 666nm par un spectrophotomètre (JENWAY GenovaPlus, UK). Pour le calcul, la formule de Wellburn (1994) pour le méthanol est appliquée :

$$\text{Chlorophylle}_a \left(\text{Chl}_a \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de MS} \right) = (15.65 \times A_{666}) - (7.34 \times A_{653}) \quad (6.7)$$

$$\text{Chlorophylle}_b \left(\text{Chl}_b \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de MS} \right) = (27.05 \times A_{653}) - (11.21 \times A_{666}) \quad (6.8)$$

$$\text{Caroténoïdes}_T \left(\text{Car}_T \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ de MS} \right) = \frac{(1000 \times A_{470}) - (2.86 \times \text{Chl}_a) - (129.2 \times \text{Chl}_b)}{221} \quad (6.9)$$

6.2.3.8. Détermination de la teneur en protéines

La détermination de la matière azotée est effectuée selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1997 ; ISO TS-17837, 2008). Les échantillons ont été pesés, puis introduits dans des matras (tubes de minéralisation) en présence d'acide sulfurique 0,1N (H₂SO₄), et minéralisés à 420°C pendant 3 h. Le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ est le produit essentiel de la minéralisation.

Après cela, une distillation a été réalisée avec une base forte (NaOH) ajoutée en volume égal à celui du minéralisat. Au cours de la distillation, l'hydroxyde d'ammonium formé (NH₄OH) a été entraîné par la vapeur d'eau et récupéré dans un bécher de titrage contenant une solution d'acide borique. Le borate d'ammonium formé ((NH₄)₃BO₃) fait augmenter le pH de la solution.

La solution est par la suite titrée par de l'acide sulfurique 0,1N. Le volume d'acide sulfurique ajouté correspond à l'ammonium contenu dans l'échantillon de départ. Les résultats sont calculés selon les formules (10) et (11) :

$$NT \% = (V_1 - V_2) \times 0.14 \times 10 \times N/P \quad (6.10)$$

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

$$\text{Taux de protéines } \left(\frac{\text{g}}{100\text{ml}} \right) = 5.95 \times NT \quad (6.11)$$

Avec, V_1 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage de l'échantillon en ml ;

V_2 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage du blanc en ml ;

N : normalité de l'acide sulfurique (0,1N) ;

P : masse de l'échantillon de jus en g

5, 95 : facteur protéique de la chlorelle.

6.2.3.9. Détermination de la teneur en matière grasse

Les lipides ont été extraits selon une méthode modifiée de Xu *et al.* (1998) (Aouir et al,2017), en utilisant un mélange de solvant de chloroforme :méthanol(2:1,v/v).Après avoir réchauffé l'échantillon dans un appareil Soxhlet, le solvant est ensuite évaporé sous pression à l'aide d'un évaporateur à vide rotatif (Rotavapor,Heidolph G1,Allemagne).Après 5 heures d'extraction, la procédure est répétée trois fois jusqu'à ce que la totalité des lipides soit extraite. Ensuite, les résidus ont été séchés et pesés. Les résultats sont exprimés selon l'équation suivante:

$$L_t(\%) = (M_1 - M_0)100/P \quad (6.12)$$

Où;

L_t : teneur en lipides totaux

M_0 : poids du ballon vide.

P: prise d'essai avant dessiccation

M_1 : masse de l'échantillon après évaporation

6.2.3.10. Détermination du profil en Acides Gras

La composition en acides gras du jus a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) décrite par la norme ISO 12966-4. Avant d'être analysés la première étape était d'extraire la matière grasse par l'ammoniaque et un mélange de solvants. Ensuite, la quantité de matière grasse a été récupérée après évaporation à sec en présence d'éther-di-éthylique.

La deuxième étape consistait à transformer les acides gras en esters méthyliques par la méthode de transésterification à froid au moyen de solution méthanoïque d'hydroxyde de

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

sodium et une solution d'acide chlorhydrique. Une quantité de matière grasse obtenue a été mélangée à l'hexane pour extraire les triglycérides qui sont transformés en esters méthyliques en présence d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (2N) et une solution méthanolique d'acide chlorhydrique (2N).

Les esters obtenus ont été analysés par CPG. Un volume de 0,8 µL a été injecté dans la colonne à une température de 250°C pour les injecteurs et le détecteur, avec utilisation de l'azote comme gaz vecteur. Les acides gras ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux des composés standards.

6.2.3.11. Détermination des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par colorimétrie à 483 nm par la méthode de Dubois et *al.*, (1956), après hydrolyse de l'échantillon avec de l'acide sulfurique fumant (98%) en présence du phénol (50g/l). Le D-glucose est utilisé comme standard (le protocole d'analyse des sucres totaux est détaillé dans (Annexe 02)

La teneur en sucres totaux est calculée selon la formule suivante

$$ST\% = \frac{X \cdot FD \cdot 10^3}{10^6} \times 100 \times \frac{100}{(100-H)} \quad (10)$$

X : Concentration de sucres sur la courbe d'étalonnage en gramme.

FD : Facteur de dilution.

10³ : Facteur de conversion en gramme.

H : Teneur en eau, exprimée en pourcentage massique de la poudre végétale

6.2.3.12. Détermination de la valeur énergétique

Le pouvoir calorifique totale des boissons étudiées a été déterminé en multipliant les valeurs totales des protéines, des lipides et des glucides par 9, 4 et 4 kcal respectivement, puis en additionnant les résultats obtenus.

6.2.4. Analyses microbiologiques

6.2.4.1. Analyses effectuées sur la poudre de Chlorelle

Les analyses effectuées sur la poudre de chlorelle, ont été effectuées comme décrit dans le chapitre 1. Il s'agit de rechercher les Germes mésophiles aérobies totaux (FMAT), Flore fongique (FF) ainsi que les Coliformes Totaux (CT).

6.2.4.2. Analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini enrichi

Selon la réglementation algérienne, les analyses effectuées sur les jus de fruits pasteurisés, se résument à la Recherche et dénombrement des levures et moisissures (voir Annexe 11). Les levures et moisissures sont recherchées et dénombrées dans les jus de fruits en portant aseptiquement 0,1 ml dans une boîte de Pétri contenant de la gélose Sabouraud au Chloramphénicol préalablement fondue, coulée, incubée à 22°C pendant 5 jours. Pour la lecture et dénombrement, Les résultats exprimés sont la moyenne de trois répétitions.

6.2.5. Etude de la stabilité de la boisson au cours de stockage

Elle sert à décrire le comportement physicochimique et microbiologique et à confirmer la stabilité de la boisson dans des conditions climatiques différentes dont le facteur le plus important est la température.

Des échantillons de boissons sont conservés à des températures de 4 et 50°C, respectivement pendant 21 et 3 jours, puis analysés pour les paramètres physicochimiques et microbiologiques, comme décrit plus haut.

6.2.6. Analyse statistique

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour l'étude de la tendance entre les différents paramètres de dégustation étudiés et voir l'homogénéité et la nature de ces paramètres. Ainsi qu'une analyse de classification hiérarchique ascendante (AHC) a été réalisée afin d'évaluer l'impact des doses de chlorelle sur le panel de dégustation et de déterminer ainsi une concentration optimale.

6.2.7. Etude de la valeur marchande

Après une évaluation sensorielle et nutritionnelle des boissons formulées, une estimation de leurs prix de revient a été réalisée en tenant compte des prix unitaires des matières premières, ainsi que de ceux des ingrédients.

6.3. Résultats et discussion

6.3.1. Analyse sensorielle

Une analyses sensorielle a été effectuée pour le choix de la formule de boisson la plus appréciée par les dégustateurs, en se basant sur six descripteurs principaux: le goût, l'odeur, la couleur, la consistance, l'acidité et la qualité d'ensemble (Voir fiche de dégustation en Annexe 10). Les différentes formules ont été codées de 1 à 6 (les boissons 1 et 4 sont les

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

controle pour chaque type de boisson) et les dégustateurs ont attribuées a chaque boisson les appréciations suivantes: Très bon (TB), bon (B), moyen (M) et mauvais (MV)

Les figures 6.1,6.2,6.3,6.4,6.5 et 6.6 montrent les appréciations des dégustateurs pour les différentes formules de boisson en %. D'après ces dernières, plusieurs remarques sont ressorties:

Pour le caractère gout, les dégustateurs ont mis la boisson 1 en préférence à 60%. Ensuite, le caractère odeur de la boisson 5 a été le plus appréciée avec un pourcentage de 80%. Quant au caractère couleur, l'orientation des dégustateurs s'est faite sur la boissons 5 avec 70% des votes. La boisson 5 a été aussi retenue à 80% pour la consistance. Mais pour la qualité d'ensemble des boissons, c'est la boisson 1 qui a été la plus appréciée.

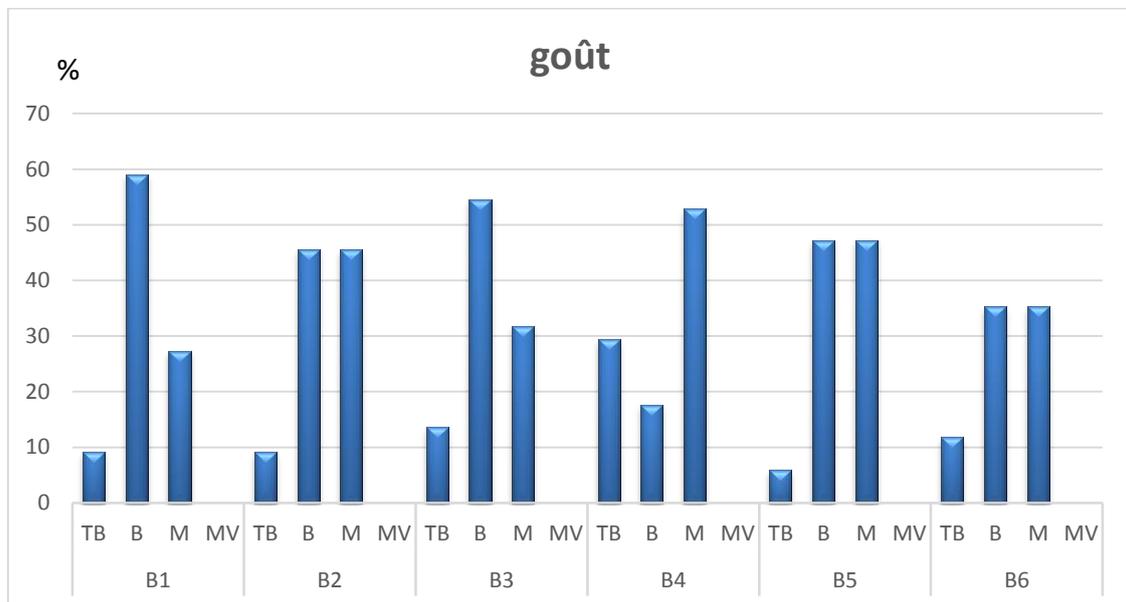


Figure 6.1 : Comparaison du caractère goût des boissons formulées.

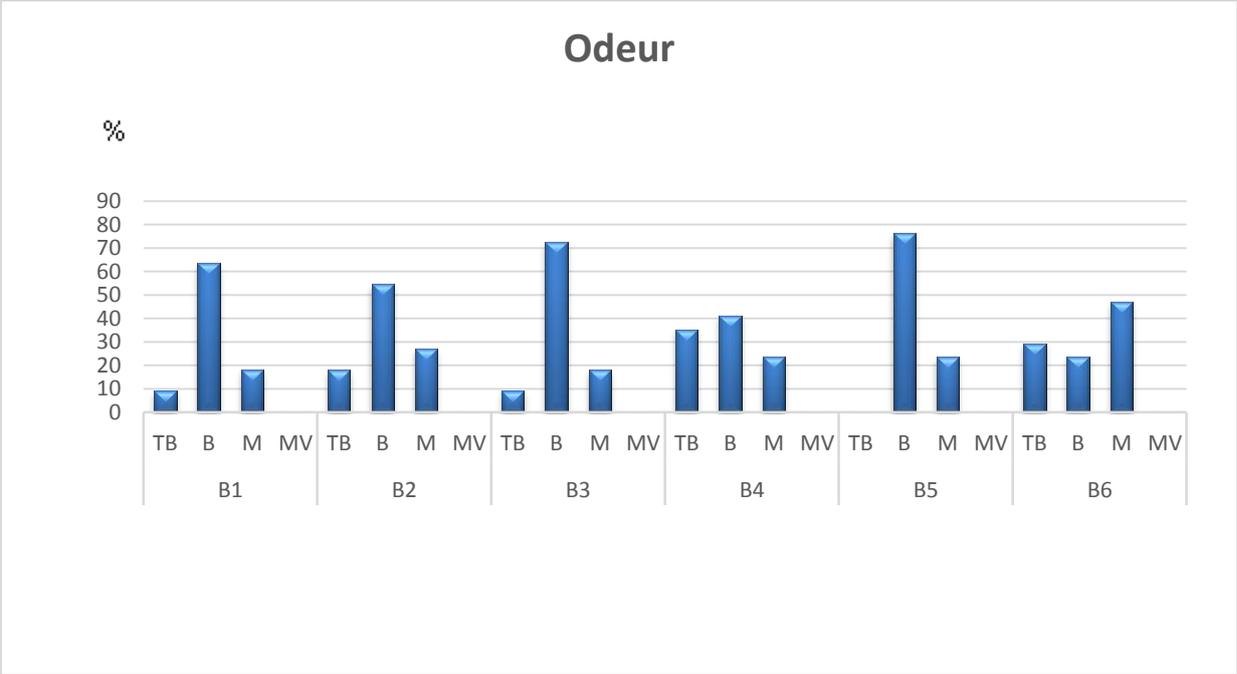


Figure 6.2 : Comparaison du caractère odeur des boissons formulées.

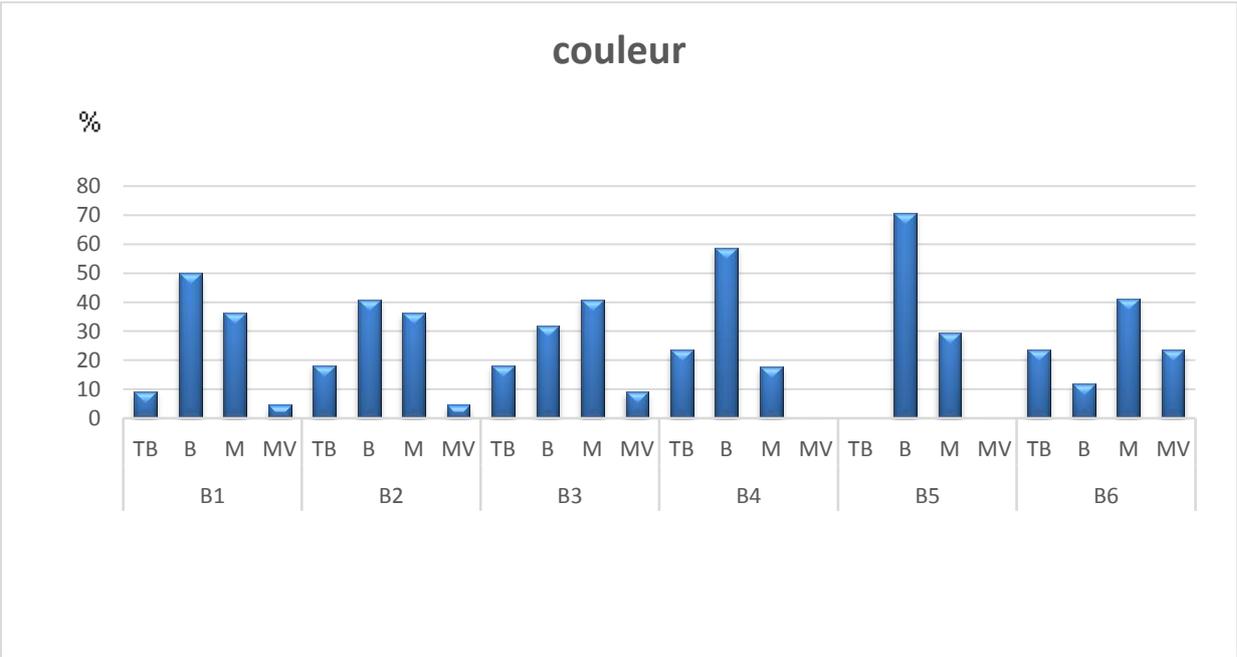


Figure 6.3 : Comparaison du caractère couleur des boissons formulées.

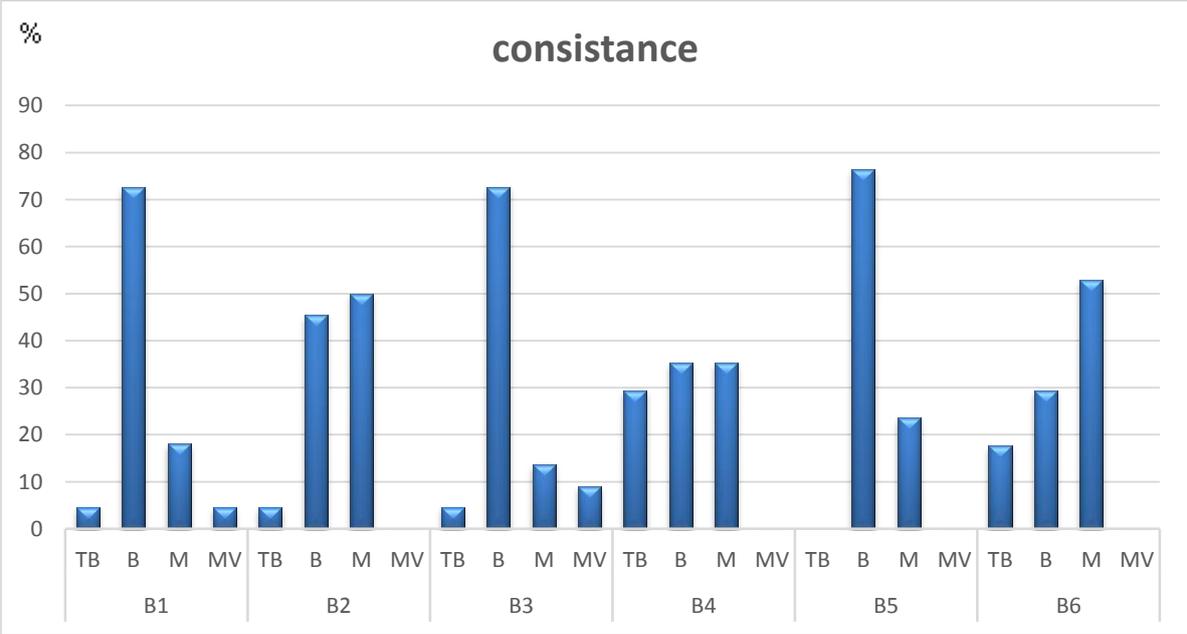


Figure 6.4 : Comparaison du caractère consistance des boissons formulées.

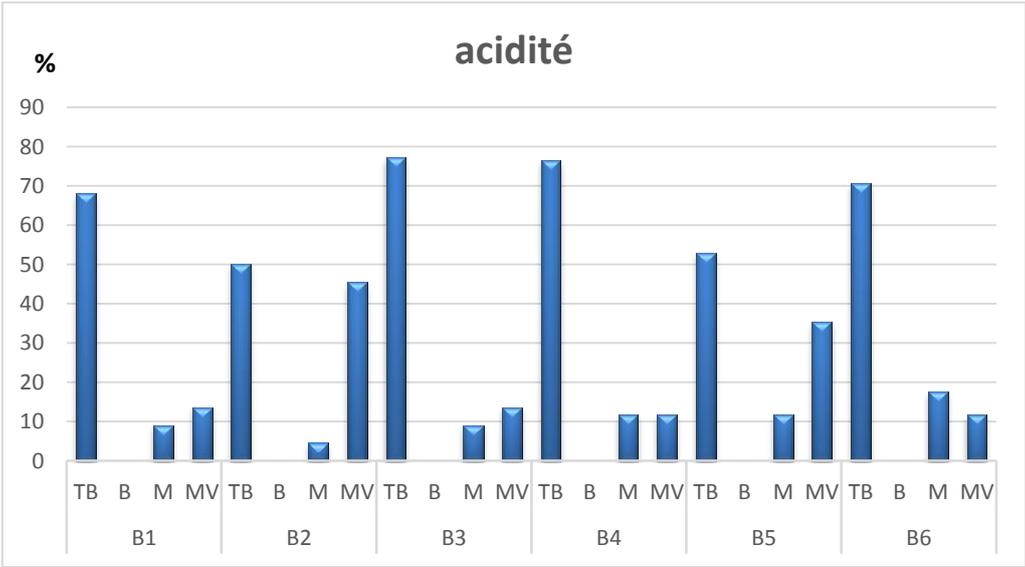


Figure 6.5 : Comparaison du caractère acidité des boissons formulées.

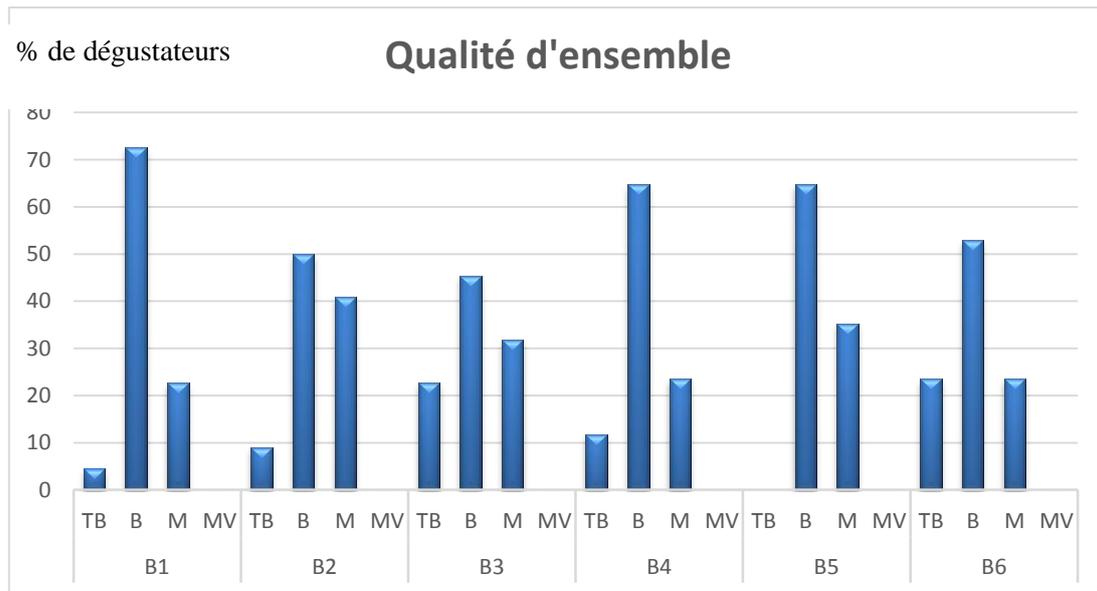


Figure 6.6 : Comparaison du caractère qualité d'ensemble des boissons formulées.

6.3.2. Effet de l'incorporation de la chlorelle sur les paramètres physico-chimiques des boissons.

La chlorelle est reconnue comme "Generally Recognized As Safe" (GRAS) par la FDA, son utilisation et son incorporation dans les produits alimentaires est donc sans danger, à condition de respecter les bonnes pratiques hygiène (BPH) et de bonnes pratiques de fabrication (BPF) (De Morais et al., 2015; Costa et al., 2013; Costa et al., 2006).

L'effet de l'incorporation de la chlorelle sur les caractéristiques physico-chimiques sur les boissons formulées est représenté par le tableau 8, les boissons 1, 2 et 3 correspondent à la formule (citron-menthe), la boisson 1 représente le controle (0g/l de chlorelle) , pour les boissons 4,5 et 6, elle représentent, la formule cocktail de fruits, avec comme controle la boisson 4.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Tableau 6.2Caractéristiques physico-chimiques des boissons formulées.

Caractéristiques	Boisson 1	Boisson 2	Boisson 3	Boisson 4	Boisson 5	Boisson 6
Extrait sec soluble (°Brix)	9±0,1	9±0,09	9,3±0,2	8,5±0,3	8±0,6	8±1,1
Matière sèche (%)	8,59±0,3	8,92±0,0	9,07±0,7	7,91±1,2	8,35±0,3	8,35±0,7
Teneur en eau (%)	91,40±1,6	91,07±1,42	90,92±1	92,08±0,8	91,64±0,7	91,64±0,53
pH	2,53±0,01	2,59±0,2	2,59±0,1	3,27±0,3	3,28±0,1	3,29±0,1
Acidité titrable (g/l)	12.48±0,21	12.60±0,13	12.67±0,01	2.94±0,2	2.88±0,1	4.09±0
Chlorophylle a (mg/g)	0,46±0,08	0,57±0,001	0,55±0,05	0,04±0,002	0,831±0,001	1,43±0,1
Chlorophylle b (mg/g)	0,14±0,07	0,19±0,04	0,32±0,01	0,07±0,001	0,97±0,008	1,50±0,2
Caroténoïdes (mg/g)	0,04±0,008	0,11±0,003	0,23±0,05	0,80±0,01	0,96±0,05	1,08±0,04
Sucres totaux (g/l)	9;8±1,2	10,01±8,1	10,32±2,3	7,93±0,1	8,22±0,5	8,48±1,8
Protéines (g/l)	0,34±0,14	1,45±0,02	1,71±0,1	0,38±0,05	1,52±0,02	1,97±0,08
Cendres (%)	0,004±0	0,01±0	0,009±0	0,02±0	0,02±0	0,03±0
Densité optique	0,065±0,01	0,070±0,003	0,103±0,05	0,187±0,03	0,191±0,2	0,199±0,1

L'extrait sec soluble correspond à la teneur en solides solubles exprimé en ° Brix, et en majeure partie représenté par les sucres présents. Pour les jus de fruits, ce taux naturel est ajusté, car il joue un rôle très important sur le goût du produit final.

Selon le tableau 6.8 l'ESS a varié entre 8 et 9 °Brix, et l'incorporation de la chlorelle dans les 2types de boissons, n'a pas donné de différence remarquable.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Ces résultats sont conformes aux normes fixées par l'Australian Fruit Juice Association (AFJA), pour les valeurs de l'extrait sec soluble fixées pour le jus de citron avec un minimum de 7 et le jus de fraise avec un minimum de 6.3 °Brix. Par ailleurs, une valeur minimale de 8°Brix corrigée en fonction de l'acidité est convenue pour les jus de lime et de citron (Codex alimentarius).

Pour la matière sèche, ses valeurs augmentent avec l'incorporation des doses de 0.5 et 1.5 g/l de poudre de chlorelle, pour les 2 types de boissons, comparé au contrôle avec 0g/l.

Nos résultats corroborent à ceux de Mohamed *et al.*, (2013) qui ont observé une diminution de la teneur en eau et augmentation de la Matière sèche, parallèlement avec l'apport des quantités de *Chlorella vulgaris* incorporée dans un fromage. Ainsi, cette augmentation de Matière sèche est expliquée par la capacité de rétention d'eau de la poudre de chlorelle (Anusuya et Vnakatarman, 1984)

Pour la teneur en eau des boissons formulées, elle reste élevée \geq à 90 %, ce qui leur confère un pouvoir hydratant et rafraichissant. Ces jus sont composés de jus, purées ou de concentré de fruit additionnés d'eau. L'incorporation a montré des diminutions de la teneur en eau lors de l'addition de la chlorelle comparé aux boissons contrôles. Ceci pourrait être expliqué par la teneur importante en protéines, constituants hydrophiles, ce qui mène à une forte absorption de l'eau, diminuant ainsi sa teneur dans le produit final (Robinson *et al.*, 2000).

Pour l'effet de l'enrichissement sur le pH, les valeurs ont varié entre 2,53 et 2,59 pour la boisson citron-menthe, et entre 3,27 et 3,29 pour le cocktail de fruit. Selon les normes de MSDA (Manuel suisse des denrées alimentaires) pour les jus de fruits allant de 2,8 à 4,3, nos résultats restent conformes pour les boissons cocktail de fruit. Une augmentation des valeurs du pH sont notées avec l'augmentation des doses de chlorelle ajoutées. D'après Jaurdan (2013), cette augmentation peut être expliquée par l'alcalinité de la chlorelle car cette dernière se développe naturellement dans les eaux douces à tendance alcalines.

Par rapport à l'acidité titrable, elle a varié entre les formules et pour les différentes doses ajoutées de chlorelle. Ainsi des valeurs observées pour les jus de citron-menthe de 12.48 ± 0.21 g/l pour la boisson contrôle, et seulement 2.94 ± 0.2 g/l. Ceci peut être expliqué par le type de fruit utilisé pour la préparation des jus de fruit, puis par l'ajout d'acide citrique. Le citron étant le plus acide, il pourrait conférer aux boissons 1,2,3 plus d'acidité. Quant à l'ajout de la chlorelle, l'acidité s'est vue augmentée à 12.60 ± 0.13 et 12.67 ± 0.01 pour les boissons citron-menthe, puis 2.88 ± 0.1 et 4.09 ± 0 pour les boissons cocktails.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Pour les pigments: Chlorophylle *a,b* et les caroténoïdes, leur valeurs dans les boissons témoins ont été respectivement de $0,46\pm 0,08$, $0,14\pm 0,07$, $0,04\pm 0,008$ mg/g pour la boisson contrôle citron-menthe. Ces valeurs ont augmenté avec l'augmentation des doses en ordre à $0,57\pm 0,001$; $0,19\pm 0,04$; $0,11\pm 0,003$ pour l'incorporation de 0,5g/l de chlorelle, et $0,55\pm 0,05$, $0,32\pm 0,01$; $0,23\pm 0,05$ pour la dose de 1,5g/l. Aussi, la même augmentation est observée pour la formule cocktail de fruit, ou la boisson référence montre des doses de Chlorophylle *a,b* et Caroténoïdes respectivement, de $0,04\pm 0,002$, $0,07\pm 0,001$ et $0,80\pm 0,01$. Ces doses ont marqué un accroissement pour la dose de 0.5g/l à $0,831\pm 0,001$; $0,97\pm 0,008$; $0,96\pm 0,05$ et pour la dose de 1.5g/l $1,433\pm 0,1$, $1,50\pm 0,2$; $1,08\pm 0,04$ respectivement pour les teneurs en Chlorophylle *a,b* et Caroténoïdes. Ceci peut être expliqué par la richesse de la chlorelle en pigments comme montré dans les chapitres précédents, la chlorophylle (0,5% à 1% de poids sec), caroténoïdes (0,1% à 0,2% de poids sec (en moyenne)). Par conséquent, l'ajout de la chlorelle en poudre, est susceptible d'améliorer le profil nutritionnel des boissons, et possiblement faire bénéficier les consommateurs des composés qu'elle contient.

D'après le tableau 6.2, les teneurs en sucres totaux des boissons formulées ont varié de $9,8\pm 1,2$ pour la boisson citron-menthe contrôle, puis ont augmenté à $10,01\pm 8,1$ g/l et $10,32\pm 2,3$ pour les doses ajoutées de 0.5 et 45,654- 48,81g/l par rapport au témoin (1.5 g/l), respectivement. $7,93\pm 0,1$ a été observée pour la boisson contrôle cocktail de fruit, cette valeur a augmenté à $8,22\pm 0,5$ g/l après l'ajout de 0.5g de chlorelle, puis $8,48\pm 1,8$ g/l pour 1.5g de chlorelle incorporée. Ceci est due à la haute teneur en sucres totaux de *Chlorella sp* qui dans cette étude a été calculée à $19\pm 1,1$ %

Les glucides dans la biomasse de *Chlorella vulgaris* retrouvent sous formes, d'amidon, de glucose, de sucres et d'autres polysaccharides (Hadj-Romdhane et al., 2013.)

Pour les protéines, Les valeurs observées mettent en évidence une variabilité des teneurs de protéines entre les boissons enrichies par la chlorelle et les échantillons témoins. Ces teneurs sont passées de $0,34\pm 0,14$ g/l pour la boisson témoin à $1,45\pm 0,02$ g/l puis $1,71\pm 0,1$ g/l pour les jus citron-menthe enrichis. Aussi une teneur de $0,38\pm 0,05$ g/l est observée pour la boisson témoin pour le cocktail de fruits, une augmentation a été notée après enrichissement à la poudre de chlorelle donnant $1,52\pm 0,02$ g/l et $1,97\pm 0,08$ g/l

Nos résultats corroborent à ceux obtenus par Mohamed et al. (2013) où les teneurs de protéines ont augmenté après ajout de biomasse de *Chlorella vulgaris*. Aussi, Fradique et al.

Chapitre 6: Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

(2010) ont noté une augmentation de la teneur en protéines dans les pâtes après incorporation de *Chlorella vulgaris*

Par rapport aux cendres, l'incorporation de *Chlorella* dans les boissons a entraîné une augmentation de la teneur totale en cendres par rapport au témoin. En effet, une valeur initiale pour les jus de citron-menthe de $0,004 \pm 0$ % qui a augmenté à $0,015 \pm 0$ % puis $0,0095 \pm 0$ % pour 0.5 et 1.5g/l, respectivement. Aussi, pour les cocktails de fruit, un accroissement a été observée de $0,0215 \pm 0$ jusqu'à $0,0225 \pm 0$ et $0,03 \pm 0$ pour les même doses. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Fradique et *al.* (2010), notant une augmentation du pourcentage des cendres (1,8%) par rapport au témoin (1,2%). Ceci peut être expliqué par la teneur en cendres de la chlorelle obtenue à $9,11 \pm 0.7$ % et sa richesse en minéraux. En effet, elle contient plusieurs minéraux, tels que Ca, K, Mg et Zn.

Pour l'analyse statistique, l'analyse ACP (analyse en composante principale), qui a étudié la tendance des différents paramètres de dégustation, l'homogénéité et la nature de ces paramètres, a donné le cercle de corrélation détaillé en figure 6.7.

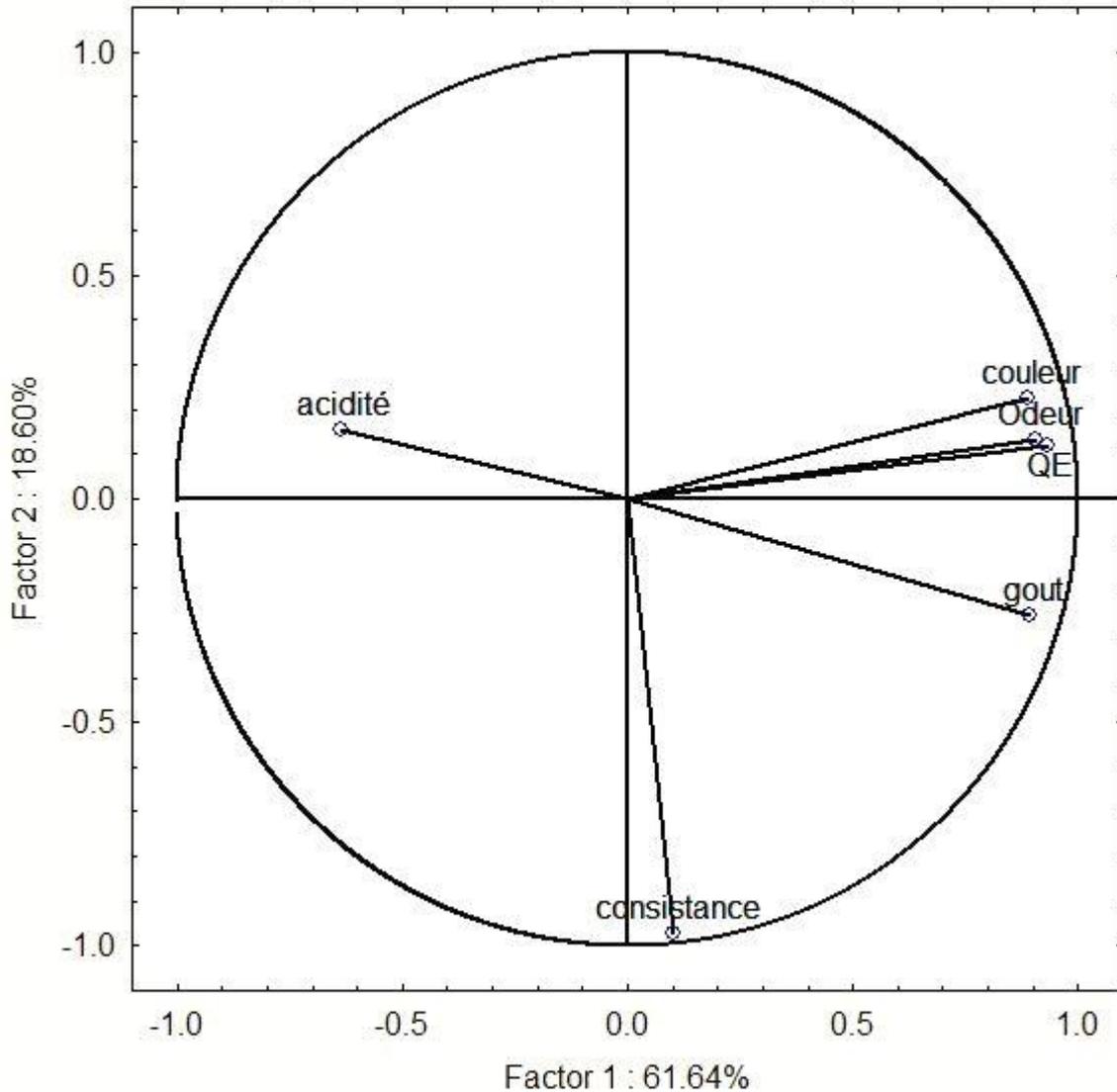


Figure 6.7 : Cercle de corrélation entre les paramètres de dégustation

Le cercle de corrélation a montré une excellente représentation du goût, de la consistance, de la couleur et de l'odeur, donnant ainsi une importante corrélation entre la couleur, l'odeur et la qualité d'ensemble. Cependant on note une indépendance entre les facteurs goût, acidité, odeur et qualité d'ensemble avec la consistance.

Quant à l'analyse AHC (classification hiérarchique ascendante); représenté par la figure 6.8, dont le but est de classer les différentes boissons avec l'appréciation et voir quelles boissons présentent la meilleure appréciation par rapport à tous les paramètres de dégustation. Il en est ressorti, que les meilleures boissons ayant eu les plus hautes appréciations sont celles du groupe 2 (cocktail de fruit) avec la boisson 4 (boisson standard) et la boisson 6 (enrichie avec 2g/l de chlorelle)

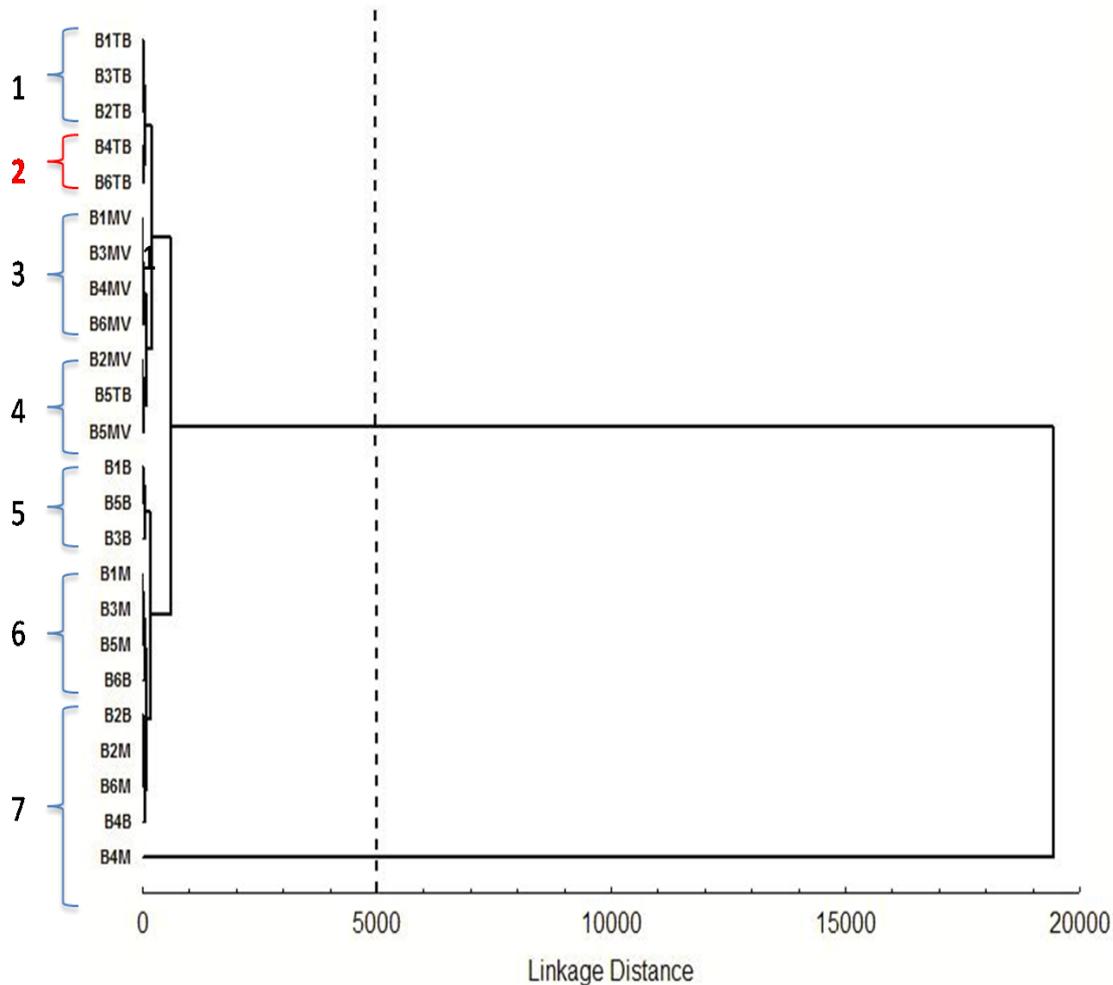


Figure 6.8 : Classification hiérarchique ascendante

6.3.3. Effet de la chlorelle sur la qualité microbiologique des boissons

Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les boissons enrichies, ont montré la conformité des boissons formulées, selon les normes fixées par l'arrêté ministériel Journal Officiel n 39 de 2017 (Annexe 11), fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Ce qui correspond à rechercher et dénombrer les levures et moisissures correspondant aux germes demandés pour la catégories 11, pour les boissons, et plus précisément les jus de fruit pasteurisés. Ceci s'explique par une bonne maîtrise de l'hygiène, respect des bonnes pratiques d'hygiene et des bonnes pratiques de fabrication et par l'efficacité du traitement thermique utilisé.

6.3.4. Analyse de l'épreuve de stabilité des boissons

6.3.4.1. Evolution des caractéristiques physico-chimiques après stockage

Les caractéristiques physico-chimiques des boissons à 4°C et à 50°C, respectivement pendant 21 jours et 3 jours sont représentées dans le tableau 6.4.

Chapitre 6 Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Tableau 6.3Caractéristiques physico-chimiques des boissons à 4°C et à 50°C, respectivement pendant 21 jours et 3 jours.

Caractéristiques	à 4°C pendant 21 jours				à 50°C pendant 3 jours			
	Boisson 1	Boisson 2	Boisson 4	Boisson 5	Boisson 1	Boisson 2	Boisson 4	Boisson 5
Extrait sec soluble (%)	9±0,1	9±0,12	8±0,09	8±0,1	9±0	9±0,03	8±0	7±0,1
Matière sèche(%)	8,04±0,05	9,17±0,1	7,78±0,02	9,07±0,7	8,33±0,3	9,72±0,8	7,87±0,1	8,79±0,8
Teneur en eau (%)	91,95±1,1	90,82±1,0	92,21±1,2	90,92±0,1	91,66±1,1	90,28±0,1	92,12±0,0	91,20±0,5
pH	2,53±0,1	2,57±0,1	3,26±0,1	3,29±0,2	2,50±0,3	2,57±0	3,29±0,3	3,31±0,2
Sucres totaux (g/l)	80±2,5	85,65±1,6	64,36±1,8	71,45±0,1	79,12±1,5	83,45±1,9	62,86±2,0	69,68±1,90,1
Protéines (g/l)	0,11±0,1	0,17±0,02	0,23±0,08	0,29±0,1	0,10±0,03	0,12±0,1	0,19±0	0,23±0,06

Chapitre 6 Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

Pour l'extrait sec soluble, l'analyse des boissons a révélé qu'il est resté constant durant tout le test de stabilité pour les boissons 1 et 2 pour les deux lots (4°C et 50°C). Cependant, on note une légère baisse de l'ES pour les boissons 4 et 5. Ces résultats corroborant ceux reportés par Ayhan et *al.* (2002) et Robertson et Samaniego (1986), qui ont rapporté la stabilité des jus de citron stocké à 36°C et jus d'orange à 2°C et 22°C, l'ESS n'a présenté aucun changement. Le jus de citron et contenant un °Brix de 9,4 ne présente aucun changement significatif durant le stockage.

La teneur en eau des boissons a varié d'une boisson à l'autre, pour les boissons 1 et 4, une augmentation de cette teneur est observée, mais pour les boissons 2 et 5, une diminution est rapportée. Ce qui peut être expliqué par l'absorption de l'eau par la chlorelle au cours du stockage.

Pour la teneur en matière sèche, elle varie selon les types de boisson ; pour les boissons 1 et 4 (Jus témoins non-enrichis), elle décroît ; puis elle augmente selon les doses de Chlorelle ajoutées (les boissons 2 et 5).

Concernant le pH, durant le stockage, de légères variations ont été notées, mais ne dépassant pas 0.03. Ce qui est en accord avec Labuza et *al.* (1988); Souci et *al.* (1986) qui ont étudié l'effet du stockage des jus de fruits sur le pH, en ne rapportant aucune variation remarquable.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet du stockage sur le pH de jus de fruits pasteurisés ; n'avaient pas observé de grandes variations de pH pendant le stockage.

Pour les sucres totaux, on remarque selon le tableau 6.11, une baisse de la teneurs en sucres, ceci pourrait être dû à l'hydrolyse de ces derniers par les acides organiques (Sadler et *al.*, 2002; Kannane et *al.*, 1988).

Par rapport aux protéines, une baisse de la teneur en protéines est notée, par rapport à la boisson fraîche, expliquée possiblement par la dégradation des protéines au cours du stockage, ou de leur inactivité (Road, 2005).

6.3.4.2. Evolution des caractéristiques microbiologiques après stockage

Les analyses microbiologiques effectuées sur les boissons après stockage à différentes températures, sont présentés dans le tableau 6.5. Selon ce dernier, une légère présence de la flore fongique est notée dans toutes les boissons, mais restent selon les normes algériennes citées précédemment, conformes.

6.3.5. Valeur marchande

Les tableaux 6.6 et 6.7 représentent les prix unitaires des matières premières, et ceux des ingrédients, ainsi qu'une estimation du prix de revient des boissons.

Tableau 6.4 Prix unitaires des ingrédients des boissons formulées enrichies en chlorelle.

Ingrédients	Prix unitaire
Citron	300 DA/Kg
Menthe	200 DA/Kg
Fraise	160 DA / Kg
Concentré d'orange	213,591 DA / Kg
Purée de pêche	2070,52 DA / Kg
Poudre de chlorelle	10553,85 DA / Kg
Sucre	100 DA / Kg
Eau	157 DA / m ³

Tableau 6.5 Estimation de la valeur marchande des boissons formulées.

Paramètres	Quantité utilisée	Prix de revient
	/L	(DA)
Matières premières	Poudre de chlorelle	57,12
	Jus de Citron	9
	Menthe	0,5
	purée de fraise	27,1
	Concentré d'orange	8
	Purée de pêche	3
	Sucre	10 et 3,5
	Eau	0,1575
Citron-menthe		Cocktail
Prix de revient (DA)	76,78	98,88
Prix de vente (DA)	100	120

Les deux boissons formulées sont plus chères que celles retrouvées sur le marché à cause du prix élevée de la chlorelle ; à l'exception des boissons énergisantes qui avoisinent nos prix. En revanche, nos boissons présentent des qualités nutritionnelles meilleures.

6.4. Conclusion

Parmi les habitudes de consommations, c'est se désaltérer avec des boissons aromatisées en général, et les jus de fruits en particulier. Bien que ces dernières sont à base de jus, purées ou concentré de fruit, elles contiennent des doses élevées de sucres et de nombreux additifs (colorants, conservateurs, antioxydants,...), faisant d'elles, des boissons qui ne sont pas saines pour les consommateurs, induisant ainsi des impacts négatif sur leur santé dans le moyen et long terme. De ce fait, le besoin de l'industrie agro-alimentaire qui oeuvre dans la recherche et le développement afin d'imaginer, créer, élaborer des boissons avec une valeur nutritionnelle plus équilibrée, et d'incorporer des produits qui renferment des bioactifs bénéfiques pour la santé, ce sont les boissons fonctionnelles.

L'objectif principal de cette étude a été d'élaborer des boissons fonctionnelles, à base jus de fruits enrichie par la poudre de chlorelle cultivée au laboratoire sous des conditions contrôlées. Puis d'analyser les effets de cette l'incorporation sur les différents paramètres physico-chimiques, microbiologiques, sensorielle et nutritionnels pour l'obtention de boissons enrichies

Les résultats obtenus au cours des analyses ont révélé que l'incorporation de la Chlorelle dans le jus de fruits à différentes doses (0.5 et 1.5 g/l), influence les paramètres physico-chimiques du jus . En outre, la qualité bactériologique n'a pas été affectée par l'introduction de la Chlorelle ; en laissant les produits conformes selon la réglementation algérienne.

Sur la base de six formules de boissons élaborées avec des doses de Chlorelle différentes (0.5 et 1.5 g/l), l'analyse des paramètres sensoriels du panel de dégustation ont révélé que le consommateur a réagi positivement à l'incorporation de la Chlorelle.

Il ressort des résultats obtenus que l'enrichissement des boissons par l'introduction de la chlorelle ait été une opération encourageante qui tend à être plus développée.

Il serait donc souhaitable de poursuivre les recherches dans ce domaine et réaliser entre autres perspectives :

- L'élargissement du champ de production et promouvoir l'utilisation de la chlorelle en Algérie par son incorporation dans d'autres produits alimentaires, tels que les produits céréaliers et laitiers...

Chapitre 6 Elaboration d'une boisson fonctionnelle-Jus de fruits enrichi en chlorelle -

- Encourager la création de fermes de culture utilisant d'autres micro-algues à haute valeur nutritionnelle dans le but de lutter contre la malnutrition dans le monde.
- L'industrialisation de produits enrichis par la chlorelle tout en validant sa qualité nutritionnelle et technologique, complétée par des essais et des analyses plus précis (analyse des acides aminés, analyses nutritionnelles après cuisson...).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Conclusion générale

La *Chlorella sp* a été signalée comme une excellente source de protéines et est l'une des microalgues les plus utilisées comme additifs pour améliorer les teneurs nutritionnelles des aliments. Ainsi, elle améliore la santé humaine, car elle est connue aussi pour être une source riche en lipides, fibres, vitamines essentielles et minéraux. Elle contient aussi des molécules bioactives ayant des activités biologiques analysées: antibactérien, antifongique, antioxydants. Cependant, cette microalgue possède une paroi rigide, qui freine l'accessibilité de ces bioactifs, ce qui rend l'utilisation de techniques de rupture cellulaire intéressante pour palier ce problème.

Plusieurs objectifs ont été fixés pour cette étude, D'abord, de caractériser la chlorelle et connaître sa composition en macro et micronutriments, Ensuite, d'évaluer ses activités biologiques: anti-bactérienne, anti-fongique et anti-oxydante à l'aide d'extraits de différents solvants (eau, méthanol, éthanol, chloroforme et acétone). Ces extractions ont été effectuées selon 3 types: simple macération, prétraitement aux Ultrasons, et Champs Electriques Pulsés. Puis, de trouver la meilleure technique d'extraction des lipides, et de leur combinaison, sur l'extraction des lipides de *Chlorella sp*, ainsi que les observations faites sur le rendement en lipides et le profil en acide gras obtenus pour chaque prétraitement utilisé. Enfin, d'élaborer une boisson fonctionnelle, à base de jus de fruit enrichi en poudre de chlorelle lyophilisée, et d'en évaluer l'acceptabilité auprès d'un panel de dégustateurs.

En effet, la caractérisation générale de la chlorelle a donné les résultats suivants: 58 ± 2.02 % de protéines; 19 ± 1.1 % de glucides avec la présence de glucose, fructose et saccharose, (11.8 ± 1.06 %) de lipides avec une majorité en acide palmitique ($40,12 \pm 0,75$ %) et la présence des acides gras mono et polyinsaturés ($31.66\% \pm \dots$) Des acides gras totaux, et enfin $9,11 \pm 0.7$ % de cendres avec le sodium comme composant majoritaire ($186,9 \pm 3,3$ mg/g de MS), suivi par le Magnésium ($13,21 \pm 1,85$ mg/g de MS), mais aussi la présence d'autres minéraux comme ; le fer, l'aluminium, le cuivre, le potassium, le manganèse et le zinc. Pour les pigments, La chlorophylle *a* est présente avec une valeur de $10,65 \pm 1.2$ mg/g de matière sèche, la chlorophylle *b* et les caroténoïdes avec $7,03 \pm 0.6$ et $1,32 \pm 0.14$ mg/g de matière sèche, respectivement.

Le screening phytochimique a montré la présence de molécules bioactives telles que les tannins, caroténoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes, chlorophylle, phénols, glycosides et sucres réducteurs. Ces dernières ont inhibé la croissance *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, et

Conclusion générale

E. coli à des degrés différents selon la techniques d'extraction. *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, et *Aspergillus niger* ont été sensibles aux extraits obtenus avec le chloroforme. L'Extraction utilisant le méthanol, éthanol et acétone ont donné les meilleures activités. Les combinaisons CEP/éthanol and CEP/acétone ont obtenu les activités antioxydantes les plus intéressantes. Le Champ électrique Pulsé a représenté le meilleur pré-traitement pour l'extraction des molécules bioactives, suivi par les ultrasons.

De même, pour l'extraction des lipides, l'application du CEP en prétraitement et toutes les combinaisons avec ce dernier, a montré une amélioration significative. Les US et leur combinaison ont montré quant à eux des résultats non satisfaisants, en dépit de la littérature qui reconnaît cette techniques comme efficace pour les extractions, en réduisant le temps de l'extraction et en augmentant les rendements des lipides à partir de graines oléagineuses et de microalgues. A ce jour, rares sont les études qui reportent l'effet négatif de la méthode des ultrasons sur l'extraction lipidique et sur la qualité des lipides extraits et/ou la stabilité des AGPI.

Enfin, Les résultats obtenus au cours des analyses ont révélé que l'incorporation de la Chlorelle dans le jus de fruits à différentes doses (0.5 et 1.5 g/l), influence les paramètres physico-chimiques du jus. En outre, la qualité bactériologique n'a pas été affectée par l'introduction de la Chlorelle ; en laissant les produits conformes selon la réglementation algérienne (JORAD,,). Sur la base de six formules de boissons élaborées avec des doses de Chlorelle différentes (0.5 et 1.5 g/l), l'analyse des paramètres sensoriels du panel de dégustation ont révélé que le consommateur a réagi positivement à l'incorporation de la Chlorelle. Il ressort des résultats obtenus que l'enrichissement des boissons par l'introduction la chlorelle a été une opération encourageante qui tend à être plus développée.

Toutes ces informations permettent une fois regroupées une meilleure connaissance de cette microalgue, pour pouvoir l'adapter et l'utiliser dans différents domaines, et sa consommation en l'état ou étant un ingrédient fonctionnel pour plusieurs types de produits alimentaire entre autre, permettrait d'améliorer son profil nutritionnel.

La présente étude confirme que la microalgue verte *Chlorella* sp. est très riche en composés à utilisations potentielles en pharmacologie et dans le domaine des nutraceutiques. Ces composés incluent des inhibiteurs de microorganismes et des antioxydants. L'extraction aux solvants assistée aux US et au CEP est accrue comparée à une macération simple.

Conclusion générale

L'acétone et l'éthanol sont des solvants utiles pour l'obtention des extraits donnant des résultats importants dans différents tests d'activités biologiques. Cependant, l'éthanol pourrait être le plus approprié car possède le statut "reconnu comme sécuritaire" (GRAS: generally recognized as safe).

Des approches d'extraction différentes pour l'extraction des lipides de la biomasse fraîche de *Chlorella sp.* L'application du CEP en prétraitement et la combinaison avec ce dernier, a montré une amélioration significative. Les US et leur combinaison ont montré quant à eux des résultats non satisfaisants. Cependant, à ce jour, rares sont les études qui reportent l'effet négatif de la méthode des ultrasons sur l'extraction lipidique et sur la qualité des lipides extraits et/ou la stabilité des AGPI.

Enfin, l'amélioration de l'extraction des lipides doivent être suivie par l'application de solvants verts et renouvelables, durables et non-toxiques. Généralement reconnus comme SAFE (GRAS), pour remplacer les solvants toxiques comme le méthanol et le chloroforme.

Toutefois, Il serait souhaitable de poursuivre les recherches dans ce domaine et relever entre autres quelques défis spécifiques à l'étude:

- Etudier la composition des protéines en acides aminés,
- Identifier les familles composés et le type de molécule, qui sont directement responsables des activités antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes.
- Tester d'autres méthodes d'extraction plus économiques
- Optimiser les techniques d'extraction

Et plus généralement:

- Sensibiliser le grand public pour l'intérêt des algues (macro et microalgues)
- Encourager la création de fermes de culture des micro-algues pour leur haute valeur nutritionnelle,
- Promouvoir la production et la vente de la chlorelle en Algérie
- Incorporer la chlorelle dans plusieurs autres types de produits alimentaires, tels que les produits céréaliers et laitiers.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Aaronson S., Berner T, Dubinsky Z., 1980. Microalgae as a source of chemicals and natural products. In *Algae Biomass*, Shelef G. & Soeder C.J. (Eds.), Elsevier Press, Amsterdam : 575- 601.
- Abo-State MAM, Shanab SMM, Ali HEA, Abdullah MA. 2015. Screening of antimicrobial activity of selected Egyptian cyanobacterial species. *J Ecol Health Environ*, 3:7–13
- Abdo SM, Ali GH, El baz F., 2015. Potential production of omega fatty acids from microalgae. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*,vol 34 n (2), Article No. 35, Pages: 210-215
- Adam F, Abert-Vian M, Peltier G, Chemat F .2012.“Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. *Bioresour Technol* 114:457–465.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.096pppo20>
- Adhikari, U.; Mateu, C. G.; Chattopadhyay, K.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Ray, B. 2006. Structure and antiviral activity of sulphated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*, 67, 2474–2482
- Adhoni S.A., 2016,Thimmappa S.C,. Kaliwal B.B. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Chorella vulgaris* isolated from Unkal Lake. *Journal of Coastal Life Medicine.*, 4(5): 368-373
- AFNOR, 1996. Jus de fruits et legumes : specification et methods d’analyse. Paris, 2 éd, Tour Europe, 155p.
- AFSSA, CNERNA, CNRS, 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Le fer. Paris, Ed Tec et Doc, Lavoisier, p.p.150-155. *Agric. Food Chem.*, vol.49, p.p. 669-674.
- Aguilera, JM, Stanley DW, 1999. *Microstructural principles of food processing and engenierring*, 2nd Edition. Aspen Publisher, Gaithersburg, 432p
- Aguirre, A., Bassi, A., 2014. Investigation of high pressure steaming (HPS) as a thermal treatment for lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 164, 136-142.
- Agwa O.K, Ibe S.N, Abu G.O., 2012. Biomass and lipid production of a fresh water algae *Chlorella sp.* using locally formulated media. N°9, vol.3 . *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*, p.p. 288-295.

Références bibliographiques

- Ahmed E.A. 2016. Antimicrobial Activity of Microalgal Extracts Isolated From Baharia Oasis, Egypt. Global. Advanced. Research. Journal of . Microbiology. Vol. 5(3) pp.. 033-041,
- Ahmed, J., & Kumar, V. 2022. Effect of high-pressure treatment on oscillatory rheology, particle size distribution and microstructure of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 62, 102617. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102617> Arakawa, T., Kita, Y., &
- Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M., Huntington, T., Hasan, M. 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestical animals and fish .
- Albagnac G., Varoquaux P., Montigaud J C., 2002. Technologies de transformation des fruits. Paris, Lavoisier, 498p.
- Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A. 2019, Brooks, MS-L. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. . *J. Appl. Phycol.* 31, 61-88.
- Ali HEA., Shanab SMM, Abo-state MAM, Shalaby EAA, 2015. Screening of microalgae for antioxydant activities, carotenoids and phenolic content. *Applied mechanics and materials*, vol 625, p.p.156-159
- Amaro H. M., Guedes A. C., Malcata F. X. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A. Mendez vilas ed
- Ambrozova, J.V.; Misurcova, L.; Vicha, R.; Machu, L.; Samek, D.; Baron, M.; Mlcek, J.; Sochor, J.; Jurikova, T. 2014. Influence of extractivesolvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules*, 19, 2344–2360.
- Amiali M. and Ngadi M.O., 2012. Microbial decontamination of food by Pulsed Electric Fields (PEFs), in *Microbial decontamination in food industry: Novel Methods and Applications*, Chap. 14, pp 407- 449, Woodhead Publishing Ltd. U.K.
- Amiali M., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Enteritidis* in liquid egg products using pulsed electric field. Thèse de Doctorat, Department of Bioresource Engineering Macdonald Campu s, McGill University Montreal, Quebec. 192 p.

Références bibliographiques

- Amiali M; Ngadi M.O ;Raghavan V.G.S; Nguyen D-H., 2006. Electrical Conductivities of Liquid Egg Products and Fruit Juices Exposed to High Pulsed Electric Fields. *Int. J. Food Properties*. 9: 533–540.
- Amin M., Chetpattananondh P., 2019. Enhanced Lipid recovery from Marine *Chlorella sp.* by ultrasonication with an integrated process approach for wet and dry mass. *Bioenergy Research*. 15p
- Anchang K.A., Lewi D., Nji C. 2016. Toxicological, phytochemical, and antibacterial assessment of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* powder in albino rats. a preliminary study. *Revista peruana de medicina integrativa*. 1(3):5-117 and the USA. n°15, vol. 11, *Journal of Measurement and Characterization*, p.p. 913-923.
- Andersen R. A. 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press.
- Andrich G., Zinnai A, Nesti U., Venturi F., Fiorentini R. 2006. Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (arthrospira) platensis*. *Acta Alimentaria*, 35, 195–203.
- Annamalai J. , Nallamuthu T. 2014 ,Antioxidant potential phytochemicals from methanol extract of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of algal biomass utilisation*. 5 (4). 60-67.
- Anonyme, 1997. *Chlorella vulgaris*. NCBI
- Anonyme, 2007. *World Cancer Research Fund*.
- Anonyme., 2016. *CIQUAL, table de composition nutritionnelle des aliments par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*.
- Aouir A, Amiali M, Bitam A, Benchabane A, Raghavan G.V., 2017. Compariso of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad
- Aouir A. , Amiali M, Kirilova-Gachovska T, Benchabane A and Bitam A. 2015. The Effect of Pulsed Electric Field (PEF) and Ultrasound (US) Technologies on the Extraction of Phycopiliproteins from *Arthrospira Platensis*. *IEEE Canada International Humanitarian Technology Conference (IHTC)*
- Aouir A., 2017. *Extraction des composés bioactifs de Spirulina platensis par champ électrique pulsé*. These de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger, 220p

Références bibliographiques

- Arad S, Yaron A., 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. Vol.3.Trends in Food Science and Technology, p.p. 92–97
- Araujo G. S, Matos L. J., Fernandes J. O., Cartaxo S. J., Gonçalves L. R.Fernandes., F. A.,Farias W. R. 2013.Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. Ultrasonics Sonochemistry, 20, 95 – 98.
- Araujo GS, Matos LJBL, Fernandes JO et al .2013.Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. Ultrason Sonochem 20:95–98
- Arsenault C., 2002. Le magnésium, nutriment essentiel à la santé. La Jasette officielle, le magazine des jeunes familles, vol. 2, n.6. artificial waste water medium. Bioresource Technology 102: 101-105.
- Asavasanti et al.2011. Permeabilization of plant tissues by monopolar pulsed electric fields: effect of frequency. Journal of Food Science,76, p.p.98–11
- Ashokkumar, M.; Mason, T.J. 2007 Sonochemistry. Encycl. Chem. Technol, 247, 1439–1445.
- Ashurst P-R., 2005. Chemistry and Technology of Soft Drinks and fruit juices. Blackwell Publishing Ltd, 2 éd. 393p.
- Ashwell M., 2002. Concepts of Functional International Life Sciences Institute (ILSI Europe), 39p. Assoc, p.p.1440–1449.
- Atalah E, Cruz CMH, Izquierdo MS et al .2007.Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 270:178–185
- Audo M., 2013. Évaluation du potentiel rhéologique d'huiles issues de microalgues pour des applications en tant que matériaux de substitution aux bitumes. These de Doctorat, Université de Nantes, 314p
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) et sorghum products. Journal of agricultural et food chemistry, 51(23), 6657-6662
- Ayhan Z., Yeim H. W., Zhang Q. H., Min D. B., 2001. Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. J. Agric. Food Chem., vol.49, p.p. 669-674.

Références bibliographiques

B

- Balasubramanian R.K., Doan T.T.Y., Obbard J.P.H. 2013. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 215, 216, pp. 929-936.
- Barba F.J., Grimi N., Vorobiev E. 2014. New Approaches for the Use of Non-conventional Cell Disruption Technologies to Extract Potential Food Additives and Nutraceuticals from Microalgae. *Food Eng Rev.* 7: p.p.45–62
- Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A. 2012. Impact of high-pressure processing on vitamin E (α -, γ -, and δ -Tocopherol), vitamin D (cholecalciferol and ergocalciferol), and fatty acid profiles in liquid foods. *J Agric Food Chem* 60:3763–3768
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, Vorobiev, E. 2015. Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77, 773–798. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.015>
- Barbosa-Cánovas, G.V., Altunakar, B., 2006. Pulsed Electric Fields Processing of Foods: An Overview. In: Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications*. Springer Science+Business Media, LLC, pp. 8–15.
- Barka A., Blecker C., 2016. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. N°3, volume 20. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, p.p. 427-43.
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489-1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Batista A. P., Gouveia L., Bandarra N. M., Franco J. M. and Raymundo A., 2013, Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products, *Algal Research*, 2, 164-173
- Batista P., Nunes M.C., Fradinho P., Gouveia L., Sousa I., Raymundo A., Franco J. M., 2012 Novel foods with microalgal ingredients—effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of *Spirulina* and *Haematococcus* gels, *Journal of Food Engineering*, 110: 182–189

Références bibliographiques

- Batista P., Nunes M.C., Raymundo A., Gouveia L., Sousa I., Cordobes F., Guerrero A., Franco J. M., 2010. Microalgae biomass interaction in biopolymer gelled systems, *Food Hydrocolloids*, , 25: 817-825.
- Baumgartner S, Bruckert E, Gallo A, Plat J., 2020. The position of functional foods and supplements with a serum LDL-C lowering effect in the spectrum ranging from universal to care-related CVD risk management. *Atherosclerosis*, In Press.
- Becerra Celis G.P. 2009. Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Thèse de Doctorat, Ecole supérieure d'électricité, Gif-sur-Yvette (France).
- Becker E.W, 2004. Microalgae in human and animal nutrition, in *Handbook of Microalgal Culture*. Ed. by Richmond A. Blackwell, Oxford, p.p.312–351.
- Becker E.W, 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.*, 25, 207-210.
- Beheshtipour H, Mortazavian A M, Mohammadi R, Sohrabvandi S and Khosravi-Darani K., 2013. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milk. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12 144–154
- Belkoura M, Benider A, Dauta A., 1997. Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorella sorokiniana*. *Shihira & Krauss*. n°3, vol. 33. *Annls Limnol*, p.p. 3-11
- Bellou S., M.N. Baeshen, A.M. Elazzazy, D. Aggeli, F. Sayegh, G. Aggelis, .2014 Microalgaù lipids biochemistry and biotechnological perspectives, *Biotechnol. Adv.* 32 (8) (Dec) 1476–1493.
- Beloul A., Zourane K., 2020. Les aliments fonctionnels, formulation d'un yaourt fonctionnel à base de *Syzygium aromaticum*. Mémoire de Master, Université de Bejaia. 56p
- Ben Ammar J., et al., 2011. Impact of a pulsed electric field on damage of plant tissues: effects of cell size and tissue electrical conductivity, *Journal of Food Science* 76 (1) E90–E97.
- Benamor Ben Ayed H, 2015. Etude et optimisation de la bioaccumulation de magnésium dans les microalgues « *Chlorella vulgaris* ». Diplôme de doctorat, Université Paris-Saclay, France, et Université de Sfax, Tunisie, p.p. 21.
- Bensalem, S., Lopes, F., Bodénès, P., Pareau, D., Français, O., & Le Pioufle, B. 2018. Understanding the mechanisms of lipid extraction from

Références bibliographiques

microalga *Chlamydomonas reinhardtii* after electrical field solicitations and mechanical stress within a microfluidic device. *Bioresource Technology* 257 : 129-136.

- Berlinet C., 2006. Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité du jus d'orange. Thèse de doctorat, France, L'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA), 224p.
- Bernaerts, T.M.M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Kermani, Z.J., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M.E., Van Loey, A.M., 2018. Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Res.* 32, 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.017>.
- Bernard O, 2010. Production de biocarburants lipidiques avec des microalgues. *Journal de la Société de Biologie*.vol 202 n3, p.p. 201-211
- Bewicke D., Potter A B., 2009. The emerald food. Ronin publishing, Berkeley, CA, 120p.
- Bhattacharya S., Maurya R., Mishrz SK., Ghosh T., 2016. Solar Driven mass cultivation and the extraction of lipids from *Chlorella variabilis*: A case study; *Algal research*.14, p.p. 137-142
- Bigliardi B, Galiardi F, 2013. Innovation trends in the food industry:The case of fonctionnal food, *Trends in food science and Technology*, 31,118-129
- Biller P, Friedman C, Ross AB 2013. Hydrothermal microwave processing of microalgae as a pre-treatment and extraction technique for bio-fuels and bioproducts. *Bioresource Technology*, vol 136, p.p.188-195
- Billiau L, Constant M., Mattaigne A. , Nzeza R., Vanhamme E, 2010 *Sciences Biomédicales Printemps des Sciences – Bruxelles*.
- Bin azmi AA., Sankaran R., Show PL., Ling TC., Tao Y., Munawaroh HSH., Kong SH., Lee SJ., Chang JS., 2020. Current application of electrical pre-treatment for enhanced microalgal biomolecules extraction. *Bioresource Technology*. 302.
- Binnal P., Babu P.N, 2017. Statistical optimization of parameters affecting lipid productivity of microalga *Chlorella protothecoides* cultivated in photobioreactor under nitrogen starvation. *South African Journal of Chemical Engineering*. 23. p.p. 26-37.
- Bishop W.M. and. Zubeck H. M, 2012, Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements, *J Nutr Food Sci*, vol 2 numero (5).

Références bibliographiques

- Bligh E. G., Dyer W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology*, vol 37, p.p. 911–917.
- Bluhm H. 2006. Pulsed power systems: principles and applications. Heidelberg: Springer; Boardman N.K. (Eds.), Academic Press, New York : p.p. 193-236.
- Boer K., Moheimani N.R., Borowitzka M. A, and Bahri P. A. 2012., Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: A review focused on energy consumption. *Journal of applied phycology*, vol 24 n6.p.p. 1681-1698
- Borges L., Caldas S., D’Oca M.G.M., Abreu P.C., 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*, *Aquac. Reports*. vol 4, p.p.164–168.
- Borowitzka M.A, 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, Vol.70. p.p. 313–321
- Borowitzka M.A. & Borowitzka L.J. (Eds.), Cambridge University Press, London : 257-287.
- Borowitzka M.A., 1988. Fats, oils and hydrocarbons in Microalgal biotechnology.
- Borowitzka MA, 1992. Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 267-279. 30.
- Bosset J O., Galmann P U., Sieber R., 1993. Influence de la translucidité de l’emballage sur la conservation du lait et des produits laitiers. In : *Emballage et conservation des produits alimentaires*, Polytechnica, Paris, p.p. 257-307.
- Bot F., Verkerk R., Mastwijk H., Anese M., Fogliano V., Capuano E. 2018 The effect of pulsed electric fields on carotenoids bioaccessibility: the role of tomato matrix. *Food Chemistry*.
- Bouchia K, Lemgoud L, 2015. Caractérisation biochimique de la souche *Chlorella sp1*, durant le processus de lipogénèse (Effet du NaCl). *Mémoire de Master*. Université de Oum el Bouaghi. 46p
- Boukhris S. et al. 2017. The Potential of a Brown Microalga Cultivated in High Salt Medium for the Production of High-Value Compounds. *Hindawi . Biomedical Research International*.
- Boulho R., 2017. Application de procédés éco-responsables pour l’extraction de molécules de la macroalgue *Solieria chordalis*, caractérisations chimiques et étude d’activités biologiques. *These de Doctorat*. Université de Bretagne Sud. 406p

Références bibliographiques

- Bourgeois C. M., et Larpent J. P., 1996. Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentation alimentaires, Ed Tech et Doc, Lavoisier, 2^{éd}, Tome 2. Paris, 523p.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F et Zucca J., 1996. Microbiologie alimentaire. Lavoisier Tec & Doc, Paris.
- Bourseau, 2013. The culture of *Chlorella vulgaris* in a recycled supernatant: Effects on The biomass production and medium quality. *Bioresource Technology*, vol 132, p.p. 285-292.
- Boyd A. R., Champagne P., McGinn, P. J., MacDougall K. M., Melanson J. E, Jessop P. G. 2012. Switchable hydrophilicity solvents for lipid extraction from microalgae for biofuel production. *Bioresource Technology*, vol 118, p.p.628 – 632.
- Bradley T., Maga D., Antón S, 2015. Unified approach to Life Cycle Assessment between three unique algae biofuel facilities, *Appl. Energy* vol 154, p.p.1052–1061.
- Braescoa V., Gauthie T., Bellislec F., 2013. Jus de fruits et nectars. Vol 48. Cahiers de nutrition et de diététique, p.p. 248-256
- Brennan L., Owende P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* vol 14: p.p. 557-577.
- Brown M.R. and Jeffrey S.W. 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* vol 161: p.p. 91- 113.
- Buchmann, L., Brändle, I., Haberkorn, I., Hiestand, M., Mathys, A., 2019. Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts. *Bioresour. Technol.* vol 291, 121870. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121870>. .
- Bundhoo Z.M.A. 2017, Microwave-assisted conversion of biomass and waste materials to biofuels, *Renew. Sust. Energ. Rev.* vol 82,p.p. 1149–1177, <https://doi.org/10.1016/j.rser.09.066>.
- Buono, S., Langellotti, A.L., Martello, A., Rinna, F., Fogliano, V., 2014. Functional ingredients from microalgae. *Food Funct.* 5, p.p. 1669–1685.
- Burczyk, J., Hesse, M., 1981. The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin. *Plant Syst. Evol.* vol 138, p.p.121-137.

Références bibliographiques

- Byrne, F.P.; Jin, S.; Paggiola, G.; Petchey, T.H.M.; Clark, J.H.; Farmer, T.J.; Hunt, A.J.; McElroy, C.R.; Sherwood, J. 2016, Tools and techniques for solvent selection: Green solvent selection guides. *Sustain. Chem. Process.* 4, p.p.1–24.

C

- Cabibel C., 1976. Extraction, dosage et stabilisation des carotenoides d'agrumes. Vol.34. *Fruits d'outre-mer*, p.p.479-488.
- Camel, V. 2001, Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction et microwave-assisted extraction: their potential et pitfalls. *Analyst*, vol 126 num (7), p.p. 1182-1193.
- Campenni L., Nobre B. P., Santos C. A., Oliveira A. C., Aires-Barros M. R., Palavra A. M. F., Gouveia L. 2012. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Bioenergy and biofuels*.
- Canelli, G., Kuster, I., Jaquenod, L., Buchmann, L., Murciano Martínez, P., Rohfritsch, Z., ... Mathys, A. 2022. Pulsed electric field treatment enhances lipid bioaccessibility while preserving oxidative stability in *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 75, 102897. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102897>
- Carlsson, A.S., van Beilen, J.B., Möller, R., Clayton, D. 2007. Micro-and macro-algae: utility for industrial applications, In: Bowles D, editor. *Outputs from the EPOBIO project*. UK: CPL Press. 82.
- Carreira-Casais A., Otrero P., Garcia- perez P., Garcia-Oliviera P., Perreira A., 2021. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol 18, 9153
- Carrero A, Vicente G, Rodriguez G, Linares M, del Peso GL. 2011. Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalga oil. *Catalysis Today*;167:148e53.
- Carullo, D., Abera, B. D., Casazza, A. A., Donsi, F., Perego, P., Ferrari, G., & Pataro, G. 2018. Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the

Références bibliographiques

aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 31, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.017>

- Castro M. D. L., García-Ayuso L. E. 1998,. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369, p.p. 1 –10.
- Celis B G., 2009. Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgue dans un photobioréacteur continu : Facteurs physiques. (Thèse de Doctorat. GP). Ecole centrale des arts et manufactures « École centrale Paris ».
- Cerón-García, M.C. , Macías-Sánchez M.D., Sánchez-Mirón A., García-Camacho, Molina-Grima E. 2013. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Applied Energy* 103:p.p. 341-349.
- Certik, M., Shimizu, S., 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87, p.p. 1–14.
- Cesaro A, Velten S, Belgiorno V, Kuchta K. 2014. Enhanced anaerobic digestion by ultrasonic pretreatment of organic residues for energy production. *J Clean Prod* 2014;74:119e24
- Cha K. H., Kang S. W., Kim C. Y, Um B. H., Na Y. R., Pan C.-H, 2010 “Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 8, pp. 4756–4761,.
- Cha, K. H.; Koo, S. Y.; Lee, D. U. 2008, Antiproliferative effects of carotenoids extracts from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10521–10526.
- Chaabani E., 2014. Préparation d'extraits lipidiques de microalgues par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Mémoire de Master. Agrocampus ouest, Rennes.50p
- Chatsungnoen, T., Chisti, Y., 2016. Oil production by six microalgae: impact of flocculants impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. *J. Appl. Phycol.* 28, 2697-2705. DOI 10.1007/s10811-016-0823-6.
- Chaudhuri D., Ghate N., Deb S., Panja S., Sarkar R., Rout J., Mandal N. 2014, Assessment of the phytochemical constituents and antioxidant activity of a bloom forming microalgae *Euglena tuba*. *Biological Research.* vol 47:n 24

Références bibliographiques

- Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2015. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Adv. Biofuels Chem. Algae* 184, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.026>
- Cheftel J C., Cheftel H., 1997. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et documentation, Paris, 381 p.
- Chemat, F., Vian, M. A., and Gravotto, G. 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* 13, p.p. 8615–8627. doi: 10.3390/ijms13078615
- Chemat, F., Zill-E, H., Khan, M.K., in press. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* vol 18, issue4, p.p. 318-835
- Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.*, 34, 540–560. *Chemosphere*, p.p. 1244-55. NCBI. National Center for biotechnology information: *Chlorella vulgaris*.
- Chen B.H, Chen T.M, and Chien J.T., 1994. Kinetic Model for Studying the Isomerization of α - and β -Carotene during Heating and Illumination. n°11, volume 42. *J. Agric. Food Chem*, p.p. 2391-2397.
- Chen Y.-J., Huang L.-W, Shih T.-S. 2003.. Diagnosis of oxide films by cavitation microjet impact. *Materials Transactions*, 44, p.p.327–335.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), p.p.71 81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, W., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2011. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour Technol.* vol 102:p.p.135–141.
- Cheng C.-H., Du T.-B., Pi H.-C., Jang S.-M., Lin Y.-H., Lee H.-T. 2011. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresource Technology*, 102, p.p. 10151 – 10153.
- Cherng JY., Liu CC., Shen CR., Lin HH., Shih MF., 2010. Beneficial effects of *Chlorella-11* peptide on blocking LPS-induced macrophage activation and alleviating

Références bibliographiques

thermal injury induced inflammation in rats. N°3, Vol 23. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, p.p. 811-20.

- Chia S.R., Chew K.W, Zaid H.F.M., Chu D.T., Tao Y., Show P.L. 2019, Microalgal protein extraction from *Chlorella vulgaris* FSP-E using triphasic partitioning technique with sonication, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 396.
- Chittapun S., Jonjaroen V., Khumrangsee K., Charoenrat T. 2020. C-phycoyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research*. 46. 10178.
- Cho HS, Oh YK, Park SC, Lee JW, Park JY. 2013. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renew Energ*;54:156e60.
- Cho S-C, Choi W-Y, Oh S-H et al. 2012. Enhancement of lipid extraction from marine microalga, *Scenedesmus* associated with high-pressure homogenization process. *J Biomed Biotechnol*. Article ID 359432, pp 6.
- Choix, FJ., de-Bashan, LE., Bashan, Y. 2012. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme Microb Technol*. 51:p.p. 294–299.
- Choochote W. , Suklampoo L. , Ochaikul D. 2013. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of applied phycology*, vol 26, n1, p.p. 43-48
- Chouana T., 2017. Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*. Thèse de Doctorat. Université de Kasdi Merbah d'Ouargla.
- Chynoweth D.P, 2002. Review of biomethane from marine biomass. University of Florida.
- Clark et al., 1957. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. N° 24, Vol 276. *The Journal of the American Medical Association*.
- Clarke, C.J.; Tu, W.-C.; Levers, O.; Brohl, A.; Hallett, J.P. 2018, Green and sustainable solvents in chemical processes. *Chem. Rev.* 118, p.p. 747–800
- Clément-Laroisiere B., 2014. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris*, en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées en CO₂. These de Doctorat. Ecole Centrale Paris, 233p
- Codex Alimentarius, 2005. Norme générale Codex pour les jus et les nectars de fruits : Codex Stan 247, p.p. 1-2. Codex Stan 247, 19p.

Références bibliographiques

- Coghlan A., 1996. A plateful of medicine. *New Scientist*, vol.2054, p.p 12-13.
- Cohen Z, 1997. The Chemicals of Spirulina, In: Vonshak, A (Ed.) *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*, Taylor & Francis Ltd., p.p. 175-204.
- Concas A., Pisu M., Cao G., 2015. Disruption of microalgal cells for lipid extraction, Through fenton reaction: Modelling of experiments and remarks on its effects on lipid composition. *Chemical Engineering Journal*. vol 263, p.p. 392-401
- Cannon R., 2007. Culturing of *Chlorella vulgaris* - Standard Operating Procedure. Daphnia Research group (University of Reading).
- Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P., Del Borghi M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* vol 48, n (6), p.p. 1146-1151.
- Costa J. A. C. and Morais M. G., 2013. "Microalgae for food production," in *Fermentation Process Engineering in the Food Industry*, C. R. Soccol, A. Pandey, and C. Larroche, Eds., p. 486, Taylor & Francis,
- Costa J. A. V, Radmann E. M, Cerqueira V. S, Santos G. C, Calheiros M. N. 2006. "Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições," N°. 4, vol. 17. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, p.p.429–436.
- Costa J.A.C, Morais M.G., 2013. Microalgae for food production, in *Fermentation Process Engineering in the Food Industry*, C.R.Soccol, A.Pandey, C.Larroche,Eds., p.486, Taylor &Francis
- Coustets M, Al-Karablieh N, Thomsen C, Teissie´ J 2013 Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae. *J Membr Biol* vol 246:p.p.751–760
- Coustets M., Tiessie´ J. 2013. the use of pulsed electric fields for protein extraction from nanochloropsis and chlorella. *IFMBE Proceedings*.Vol. 53. p.p. 405-408.
- Couto R. M., Simoes P. C., Reis A, Da Silva T. L., Martins V. H., Sanchez- Vicente Y. 2010,.Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodium cohnii*. *Engineering in Life Sciences* vol 10, p.p.158–164.
- Couto, D., Melo, T., Conde, T. A., Moreira, A. S. P., Ferreira, P., Costa, M., ... Domingues, P. 2022. Food grade extraction of *Chlorella vulgaris* polar lipids: A comparative lipidomic study. *Food Chemistry*, 375, 131685

Références bibliographiques

- Cravotto G, Boffa L, Mantegna S et al .2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/ or microwaves. *Ultrason Sonochem* vol 15:p.p. 898–902
- Custódio L., Justo T., Silvestre, L. et al., 2012. “Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities,” *Food Chemistry*, vol. 131, no. 1, pp. 134–140,

D

- Dae Geun K., Sung Bum H., (2013) Growth and fatty acid composition of three heterotrophic *Chlorella* species, *Algae* 28 101e109.
- Dang, T.T.; Van Vuong, Q.; Schreider, M.J.; Bowyer, M.C.; Van Altena, I.A.; Scarlett, C.J. 2017, Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *J. Appl. Phycol.* vol 29, p.p.3161–3173.
- Dantas D.M.M, Costa R., Carneiro-da-Cunha M.G., Galvez A. O., Drummond A. R., Bezerra R.S. 2015. Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*. Volume 4, Issue 2
- Dash P, Padhi SB. 2012; Natural Antioxidant Production by *Oscillatoria* Sp. and *Microcystis* Sp. From Ponds of Puri District, Odisha. *International Journal of Microbiology Research*. vol 4, n (6):p.p. 249-252.
- Dawes, C.J., Mathieson, A.C. 2008. *The Seaweeds of Florida*. University Press of Florida, Gainesville.
- Dejoye Tanzi C., Abert Vian M., Ginies C., Elmaataoui M., Chemat F., 2012. Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*, vol 17, p.p. 8196–8205.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. 2000. Carotenoid and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research* 36: 2941-2948.
- Del Campo, J.A.; Moreno, J.; Rodriguez, H. 2000, Carotenoid content of Chlorophycean microalgae: Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta). *J. Biotechnol.* vol 76, p.p.51–59.

Références bibliographiques

- Demirbas A, Demirbas MF., 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion Management*. vol 52, p.p. 163-170.
- Demirbas A. 2009. Production of biodiesel from algae oils. *Energy Source*;A31: 163e8.
- Demirbas M.F, 2011. Biofuels from algae for sustainable development, *Appl. Energy* vol 88, p.p.3473–3480.
- Dey, S.; Rathod, V.K. 2013, Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason. Sonochem.* vol 20, p.p.271–276.
- Diker KS, Akan M, Hascelik G, Yurdakök M. 1991. The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett Appl Microbiol*; 12: 34-5.
- Dineshkumar R., Nrendran R., Jayasingam P., Sampathkumar P., 2017. ***Cultivation and Chemical Composition of Microalgae Chlorella vulgaris and its Antibacterial Activity against Human Pathogens.*** *Aquac Mar Biol*, vol 5(3): 00119
- Djemai W., 2019. Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactives. These de Doctorat. Université de Tlemcen, 114p
- DomínguezDíaz L, Fernández-Ruiz V, Cámara M .2020. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *Journal of Functional Foods* 68: 103896,p.p. 1-14.
- Dong T, Knoshaug EP, Pienkos PT, Laurens LML .2016. Lipid recovery from wet Oleaginous microbial biomass for biofuel production: a critical review. *Appl Energy* vol 177:p.p. 879–895
- Dos santos et al, 2014
- Doucha J., Straka F., Lívanský K. 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp. in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* vol 17 n(5): p.p. 403–412.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy* vol 88, p.p. 3331–3335
- Drummond A. R., Bezerra R.S., 2015. Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*. Volume 4, Issue 2
- Du Y., Schurr B., Kersten SRA, Brillman DWF, 2015. Opportunities for switchable solvents for lipid extractions from wet algal biomass: An energy evaluation. *Algal Research*, vol 11, p.p. 271-283

Références bibliographiques

- Dubinsky Z., Aaronson S.. 1979 .Increase of lipid yields from some algae by acid extraction.Phytochemistry, 18, p.p. 51 – 52.
- Dunker, S., Wilhelm, C. 2018. Cell wall structure of coccoid green algae as an important trade off between biotic interference mechanisms and multidimensional cell growth. Front microbiology, vol 13 n9

E

- Egan H ,Kirk RS, Sawyer R .1981. Pearson's Chemical Analysis of Foods.8thEdition, Churchill Livingstone. p.p. 7-34.
- Eing C, Goettel M, Straessner R et al.2013.Pulsed electric field treatment of microalgae—benefits for microalgae biomass processing. IEEE Trans Plasma Sci 41:p.p. 2901–2907
- Ekpo MA, Etim PC. 2009. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Sida acuta* on microorganisms from skin infections.. Journal of Medicinal Plants Research; vol 3(9), p.p.621-624.
- El guecier S., 2012. Caractérisation nutritionnelle d'une cyanobactérie '*Chlorella*', Mémoire de Master, Université de Blida 1, 98p.
- El makawy A.I., Abdel-Aziem S. H., Ibrahim F. M., Sharaf H. A., O. M. Abd-Elmoneim, A.M Darwish,. 2016. Potential Modulator Role of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* On Monosodium Glutamate Oxidative Stress, Genotoxicity, Apoptotic Gene Expression and Histopathological Alterations. International Journal of PharmTech Research . Vol.9, No.11, p.p 161-177,
- El Sheekh M.M, Fathy A.A., 2009. Variations of some nutritional constituents and fatty acid profiles of *Chlorella Vulgaris* Beijerinck grown under auto and heterotrophic conditions. N°2, volume 5. International Journal of Botany, p.p. 153-159.
- El-Baky HHA, El Baz FK, El-Baroty GS. 2008 Characterization of nutraceutical molecules in blue green alga *Spirulina maxima*. J Med Plants Res; 2(10): 292-300.
- Elersek T., Flisar K., Likožar B., Klimencic M., Golob J., 2020. Electroporation as a Solvent-Free Green Technique for Non-Destructive Extraction of Proteins and Lipids From *Chlorella vulgaris*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, vol 8, article 443

Références bibliographiques

- El-fayoumy E.A., Shanab S.M. M., Shalaby E.A. 2020. Metabolomics and Biological activities of *Chlorella vulgaris* grown under modified growth medium (BG11) composition. *Journal of Natural Sciences*. vol 19.n 1.
- Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, T.V., Velpuri, J., Kuppam, C., 2018. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94, p.p. 49–68.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>
- Eriksen, N.T. 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*. 30:1525-36.
- Eskilsson C. S, Björklund E.. 2000, Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 902, 227 – 250.
- Espiard E., 2002. Introduction à la transformation industrielle des fruits. Lavoisier, Paris,360p.

F

- Fabre J. F, Niangoran N. U. F, Gaignard C, Buso D., Mouloungui Z, Valentin R., 2022. Extraction, purification and stability of C-phycoyanin. *European food research and technology*, vol 248 n 6; p.p. 1583-1599
- Fadoul H.E., 2014. Antimicrobial Activity of Extracts from Aquatic Algae Isolated From Salt Soil and Fresh Water in Thailand. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*. Volume 2, Issue 11 . p.p.149-152
- FAO : Food and Agriculture Organisation, 2018.
- FDA : Food and Drug Administration, 2014.
- Felix et al., 1998. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, Vol.18 .p.p.265-76.
- Feng Y Chao Li, Zhang D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in
- Fiedor, J.; Burda, K. 2014, Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, p.p.466–488. [CrossRef] [PubMed]
- Filali R., Tebbani S., Dumur D. Isambert A. Pareau D, Lopes F. 2011. Growth modelling of the green microalga *Chlorella vulgaris* in an air-lift photo-bioreactor. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*. vol 18 :p.p.10603-10608

Références bibliographiques

- Flaumenbaum B. 1949; Electrical treatment of fruits and vegetables before extraction of juice. Trudy OTIKP. 3:p.p.15–20.
- Flisar K, Meglic S H, Morelj J, Golob J, Miklavcic D. 2014. Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for E. coli inactivation and microalgae lipid extraction Bioelectrochemistry (doi 10.1016/j.bioelechem.2014.0
- Flisar K, Meglic S H, Morelj J, Golob J and Miklavcic D, 2014. Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for E. coli inactivation and microalgae lipid extraction Bioelectrochemistry (doi 10.1016/j.bioelechem.2014.03.008)
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry, 226, p.p.497–509.
- Foltz G .2012.Algae lysis with pulsed electric fields. California Polytechnic State University, San Luis Obispo
- Fournier P., 2002. Conservation des aliments. Encyclopaedia Universalis, Version 9, 6p.
- Fradique, M., A.P. Batista, M. Nunes, L. Gouveia and N. Bandarrac Raymundo, 2010. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. J. Sci. Food Agric., 90: p.p. 1656-1664.
- Frey W., Gusbeth C., Schwartz T., 2013, Inactivation of *Pseudomonas putida* by pulsed electric field treatment: a study on the correlation of treatment parameters and inactivation efficiency in the short-pulse range, Journal of Membrane Biology (<http://dx.doi.org/10.1007/s00232-013-9547-6>).
- Fuentes M.M.R., Fernandez G.G.A., Perez J.A.S. and Guerrero J.L.G. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. Food Chem. 70: 345- 353.

G

- Ganeva V., Galutzov B., Teissié J., 2003 High yield electroextraction of proteins from yeast by a flow process, Analytical Biochemistry vol 315 (1) p.p.77–84.
- Ganzler K., Salgó A., Valkó K.1986,..Microwave extraction: a novel sample preparationmethod for chromatography. Journal of Chromatography A 371, p.p. 299 – 306.

Références bibliographiques

- Garcia-Vaquero, M.; Ummat, V.; Tiwari, B.; Rajauria, G. 2020. Exploring ultrasound, microwave and ultrasound-microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Mar. Drugs* , 18, 172.
- Garoma T., Janda D. ,2016. Investigation of the effects of microalgal cell concentration and electroporation, microwave and ultrasonication on lipid extraction efficiency, *Renew. Energy* 86 117–123, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.08.009>.
- Gateau, H., Blanckaert, V., Veidl, B., Burlet-Schiltz, O., Pichereaux, C., Gargaros, A., Schoefs, B. 2021. Application of pulsed electric fields for the biocompatible extraction of proteins from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioelectrochemistry*, 137, 107588. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107588>
- Gateau, H., Solymosi, K., Marchand, J., & Schoefs, B. 2016. Carotenoids of microalgae used in food industry and medicine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol 17(13), p.p.1140–1172. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160808123841>
- Geciova J, Bury D, Jelen P. 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review. *Int Dairy J*;12:541e53.
- Geetha BV, Navasakthi R, Padmini E. 2010; Investigation of Antioxidant Capacity and Phytochemical Composition of Sun Chlorella , An Invitro Study. *J Aquac Res Development*.1:104
- Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao L et al, 2012. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, 125 (0): p.p. 175-181
- Ghasemi Y, Yazdi TM, Shafiee A, Amini M, Shokravi S, Zarrini G., 2004. Parsiguine a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology*.42(4-5):p.p. 318-322
- Ghosh S., Roy S., Das D., 2015. Enhancement in lipid content of *Chlorella* sp. MJ 11/11 from the spent medium of thermophilic bihydrogen production process. *Bioresource Technology*. vol 223, p.p. 219-226
- Gille A, Trautmann A, Posten C, Briviba K., 2016. Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.

Références bibliographiques

- Givens DI, Gibbs RA, 2006. Very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the food chain in the UK and the potential of animal-derived foods to increase intake. *Nutrition Bulletin*, 31, p.p. 104-110.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., Frey, W., 2013. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Res.* 2, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004>.
- Goh L. P., Loh S. P, Fatimah M. Y. and Perumal K., 2009, Bioaccessibility of Carotenoids and Tocopherols in Marine Microalgae, *Nannochloropsis* sp. and *Chaetoceros* sp., *Mal J Nutr.*, 15(1), p.p. 77 – 86.
- Golberg A, Fischer J, Rubinsky B. , 2010: The use of irreversible electroporation in food preservation. *Irreversible Electroporation*. p.p. 273–312.
- Golberg A, Rubinsky B. 2013. Mass transfer phenomena in electroporation—transport in biological media. New York: Elsevier; p. 456–92.
- Golberg, M. Sack, J. Teissie, G. Pataro, U. Pliquet, G. Saulis, S. Töpfl, D. Miklavcic, E. Vorobiev, W. Frey, 2016. Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development, *Biotechnol. Biofuels* 9
- Goldberg I., 1994. *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Springer US, Ed.01, p.571.
- Gong M., Bassi M., 2018. Carotenoids from microalgae: a review of recent developpements. *Biotechnology advances*. vol 34, p.p. 1396-1412
- González del Val A, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, et al. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Microbiol*; 4: p.p.35-40.
- Gordon H. T., Bauernfeind J. C. 1982. Carotenoids as food colorants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18–59.
- Gouveia L, Batista A.P, Miranda A, Empis J, Raymundo A., 2007. *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. Vol.8. *innovative food scienceemerging technologies*, p.p. 433-436
- Gouveia L, Batista A.P, Raymundo A, Sousa I, Empis J, 2006. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. Vol.222. *European Food Research and Technology*, p.p. 362–367.

Références bibliographiques

- Gouveia L, Coutinho C, Mendonça E, Batista A.P, Sousa I, Bandarra N.M., 2008. Sweet biscuits with *Isochrysis galbana* microalga biomass as a functional ingredient. Vol.88. Journal of the Science of Food and Agriculture, p.p. 891– 896.
- Gouveia L, Veloso V, A. Reis, Fernandes H, Novais J, Empis J., 1996. Evolution of. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. 57. Bioresource Technology, p.p. 157-163.
- Gouveia L., Batista A. P, Miranda A., Empis J. and Raymundo A., 2007, *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies, Innovative Food Science and Emerging Technologies,8: p.p.433-436.
- Gouveia L., Coutinho C., Mendonca E., Batista A. P., Sousa I., Bandarra N. M. and A. Raymundo, 2008 Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*, Journal of the Science of Food and Agriculture, b.
- Gouveia L., Raymundo A., Batista A. P., Sousa I. and Empis J. 2006, *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions, Eur Food Res Technol, , 222, p.p.362–367.
- Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardoso, M.T., Palavra, A.F., Mendes, R.L. 2007. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. Food Chemistry 101:717-723.
- Gracia L I. O, Cianca K, Montero L, Padilla B E, Norés G I, Lobato V C, Batista C A.,
- Greque de Morais Michele, Brunada Silva Vaz, Etiele Greque de Morais, Jorge Alberto Vieira Costa., 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. BioMed Research International. p.15
- Greque de Morais, M. and Costa, J. 2007. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. Biotechnol Lett. 29:1349–1352.
- Grimi N, Dubois A, Marchal L et al. 2014. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. Bioresource Technologie . 153: p.p.254 259
- Grimi N., 2009. Vers l'intensification du pressage industriel des agroressources par champ électrique pulsé: Etude multi-échelle. These de Doctorat, Université de Technologie, Compiègne. 142p

Références bibliographiques

- Grosso C., Valentão P., Ferreres F., Andrade P. B. 2015, Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. *Marine . Drugs* 13, p.p.3182-3230;
- Guderjan, M., Elez-Martínez, P., Knorr, D., 2007. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, p.p. 55–62.
- Guiry, M. 2008. Seaweed Site [Online]. Available from:<http://www.seaweed.ie/default.lasso>
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., Bux, F., 2014. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel* 128, p.p. 46-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.059>.
- Günerken, E.; D’Hondt, E.; Eppink, M.; Garcia-Gonzalez, L.; Elst, K.; Wijffels, R. 2015, Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, p.p. 243–260. [CrossRef]
- Guo, B., Yang, B., Silve, A., Akaberi, S., Scherer, D., Papachristou, I., Frey, W., Hornung, U., Dahmen, N., 2019. Hydrothermal liquefaction of residual microalgae biomass after pulsed electric field-assisted valuable extraction. *Algal Res.* 43, 101650. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101650>.
- Gustafson, K.R., Cardellina, J.H., Fuller, R.W., Weislow, O.S., Kiser, R.F., Snader, K.M., Patterson, K.M.L., Boyd, M.R. 1989. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *Journal of the National Cancer Institute.* 81: p.p. 1254-1258.
- Guzmán S., Gato A., and Calleja J. M.,. 2001. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy research.* 15, p.p. 224–230 .

H

- Häckl, K.; Kunz, W. 2018, Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chim.* 21, p.p. 572–580.
- Hadj-Romdhane, F., Zheng X., Jaouen P., Pruvost J., Grizeau D., Croue J.P.

Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. Vol.222.

Références bibliographiques

- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. 2012. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process biochemistry*, vol 47(12), p.p.1691-1698.
- Hajimahmoodi M., Faramarzi M.A., Mohammadi N., Soltani N., Oveisi M.R., Nafissi-Varcheh N. 2010,. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae, *Journal of applied phycology*. vol 22. p.p. 43-50
- Halim R, Rupasinghe TWT, Tull DL, Webley PA 2013 Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass. *Bioresour Technol* 140:p.p. 53–63
- Halim R., Danquah M.K., Webley P.A, 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review, *Biotechnol. Adv.* 30 709–732, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, p.p. 178–185.
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M.K., Webley, P.A. 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Appl. Energy.* 91, 116-121
- Halperin SA., Smith B., Nolan C., Shay J., Kralovec J., 2003. Safety and immunoenhancing effect of a *Chlorella*-derived dietary supplement in healthy adults undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. N° 2, Vol 169. *Canadian Medical Association Journal*, p.p. 111-7.
- Hamed I., Özogul F., Özogul Y., Regenstein M J., 2015. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. N°4, Vol 14. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, p.p. 446-465.
- Han, S.F., Jin, W., Yang, Q., El-Fatah Abomohra, A., Zhou, X., Tu, R., Chen, C., Xie, G.J., Wang, Q., 2019. Application of pulse electric field pretreatment for enhancing lipid extraction from *Chlorella pyrenoidosa* grown in wastewater. *Renew. Energy* 133, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.034>.
- Haoujar I. et al. 2019, The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules.* 24, 4037.
- Hardy, G. 2000. Nutraceutical and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*, 16, 688e698
- Harris WS, 2006, The omega-6/omega3 ratio and endovascular disease risk: uses and abuses. *Current Atherosclerosis Reports*, 8(6), p.p. 453-459.

Références bibliographiques

- Harrison, S.T., 1991. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Adv.* 9, p.p. 217–240.
- Harun R., Singh M., Forde G. M, Danquah M. K. ,2010., “Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 3, p.p. 1037–1047,
- Hasler C M, 1998. Functionnal foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.*52;p.p. 63–70
- Herman, L.2015. *Herb& Spice Companion: the Complete Guide to over 100 Herbs& Spices.*Wellfleet Press, New York, NY.
- Hermann, M. 2009. The impact of the European Novel Food Regulation on trade and food innovation based on traditional plant foods from developing countries. *Food Policy*, 3, p.p. 499–507.
- Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry* 98, p.p. 136 – 148.
- Hibbeln JR, Nieminen LRG, Blasbalg TL et al .2006. Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr* 83:1483S–1493S
- Higdon J., Drake J V., He J., 2009. Potassium. *Linus Pauling Institute micronutrient*
- Hillian M., 1995. Functional foods: current and future market developments. *Food*
- Hooper J., 1984. History and scope of the fruit juices and drinks industry. *N°3*, vol.37.
- Hoppe, H.A. 1979. Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (eds), *Marine Algae in Pharmaceutical Science.* Walter deGruyter, Berlin -New York, pp: 25-119.
- Hosikian A., Lim S., Halim R., Danquah M. K., 2010. Chlorophyll Extraction fromMicroalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering.* Hindawi.
- Hosseinizand H, Sokhansanj S, Lim CJ .2017. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Dry Technol* 1–12
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639

Références bibliographiques

- Huelin F.E, et al., 1971. The anaerobic decomposition of ascorbic acid in the pH range of foods and in more acid solutions. Vol22. Journal of the Science of Food and Agriculture, p.p.540-542.

I

- Ibañez E. et Cifuentes A., , 2013. “Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients,” Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 93, no. 4, pp. 703–709
- Ibrahim I., Elbaily Z., 2020. review: Importance of chlorella and different applications. Alexandria Journal of Veterinary Sciences Vol. 65 (1): 16-34
- IFIC Foundation, 1995. Functional Foods: Opening the door to better health. Food Insight November/December.
- IFIC, 1995. International Food Information Council. 1 10 Connecticut Ave. NW, Suite 430, Washington, DC, 20036540 Interactive Design and Development Inc.
- Igamberdiev AU, Bykova NV, 2018. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. Free Radic Biol Med. pii: S0891-5849(18)30026-1. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.016.
- Imbimbo, P.; D’Elia, L.; Liberti, D.; Olivieri, G.; Monti, D.M. 2020, Towards green extraction methods from microalgae learning from the classics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104, p.p. 9067–9077
- Iqbal J., Theegala C. 2012., Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. Algal Research vol 2, p.p.34-42.

J

- Jabeen S., Gao X., Altarawneh M., Jun-ichiro Hayashi J., Zhang M., and Dlugogorski B.Z., 2020. Analytical Procedure for Proximate Analysis of Algal Biomass: Case Study for *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. Energy Fuels, vol 34, p.p. 474–482

Références bibliographiques

- Jaeschke DP, Rech R, Marczak LDF, et al. 2016; Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresour Technol.* vol 224, p.p.753–757. Epub 2016/12/14.
- Janczyk P, Wolf C, Souffrant W. 2005. Evaluation of nutritional value and safety of the green micro-algae *Chlorella vulgaris* treated with novel processing methods. *Arch Zootech;l* vo8, p.p.132–47.
- Janositz A, Noack A-K, Knorr D. 2011; Pulsed electric fields and their impact on the diffusion characteristics of potato slices. *LWT Food Sci Technol.*vol 44:p.p.1939–45.
- Jay MI, Kawaroe M, Effendi H. 2018, Lipid and fatty acid composition microalgae *Chlorella vulgaris* using photobioreactor and open pond. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.*;vol 141:p.p.1-7.
- Jaya Prakash goud M., Seshikala D., Singara Charya M.A. 2007. Antibacterial activity and biomolecular composition of certain fresh water micro-algae from River Godavari (India). *International Journal on Algae* .vol 9, n4, p.p. 350-358
- Jayalalitha V., Elango A., Pugazhenthii TR. and Balasundaram B. 2019. Yoghurt: Ideal vehicle for healthy ingredients: A review. *International Journal of Chemical Studies*; vol7 ,n4: p.p.1139-1144.
- Jayasooriya et al. 2004. Effect of high power ultrasoundwaves on properties of meat: a review. *International Journal of Food Properties.* vol7, n2, 301-319
- Jayshree A., Jayashree S.,Thangaraju N., 2016. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Mediators. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 8(5):575-581
- Jensen G.S, Ginsberg, Drapeau M.S., 2001. Blue–green algae as an immune enhancer and biomodulator. Vol.3, *Journal of the American Nutraceutical Association*, p.p. 24 - 30
- Joannes C, Sipaut C S, Dayou J, Yasir S M, Mansa k R F, 2015. Review Paper on Cell Membrane Electroporation of Microalgae using Electric Field Treatment Method for Microalgae Lipid Extraction. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* vol 78, 012034
- Johnson, E.J.2002. The role of carotenoids in human health. *Nutritional. Clinic. Care*, vol 5, p.p.56–65. [CrossRef] [PubMed]
- Jong-Yuh C., Mei-Fen S. 2005. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* instreptozytocin-induced diabetic mice. *Life sciences* vol.77, n 9, p.p.980–990.

Références bibliographiques

- JORA 2018. Journal Officiel De La Republique Algerienne N° 25, 16 Chaâbane 1439, p.p. 21-32

K

- Kaci et Abtroun, 2012. Filière boissons en Algérie. Etude réalisée dans le cadre du programme du Ministère de l'Industrie, de la Petite et Moyenne Entreprise et de la Promotion de l'Investissement II, 22p
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* vol 47, p.p. 3954- 3962.
- Kanda H., Li P., Ikehara T., Yasumoto-Hirose M., 2012. Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: extraction yield and properties. *Fuel*, 95, p.p.88 – 92.
- Kannane B., Kane D., Labuza T.P., 1988. Time and temperature effect on stability of Moroccan processed. *Journal of food science*, vol.53, p.p. 1470-1474.
- Kapoore R.V., Butler, T.O., 2018 .Microwave-assisted extraction for microalgae: from biofuels to biorefinery, *Biology* vol 7, n1
- Karlsen A., 2007. Anthocyanins inhibit nuclear factors-kappa beta activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr*, vol.137, p.p.1951-1954.
- Kassis NM, Beamer SK, Matak KE et al .2010. Nutritional composition of novel nutraceutical egg products developed with omega-3-rich oils. *LWT Food Sci Technol* vol 43, p.p.1204–1212
- Kaufmann, B. and Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, vol 13, n2, p.p.105-113.
- Kay A R., Barton L L., 1991. Microalgae as food and supplement. N°30, Vol 6. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p.p. 555-573
- Kearney, J. 2010. « Food Consumption Trends and Drivers ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 n1554, p.p. 2793-2807. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0149>.

Références bibliographiques

- Kempkes, M. A., Roth, I., & Gaudreau, M. P. J. 2015. Pulsed Electric Field (PEF) method for continuous enhanced extraction of oil and lipids from small aquatic plants (pp. 1–6). Diversified Technologies Inc.. US 9,029,108 2.
- Kentish, S.; Ashokkumar, M. 2011; The physical and chemical effects of ultrasound. In *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*; Springer: New York, NY, USA, pp. 1–12. ISBN 9781441974716.
- Kessler E., 1976. Comparative physiology, biochemistry, and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Syst. Evol*, vol 125,p.p. 129-138.
- Khalil Z.I., Asker M.M. S. , El-Sayed S. , Kobbia I.A., 2009. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1225–1231 DOI 10.1007/s11274-009-0292-z
- Khoeyi ZA. , Seyfabadi J., Ramezanpour Z, 2011. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquacult Int*, vol 20, p.p. 41-49
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Pimenta-Leibowitz, M., Nechev, J., Zilberg, D., 2006. Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena sp.* *Aquaculture* vol 255, p.p.142–150.
- Kim YH, Choi YK, Park J, Lee S, Yang YH, Kim HJ, 2012, et al. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresour Technol*;vol 109:312e5.
- Kim, D-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J-I., Lee, K., Park, J-Y., Chang, W-S., Lee, J-S., Oh, Y-K., 2016. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresour. Technol.* vol 199, p.p. 300-310.<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>.
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C.W., Park, M.S., Yang, J.W., 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnol adv*, vol 31 n 6, p.p.862-876
- Kinkel, D., 2018. Mikroalgen – eine Rohstoffquelle der Zukunft! [WWW Document]. der Ernährungsindustrie E.V, Forschungskr.
- Kitada K. et al, 2009; Antioxidant and Antibacterial Activity of Nutraceutical Compounds from *Chlorella vulgaris* Extracted in Hydrothermal Condition. *Separation Science and Technology*..44: 1228–1239

Références bibliographiques

- Klejdus B, Lojková L, Plaza M, Snóblová M, Štěrbová D. 2010. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry.
- Kokou F., Makridis P., Kentouri M., and Divanach P , 2012., “Antibacterial activity in microalgae cultures,” *Aquaculture Research*, vol. 43, no. 10, p.p. 1520–1527,
- Kolympiris C., Kalaitzandonakes, Miller D., 2014. “Public funds and local biotechnology firm N. creation,” *Research Policy*, vol. 43, no. 1, p.p. 121–137,
- Kong W, Liu N, Zhang J et al .2014. Optimization of ultrasound- assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *J Food Sci Technol* vol 51, n9, p.p. 2006–2013
- Kord A., Debbari Z., Ghojri M., Chader S., 2012. Caractérisation des acides gras de la Chlorelle en vue d’une application bioénergétique : Isolement et purification des souches de la chlorelle. *Revue des Energies Renouvelables SIENR’12*, p.p. 253 – 256.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. 2006. Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Discussion Paper 30. Washington, DC: World Bank
- Kotnik T, Kramar P, Pucihar G ,Miklavicic D , 2013. Cell membrane electroporation – Part 1: The phenomena *IEEE Electr. Insul. Mag.* vol 28, n5, p.p.14-23
- Krinsky, N.I.; Mayne, S.T.; Sies, H. , 2004. *Carotenoids in Health and Disease*; Marcel Dekker: New York, NY, USA,
- Krishnan S., Abd N., Aminuddin NF., Quraishi KS., Azman NS., Cravotto G., Leveque JM, 2019. Microwave assisted lipid extraction from *Chlorella vulgaris* in water with 0.5%-2.5% of imidazolium based ionic liquide as additive. *renewable energy*, 34p
- Kulkarni S, Nikolov Z .2018. Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Res* vol 35, p.p.185– 193
- Kumar M, Kulshreshtha J, Singh G.P., 2011. Growth and biopigment accumulation of Cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Braz. J. Microbiol.* vol 42, p.p. 1128– 1135
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. 2011. Pulsed electric field pretreatment of switchgrass and wood chip species for biofuel production. *Ind Eng Chem Res* ;vol 50, p.p.10996–1001.

Références bibliographiques

- Kwak, N. S., & Jukes, D. J. 2001. Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*, vol 13, 99e107
- Kwang HC, Lee HJ, Koo SY et al .2010.Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem* vol 58, p.p.793–797

L

- Lam, G. P., Postma, P. R., Fernandes, D. A., Timmermans, R. A. H., Vermuë, M. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & Olivieri, G.2017. Pulsed Electric Field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, vol 24, p.p. 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.001>.
- Lavilla, I.; Bendicho, C. 2017. Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp. 291–316. ISBN 9780128096154.
- Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F. 2011. Enhancing Extraction Processes in the Food Industry. Series: Contemporary Food Engineering. CRC Press, Taylor & Francis LLC. p. 592.
- Lecerf J.M., 2003. Les antioxydants et les autres éléments protecteurs dans les jus de fruits et légumes. Lille, Institut Pasteur, p.p.1-39.
- Lee J., Cho D.H., Ramanan R., Kim B-H , Oh H.M., Kim H.S.2013. Microalgaeassociated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *BioresourceTechnology* vol 13, p.p. 195-201.
- Lee J.Y., Yoo C., Jun S.Y., Ahn C.Y, Oh H.M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, vol 101, pp. S75–S77.
- Lee SY, Cho JM, Chang YK, Oh YK. , 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review *Bioresource Technology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Lee YC, Huh YS, Farooq W, Chung J, Han JI, Shin HJ, et al. 2012. Lipid extractions from docosahexaenoic acid (DHA)-rich and oleaginous *Chlorella* sp. biomasses by organic-nanoclays. *Bioresour Technol*; vol 137, p.p.74-81.

Références bibliographiques

- Lee YC, Huh YS, Farooq W, Han JI, Oh YK, Park JY., 2013. Oil extraction by aminoparticle-based H₂O₂ activation via wet microalgae harvesting. RSC Adv;vol 3:12802e9. b
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. Biomass Bioenergy vol 46, p.p. 89-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bionbioe.2012.06.03>
- Lee, S.Y., Cho, J.M., Chang, Y.K., Oh, Y-K., 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. Bioresour. Technol. vol 244, p.p.1317-1328.<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>.
- Leong, T.; Ashokkumar, M.; Kentish, S. 2016;The growth of bubbles in an acoustic field by rectified diffusion. In Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry; Springer: Singapore, pp. 69–98. ISBN 9789812872784
- Leong, T.; Ashokkumar, M.; Sandra, K. 2011. The fundamentals of power ultrasound—A review. Acoust. Aust, vol 39, p.p. 54–63.
- Leonhardt L., Käferböck A., Smetana S., de Vos R., Toepfl S., Parniakov O., 2020. Bio-refinery of *Chlorella sorokiniana* with pulsed electric field pre-treatment. Bioresource Technology vol 301, 122743
- Leonhardt L., Kaferbock A., Smetana S., De vos R., Toepfl S., Parniakov O., 2020. Bio-refinery of *Chlorella sorokiniana* with pulsed electric field pretreatment. Bioresource Technology. 301, 122743
- Levy J, Stauber J, Dianne F. Jolley .2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. Science of the Total Environment vol 387, p.p. 141–154
- Leyral G., Vierling E., 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Franc, Doin, CRDP d'Aquitaine, 287p.
- Li H., Pordesimo L., and Weiss J., 2004. “High intensity ultrasoundassisted of oil from soy beans. Food Research International, vol 34. n7. p.p. 731-738
- Li L., Li W., Kim Y.-H, Lee Y.W., 2013. “Chlorella vulgaris extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice,” Experimental and Toxicologic Pathology, vol. 65, no. 1- 2, pp. 73–80,
- Liang K., Zhang Q., Cong W. 2012. Enzyme-assisted aqueous extraction of lipid frommicroalgae. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 60, p.p.11771–11776.

Références bibliographiques

- Lin L.P., 1985. Microstructure of spray-dried and freeze-dried microalgal powders, *FoodStruct.* vol 4, n2,17.
- Littler, D. S., Littler, M. M. 2000. *Caribbean Reef Plants*. Offshore Graphics, Washington,D.C.
- Liu, J. C., Chen, Y. M., & Ju, Y. H. 1999. Separation of algal cells from water by column flotation. *Separation Science and Technology*, vol 34, n11,p.p. 2259–2272.<https://doi.org/10.1081/SS-100100771>
- Liu, J., Chen, F., 2016. Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and prospects. *Adv biochem ebg biotechnol.*vol 153, p.p. 1-35
- Liu, R., Li, S., Tu, Y., Hao, X., & Qiu, F. 2022. Recovery of value-added products by mining microalgae. *Journal of Environmental Management*, vol 307, 114512. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114512>
- Liu, S., Gifuni, I., Mear, H., Frappart, M., & Couallier, E. 2021. Recovery of soluble proteins from *Chlorella vulgaris* by bead-milling and microfiltration: Impact of the concentration and the physicochemical conditions during the cell disruption on the whole process. *Process Biochemistry*, vol 108, p.p.34–47. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.021>
- Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., Zhou, B.-C., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* vol99, p.p.4717–4722.
- Livre turquoise: Algues filiere du futur, 2010. Adebitech edition. Romainville. 182p
- Loke Show P. ,2022. Global market and economic analysis of microalgae technology: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, vol 357, 127329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127329>
- Lorenz R. T., Cysewski G. R. 2000.Commercial potential for *Haematococcus* microalgaeas a natural source of astaxanthin. *Trends biotechnology*, vol 18, p.p. 160–167.
- Luengo, E., et al., 2015.Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.02.012>
- Luengo, E., Martinez, J.M., Bordetas, A., Alvarez, I., Raso, J., 2015. Influence of the treatmentmedium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* vol 29, p.p.15-22.

Références bibliographiques

M

- Ma Y.-A., Cheng Y.-M., Huang J.-W., Jen J.-F., Huang Y.-S., and Yu C.-C., 2014. “Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 37, no. 8, pp. 1543–1549,.
- Ma YA, Cheng YM, Huang JW, Jen JF, Huang YS, Yu CC .2014.Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess Biosyst Eng* vol 37, p.p. 1543–1549. [https:// doi.org/10.1007/s00449-014-1126-4](https://doi.org/10.1007/s00449-014-1126-4)
- Maci´as-Sa´nchez MD, Mantell C, Rodr´ıguez M et al .2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* vol 77, p.p.948–952
- Maciel, E., Leal, M. C., Lillebø, A. I., Domingues, P., Domingues, M. R., & Calado, R.2016. Bioprospecting of marine macrophytes using MS-based lipidomics as a new approach. *Marine drugs*, vol 14, n3, 49.
- Mahanom Z., Azizah A.H., Dzulkifly M.H., 1990. Effect of different drying methods on concentration of several phytochemicals in herbal preparation 8medecinal plant leaves. *Malaysian Journal of Nutrition*.vol 5, p.p.47-54
- Makinen-Aakula, M. 2006. Trends in functional foods dairy market. In *Proceedings of the third functional food net meeting*.
- Maksimova, I. V.; Bratkovskaya, L. B.; Plekhanov, S. E. 2004, Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biol. Bull.* vol 31, n 175–181.
- Malykh, V.N.; Petrov, G.S. 2003 On sonocapillary effect. In *Proceedings of the 5th World Congress on Ultrasonics (WCU)*, Paris, France, 7–10 September; pp. 435–438.
- Manchu N., Melpha Y., Jeeva S., Edwin James J.. 2015. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Chaetomorpha antennina* from rasthacaud coast, tamil nadu, india.world Journal of Pharmaceutical Research. Volume 4, Issue 3, p.p.1337-1351.
- Manivannan K, Anantharaman P, Balasubramanian T. 2012. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p.p.342-346.
- Mao, W.; Li, H.; Li, Y.; Zhang, H.; Qi, X.; Sun, H.; Chen, Y.; Guo, S. 2009, Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysachharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* vol44, p.p.70–74.

Références bibliographiques

- Mark-Herbert, C. 2004. Innovation of a new product category e functional foods. *Technovation*, vol 24, 713e719.
- Markou, G., & Nerantzis, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532–1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>
- Markou, G., Chentir, I., & Tzovenis, I. 2021. Microalgae and cyanobacteria as food: Legislative and safety aspects. *Cultured Microalgae for the Food Industry* (pp. 249–264). Academic Press.
- Martinez-Guerra E, Gude VG, Mondala A, Holmes W, Hernandez R .2014. Microwave and ultrasound enhanced extractivetransesterification of algal lipids. *Appl Energy* 129:354–363. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.04.112>
- Mason, T.J., 1990. *Chemistry with Ultrasound*. Elsevier Applied Science, New-York.
- Mason, T.J., 1992. *Practical Sonochemistry: User’s Guide to Applications in Chemistry and Chemical Engineering*. Ellis Horwood Ltd., New York.master, Université d'Etat d'Haiti (UEH / FAMV).
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS .2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 14:217–232
- Materassi R, Paoletti C, Balloni W, Florenzano G., 1980. Some considerations on the maternal transfer with *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) supplements. N°9, Vol 61.
- Mato I., Suarez-luque S., Huidoha J.F., 2005. A review of analytical methods to dermine organic acids in grapes juices and wines. *Food Research International*, n38, p.p.1175-1176.
- Matos J.,Cardoso C., Bandarra N.M., Afonso C., 2019, Microalgae as a healthy ingredient for functional food: A review. *food and Function*.1-41
- Mcclements DJ, Decker EA, Park Y, Weiss J .2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* vol 49, p.p.577–606
- McNichol J., MacDougall K, Melanson J., McGinn P. 2012. Suitability of soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification. *Lipids*,vol 47, p.p.195–207.
- Medina-Jaritz N. B, Carmona-Ugalde L. F., Lopez-Cedillo J.C., Ruiloba-DeLeon F. S. L 2013., “Antibacterial activity of methanolic extracts from *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris*,” *TheFASEB Journal*, vol. 27, abstract 1167.5,

Références bibliographiques

- Mello-Sampayo C., Corvo M. L., Mendes R., Duarte D., Lucas J., Pinto R., Batista A. P., Raymundo A Silva-Lima, B., Bandarra N. M. and Gouveia L., 2013, Insights on the safety of carotenogenic *Chlorella vulgaris* in rodents, *Algal Research*, vol 2, p.p.409–415.
- Mendes, R. L.; Fernandes, H. L.; Coelho, J. P.; Reis, E. C.; Cabral, J. M. S.; Novais, J. M.; Palabra, A. F. 1995 .Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem.* vol53, p.p. 99–103.
- Menrad, K. 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, vol 56, p.p.181e188.
- Menrad, K. 2004. Innovations in the food industry in Germany. *Research Policy*, vol 33, p.p. 845e878.
- Merchant R E., Andre A C., 2001. A Review of recent clinical trials of the nutritional
- Merchant R E., Carmack C A., Wise C M., 2000. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for patients with fibromyalgia syndrome: a pilot study. N°3, Vol 14. *Phytotherapy Research*, p.p.167-73.
- Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M.J., Pouet, Y., 1985. Structures of some botryococenes: branched hydrocarbons from the b-race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* vol 24, p.p. 2995–3002.
- Michalak, I., Tuhy, Ł., & Chojnacka, K. 2015. Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chemistry*, vol 13.
- Milledge JJ, 2011. Microalgae: commercial potential for fuel, food and feed. *Food science and technology*. vol 26 n1, p.p. 28-30
- Miyahara M, Aoi M, Inoue-Kashino N, Kashino Y, Ifuku K. 2013. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multipulse electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem.*;vol 77, p.p.874–876.
- Mizoguchi, T., Takehara, I., Masuzawa, T., Saito, T., Naoki, Y., Sep. 2008. Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *Journal of medicinal food*, vol11, n3, 395–404.
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. 2003, January. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances*. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)

Références bibliographiques

- Mollet, B., & Rowland, I. 2002. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Current Opinion in Biotechnology*, vol 13,483e485.
- Monrose S G., 2009. Standardisation d'une formulation de confiture de chadèque et
- Monteiro C.M., Castro P.M.L., Malcata FX. 2012. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Progress.* vol 28, p.p. 299-311.
- Moraine, G. Shelef, A. Meydan, and A. Levi. 1979. Algal single cell protein from wastewater treatment and renovation process. *Biotechnol. Bioeng.* vol 21, p.p.1191-1207,
- Morais MG, Vaz Bda S, de Morais EG, Costa JA. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Research International*.
- Morand C., Dubray C., Milenkovic D et al., 2011. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* January, vol.93, n.1, p.p.173-180.
- Morita K., Matsueda T., Iida T., Hasegawa T.1999. Chlorella accelerates dioxin excretion in rats. *The Journal of Nutrition* vol 129, n9,p.p. 1731–1736..
- Morris, H. J.; Carrillo, O.; Almarales, A.; Bermudez, R. C.; Lebeque, Y.; Fontaine, R.; Llauro, G.; Beltran, Y, 2007,. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microb. Technol.* vol 40, p.p. 456–460.
- Morris, H.J., Carrillo, O.V., Almarales, A., Bermúdez, R.C., Alonso, M.A., Borges, L., Quintana, M.M., Fontaine, R., 2009. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition. N°2, volume 26. *Biotechnología Aplicada*, p.p.162-165.
- Mostafa S. S. M., 2012. “Microalgal biotechnology: prospects and applications,” in *Plant Science*, chapter 12, pp. 275–314, InTech,
- Multon J L., Bureau G., 1998. L’emballage des denrées alimentaires de grande consommation. Paris, Lavoisier, 1082p.
- Multon J L., Sorsote A., Arthaud J F., 1994. La qualité des produits alimentaires. Paris, Lavoisier, 754p.

Références bibliographiques

N

- Naessens., 1998. Contribution à L'écotoxicologie analytique par des cellules végétales, applications en microscopie et à la réalisation des biocapteurs. (Thèse.Doc.GP). Ecole nationale supérieure des mines de Saint-Etienne, institut national polytechnique de Grenoble, France, 40p.
- Naghdi F. G., Gonz'alez L. M. G., Chan W., and Schenk P. M., 2016 ,“Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production,” *Microbial Biotechnology*, vol. 9, no. 6,pp. 718–726,.
- Nakano S., Noguchi T., Takekoshi H., Suzuki G., Nakano M., 2005. Maternal-fetal distribution and transfer of dioxins in pregnant women in Japan, and attempts to reduce maternal transfer with *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) supplements. N°9, Vol 61. *Chemosphere*, p.p. 1244-55.
- Nascentes, C.C.; Korn, M.; Sousa, C.S.; Arruda, M.A.Z. 2001, Use of Ultrasonic Baths for Analytical Applications: A New Approach for Optimisation Conditions. *J. Braz. Chem. Soc.* vol 12, p.p. 57–63.
- Navapanich T, Giorgi D., 2008. Pulsed electric field apparatus and methods for ethanol production. United States Patent Application 20080311639.
- Nazih H; Bard J-M, 2018. Chapitre 10: Microalgae in Human Health: Interest as a Functional Food. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier. p.p. 211-220
- Negoro M., Shioji N., Miyamoto K., Micira Y.,1991. Growth of microalgae in high CO₂ gas effect of SO_x and NO_x, *Applied biochemistry and biotechnology*. vol 28, p.p. 877-886
- Netten V.C, Hoption Cann H.S.A, Morley D.R, Netten V.J.P., 2000. Elemental and radioactive analysis of commercially available seaweed. n°1–3, vol.255. *Science of The Total Environment*, p.p. 169-175.
- Nicoué, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K. 2007. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction et identification. *Journal of agricultural et food chemistry*, vol 55, n14,p.p. 5626-5635.
- Nighiem-xuan R., 2018. Optimisation de la culture d'Haslea ostrearia en photobioréacteur. These de doctorat, Génie des procédés. Université Bertagne Loire, 280p

Références bibliographiques

- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. 2001, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4): 418-425.
- Nusser SM, Carriquiry AL, Dodd KW, Fuller WA., 1996. A semi parametric nutrition et de diététique, p.p. 248-256.

O

- Obeid S., Beaufils N, Camy S, Takache H, Ismail A, Pontalier P., 2018. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Algal research*.vol 34.p.p. 49-56
- Oh J-S., Y-K., 2016. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresour. Technol.* vol 199, p.p.300-310.
- Oh, Y.-K., 2016. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: [org/10.1016/J.BIORTECH.2015.08.107](https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.08.107).
- Ohkawa S., Yoneda Y., Ohsumi Y., Tabuchi M., 1995. Warfarin therapy and *Chlorella*.N°7, Vol 35. *Rinsho Shinkeigaku*, p.p. 806-7.
- Okamoto K., Iizuka Y., Murakami T., Miyake H., Suzuki T.1978. Effects of *Chlorella*alkali extract on blood pressure in SHR. *Japanese heart journal* vol 19, n4,p.p. 622– 623.
- Ortega-Calvo J. J, Mazuelos C, Hermosin B, Saiz-Jimenez C., 1993. Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. N°4, vol.5. *Journal of Applied Phycology*, p.p. 425–435.
- Ötleş S., Pire R., 2001. Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae Species. NO. 6, VOL. 84. *Journal of AOAC international*, p.p. 1708-1715.

P

- Panda, D.; Manickam, S. 2019,Cavitation technology-the future of greener extraction method: A review on the extraction of natural products and process intensification mechanism and perspectives. *Appl. Sci.*l vo9, n 766.

Références bibliographiques

- Papachristou I., Silve A., Jianu A., Wustner R., Nazarova N., Muller G., Frey W., 2020. Evaluation of Pulsed electric field on the microalgae cell mechanical stability through high pressure homogenization. *Algal Research*. vol 47.
- Park JY, Oh YK, Lee JS, Lee K, Jeong MJ, Choi SA. 2014. Acid-catalyzed hot-water extraction of lipids from *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol*; 153: 408e12.
- Park, J. S.; Chew, B. P.; Wong, T. S. 1998, Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. *J. Nutr.* vol 128, p.p. 1650–1656.
- Parniakov O., Barba F.J., Grimi N., Marchal L., Jubeau S., Lebovka N., Vorobiev E., 2015. Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *nannochloropsis*, *Algal Research*. vol 8, p.p.128–134,
- Pasquet V, Che´rouvrier J-R, Farhat F et al .2011. Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem* vol 46, p.p.59–67
- Patel AK., Joun J., Sim SJ., 2020. A sustainable mixotrophic microalgae cultivation from dairy wastes for carbon credit, bioremediation and lucrative biofuels. *Bioresource Technology*. vol 313
- Patterson G.M.L., Baldwin C.L., Bolis C.M., Caplan F.R., Karuso H., Larsen L.K., Levine I.A., Moore R.E., Nelson C.S., Tschappat K.D., Tuang G.D., Furusawa E., Furusawa S., Norton T.R., Raybourne R.B. 1991. Antineoplastic activity of cultured bluegreenalgae (Cyanophyta). *Journal of Phycology*. vol 27, p.p. 530-536.
- Pérez MJ, Falqué E, Domínguez H., 2016. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, vol 14, p.p.1–38
- Pétrier, C., Gondrexon, N., & Boldo, P. 2008. Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*. Sciences fondamentales, (AF6310).
- Phukan MM, Chutia RS, Konwar BK, Katak R .2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Appl Energy* 88:3307–3312.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy>.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux C., Defraigne JO., 2002. Mécanisme de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, vol 16, i4, p.p. 133-239
- Pingret D., Durand G., Fabiano-Tixier A.-S., Rockenbauer A, Ginies C., and Chemat F., 2012. “Degradation of edible oil during food processing by ultrasound: electron

Références bibliographiques

- paramagnetic resonance, physicochemical, and sensory appreciation,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 31, pp. 7761–7768,
- Piorreck M, Baasch K H, Pohl P., 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. N°. 2, Vol. 23. *Phytochemistry*, p.p. 207-216.
 - Piquemal F., 1990. Contribution à l'étude écophysiological de quelques espèces d'algues en culture. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse III : 137 p.
 - Plaza M, Herrero M, Cifuentes A.A, E. Ibanez., 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. N°16, vol. 57. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p.p. 7159–7170
 - Plaza M, Santoyo S, Jaime L et al .2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT Food Sci Technol* vol 46, p.p. 245–253
 - Plumey L., Braesco V., Bellisle F., 2015. Jus de fruits : Plasir, nutrition et santé. Paris, unijus, 51p.
 - Poojary M.M., Barba F.J., Aliakbarian B., Donsi F., Pataro G., Dias D.A., Juliano P. 2016, Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds, *Mar. Drugs* vol 14, p.p.1–34, <http://dx.doi.org/10.3390/md14110214>.
 - Postma, P. R., Miron, T. L., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., and Epping, M. H. M. 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresour. Technol.* 184, 297–304. doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.033
 - Postma, P.R., Cerezo-Chinarro, O., Akkerman, R.J., Olivieri, G., Wijffels, R.H., Brandenburg, W.A., Eppink, M.H.M., 2018. Biorefinery of the macroalgae *Ulva lactuca*.
 - Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Ferrari, G., 2016. Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresour. Technol.* 203, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.012>
 - Postma, P.R., Suarez-Garcia, E., Safi, C., Yonathan, K., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2017. Energy efficient bead milling of microalgae:

Références bibliographiques

Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates.

Bioresour. Technol. 224, 670–679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.071>

- Prabakaran P, Ravindran AD. 2011. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*;53:150e4.
- Prabakaran P., Ravindran A., 2011. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, vol 53, p.p. 150–154.
- Pradhan J., Das S., Das B.K. 2014, Antibacterial activity of fresh water microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*..Vol 8 (32).p.p. 809-819.
- Prat, D.; Hayler, J.; Wells, A. 2014, A survey of solvent selection guides. *Green Chem.* 16, 4546–4551.
- Praveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Park, J.-Y., Lee, J.-S., Lee, Y.-C., Oh, Y.- K., 2014. Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas. *Bioresour. Technol.* vol 171, p.p. 500-505
- Pulz O., Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae, Minireview, *Applied Microbiology and Biotechnology* vol 65, p.p. 635- 648.
- Punthakee, Zubin, Ronald Goldenberg, et Pamela Katz. 2018. « Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome ». *Canadian Journal of Diabetes* 42 S10,15. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.003>.
- Pushparaj B., Pelosi E., Torzillo G., Materassi R. 1993. Microbial biomass recovery using a synthetic cationic polymer. *Bioresource Technology* vol 43, p.p. 59-62.

Q

- Qin B.L., Barbosa-Ca´novas G.V., Swanson B.G., Pedrow P.D., Olsen R.G., 1998. Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE T. Ind. Appl.* , vol.34, p.p. 43-50.
- Qin S, Timoshkin I V, Maclean M, Wilson M P, MacGregor S J, Given M J, Anderson J G and Wang T., 2014. Pulsed electric field treatment of microalgae: Inactivation tendencies and energy consumption *IEEE Transactions on Plasma Science*., p.p.1-6

Références bibliographiques

R

- Radwan SS .1991.Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. Appl Microbiol Biotechnol vol 35, p.p. 421–430
- Rajendran N., Karpanai Selvan K., Piriya S., Logeswari V., Kathiresan E., Tamilselvi A., Vennison J. 2014. Phytochemicals, antimicrobial and antioxidant screening from five different marine microalgae. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences ISSN: 0974-2115
- Ramluckan K., Moodley K.G., Bux F. 2014, An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the Soxhlet extraction method, Fuel, vol 116, p.p. 103–108, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.07.118>.
- Ranjan A, Patil C, Moholkar VS. 2010. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. Ind Eng Chem Res vol 49, p.p. 2979–2985
- Ranjith Kumar R., Hanumantha Rao P., Arumugam M, 2015. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review, Front. Energy Res.
- Raso V. and Heinz, J Pulsed, 2006. Electric Field Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications, Springer. New York,. (Eds.),
- Ratti C., 2001.Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review, J. Food Eng. vol 49, n4, p.p. 311–319.
- Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Appl. Energy vol 88, p.p. 3411-3424
- Raymundo A, Gouveia L, Batista A.P, Empis J, Sousa I., 2005. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilised by pea protein. Vol.38.Food Research International ,p.p. 961–965.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, Nos. 9/10, Pp. 1231–1237,
- Rego D., Costa L., Pereira M. T., Redondo L. M., 2012. Cell Membrane Permeabilization Studies of *Chlorella sp.* by Pulsed Electric Fields. Ie transactions on plasma science.

Références bibliographiques

- Richmond A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, p.p.1-588.
- Richmond A. 2007. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science.
- Riemersma R.A., 1996. A fat little earner. Lancet, vol.347, p.p.775-776.
- Rivera P.A, Cabornida B.I.M., 2008. Development of ready-to-drink green mango juice. N°1, vol.16. USM R&D Journal.
- Road M., 2005. Protein stability and storage. Technical Resource, USA, 3p.
- Roberfroid M., 2002. Aliments fonctionnels. Paris, Lavoisier, 484p.
- Roberfroid M., Coxam V., Delzenne N., 2008. Aliments fonctionnels. 2éd. Paris, Lavoisier, 1042p.
- Roberston G.L., Samaniogo M.L., 1986. Effect of initial dissolved oxygen level on the degradation of ascorbic acid and the brewing of lemon juice storage, journal of food
- Robinson S.P, Walker D.A., 1981. Photosynthetic carbon reduction cycle. In The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. Volume 8: Photosynthesis. Hatch M.D. & Boardman N.K. (Eds.), Academic Press, New York, p.p. 193-236.
- Röch C., Posten C. 2012. (eds). Introduction to the thematic Focus. Technikfolgenabschätzung Theorie und Praxis. Karlsruher institute für Technologie.
- Rojas et Gerschenson., 1997. Influence of system composition on ascorbic acid destruction at processing temperatures. Vol.4. Journal of the Science and the Food Agriculture, p.p. 369-378.
- Rokicka M., Zielinski M., Dudek M., Debowski M., 2020. Effect of ultrasonic and microwave pretreatment on lipid extraction, of microalgae and methane production, from the residual extracted biomass. Bioenergy research. vol 14, p.p. 752-760.
- Ross, A., Jones, J., Kubacki, M., Bridgeman, T. 2008. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behavior. Bioresource Technology 99: 6494–6504
- Ruen-ngam D., Shotipruk A., Pavasant P, 2011. Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Sep Science Technology vol 46, p.p. 64–707
- Ryckebosch E., Muylaert K., Foubert I, 2012.. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. Journal of the American Oil Chemists' Society, 89, 189–198.

Références bibliographiques

- Ryckebosch E., Muylaert K., Foubert I. 2011. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *J Am Oil Chem Soc*, 10, 1007, pp.1-10
- Ryu B, Kim S., 2013. Isolation and Biological Activities of Peptides from Marine Microalgae by Fermentation. N°1. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, p.p. 441-447.

S

- Sack M., et al., 2010. Research on industrial-scale electroporation devices fostering the extraction of substances from biological tissue, *Food Engineering Reviews* 2 (2) 147–156.
- Sadi, M., 2012. Les micro algues: un défi prometteur pour des biocarburants propres. *Revue Des Energies Renouvelables SIENR'12 Ghardaïa*, 195–202.
- Safafar H., Nørregaard P.U., Ljubic A., Møller P., Løvstad S., Jacobsen C., 2016. Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *J. Mar. Sci. Eng.*, 4, 84; doi:10.3390/jmse4040084
- Safi et al., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p.p. 265–278.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Pontalier, P-Y., Vaca-Garcia, C. 2013. Evaluation of the protein quality of *Porphyridium cruentum*. *J Appl Phycol.* 25:497–501.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P-Y. 2013. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J Appl Phycol.* 25:523–529.
- Safi, C., Charton, M., Ursu, AV., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P-Y., et al. 2014. Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Res.* 3:55–60.
- Safi, C., Liu, D. Z., Yap, B. H. J., Martin, G. J. O., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P.-Y. 2014. A two-stage ultrafiltration process for separating multiple components of *Tetraselmis suecica* after cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, 26(6), 2379–2387. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0271-0>

Références bibliographiques

- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y., Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 35:265–278.
- Sahin S, Nasir N, Erken I., Cakmak Z., Cakmak T., 2019. Antioxidant composite films with chitosan and carotenoid extract from *Chlorella vulgaris*: optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids and surface characterization of chitosan films. *Material Resource Express* , vol 6 095404
- Saien, J.; Daneshamoz, S. 2018, Experimental studies on the effect of ultrasonic waves on single drop liquid–liquid extraction. *Ultrason. Sonochem.* vol 40, p.p. 11–16.
- Salder G.O., Parish M.E., Wickler L., 1992. Microbial enzymatic and chemical changes during storage of fresh and processed orange juice. *Journal of Food Science*, vol.57, n.7, p.p.168-180.
- Salem Olfat MA, Hoballah EM, Ghazi Safia M, Hanna Suzy N. 2014. Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasis on *Nostoc* sp. *Life Science Journal*, vol 11, n12, p.p. 752-758
- Salvador N., Garreta A.G., Lavelli L. and Ribera M.. Mar. 2007, Antimicrobial activity of Iberian macro algae. *Sci.* vol 71, p.p. 101-113.
- Saroya S; Bansal V. 2018. Comparison of Lipid Extraction from Algae (*Chlorella* Species) using Wet Lipid Extraction Procedure and Bligh and Dry Method. 2018 IEEE International Students' Conference on Electrical, Electronics and Computer Science
- Saulis G. 2010, Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing, *Food Engineering Reviews* vol 2, n2, p.p.52–73.
- Schagerl M., Künzl G., 2007. Chlorophyll a extraction from freshwater algae—a reevaluation, *Biologia* vol 62, n3, p.p.270–275.
- Scherer, D., Krust, D., Frey, W., Mueller, G., Nick, P., & Gusbeth, C. 2019. Pulsed electric field (PEF)-assisted protein recovery from *Chlorella vulgaris* is mediated by an enzymatic process after cell death. *Algal Research*, 41, 101536. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.10153>
- Seghiri R., Kharbach M., Essamri A. 2019. Functional Composition, Nutritional Properties, and Biological Activities of Moroccan *Spirulina* Microalga. *Journal of Food Quality*. Hindawi.
- Servaites, J.C., Faeth, J.L., Sidhu S.S. 2012. A dye binding method for measurement of total protein in microalgae. *Anal Biochem.* vol 421, p.p.75–80.

Références bibliographiques

- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., Amini Khoeyi, Z. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J Appl Phycol.* vol 23, p.p.721–726.
- Shalaby S M and Yasin N M ., 2013 .*World J. Dairy Food Sci.*8 58–66
- Shanmugan S., Mathimani T., Anto S., Sudhakar MP., Kumar SS., Pugazendhi A., 2020. Cell density, Lipidomic profile and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 304.
- Sharmin T, Hasan CMd M, Aftabuddin S, Rahman Md.A, Khan M. Growth, 2016, fatty acid, and lipid composition of marine microalgae *Skeletonema costatum* available in Bangladesh coast: consideration as biodiesel feedstock. *J Mar Biol.*; p.p. 1-8.
- Sheih, I. C.; Wu, T. K.; Fang, T. J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol.*, vol 100, p.p. 3419–3425.
- Sheng J, Vannela R and Rittmann B E. 2011. Evaluation of cell disruption effects of pulsed electric field treatment of *synechocystis* PCC 6803 *Environ. Sci. Technol* vol 45, p.p. 3795–802
- Shi, Y.; Sheng, J.; Yang, F.; Hu, Q. 2007. Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem.* vol 103, p.p.101–105.
- Shibata, S.; Hayakawa, K.; Egashira, Y.; Sanada, H. 2007, Hypocholesterolemic mechanism of *Chlorella*: *Chlorella* and its indigestible fraction enhance hepatic cholesterol catabolism through up-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in rats. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* vol 71, p.p. 916–925.
- Shihira & Krauss. n°3, vol. 33. *Annls Limnol*, p.p. 3-11.
- Shin HJ, Park JH, Jung WK, Cho H, Kim SW. 2011. Development of biorefinery process using microalgae. *J Korean Soc Precis Eng*; 28:154e67.
- Show, K. Y., & Lee, D. J. 2014. Algal Biomass Harvesting. In *Biofuels from Algae* (pp. 85–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00005-X>
- Show, P.L., Tang, M.S.Y., Nagarajan, D., Ling, T.C., Ooi, C-W., Chang, J-S., 2017. A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 215. Doi:10.3390/ijms18010215.
- Side, C. 2006. Overview on marketing functional foods in Europe. In *Functional food network general meeting*.

Références bibliographiques

- Silve A., Kian C. , Papachristou I., Kubisch C., Nazarova N., Wustner R., Leber K., Strassner R., Frey W. 2018,. Incubation time after pulsed electric field treatment of microalgae enhances the efficiency of extraction processes and enables the reduction of specific treatment energy. *Bioresource Technology*. 269. p.p.179-187
- Siró, István, Emese Kápolna, Beáta Kápolna, et Andrea Lugasi. 2008. « Functional Food. Product Development, Marketing and Consumer Acceptance—A Review ». *Appetite* vol 51, n3, p.p. 456-467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>.
- Skjanes K., Lindblad P., Muller J. 2007. Bio CO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products.*Biomolecular Engineering* vol 24, p.p.405-413.
- Sloan, A. E. 2000. The top ten functional food trends. *Food , Technology* vol 54, p.p. 33e62.
- Slocombe S.P. et al., 2013. A rapid and general method for measurement of protein in microalgal biomass. *Bioresource Technology*, volume 129, page 51-57
- Smee D. F., Bailey K. W., Wong M.-H et al., 2008. “Treatment of influenza A (H1N1) virus infections in mice and ferrets with cyanovirin-N,” *Antiviral Research*, vol. 80, no. 3, p.p. 266–271
- Smith S, 2018. Rapport réalisé pour le compte d'études de marché.UNCTAD
- Soleimani khorramdashti, M., Samipoor Giri, M., & Majidian, N. 2021. Extraction lipids from *Chlorella vulgaris* by supercritical CO₂ for biodiesel production. *South African Journal of Chemical Engineering*, 38, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.03.008>
- Song, X., Wang, J., Wang, Y., Feng, Y., Cui, Q., & Lu, Y. 2018. Artificial creation of *Chlorella pyrenoidosa* mutants for economic sustainable food production. *Bioresource Technology*, 268(58), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.007>
- Soni B, Kalavadia B, Trivedi U, Madamwar D .2006.Extraction purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet Dwarka Gujarat India. *Process Biochemistry* vol 41, p.p.2017-2023
- Soto-Sierra L. , Kulkarni S. , Woodard S. L., Nikolov Z. L., 2020. Processing of permeabilized *Chlorella vulgaris* biomass into lutein and protein-rich products. *Journal of Applied Phycology*.

Références bibliographiques

- Souza M, Santos perreira D., Perreira freitas S., 2017. Neutral sugars determination in *Chlorella* : Use of a one-step dilute sulfuric acid hydrolysis with reduced sample size followed by HPAEC analysis. *Algal research. Soviet Plant Physiol*, vol 16, p.p.79-83.
- Spence, J. T. 2006. Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol 19, S4eS6.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. "Commercial applications of microalgae," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 101, no. 2, pp. 87–96,
- Stephenson, AL., Dennis, JS., Howe, CJ., Scott, SA., Smith, AG. 2009. Influence of nitrogen limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*. vol 1, p.p. 47–58.
- Stirk W.A., B 'alint P., Vambe M., Lov´asz C., Molna´ r Z., van Staden J., O´ rdo´g V., 2020. Effect of cell disruption methods on the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass. *Journal of Biotechnology*.
- Stolz, P., Obermayer B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries*, vol 120, p.p. 99-106.
- Subhash, G.V., Rajvanshi, M., Kumar, B.N., Govindachary, S., Prasad, V., Dasgupta, S., 2017. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. *Bioresour. Technol.* vol 244, 1304-1316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.024>.
- Sukoyo A., Djoyowasito G. , Wibisono Y., 2019. Unravelling the Potency of Activated Carbon Powder Derived from Cultivated Marine Microalgae as a Promising Filler in Mixed Matrix Membranes. *AgriEngineering* vol 2, pp 188-204; doi:10.3390/agriengineering1020014
- Sumi Y. 2009. Microalgae Pioneering the Future -Application and Utilization, *Life Science. Research Unit*, quarterly review No.34.
- Sun Y., Wang C. 2009. The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus, Zn^{2+} , CO_2 , and light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* vol 14, n2, p.p. 225–231.
- Sushchik, N. N., Kalacheva, G. S., Zhila, N. O., Gladyshev, M. I., Volova, T. G., May 2003. A temperature dependence of the intra- and extracellular Fatty-Acid

Références bibliographiques

composition of green algae and cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiology vol 50, n3, p.p.374–380.

- Syed S., Arasu A. 2016, Ponnuswamy I. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology. Vol.7, No.1 , pp.185-190

T

- Tang S., Qin C., Wang H., Li S., Tian S.. 2011, Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. The Journal of Supercritical Fluids 57, p.p. 44 – 49.
- Tantichantakarun M., Chetpattananondh P., Ratanawilai S., 2019. *Chlorella* sp extraction and estimation of fuel properties of lipids derived from FFA profiles. Technology International Europe, pp.25-31.
- technologies.
- Templeton D.W., Quinn M, S Van Wychen S., Hyman D., Laurens L.M.L., 2012. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. Journal of Chromatography A. vol 1270, p.p. 225– 234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.034>
- Thomas M., 2012. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) . These de doctorat, Université d'Orléans, 289p
- Thomas P.R, Earl R., 1994. Food & Nutrition Board,. National academy of sciences. In. Washington D.C. Opportunities in the nutrition and food sciences. National Academy Press.
- Tiwari, B.K. 2015, Ultrasound: A clean, green extraction technology. TrAC Trends Anal. Chem. vol 71, p.p.100–109. [CrossRef]
- Toepfl S .2006. Pulsed electric fields (PEF) for permeabilization of cell membranes in food- and bioprocessing applications, process and equipment design and cost analysis. These de Doctorat. Technological University of Berlin- Allemagne.
- Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D. 2006. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. Food Rev Int .vol 22, p.p. 405–423

Références bibliographiques

- Toepfl, S., Siemer, C., Heinz, V., 2014. Chapter 8 – Effect of High-Intensity Electric Field Pulses on Solid Foods. In: Emerging Technologies for Food Processing, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00008-5>.
- Tohamy M.M, Ali MA, Shaaban H.A., Mohamad A.G., Hasanain A.M., 2018. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. vol 17, num 4, p.p.347–358
- Tokus,oglu, O., & Uunal, M. K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, vol 68, n4, p.p.1144–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09615.x>
- Tokus,oglu, O., & Uunal, M. K. 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68 (4), 1144–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09615.x>
- Toribio, A., Nuzillard, J.-M. and Renault, J.-H. 2007. Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*, vol 1170 n (1-2), p.p. 44-51.
- Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*, 41, 107536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Trubachev N.I., Gitel'zon I.I., KalachevaG.S., Barashkov V.A., Belyanin V.N, Andreeva R.I., 1976. Biochemical composition of several blue-green algae and *Chlorella*. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, vol 12, p.p. 196-202.
- Turk M., 2010. Vers une amélioration d'un procédé industriel d'extraction des fractions solubles de pomme à l'aide de technologie électriques. These de Doctorat, Université de Technologie, Compiègne. 142p

u

- Uauy, R., Valenzuela, A., 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition* vol 16, p.p. 680–684..
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 2: 1-15 ulcerative colitis. N°3, Vol 7. *Alternative therapies in health and medicine*, p.p.79-91.

Références bibliographiques

- Uma R., Sivasubramanian V. Niranjali Devaraj S.2011. Evaluation of in vitro antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmococcus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. Journal of algal biomass utilisation. vol 2, n3, p.p.82– 93
- Ummat, V.; Sivagnanam, S.P.; Rajauria, G.; O'Donnell, C.; Tiwari, B.K. 2021. Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. Trends Food Sci. Technol. undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. N° 2, unijus, 51p. Prospects. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 153, 1-35. Université de Sfax, Tunisie, p.p. 21.
- Ursu A.V, Marcati A, Sayd T, Sante-Lhoutellier V, Djelveh G, Michaud P., 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorellavulgaris*. Volume 157. Bioresource Technology, p.p. 134-139

V

- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. 2012. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. Bioresource Technology, 105, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.105>
- Vázquez-Rodríguez, B.; Gutiérrez-Urbe, J.A.; Antunes-Ricardo, M.; Santos-Zea, L.; Cruz-Suárez, L.E. 2020. Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae). J. Appl. Phycol, 32, 1441–1453.
- Vehapi M., Yilmaz A., Özçimen D. 2018. Antifungal activities of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* Microalgae cultivated in bold basal medium, wastewater and extract water against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. Rom Biotechnol Lett, 1:1
- Venkata Subhash G., Rajvanshi M., Navish Kumar B., Govindachary S., Prasad V., Dasgupta S. 2017, Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds, Bioresour. Technol. 244 (1304–1316, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.024>).
- Verachten P, Vercauteren A, Wuidart., 2010 Sciences Biomédicales Printemps des Sciences

Références bibliographiques

- Vierling E., 2008. Aliments et boissons: filières et produits. Paris, Doin, 277p.
- Vierling E., 2008. Aliments et boissons: Technologies et aspects réglementaires. Bordeaux, Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, 202p
- Vijayavel K, et al. 2007, Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular Cellular Biochemistry.*; vol 303, p.p. 39–44.
- Vladimirova M.G., Rudova T.S., Shatilov V.R., Salamatova L.V. & Nazarova G.D., 1979. Comparative characterization of *Chlorella pyrenoidosa* Chick 82 and *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82T under intensive culture conditions. *Soviet Plant Physiol*, 26, p.p. 913-920.
- Volk R.-B. and Furkert F. H., , 2006 “Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth,” *Microbiological Research*, vol. 161, no. 2, pp. 180–186.
- Volk R.-B., 2008 “A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction,” *Microbiological Research*, vol. 163, no. 2, pp. 161–167,.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N., 2008. Pulsed-Electric-Fields-Induced Effects in Plant Tissues: Fundamental Aspects and Perspectives of Applications. *Food Engineering Series*. p.p. 39–81

W

- Wahlen B. D., Willis R. M., Seefeldt L. C. 2011.. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed cultures. *Bioresource Technology*, 102, 2724 – 2730
- Wang H, et al. 2010. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Proc Biochem*. vol 45, p.p. 1865–1872
- Wang L, Weller CL 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* vol 17, p.p.300–312
- Wang N.X, Li B., Deng X.H, Miao A.J., Ji R., Yang L.Y. 2013. Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes, *Water research* vol 47, p.p. 2497-2506.

Références bibliographiques

- Wellburn A.R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*. Volume 144, Issue 3, , Pages 307-313
- Weltin-Chanes, J., Vélez-Ruiz, J. F., & Barbosa-Canovas, G. V. 2003. *Transport phenomena in food processing*. Florida: CRC Press
- Wen, Z., Johnson, M. B. 2009. *Microalgae as a feedstock for biofuel production*, Virginia Cooperative Extension Publication pp: 442-886.
- Widyaningrum D ., Prianto A.D., 2021. *Chlorella as a source of functional food ingredients : Short review*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 794 012148
- Wijesekara I. Kim SK., 2010. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs* vol 8, p.p. 1080-1093.
- Wiltshire KH, Boersma M, Moëller A, Buhtz H .2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquat Ecol* vol 3, p.p.119–126
- Wiyarno, B.; Yunus, R.M.; Mel, M. 2011. Extraction of algae oil from *Nannocloropsis* sp.: A study of Soxhlet and Ultrasonic-Assisted Extractions. *J. Appl. Sci.*, vol 11, p.p. 3607–3612
- Wu LC., Ho JA., Shieh MC., Lu IW., 2005. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. N°10, Vol 53. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p.p. 4207–4212.
- Wu, Z.; Wu, S.; Shi, X. 2007, Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Food Process Eng.* 30, 174–185.
- Wustner R., Leber K., Strassner R., Frey W., 2018. Incubation time after pulsed electric field treatment of microalgae enhances the efficiency of extraction processes and enables the reduction of specific treatment energy. *Bioresource Technology*. vol 269. p.p.179-187

X

- Xu H, Miao X, Wu Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol*

Références bibliographiques

- Xu, B. J., & Chang, S. K. C. 2007. A comparative study on phenolic profiles et antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, vol 2, n2.

y

- Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M, Takriff MS, 2014, 1 An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research*, vol 21, n6, p.p.1-10.
- Yamaguchi K, 1997. Recent advances in microalgae bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. Vol.8. *Journal of Applied Phycology*, p.p. 487–502.
- Yang IS, Salama ES, Kim JO, Govindwar SP, Kurade MB, Lee M, et al. 2016, Cultivation and harvesting of microalgae in photobioreactor for biodiesel production and simultaneous nutrient removal. *Energ Conver Manage.*;vol 117, p.p. 54-62.
- Yap, B.H., Dumsday, G.J., Scales, P.J., Martin, G.J., 2015. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Bioresource technology* vol 184, pp. 280-285.
- Ye, H.; Wang, K.; Zhou, C.; Liu, J.; Zeng, X. 2008, Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem.* vol 111, p.p. 428–432.
- Ying, Z., Han, X., & Li, J. 2011. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, vol 127, n3, p.p. 1273-1279
- Yoo G., Park W.-K., Kim C. W., Choi Y.-E, Yang J.-W. 2012. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresource Technology*, vol 123, p.p. 717 – 722.
- Young, Y. 2000. Functional foods and the European consumer. In J. Buttriss, & M. Saltmarsh (Eds.), *Functional foods. II. Claims and evidence*. London: The Royal Society of Chemistry.
- Yu H, Jia S, Dai Y. 2009. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology*, vol 21, p.p. 127-133.
- Yusof YAM., Basari JMH, Mukti NA., Sabuddin R., Muda AR., Sulaiman S., Makpol S. and Ngah. W., 2011. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella*

Références bibliographiques

vulgaris can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. African journal of Biotechnology. vol 10, n62

Z

- Zagorulko A. 1958 ;Technological parameters of beet desugaring process by the selective electropasmolysis. New Phys Methods Foods Process. vol 1, p.p. 21–7
- Zarbà C., Chinnici G. and D'Amico M., 2020. Novel Food: The Impact of Innovation on the Paths of the Traditional Food Chain. Sustainability, vol 12, n 555, p.p. 1-18.
- Zbinden, M.D.A., Sturm, B.S.M., Nord, R.D., Carey, W.J., Moore, D., Shinogle, H., Stagg-Williams, S.M., 2013. Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. Biotechnology and Bioengineering vol 110, p.p. 1605–1615.
- Zeghichi S., Kallithraka S. 2007. Mediterranean diet in the Maghreb: An update. "World Review of Nutrition and Dietetics". Simopoulos AP., Visioli F. (Eds.): More on the Mediterranean diets. WorldRev Nutr Diet. Basal. Karger, vol 87, p.p.160-179.
- Zhang R , Gu X, Xu G, Fu X., 2021. Improving the lipid extraction yield from *Chlorella* based on the controllable electroporation of cell membrane by pulsed electric field. Bioresource Technology vol 330
- Zhang R., Lebovka N., Marchal L., Vorobiev E, Grimi N., 2020 Comparison of aqueous extraction assisted by pulsed electric energy and ultrasonication: Efficiencies for different microalgal species. Algal research. vol 47. 101857
- Zhao L, Sweet B.V., 2008. Lutein and zeaxanthin for macular degeneration. n° 13, vol. 65.The American Journal of Health-System Pharmacy, p.p.1232–1238.
- Zheng H, Yin J, Gao Z, Huang H, Ji X, Dou C .2011. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. Appl Biochem Biotechnol 164: 1215–1224. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9207-1>
- Zheng, L.; Wen, G.; Yuan, M.; Gao, F. 2016 .Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from Corn Silk and Their Antioxidant Activity. J. Chem.,
- Zhishen J., Mengcheng T., JianmingW. 1999,. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry. Vol 64.

Références bibliographiques

- Zhou, L., Li, K., Duan, X., Hill, D., Barrow, C., Dunshea, F., ... Suleria, H. 2022. Bioactive compounds in microalgae and their potential health benefits. *Food Bioscience*, 49, 101932. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101932>
- Zhukova T.S, Klyachko-Gurvich G.L, Vladimirova M.G, Kurnosova T.A., 1969. Comparative characterization of the growth and direction of biosynthesis of various strains of *Chlorella* under conditions of nitrogen starvation. II. Formation of carbohydrates and lipids. *Soviet Plant Physiol*, vol 16 , p.p.79-83.
- Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F ,1974 . Dielectric breakdown of cell membranes *Biophys. J.* 14 881-9
- Zimmermann, U. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization electrofusion. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 105, 176–257.
- Zinkone T.R., 2018. Broyage à billes de microalgues : étude et modélisation par classes de taille, application au bioraffinage. These de doctorat. Université de Nantes.2016p
- Zou T-B, Jia Q, Li H-W et al.2013. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haemotococcus pluvialis*. *Mar Drugs* vol 11, p.p. 1644–1655.
- Zulueta A, Esteve MJ, Frasquet I, Frigola A .2007. Fatty acid profile changes during orange juice-milk beverage processing by high-pulsed electric field. *Eur J Lipid Sci Technol* vol,109

ANNEXES

Annexe 01: Conditions opératoires de l'analyse du profil en Acides Gras par Chromatographie en Phase Gazeuse (Aouir, 2017)

Conditions Opératoires pour les esters méthyliques	
Chromatographe	Chrompack CP9002
Détecteur	FID(250 °C)
Injecteur	SPLIT1/100 (250C°)
Gaz vecteur	Azote 01ml/mn
Colonne Capillaire	DB23(50% Cyanopropyl)
Longueur	30 m
Diamètre intérieur	0,32mm*0.25 UM
Épaisseur	0,25 µm du film
Températures	
Injecteur	250°C
Détecteur	250°C
Four	200 C°
Quantité injectée	01UI
Vitesse du papier(Intégrateur)	0.5cm/ mn

**Annexe 02 : Dosage des sucres totaux dans les
micro-algues (Takache H, 2010 ; Dubois et *al.*, 1956).**

Principe

Les glucides en milieu acide sulfurique et à chaud sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combine facilement avec le phénol et donnent une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural). L'absorbance est lue à la longueur d'onde de 483 nm. La coloration est permanente. Cette méthode est très sensible puisqu'elle permet de détecter des quantités de glucides pouvant atteindre 1 µl

I- Appareils utilisés :

Centrifugeuse (MIKRO 22 R®)

Vortex (CYAN CL001)

Bain marie

Spectrophotomètre (JENWAY Genova Plus, UK)

II- Matériels utilisés :

Tube Centri 15 ml autoclavable en PP (19 tubes).

Tube Centri 15 ml autoclavable en PP (2 tubes).

Portoir pour tube 15 ml

Pipette Pasteur en verre avec tétine en caoutchouc.

µpipette (100-1000µl) et pointes

µpipette (1-10) ml et pointes

Chronomètre

Cuve jetable en PS

III- Réactifs :

Acide sulfurique concentré 98%

Solution phénol 50 g/l Glucose

Le volume de la suspension algale à prendre dépend de la biomasse:

Biomasse Cx en g/l	Volume de culture de µ algue ml
Cx < 0,5	10
0,5 < Cx < 1	5
1 < Cx < 2	2,5
2 < Cx < 3	1,5

1. Fixer la température du bain marie à 35 °C.
2. Préparer dans une fiole jaugée une solution mère de glucose à 0.1g/L. puis des solutions filles pour la courbe d'étalonnage avec les concentrations suivantes : 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 et 0,1 g/L.
3. Prélever le volume V de la suspension algale, le mettre dans un tube Centri 15 ml, et compléter avec de l'eau osmosée (3 ‰ NaCl) pour avoir un volume final de 10 ml.
4. Centrifuger pendant 5 minutes à 6000 rpm (utiliser la centrifugeuse Mikro 22 R® avec lerotor 1016).
5. Eliminer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur en verre munie d'une tétine.
6. Introduire 10 mL de l'eau osmosée (3 ‰ NaCl), dans le culot restant afin de laver la biomasse. Biomasse CX en g/L Volume de culture de µalgues ml
 $CX < 0.5$ 10 $0.5 < CX < 1$
 $1 < CX < 2$ 2.5 $2 < CX < 3$ 1.5
7. Mélanger le culot et l'eau à l'aide d'un vortex à 3000 rpm (quelques secondes).
8. Centrifuger de nouveau 5 minutes à 6000 rpm.
9. Éliminer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur en verre munie d'une tétine.
10. Introduire de nouveau un volume 10 ml d'eau osmosée afin de resuspendre le culot lavé. L'échantillon ainsi est prêt pour le dosage des sucres totaux.
11. Placer sur le portoir 19 tubes (3 pour l'échantillon et 16 pour la série d'étalonnage) et numéroter les de 1 à 19.
12. Ajouter 0.5 ml de la suspension précédemment préparée dessus dans chacun des 3 tubes de l'échantillon E1, E2 et E3 puis ajouter 0.5 ml de chacune des solutions de la série Biomasse Cx en g/l Volume de culture de µ algue ml d'étalonnage préparée dans chacun des 3 tubes de chaque concentration de la série d'étalonnage.
13. Ajouter 0.5 ml du phénol (50g/L) dans chacun des 19 tubes.
14. Ajouter 2.5 ml de H₂SO₄ 98% (doucement sans en déposer sur les parois) dans le premier tube numéroté 1, et chronométrer 10 minutes exactes, puis vortexer à 3000 rpm pendant 10 secondes exactes. (pour gagner de temps, attendre 30 secondes entre chaque deux tubes, et tous les tubes seront traités de la même façon que le premier tube).

15. Mettre les tubes au bain marie chauffer au préalable à 35°C pendant 30 minutes, et la coloration jaunâtre ainsi obtenu est stable pour quelques heures.
16. Utiliser le spectrophotomètre avec des cuves jetables en PS.
17. La DO des échantillons et ainsi que de la série d'étalonnage est lue à 483 nm.
18. Faire une ligne de base (calibrage) avec le blanc de la série d'étalonnage préparée.
19. Organiser les résultats dans un tableau comme suit :

Do 0,1g/l	λ	Echantillons	0 g/l	0,02g/l	0,04g/l	0,06g/l	0,08g/l
		E ₁ , E ₂ , E ₃					
DO ₁							
DO ₂							
DO ₃							
DO _{MOY}							
Ecart type							

20. Tracer la courbe représentant la concentration en g/L en fonction de ma DO ; qui doit être linéaire sous la forme $y=a.x$ qui passe par l'origine, et la concentration des ST est donnée alors par : $[S.T]= a \times DO$
21. Calculer la concentration des S.T dans l'échantillon d'après la valeur moyenne des DO de l'échantillon et en utilisant l'équation de la droite déjà calculée.
22. Calculer les incertitudes absolues.
23. Calculer le pourcentage des sucres totaux en % matière sèche

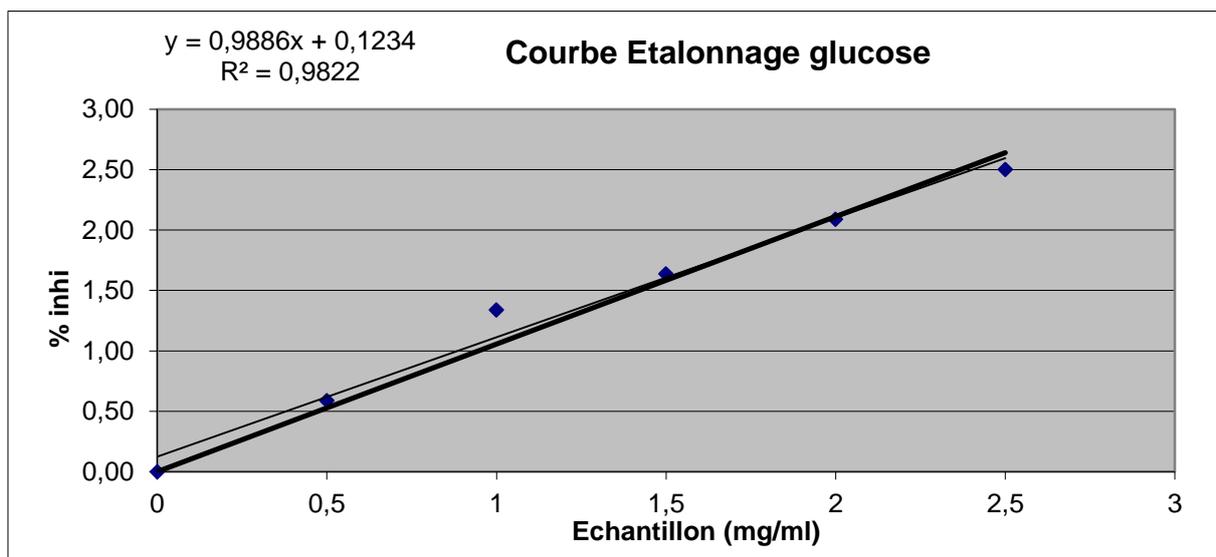


Figure a.1: Courbe d'étalonnage du glucose

Annexe 03: Conditions opératoires de l'analyse des sucres par HPLC

Les sucres ont été déterminés par HPLC Agilent de la série 1100 couplée à un détecteur de barrettes de diodes UV-vis G1315A et un détecteur d'indice de réfraction G-1362 ; réglé à ($\lambda =$ DAD à 192nm-294nm et RID). Le module de séparation était équipé d'une colonne Zorbax NH2 (150 X 4.6mm X 5 μ m) et d'une précolonne NH2 (10 X 4,6 mm). La phase mobile était Eau/ACN : 75/25 à 1.4 ml/min), et la colonne le four a été réglé à 30 ° C. Les injections sont effectuées de manière automatique (passeur d'échantillons) avec une seringue de 100 μ l. Le volume d'injection est de 10 μ l. Afin d'évaluer la concentration en monosaccharides (glucose, fructose et saccharose).

Annexe 04: Conditions opératoires de l'analyse des acides organiques par HPLC

Les acides organiques ont été déterminés par HPLC Agilent de la série 1100 couplée à un détecteur de barrettes de diodes UV-vis G1315A ; réglé à ($\lambda = 210$ nm). Le module de séparation était équipé d'une colonne Acclaim OA (5 μ m X 4 X 250mm) de DIONEX à T=30°C La phase mobile était 100mM Na₂SO₄, pH 2.65 avec MSA à 0.6ml/min.

Les injections sont effectuées de manière automatique (passeur d'échantillons) avec une seringue de 100 μ l. Le volume d'injection est de 10 μ l. Afin d'évaluer la concentration en acides organiques sélectionnés (acides fumarique, oxalique et tartrique).

Annexe 05: Préparation des gammes d'étalonnages

A. Phosphore

Principe

En solution acide, en présence d'ions V^{5+} et Mo^{6+} , l'acide phosphorique donne un complexe phospho-vanado-molybdiquejaune, dont la densité optique est mesurée spectrophotométriquement à 430 nm.

Réactifs

Réactif nitro-vanado-molybdique préparé en mélangeant :

- a) 100 ml de molybdate d'ammonium à 5 %,
- b) 100 ml de vanadate d'ammonium à 2,5 %: dissoudre 2 g de vanadate d'ammonium dans 500 ml d'eau chaude, ajouter 20 ml NO_3H ($d = 1,33$). Après refroidissement, amener à 1L.
- c) 67 ml de NO_3H ($d = 1,33$).
- d) eau, quantité suffisante pour faire 500 ml.

Mode opératoire

- Introduire une prise d'essai de 5 à 10 ml suivant la concentration présumée en phosphore de la solution de cendres dans un ballon jaugé de 25 ml.
- Ajouter 5 ml de réactif nitro-vanado-molybdique.
- Compléter le volume avec de l'eau déminéralisée.
- Attendre 1 heure avant de passer au spectrophotomètre.
- Mesurer la densité optique 430 nm La coloration reste stable pendant plusieurs heures.

Etalonnage

Solution étalon de phosphore à 1 mg P/ml:

- Peser 0,439 g de phosphate mono-potassique pur pour analyses ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) et le dissoudre dans 100 ml d'eau.

- Solution à 50 $\mu\text{g P/ml}$; diluer 20 fois la solution précédente.

Préparer à partir de la solution étalon des solutions contenant respectivement (0,5, 10, 20, 30, 40,50 $\mu\text{gP/ml}$) et y ajouter 5 ml de réactif nitro-vanado-molybdique de chacune de ces solutions.

Déterminer graphiquement la concentration en phosphate dans les échantillons prélevés (Pinta Maurice, 1968).

B. Potassium

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 1, 5, et 10 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de potassium ;
- Longueur d'onde : 766.5 nm ;
- Flamme air / acétylène.

C. Sodium

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 1, 5, et 10 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de sodium ;
- Longueur d'onde : 330.2 nm ;
- Flamme air / acétylène.

D. Fer

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 1, 5, et 10 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de fer ;
- Longueur d'onde : 302.1 nm ;
- Flamme air / acétylène.

E. Zinc

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 0.1, 1, et 2 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de zinc ;
- Longueur d'onde : 213.9 nm ;
- Flamme air / acétylène.

F. Calcium

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 5, 10, et 50 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de calcium ;
- Longueur d'onde : 422.7 nm ;
- Flamme air / acétylène.

G. Magnésium

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 0.5, 1, et 2 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de magnésium ;
- Longueur d'onde : 285.2 nm ;
- Flamme air / acétylène.

H. Manganèse

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 0.1, 1, et 2 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de manganèse ;
- Longueur d'onde : 279.8 nm ;
- Flamme air / acétylène.

I. Cuivre

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 0.1, 2, et 2 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de cuivre ;
- Longueur d'onde : 324.8 nm ;
- Flamme air / acétylène.

J. Aluminium

La gamme d'étalonnage se fait à partir des solutions standard (0, 10, 50, et 100 ppm) sont préparées par dilution à partir d'une solution mère 1000mg/l.

- **Conditions spectrales**

- Lampe à cathode creuse d'aluminium ;
- Longueur d'onde : 309.2 nm ; Flamme protoxyde d'azote / acétylène

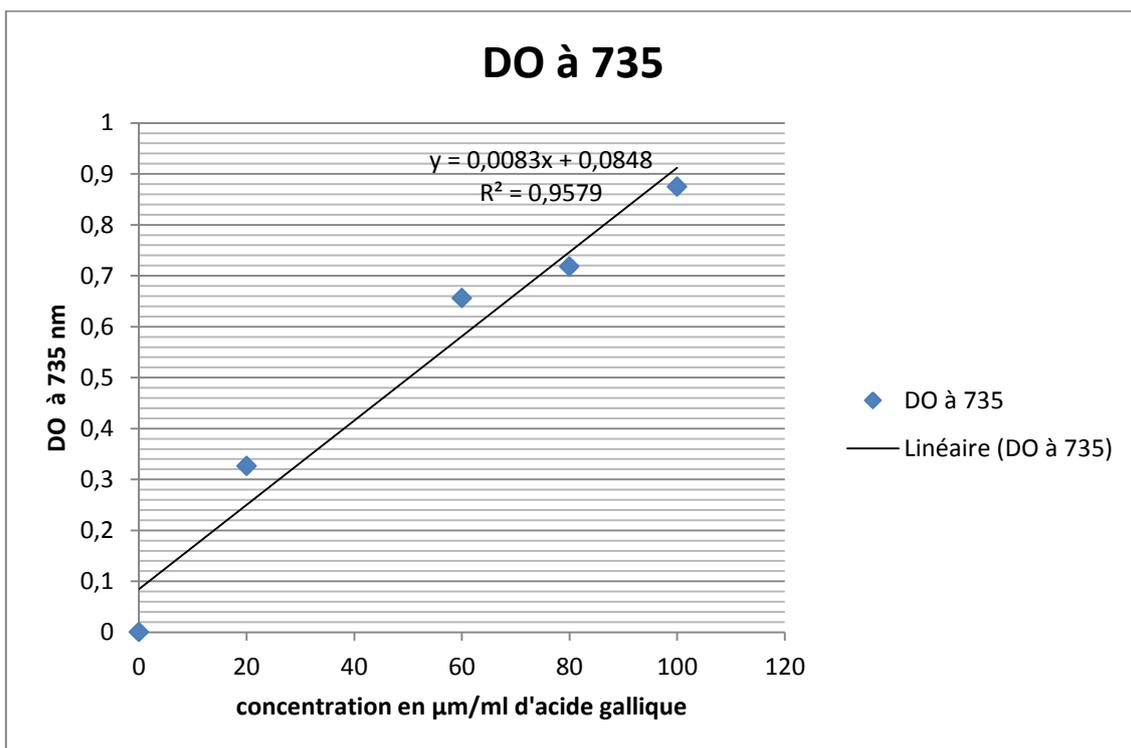
Annexe 06: Préparation des réactifs pour le screening des alcaloïdes

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme décrit en annexe 06.

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d' HgCl_2 dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

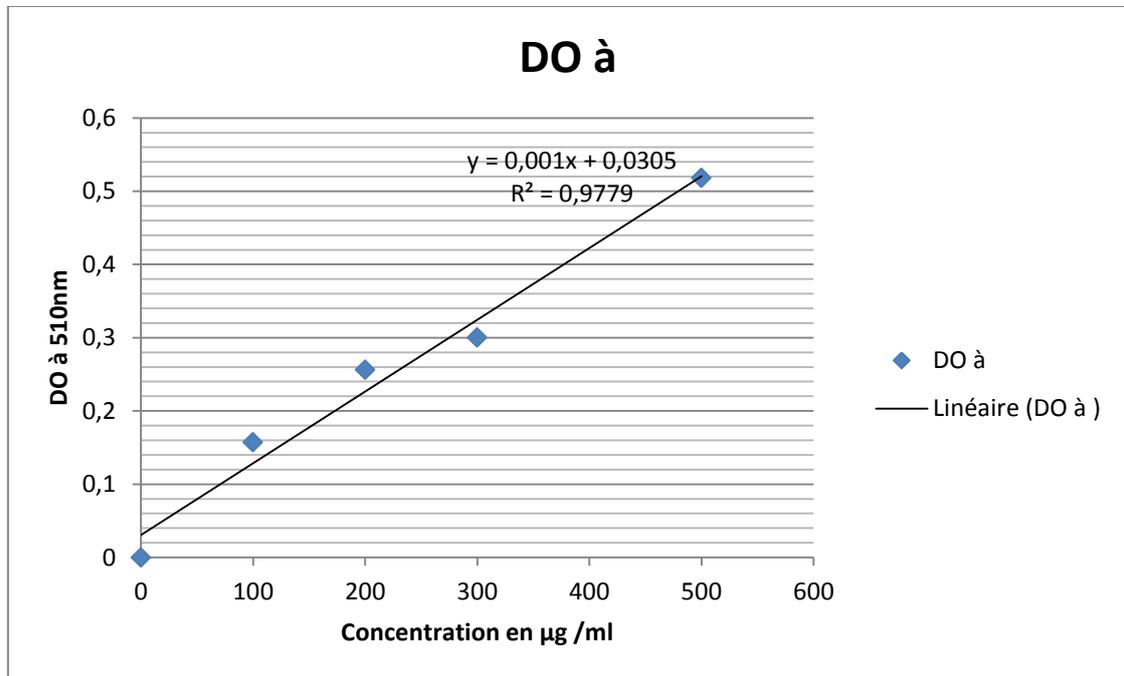
Annexe 07: Dosage des polyphénols

Courbe étalon acide gallique



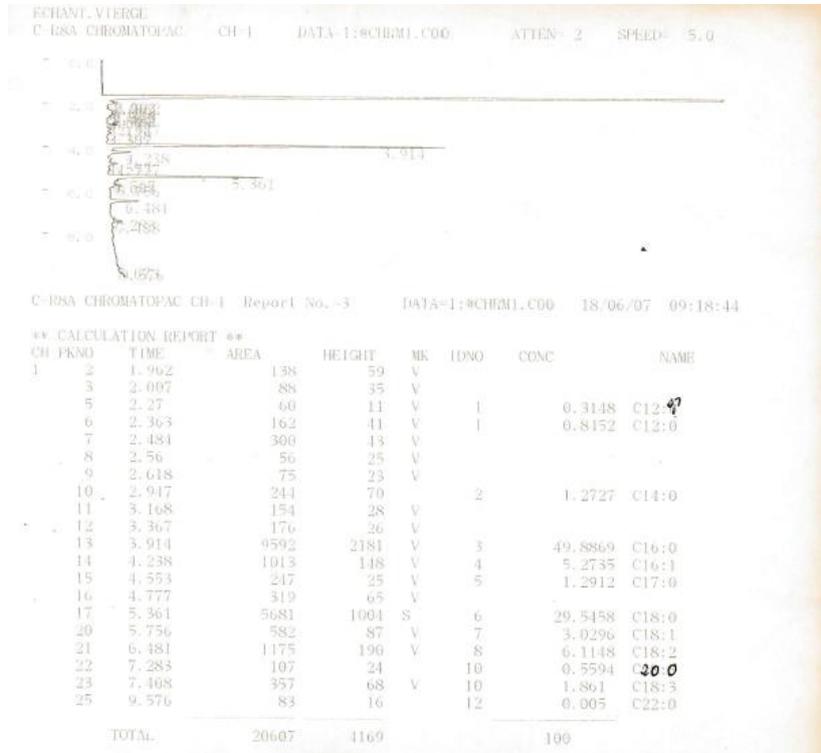
Annexe 08: Dosage des flavonoïdes

Courbe étalon catéchine

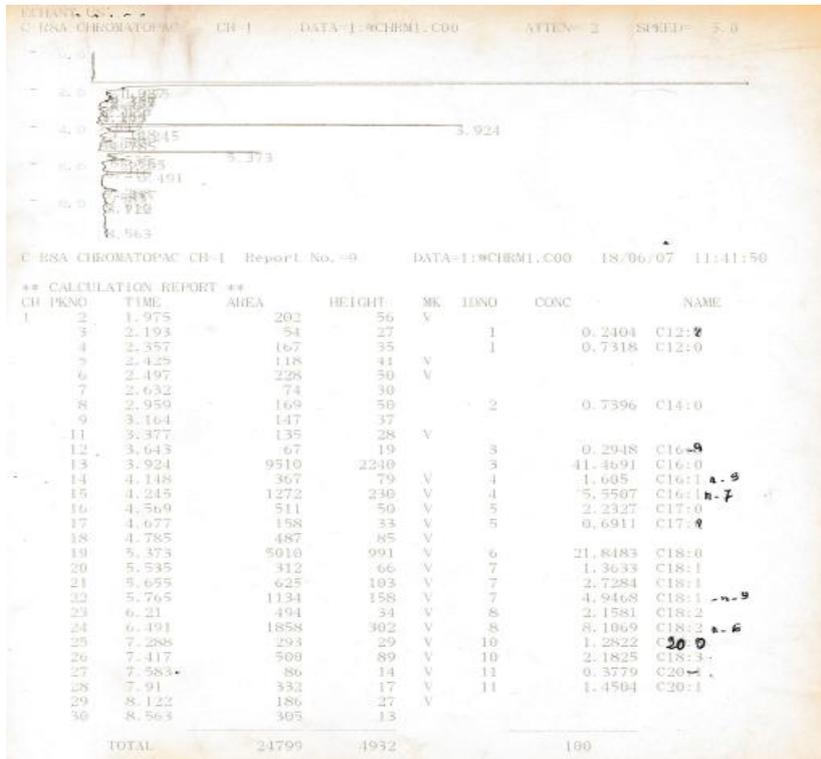


Annexe 09 : Chromatogrammes des acides gras analysés par CPG

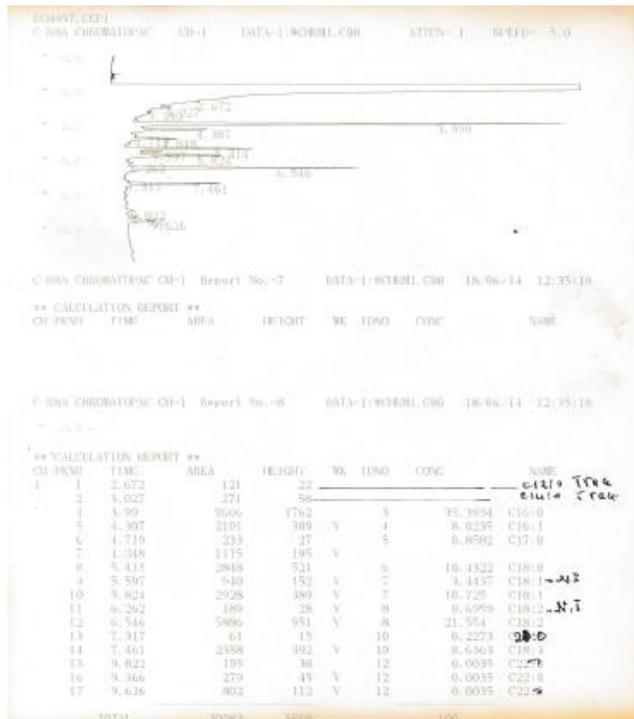
-ST-



-US-



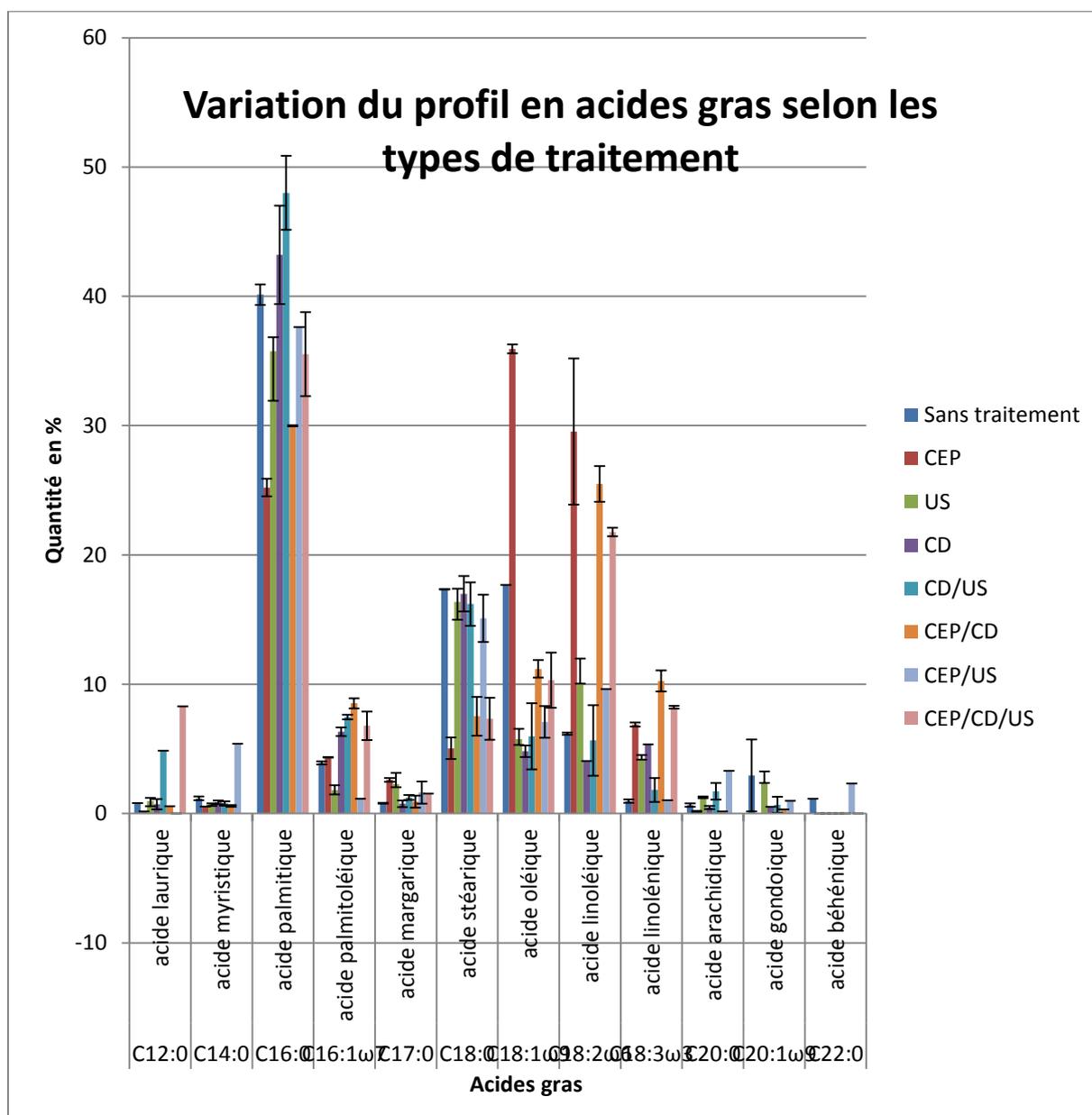
-CEP-



-CEP/CD-



Annexe 10: Graphiques regroupant les profils en acides gras



Variation des profils en acides gras selon les prétraitements et leur combinaison (%)

Annexe 10: Fiche de Dégustation

Date :

Fiche de dégustation

Boissons enrichies en chlorelle

Comment trouvez-vous ce produit ?

Code de produit :

Goût :

Très bon	Bon	Moyen	Mauvais

Odeur :

Très bon	Bon	Moyen	Mauvais

Couleur

Très bon	Bon	Moyen	Mauvais

Consistance

Très bon	Bon	Moyen	Mauvais

Acidité

Trop	Ce qu'il faut	Pas suffisamment

Qualité d'ensemble

Harmonieux	Equilibré	Peu équilibré	Déséquilibré

Que pensez-vous de cette boisson ?

Annexe 11: Critères microbiologiques pour les boissons

8 Chaoual 1438 2 juillet 2017		JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 39		25	
11- Eaux, boissons et jus de fruits et de légumes					
Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Eaux minérales naturelles et eaux de source	<i>Escherichia coli</i>	5	0	Absence dans 250 ml	
	Entérocoques	5	0	Absence dans 250 ml	
	Spores anaérobies sulfite-réductrices	5	0	Absence dans 50 ml	
	Coliformes totaux	5	0	Absence dans 250 ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0	Absence dans 250 ml	
Boissons gazeuses	Germes aérobies à 30 °C	5	3	10	10 ²
	Levures et moisissures	5	2	10	10 ²
Boissons non gazeuses traitées thermiquement	Coliformes totaux	5	0	10	
	Coliformes thermotolérants	5	0	Absence	
	Entérocoques	5	0	Absence	
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	0	Absence dans 20 ml	
	Levures et moisissures	5	2	10	10 ²
Boissons à base de jus de fruit et de lait	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ²	10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	1	10
	Enterobacteriaceae	5	2	1	10
	Levures et moisissures	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 ml	
Jus de fruits et de légumes non pasteurisés	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	Levures et moisissures	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 ml	
Jus de fruits et de légumes, nectars et boissons fruitées pasteurisées	Levures et moisissures	5	2	10	10 ²

Annexe 13 : Analyse statistiques (Chapitre 6)

I. ANALYSE ACP

(Etude de la tendance entre les différentes paramètres de dégustation étudiés et voir l'homogénéité et la nature de ces paramètres)

1. Matrice de corrélation

Matrice	gout	Odeur	couleur	consistance	acidité	QE
gout	1.00	0.79***	0.67**	0.30	-0.51*	0.77**
Odeur		1.00	0.81***	0.001799	-0.38	0.83***
couleur			1.00	-0.072**	-0.50*	0.82***
consistance				1.00	-0.10	-0.003
acidité					1.00	-0.55*
QE						1.00

2. Table de valeurs propres

Axes	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	3.698322	61.63870	3.698322	61.6387
2	1.115842	18.59737	4.814164	80.2361
3	0.679263	11.32104	5.493427	91.5571
4	0.231824	3.86373	5.725250	95.4208
5	0.150286	2.50477	5.875536	97.9256
6	0.124464	2.07439	6.000000	100.0000

PUBLICATIONS

EVALUATION OF ULTRASOUND AND PULSED ELECTRIC FIELD ASSISTED EXTRACTIONS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *CHLORELLA SPP*

ATTAL Fella-Sara^{1,4*}, KORD Afaf², BERROUANE Nour El Houda¹, BENLAHRECH Samia³,
 BENCHABANE Ahmed¹ and AMIALI Malek¹

1. Laboratory of Food Technologies and Human Nutrition, Agronomic Higher National School, El-Harrach (ENSA, ES1603), Algiers, Algeria
2. National Center for Research and Development of Fisheries and Aquaculture (CNRDPA), BP 11 Bou-Ismaïl 42415, Tipaza, Algeria
3. University of Sciences and Technology, Houari Boumediene (USTHB), Faculty of chemistry, BP 32 El-Alia Bab-Ezzouar 16111, Algiers, Algeria
4. Institute of Applied Sciences and Techniques, Saad Dahleb University, Blida 1, Blida, Algeria

Reçu le 11/07/2022, Révisé le 23/11/2022, Accepté le 03/12/2022

Abstract

Description of the subject: Ultrasound (US) and pulsed electric field (PEF) treatments are widely used to disrupt living cells to enhance the extraction of bioactive compounds

Objective : The aim of the present work was to compare them for processing fresh water green alga *Chlorella* spp. native to Lake El-Golea in southern Algeria and grown under controlled conditions in the laboratory

Methods : Intracellular contents soluble in acetone, chloroform, ethanol, methanol, and distilled water were extracted in conjunction with US or PEF or just soaking in the solvent. The extracts were screened for phytochemical content and tested for antimicrobial and antioxidant activities.

Results : They were found to contain bioactive molecules such as tannins, carotenoids, flavonoids, alkaloids, chlorophylls, phenols, glycosides and reducing sugars. They inhibited the growth of *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *E. coli* to varying degrees depending on the extraction process. *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Aspergillus niger* were all sensitive to the extract obtained using chloroform.

Conclusion : Extraction with ethanol or acetone gave the best biological activity results overall. PEF/ethanol and PEF/acetone extracts had the greatest antioxidant power. Pulsed electric field was the best enhancer of extraction of the biologically active substances, followed by ultrasound.

Keywords : *Chlorella* spp; ultrasound; pulsed electric field; bioactive compounds; biological activity.

ÉVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS DE *CHLORELLA SPP* OBTENUS PAR EXTRACTION ASSISTÉE AUX ULTRASONS ET CHAMPS ÉLECTRIQUE PULSÉ

Résumé

Description du sujet : Les Ultrasons (US) et le Champ Electric Pulsé (CEP) sont des techniques très utilisées pour fragiliser les membranes des cellules vivantes pour favoriser l'extraction des composés bioactifs.

Objectifs : L'objectif de ce présent travail a été de comparer ces techniques sur une microalgue d'eau douce *Chlorella* spp isolée dans le Sud Algérien au Lac El-Goléa et cultivée sous des conditions contrôlées.

Méthodes : Le contenu intracellulaire soluble dans l'acétone, chloroforme, éthanol, méthanol et l'eau distillée, est obtenu par Ultrasons, Champ Electric Pulsé ou par une simple macération dans les solvants. Les extraits ont été analysés pour leur contenu phytochimiques, leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes.

Résultats : Le screening phytochimique a montré la présence de molécules bioactives telles que : tannins, caroténoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes, chlorophylle, phénols, glycosides and sucres réducteurs. Ces dernières ont inhibé la croissance *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, et *E. coli* à des degrés différents selon la techniques d'extraction. Aussi, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, et *Aspergillus niger* ont été sensibles aux extraits obtenus avec le chloroforme.

Conclusion : L'Extraction utilisant le méthanol, éthanol et acétone ont donné les meilleures activités. Les combinaisons CEP/éthanol and CEP/acétone ont obtenu les activités antioxydantes les plus intéressantes. Le Champ électrique Pulsé a représenté le meilleur pré-traitement pour l'extraction des molécules bioactives, suivi par les ultrasons.

Mots clés: *Chlorella* spp; ultrasound; pulsed electric field; bioactive compounds; biological activity.

*Auteur correspondant: ATTAL Fella-Sara, E-mail: attal.fs@univ-blida.dz

INTRODUCTION

Increasing consumer demand for natural food additives and preservatives is driving the search for suitable compounds in the lithosphere (soil and plants) and in the hydrosphere, particularly in fishes and algae. Algae and microalgae found in freshwater and seawater contain numerous bioactive compounds, including proteins, enzymes, free amino acids, lipids, carbohydrates, vitamins, minerals, phenolics, flavonoids and pigments with various biological activities [1-3]. Some algae are being proposed as functional foods or nutraceutical products [4, 5]. In addition to the widely reported macronutrient value of algae [6, 7, 8], antibiotic, antifungal, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities associated with the phenolic and flavonoid portions are also being alleged [9-11].

Chlorella is a green alga consisting of spherical, non-flagellated single cells 2–8 µm in diameter [12]. It occurs as individual cells, colonies, or extended filaments in freshwater and is viewed as an excellent source of bioactive compounds [13-16]. These have been extracted using conventional methods (e.g., Soxhlet and maceration) but so far not in satisfactory quantity or quality [17]. Two alternative technologies proposed to facilitate the extraction of nutraceutical compounds from *Chlorella* are ultrasound [18-20] and pulsed electric field [21-23]. These methods work primarily by weakening the rigid cell wall. Pretreatment of microalgal biomass possessing rigid cell wall like *Chlorella*, is a critical step for enhancing the efficiency of microalgal extraction. Majority of the microalgae components are present either in the cytoplasm or inside the organelles. Due to the rigid cell walls of the microalgae protecting the organelles, intracellular molecules are hard to be released [24]. Because of that thick and strong cell walls, which acts as a barrier for compound extraction, restricting the entry of organic solvents into the cell and limiting extraction of intracellular compounds [25, 26] extraction of the target compound(s) is greatly improved if the cells are disrupted [27, 28].

Sonication is one of the most widely employed. Ultrasound is the energy generated by sound waves at frequencies above 16 kHz [24]. It disrupts cell membranes through cavitation effects, generating pressure, shear, and localized temperature gradients [19, 25-28]. Sonication's ultrasonic waves form, inside

cells, cavitation bubbles that subsequently collapse, generating shock waves that rupture cell walls then contents are released [29, 30, 19, 25, 31]. Plaza *et al.* [19], found similar functional and antimicrobial activities of the extracts obtained from microalgae after UAE in comparison with pressurized liquid extraction. Kong *et al.* [32], compared the effects of UAE (200 W/78.7 min/61.4 °C) and conventional heat extraction on chlorophyll recovery from *C. vulgaris*. They observed a significant yield increase (59 %) when they used UAE. On the other hand, Kwang *et al.* [33], reported a higher yield of chlorophyll a and b compared to maceration and soxhlet extraction, but lower compared to pressurized liquid extraction. In addition, Macías-Sánchez *et al.* [34] and Pasquet *et al.* [35], observed an increased extraction of chlorophylls a and b from *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, and *Cylindrotheca closterium* when they applied UAE in comparison with conventional treatments and other nonconventional treatments such as supercritical fluid extraction and microwave-assisted extraction.

PEF is largely used technology that induce cell membranes permeabilization by "electroporation" phenomenon [29, 32]. Pulsed electric field treatment involves applying short pulses of current at electric field strength varying from 20 to 80 kV/cm. At the critical intensity, electroporation occurs, and increasing the number of pulses can disrupt the cell envelopes with minimal heating [29-32]. The electric field applied create pore formation and loss of cell membrane, that can be reversible or irreversible depending on the intensity of to the cells, semi-permeability [36, 23]. Several authors have studied the effect of PEF to extract different valuable compounds from microalgae. In a study conducted by Foltz [37], it was concluded that PEF treatment can be a useful technology to extract lipids from microalgae species (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella salina*). Zbinden *et al.* [38], evaluated the use of PEF as a pretreatment for lipid recovery from *Ankistrodesmus falcatus*. They observed a decrease in extraction time and an increase of 130 % in lipid extraction when PEF was used compared to control sample. They attributed this phenomenon to cell disruption that occurs when the algae are exposed to the PEF pretreatment.

Coustets *et al.* [21], also observed an increase in the extraction of total cytoplasmic proteins from microalgae (*Nannochloropsis salina* and *C. vulgaris*) when they applied PEF treatment. They observed that PEF induced the formation of pores in cell membrane thus favoring the cytoplasmic content compared to control sample. This fact was confirmed by the authors by means of microscopic observation. They observed a loss of contrast after pulsed delivery. The objective of this study was to compare the effectiveness of ultrasound and pulsed electric field on the extraction of bioactive compounds from *Chlorella* and to assess the antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of the resulting phytochemical extracts, trying to reduce the time of extraction, and decrease the yield. In another hand, add some informations of the algal specie, so it can be used as a nutraceutical.

MATERIEL AND METHODS

1. Algal strain

Chlorella (species undetermined) native to Lake El-Golea, Menea, Algeria, was used throughout this study. It was freshly obtained from the CNRDPA, Bousmail, Tipaza, Algeria. It was grown in the laboratory under the conditions described below. The alga was grown in Bold Basal Medium [48] under cool-white fluorescent tubes at 4,500 Lux ($60.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with a light/dark cycle regime of 8/16. Agitation and aeration were maintained by bubbling air using an aquarium pump. The pH and salinity were measured using a pH meter (WTW, 315i/SET, Germany) and a conductivity meter (WTW, 197i, Germany). Cell morphology, culture purity, and biomass concentration were observed daily using a Malassez cell with an optical microscope (OPTIKA DC7 5V, France) at magnifications of 10X and 40X. At the end of the exponential growth phase (3 weeks), algal cells were harvested by centrifugation at 4,500 rpm for 15 min using a SIGMA 2-15 centrifuge (Germany), washed twice with distilled water and then treated directly. The growth conditions are presented in Table 1. All the chemicals used for the medium were of analytical grade obtained from the Biochem Chemopharma (France).

Table 1: *Chlorella* growth conditions

Temperature (°C)	Humidity (%)	Luminosity (Klx)	pH	Conductivity (mS/cm)
27.54 ± 0.87	8.43 ± 1.77	3.9812 5 ± 0.42	8.80 6 ± 0.58	0.932 ± 0.23

2. Preparation of algal extracts

About 1g of fresh algal biomass was suspended in 10 mL of solvent (chloroform, acetone, ethanol, methanol, or distilled water) and adjusted to a concentration of 0.1% (w/v). These suspensions were then subjected to one of the treatments described below. All the chemicals used to prepare the extracts and for analysis were of analytical grade obtained from the Biochem Chemopharma (France).

2.1. Soaking

The biomass suspension kept in vials was allowed to stand for 18 h, and then homogenized and centrifuged at 4,500 rpm for 15 min. The supernatant (primary extract) was kept at 4°C in the dark until analysis. The pellet was resuspended in solvent and centrifuged. This was repeated until the pellet became colorless (in the case of water, the pellet remained green). These supernatants were pooled, concentrated in a Rotavapor R-210 (BüchiLabortechnik AG, Flawil, Switzerland), cooled, and analyzed.

2.2. Ultrasound-assisted extraction

A Wiseclean WUC-D06H sonicator was used. It comprises a simple bath with dimensions of 29 cm x 15 cm x 15.6 cm, capable of operating at a maximal frequency of 40 kHz. After several preliminary trials at 10 to 40 kHz for 5 to 30 min, 40 kHz for 20 min was chosen according to data obtained, (data not shown), 20minutes was the optimum extraction time for the pretreatment giving the maximum yields, after 20minutes, the yields decreased.. Fresh *Chlorella* suspended in solvent at 0.1% w/v was sonicated in volumes of 10 mL immerse in the water bath, the extraction was then carried out as described above, under controlled temperature (30°C) as a maximum reaching temperature.

2.3. Pulsed-electric-field-assisted extraction

Electrical conductivity is a crucial parameter to consider when using this technology, since it determines the extent of electro-permeabilization and electrofusion of cells.

If the conductivity is too high, the peak electric field generated will be low because of the greater electrical current [49]. All *Chlorella* samples were therefore standardized using the same procedure [50] in which 10 g of fresh biomass was washed twice with distilled water, suspended in 1,000 mL of sodium phosphate buffer (0.025M, pH 5.8) to obtain an initial conductivity of 1.877 mS/cm.

The pulsed electric field treatment was carried out in a system that delivers exponentially decaying pulses. A variable autotransformer was used to supply power to a high-voltage transformer, the output voltage of which is rectified by a diode and used to charge a 20 nF capacitor. A gas spark switch was used to discharge the energy stored in the capacitor to the treatment chamber.

Chlorella in buffer was treated continuously in a 0.05 mL cofield treatment chamber at a flow rate of 0.4 mL/s. The gap between the electrodes was 0.1 cm and the electric field strength was 42.2 ± 2.5 kV/cm. The total pulse number n was calculated using equation 1. $n = (f \cdot V)/Q$ (1) where Q , f , and V are, respectively, the flow rate (mL/s), pulse frequency (Hz), and treatment chamber volume (mL). The pulse frequency was maintained at about $400 \pm$ Hz and a constant pulse duration (τ) of 28.3μ s was verified along with the wave form using a digital storage oscilloscope (SIGLENT, SDS 1102 CHL, China). The total treatment time (t) was 1,220 seconds, calculated using Equation 2. $t = n \cdot \tau$ (2)

A Tektronix P60151000:1 high-voltage probe (Beaverton, OR, USA) and a current monitor (model 410, PEARSON Electronics Inc., Palo Alto, CA, USA) were used. The energy per pulse (W_{pulse}) [kJ] and the total specific energy input (W_{spec}) [kJ/kg] were calculated using the following equation (3) and (4):

$$W_{pulse} = \frac{1}{2} \times V^2 \times C \quad (3),$$

$$W_{spec} = \frac{f}{\dot{m}} \times W_{pulse} \quad (4). \text{ Where: } V^2:$$

Voltage (V); C : Capacitance (F), f : Frequency (s^{-1}), \dot{m} : Mass flow rate ($kg \cdot s^{-1}$). The total energy input was 11.43 kJ/Kg.

The experiments were performed in triplicate. All samples were centrifuged after pretreatment and washed twice with distilled water to eliminate buffer for solvent extraction as described above.

3. Phytochemical screening

The extracts were tested qualitatively to identify phytochemical constituents such as tannins,

terpenes, carotenoids, steroids, saponins, flavonoids, alkaloids, glycosides and reducing sugars, according to standard procedures described elsewhere [51].

4. Determination of total phenols

The total phenolic content was determined previously [52]. An aliquot (50 μ L) of each extract or standard solution was mixed with 1 mL of H₂O and 500 μ L of Folin–Ciocalteu's phenol reagent. After that, 2.5 mL of 20% Na₂CO₃ solution were added to the mixture, which was incubated at ambient temperature in the dark for 2 hours. The absorbance against a blank was measured at 735 nm ((JENWAY Genova Plus, UK). Gallic acid was used to prepare a standard curve (0.05–0.3 mg/mL) using equation 5: $y = 0.008x + 0.084$ (5), $R^2 = 0.957$. The values were expressed as mg of gallic acid equivalents per g of dry extract.

5. Determination of total flavonoids

Total flavonoid content was determined as described previously [53]. An aliquot (250 μ L) of each extract or standard solution was mixed with 1.25 mL of H₂O and 75 μ L of 5% NaNO₂ solution. After 6 min, 150 μ L of 10% AlCl₃H₂O solution were added. 5 min later, 0.5 mL of 1 M NaOH solution was added and then the total volume was made up to 2.5 mL with H₂O. Following the thorough mixing of the solution, the absorbance against a blank was determined at 510 nm. Catechin(+) was used to plot the standard curve (0.05–0.5 mg/mL) using equation 6: $y = 0.001x + 0.03$ (6), $R^2 = 0.977$. The values were expressed as mg of catechin equivalents per g of dry extract.

6. Determination of chlorophyll a and b and of total carotenoid contents

The absorbance of each extract at 470 nm, 653 nm, and 666 nm against the corresponding pure solvent (in a JENWAY (UK) Genova Plus spectrophotometer) was used to calculate the concentrations of respectively chlorophyll *a* and *b* and total carotenoids using equations 7, 8 and 9 [54].

$$Chla = 15.65 \times (A_{666}) - 7.34(A_{653}) \quad (7)$$

$$Chlb = 27.05 \times (A_{653}) - 11.21(A_{666}) \quad (8)$$

$$Car T = \frac{(1000 \times (A_{470}) - 2.86 \times Chl a - 129.2 \times Chl b)}{221} \quad (9)$$

7. Microbial susceptibility studies

7.1. Test microorganisms

The microbial strains were provided by the microbiology laboratory culture collection at Mhamed Bougara University in Boumerdes, Algeria.

These were: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Listeria innocua* ATCC 74915, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Saccaromyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 6275.

7.2. Disc diffusion method

Sterile paper discs (6 mm diameter) were wetted with extract (25 µL) or ampicillin solution as a control and dried in a laminar flow hood for 1 h. Pure solvent was used as a mock treatment. The discs were then placed on Muller-Hinton agar seeded with log-phase microbial suspension culture (10µL). The plates were incubated for 18 h at 37°C and the inhibition zone diameters were measured using calipers.

8. Antioxidant activity

8.1. Free-radical scavenging activity

The free-radical scavenging power of the extracts was assessed first by measuring the color loss in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) solution. According to Kitada et al, [15]. Briefly, 0.2 mL of extract was mixed with 0.4 mL of 0.05 mol L⁻¹ DPPH in methanol. The reaction mixture was shaken vigorously and then kept at room temperature in the dark for 30 min. Absorbance at 517 nm was measured before (A₀) and after (A_t) mixing using a JENWAY Genova Plus spectrophotometer. Analytical grade methanol, ethanol, acetone, chloroform, and water were used as negative controls. BHT, quercetin, and catechin solutions (0.1 mg/ml) were used as positive controls. Equation 10 was used to calculate DPPH decolorizing.

$$\text{DPPH decolorized (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100 \quad (10)$$

8.2. ABTS⁺ radical cation scavenging assay

A modified radical cation scavenging assay was used [55]. The 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) solution diluted 50-fold in 96% ethanol (absorbance at 734 nm = 0.65–0.75) was mixed with half volume of sample. After 15 minutes at room temperature, A₇₃₄ was read. ABTS neutralization was calculated using equation 11.

Neutralization(%)

$$\frac{\text{Initial absorbance} - \text{final absorbance}}{\text{Initial absorbance}} \times 100 \quad (11)$$

The positive controls were 0.1 mg/ml BHT, quercetin, and catechin. Analytical grade methanol, ethanol, acetone, chloroform, and water were used as negative controls.

9. Statistical analysis

Values presented are means ± standard deviation of three determinations. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance and Tukey's test. Differences with a probability < 0.05 were considered significant. All computations were carried out using statistical software R version 3.0.2 (R Core Team, 2013).

RESULTS

1. Phytochemical screening

The color of the *Chlorella* extracts was generally greenish to dark green, suggesting the presence of phytochemical compounds. The ability of the different solvents to extract tannins, terpenoids, carotenoids, steroids, saponins, flavonoids, alkaloids, glycosides and reducing sugars from the wet biomass is summarized in Table 2.

Table 2: Screening of *Chlorella* extracts based on phytochemical content

Chemical group	Solvents				
	Water	Methanol	Ethanol	Acetone	Chloroform
Tannins	+	+	+	+	+
Terpenes	-	-	-	-	-
Carotenoids	-	+	+	+	+
Steroids	-	-	-	-	-
Saponins	-	-	-	-	-
Flavonoids	+	+	+	+	+
Alkaloids	+	+	+	+	+
Glycosides	+	+	+	+	+
Reducing sugar	+	+	+	+	+

2. Determination of phenol content

Total phenolics extracted by soaking in the solvent without or with ultrasound or pulsed electric fields are shown in Figure 1. Water was a significantly less effective solvent, whereas the physical treatments had no significant effect on extraction. Pulsed electric field might have had some effect in methanol, but clearly none in water. It was expected to induce electroporation and thereby disrupt *Chlorella* cell walls and membranes and ultimately cause cell lysis [61], which could only facilitate penetration by the solvent and extraction of bioactive compounds soluble therein [23].

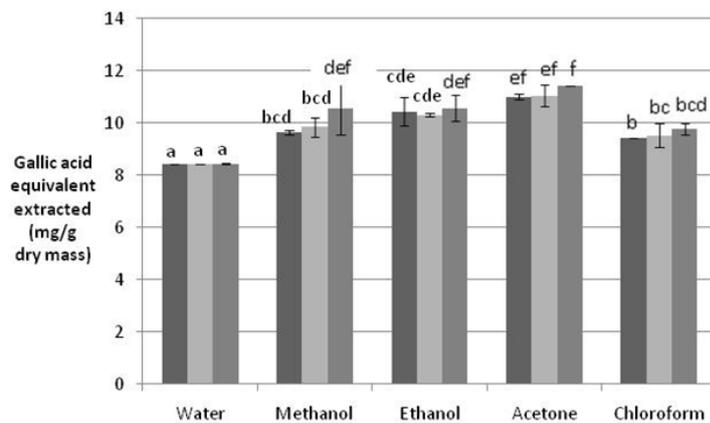


Figure 1: Phenolics extracted from Chlorella biomass by a single solvent combined with a physical treatment: soaking only (black), ultrasound (light grey), pulsed electric field (dark grey)

a, b, c, d, e, f, g, h – the same letters mean no statistical differences between samples ($p \leq 0.05$).

3. Determination of flavonoid content

In the case of flavonoids, the solvent and physical treatment had more conspicuous effects (Figure 2). Ethanol appeared to be the best solvent, and in acetone at least,

physical treatment improved extraction. Chloroform appeared to be a poor solvent for flavonoids, although the extraction may have been improved slightly by physical treatment.

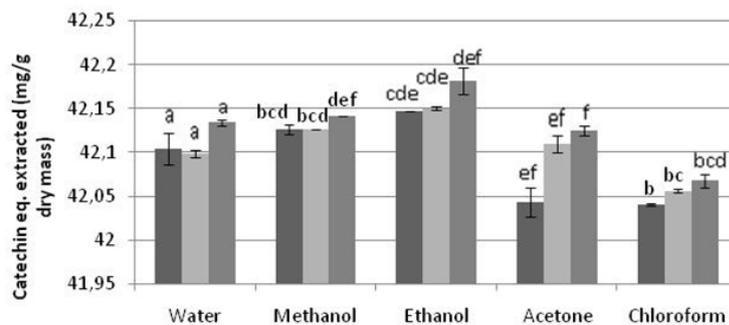


Figure 2: Flavonoids extracted from Chlorella biomass by a single solvent combined with a physical treatment: soaking only (black), ultrasound (light grey), pulsed electric field (dark grey)

a, b, c, d, e, f, g, h – the same letters mean no statistical differences between samples ($p \leq 0.05$).

4. Pigment content

4.1. Chlorophyll a and b

Chlorophyll is a highly useful bioactive compound that can be extracted from microalgal biomass. It is both a natural food coloring agent and an antioxidant [76]. Figures 3 and 4 show the total chlorophylls *a* and *b* extracted from *Chlorella*. The yield of both

types of chlorophyll was generally increased when a physical treatment was applied, especially of type *b* with pulsed electric field. Electroporation thus could be enhancing the recovery of these pigments. Ethanol appeared to be the better solvent for chlorophyll *a*, while methanol and acetone were better for extracting chlorophyll *b*.

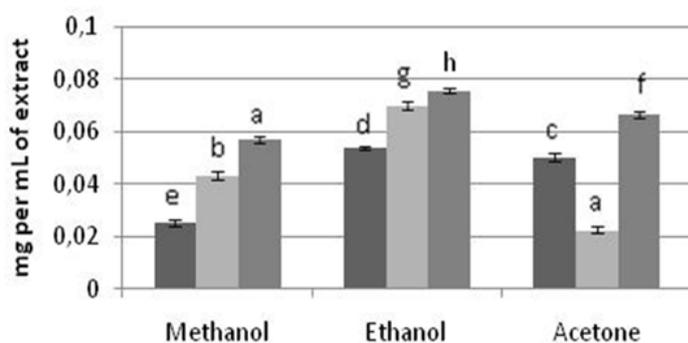


Figure 3: Chlorophyll a extracted from Chlorella biomass by a single solvent combined with a physical treatment: soaking only (black), ultrasound (light grey), pulsed electric field (dark grey)

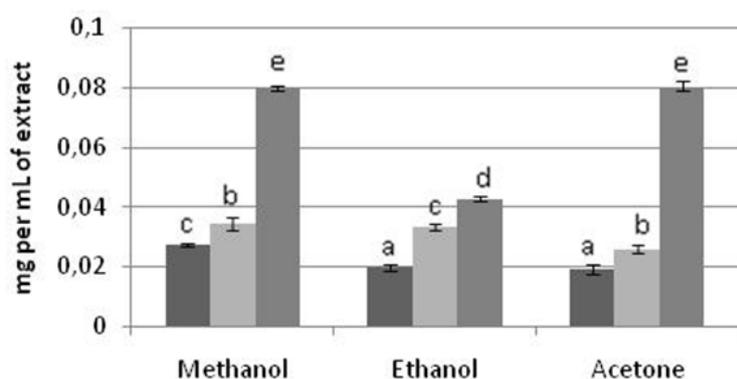


Figure 4: Chlorophyll b extracted from *Chlorella* biomass by a single solvent combined with a physical treatment: soaking only (black), ultrasound (light grey), pulsed electric field (dark grey)

4.2. Total Carotenoids

In recent decades, evidence has accumulated in support of a role for carotenoids as antioxidants with beneficial effects on human health, especially with regard to the prevention of

chronic illnesses, particularly certain cancers, cardiovascular diseases and loss of visual acuity [82-84]. The amounts of carotenoids extracted from *Chlorella* are shown in Figure 5.

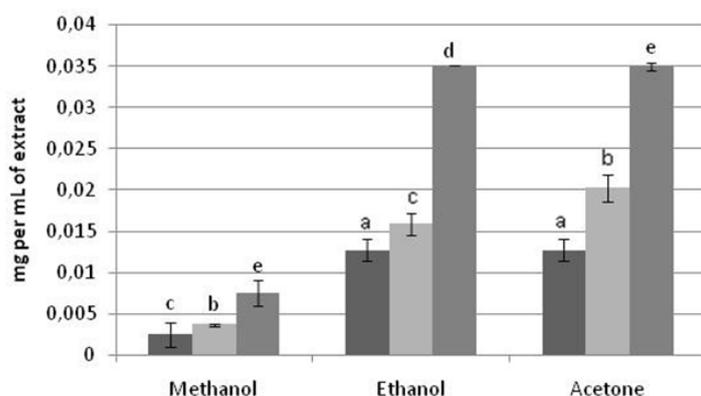


Figure 5: Total carotenoids extracted from *Chlorella* biomass by a single solvent combined with a physical treatment: soaking only (black), ultrasound (light grey), pulsed electric field (dark grey)

5. Antibacterial activity

The antibacterial activities of the *Chlorella* extracts are summarized in Table 3. The inhibition zone diameters obtained with *Staphylococcus aureus* were larger in

association with the physical treatments ($p < 0.05$). The effect of pulsed electric field was generally greater.

Table 3: Antibacterial activity of *Chlorella* extraction terms of inhibition zone diameter (mm) on agar

Microorganisms	Physical treatment	Solvents used for extractions					STD
		Water	Methanol	Ethanol	Acetone	Chloroform	
<i>S. aureus</i>	Soaking	6 ± 0 ^a	10.5 ± 0.7 ^{ab}	6 ± 0 ^a	6 ± 0 ^{ab}	6 ± 0 ^a	23.5 ± 0.7
	US	11.5 ± 0.54 ^{ab}	15.33 ± 0.57	20 ± 0	13 ± 0 ^{abc}	10 ± 0 ^{ab}	
	PEF	15.33 ± 0.57 ^{abc}	19.66 ± 0.57	24 ± 1.41	21.5 ± 0.71	24.66 ± 0.57	
<i>E. coli</i>	Soaking	6 ± 0 ^a	19.25 ± 0.95 ^{cd}	21 ± 0 ^d	17.66 ± 1.25 ^c	6 ± 0 ^a	20.2 ± 0.57
	US	11.5 ± 0.54 ^b	19 ± 1 ^{cd}	20.25 ± 0.5 ^d	19 ± 1.09 ^{cd}	6 ± 0 ^a	
	PEF	11 ± 0 ^b	20.2 ± 0.44 ^{cd}	20 ± 1.41 ^{cd}	22.17 ^d	6 ± 0 ^a	
<i>P. aeruginosa</i>	Soaking	9.5 ± 0.7 ^a	16.5 ± 0.57 ^{def}	15.33 ± 0.57 ^{def}	13 ± 0 ^{bcde}	11.66 ± 0.57 ^{abc}	9 ± 0
	US	10.5 ± 0.7 ^{ab}	16 ± 1 ^{efg}	17.5 ± 0.7 ^{efg}	12.33 ± 0.57 ^{abcd}	8.5 ± 0.7 ^a	
	PEF	11 ± 0 ^{ab}	19.66 ± 0.57 ^{gh}	20.5 ± 0.57 ^{fgh}	16.33 ± 0.57 ^{defg}	22 ± 0 ^h	
<i>L. innocua</i>	Soaking	6.75 ± 0.95 ^a	11.33 ± 0.57	10.75 ± 0.5 ^{bc}	10.2 ± 0.44 ^b	30 ± 0 ^f	20.5 ± 0.7
	US	7.8 ± 0.44 ^a	11 ± 0.81 ^{bcd}	11.25 ± 0.95 ^{bcd}	12.5 ± 0.7 ^{bcde}	36 ± 0 ^g	
	PEF	13.75 ± 0.95 ^c	13.66 ± 0.57 ^{de}	11.5 ± 0.57 ^{bcde}	12.66 ± 0.57 ^{cde}	40 ± 0 ^h	
; <i>B. cereus</i>	Soaking	6 ± 0 ^a	16 ± 0 ^{bc}	12.66 ± 0.57 ^b	15.5 ± 0.7 ^{cd}	15.5 ± 0.7 ^{bc}	23 ± 0
	US	8 ± 1 ^a	17 ± 0 ^{cde}	20.5 ± 0.7 ^{efg}	18 ± 0 ^{cde}	19 ± 1.41 ^{cdef}	
	PEF	8 ± 1 ^a	20 ± 0 ^{efg}	23 ± 1.41 ^g	20 ± 0 ^{defg}	22 ± 0 ^{fg}	

US : ultrasound; PEF : pulsed electric field; STD: Standard Error, a, b, c, d, e, f, g, h – the same letters mean no statistical differences between samples ($p \leq 0.05$).

The associated solvent effect ranked chloroform and ethanol (24mm) followed by acetone (21.5mm) and methanol (15.33mm). In conjunction with ultrasound, the ethanol extract gave the inhibition zone up to 20mm in diameter. These results suggest that medium-to-high polarity solvents are better for extracting antibacterial compounds from microalgae. The inhibition zone associated with aqueous extract was comparatively small. For *Escherichia coli*, the inhibition zone diameters ranged from 6 mm to 22 mm and the largest zones were obtained for ethanol/ultrasound, soaking/ethanol and PEF/acetone extracts. Chloroform appears to have extracted, independently of physical treatment, some substance that is an effective inhibitor of *Listeria innocua*, while chloroform/PEF extract inhibited *Pseudomonas aeruginosa* and ethanol/PEF extract inhibited *Bacillus cereus* to greater degrees than any others did.

6. Anti-fungal activity

Inhibition of the growth of *Candida albicans*, *Saccaromyces cerevesiae*, and *Aspergillus niger* on agar by *Chlorella* extract is summarized in Table 4. A strong fungal inhibitor appears to have been extracted by chloroform, whereas water apparently did not extract any antifungal substance. Methanol and ethanol enhanced by PEF extracted a relatively strong inhibitor of *Candida albicans*. In the case of *Saccaromyces cerevesiae*, the physical enhancer did not have a significant effect on the resulting inhibitory activity of the extract. Ethanol and acetone appeared to be better than methanol for extracting inhibitors of this yeast. For *Aspergillus niger*, the strongest inhibitor was obtained using acetone in conjunction with PEF.

Table 4: Antifungal activity of *Chlorella* extracts in terms of inhibition zone diameter (mm) on agar

Microorganisms	Physical treatment	Solvents used for extractions					STD
		Water	Methanol	Ethanol	Acetone	Chloroform	
<i>C. albicans</i>	Soaking	6 ± 0 ^{ab}	20.2 ± 0.44 ^{cd}	25.5 ± 0.7 ^{cd}	20.33 ± 1.03 ^c	No growth	21.5 ± 0.7
	US	8 ± 0 ^{ab}	21.66 ± 1.15 ^c	22.33 ± 1.15 ^c	20.25 ± 0.5 ^b	No growth	
	PEF	8 ± 0 ^{ab}	29 ± 0 ^{cd}	29 ± 0 ^d	23.33 ± 0.57 ^{cd}	No growth	
<i>S. cerevisiae</i>	Soaking	6 ± 0 ^b	20 ± 1 ^c	26 ± 1.41 ^d	23.25 ± 0.5 ^{cd}	No growth	20.5 ± 0.7
	US	8 ± 0 ^b	20.5 ± 0.57 ^c	25.5 ± 0.7 ^d	23.25 ± 0.57 ^{cd}	No growth	
	PEF	8 ± 0 ^b	23.6 ± 1.5 ^c	26.5 ± 0.7 ^d	24.75 ± 0.95 ^{cd}	No growth	
<i>A. niger</i>	Soaking	8 ± 0 ^a	19 ± 1.15 ^{de}	21 ± 1.41 ^{de}	12 ± 0 ^c	No growth	20.66 ± 0.57
	US	8 ± 0 ^a	18.5 ± 1 ^d	18.66 ± 1.15 ^d	13 ± 0 ^c	No growth	
	PEF	8 ± 0 ^a	21 ± 0 ^{de}	14 ± 0 ^c	24.75 ± 0.95 ^f	No growth	

US : ultrasound; PEF : pulsed electric field; STD: Standard Error, *a, b, c, d, e, f, g, h* – the same letters mean no statistical differences between samples ($p \leq 0.05$).

7. Antioxidant activity

In general, the extracts of *Chlorella* biomass subjected to ultrasound or pulsed electric field treatment had considerable antioxidant activity compared to those obtained without such

treatment ($p < 0.05$). Ethanol and acetone extracts enhanced by PEF were the most potent (Table 5).

Table 5: Antioxydant activity expressed in % of inhibition

	DPPH			ABTS		
	Soaking	USAE	PEFAE	Soaking	USAE	PEFAE
Water	35,85±1,56	44,06±0,66	67,02±0,67	44,44±0	44,72±1,02	52,92±1,3
Methanol	38,70±0,29	33,33±0	48,26±0,01	37,29±0,29	48,35±0,75	50,65±0,92
Ethanol	41,46±0,39	66,43±0,32	84,41±0,28	47,32±1,31	71,44±0,02	80,60±0,34
Acetone	78,01±0,9	79,45±0	82,01±0,83	91,37±0,81	95,41±0,88	96,95±1,29
Chloroform	6,59±0,1	8,09±1,4	10,00±1,37	6,59±0,2	8,07±1,6	10,35±0,7
Quercetin	26,44±1,4			43,49±1,33		
Catechin	29,66±0,03			57,27±1,22		
BHT	47,23±0,02			37,61±1,13		

DISCUSSION

For the phytochemical screening, water could not extract carotenoids, terpenoids or steroids, and saponins appeared to be absent in all extracts. Similar results have been reported previously, except that only glycosides were not extracted [56]. In other studies, saponins and sterols were extracted from *Chlorella vulgaris*, whereas tannins were not [57, 11]; saponins, flavonoids, and alkaloids were extracted from *Chlorella* spp. [36] and tannins and alkaloids were not [5]. The presence or absence of phytochemicals in the extracts also depends on solvent polarity, pH and extraction time, temperature, and method. The phytochemical content of the algal biomass might also vary with growth conditions and growth phase [50, 5, 52].

The results of phenolic content obtained corroborate the values reported previously: 25mg [62], 39.4 mg [63], 29.1 mg [64], and 19.15mg [65] of gallic acid equivalents per gram of *Chlorella* in ethanol. In aqueous extracts of *Chlorella vulgaris*, phenolic contents range from 3.45 mg/g [52] to 108.66 mg/g [66], whereas methanol extract 220 mg of gallic acid equivalent per g of *Chlorella vulgaris* and 150 mg of *Chlorella reinhardtii* [67]. Total phenolic content may differ among algal species, for example, from 22.94 to 39.34 mg (gallic acid equivalent) per g of *Nannochloropsis gaditana*, *Phaedactylum tricornutum*, *Nannochloris* spp. and *Tetraselmis suecica* [68], 11.15 mg per g of *Euglena tuba* [69] and 0.287 mg per g of *Spirulina platensis* [70]. Although the concentration of antioxidant compounds varies among algal species, the amount extracted depends largely on the solvent type and extraction method [71].

Flavonoid concentrations close to the range obtained (up to 33 mg of catechin equivalent per g) have been reported for extracts of *Chlorella vulgaris* [62,76]. Smaller amounts have been extracted from *Amphora* spp. using ethanol (17.69 mg/g) or water (4.27 mg/g) in another study.

Since flavonoids are polyphenolic compounds, they are potential antioxidants and free radical scavengers [73, 74]. Different flavonoid classes such as isoflavones, flavanones, and flavonols are found in microalgae [75], showing that complex secondary metabolism is not limited to land plants [5].

In other work which studied pigment content, two-phase solvent extraction (organic/aqueous) in conjunction with pulsed electric field treatment allowed the recovery of pigments from *Nannochloropsis* spp. in high yield without degrading proteins [77]. Pulsed electric field treatment is widely reported to improve the extraction of pigments from microalgae suspensions [78-80]. This is attributed to the enhancement of solvent permeation by electroporation [77].

An increase in the electrical conductivity (ionic strength) of the suspension medium leads to faster permeabilization of the cells. Indeed, conductivity increases the electrical current flow through the suspension and therefore the amount of energy applied to the cells [81].

For the carotenoids: In this case, pulsed electric field treatment improved the extraction considerably regardless of the solvent used, and it is noted that methanol was a poor solvent in comparison with ethanol or acetone. Similar patterns have been reported previously [85] for carotenoids (0.057 to 0.062 mg/g) extracted from *Chlorella protothecoides*. In another study, acetone was found superior to ethanol for extraction from *Chlorella vulgaris* [19].

Several studies have shown that pulsed electric fields can increase the yields of other valuable compounds such as colorants without resorting to the use of organic solvents. The cell membrane permeabilization afforded by this treatment undoubtedly facilitates the permeation of the eluting solvent into the cytoplasm and hence dissolving of pigments [23]. We found pulsed electric field treatment to be the most effective method of enhancing carotenoid extraction, which corroborates several previous studies. Extraction of chlorophyll and carotenoids from *Spirulina* and *Chlorella* may thus be improved [86], by up to 200% in conjunction with ethanol and 4-fold in the case of lutein [23].

Antibacterial activity: Previous reports of the inhibitory effects of *Chlorella* extracts against these bacterial species mention inhibition zone diameters in the same range, namely, 8 to 38 mm [11, 87, 88, 5].

The compounds that are likely responsible for the direct effects on bacterial growth are believed to be phenolics, polyphenols, fatty acids, lipids, pigments, and carbohydrates [89, 12]. In addition, flavonoids, triterpenoids, amides, and alkaloids are also thought to affect bacterial growth and metabolism [90, 91].

Both chlorophylls *a* and *b* and carotenoids have been reported to inhibit bacteria [92,93]. The results of the present study show clearly that both physical treatments enhanced the extraction of antibacterial substances from *Chlorella*.

Cell wall structure and composition influences the effectiveness of the cell disruption method [94] and hence the extraction of all compounds from microalgal cells. Cell walls of green microalgae can be divided into two groups: low and high resistance. *Chlorella* cell walls are of the latter type [95]. Sonication is suitable for species with less resistant cell walls [96]. In the present study, PEF appears to have been more effective than sonication at disrupting *Chlorella* cells. In addition, mass transfer is increased by heat at the expense of degrading valuable compounds and denaturing proteins. Innovative technologies such as high hydrostatic pressure (HHP), ultrasonics, and PEF have been devised to improve mass transfer while avoiding these undesired thermal effects [97]. It therefore comes as no surprise that the physical treatment applied affects the antibacterial activity of microalgae extracts to a considerable degree, leading to different responses according to the bacterial strain.

For the antifungal activity; *Chlorella* extract has been found previously to be a strong inhibitor of *Candida albicans*, with zone diameters similar to our results [66]. *Chlorella vulgaris* extracts have been found to inhibit *A. niger* and *C. albicans* [90]. In one study, antifungal activity was found only in methanolic extracts [16], whereas another study [98] concluded that methanol extract of *Chlorella* did not inhibit *Aspergillus fumigatus* (RCMB 02564), *Candida albicans* (RCMB 05035), *Geotricum candidum* (RCMB 05096) or *Trichophyton mentagrophytes* (RCMB0925). These contradictory results may be due to differences in algal species. We obtained strong inhibitory effects, compared to inhibition zone diameters of less than 6 mm observed previously for *Chlorella vulgaris* extract against *Candida albicans* and *Aspergillus niger* [11].

Several researchers have studied the inhibition of fungal growth by extracts of microalgae, including of at least one pathogen [99, 100, 98, 16, 101]. The bioactive compounds in these extracts may collectively be antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant [102].

From these results, it can be concluded again that pulsed electric field was the most effective treatment for enhancing solvent extraction of antimicrobial substances from *Chlorella*.

The results obtained for the antioxidant activity are in agreement with a recent report [62] in which DPPH decolorizing reached 85.62% with *Chlorella vulgaris* extract. However, values for *Chlorella* spp. had been found previously to range from 78% for acetone to only 18%, 10%, and 3%, respectively, for ethanol, chloroform, and methanol [51]. ADPPH decolorizing of 50% has been reported recently for sonicated *Chlorella* spp. aqueous methanol extract [103]. The antioxidant activity of *Chlorella vulgaris* has been found to reach 68.5% in aqueous extract [52] and as low as 0.74% in ultrasound-assisted ethanol extract [4]. This variability is attributable to algal species, to the chosen solvent, and to the extraction method. In addition, the strong activities found in the present study may be due also to the concentrations of phenols and flavonoids in the extracts [104, 66]. Their presence could contribute to free radical scavenging individually or by synergistic action [105].

The results obtained in this study show overall that solvent extraction assisted by ultrasound or pulsed electric field, particularly the latter, increases the yield of bioactive compounds from microalgal wet biomass. Several researchers have investigated both physical treatments as a means of increasing the yield of valuable compounds such as antioxidants from algae [105, 40, 105, 22, 103].

CONCLUSION

The present study confirms that the green alga *Chlorella* spp. is very rich in compounds that have potential uses in pharmacology and in the nutraceutical field. These compounds include inhibitors of microorganisms and antioxidants. Solvent extraction of bioactive molecules from *Chlorella* is enhanced by physical treatments such as ultrasound and pulsed electric fields. Acetone and ethanol are suitable solvents for obtaining extracts that give high scores in different biological activity tests. Nevertheless, ethanol would be the most appropriate solvent since it also has generally recognized as safe (GRAS) status. Future work should focus on identifying the algal compounds that are directly responsible for the antimicrobial and antioxidant activities.

References

- [1] . **Wijesekara I. Kim SK.,** (2010). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs* :8:1080-1093.
- [2] . **Uma R., Sivasubramanian V. , Niranjali Devaraj S.,** (2011). Evaluation of in vitro antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmocosoccus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. *Journal of algal biomass utilisation.*2 (3): 82–93
- [3] . **Manchu N., Melpha Y., Jeeva S., Edwin James J..** (2015). Phytochemical analysis and antibacterial activity of chaetomorpha antennina from rasthacaud coast, tamil nadu, india.world *Journal of Pharmaceutical Research.* Volume 4, Issue 3, 1337-1351.
- [4] . **Wang H,** et al. (2010). Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Proc Biochem.* 45:1865–1872
- [5] . **Annamalai J. , Nallamuthu T.** (2014). Antioxidant potential phytochemicals from methanol extract of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of algal biomass utilisation.* 5 (4). 60-67.
- [6] . **Brown M.R. and Jeffrey S.W..** (1992) .Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 91-113.
- [7] . **Fuentes M.M.R., Fernandez G.G.A., Perez J.A.S. and Guerrero J.L.G** (2000) Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.* 70: 345- 353.
- [8] . **González del Val A, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, et al.** (2001) Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Microbiol*; 4: 35-40.
- [9] . **Diker KS, Akan M, Hascelik G, Yurdakök M.** (1991) The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett Appl Microbiol* ; 12: 34-5.
- [10] . **Salvador N., Garreta A.G., Lavelli L. and Ribera M..** (2007). Antimicrobial activity of Iberian macro algae. *Sci. Mar.* 71: 101-113.
- [11] . **Adhoni S.A., Thimmappa S.C., Kaliwal B.B.** . (2016), Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Chorella vulgaris* isolated from Unkal Lake. *Journal of Coastal Life Medicine*4(5): 368-373
- [12] . **Pradhan J., Das S., Das B.K.** Antibacterial activity of fresh water microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2014.Vol 8 (32).p.p. 809-819.
- [13] . **Guzma'n S., Gato A., and Calleja J. M.,** (2001) Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytotherapy research.* 15, 224–230 .
- [14] . **Vijayavel K, et al.** (2007) Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular Cellular Biochemistry.*;303:39–44.
- [15] . **Kitada K. et al,** . (2009) Antioxidant and Antibacterial Activity of Nutraceutical Compounds from *Chlorella vulgaris* Extracted in Hydrothermal Condition. *Separation Science and Technology.*44: 1228–1239
- [16] . **Amaro H. M., Guedes A. C., Malcata F. X.** (2011) Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.*..A. Mendez vilas ed
- [17] . **Grosso C., Valentão P., Ferreres F., Andrade P. B.** (2015) Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. *Marine . Drugs,* 13, 3182-3230;
- [18] . **Ruen-ngam D., Shotipruk A., Pavasant P.,** (2011) Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Sep Science Technology.* 46:64–707
- [19] . **Plaza M., Santoyo S., Jaime L. et al.,** (2012) Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT Food Science Technology.*46:245–253
- [20] . **Zou T-B, Jia Q, Li H-W et al .** (2013) Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haemotococcus pluvialis*. *Mar Drugs* 11:1644–1655.
- [21] . **Coustets M., Tiessié J..** (2013) the use of pulsed electric fields for protein extraction from nanochloropsis and chlorella. *IFMBE Proceedings.*Vol. 53. p.p. 405-408.
- [22] . **Grimi N, Dubois A, Marchal L et al** (2014) .Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technologie* ..153:254 259
- [23] . **Luengo E., Martínez J. M. , Bordetas A. , Álvarez I., Raso J.,** (2015) Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric field.
- [24] . **Buchmann, L., Brändle, I., Haberkorn, I., Hiestand, M., Mathys, A.,** (2019). Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts. *Bioresour. Technol.* 291, 121870.https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.121870
- [25] . **Bernaerts, T.M.M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Kermani, Z.J., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M.E., Van Loey, A.M.,** (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Res.* 32, 150-161. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.017.
- [26] . **Kim, D-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J-I., Lee, K., Park, J-Y., Chang, W-S., Lee, J-S., Oh, Y-K.,** (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresour. Technol.* 199, 300-310.http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107
- [27] . **Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J.,** (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass Bioenergy* 46, 89-101. http://dx.doi.org/10.1016/j.bionbioe.2012.06.03
- [28] . **Show, P.L., Tang, M.S.Y., Nagarajan, D., Ling, T.C., Ooi, C-W., Chang, J-S.,** (2017). A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 215. Doi:10.3390/ijms18010215.

- [29] . **Geciova J, Bury D, Jelen P.** (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review. *Int Dairy J* 2002;12:541e53
- [30] . **Ranjan A, Patil C, Moholkar VS** (2010) Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Ind Eng Chem Res* 49:2979–2985
- [31] . **Cesaro A, Velten S, Belgiorno V, Kuchta K.** (2014). Enhanced anaerobic digestion by ultrasonic pretreatment of organic residues for energy production. *J Clean Prod* 2014;74:119e24
- [32] . **Kong W, Liu N, Zhang J et al** (2014) Optimization of ultrasound- assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *J Food Sci Technol* 51(9):2006–2013
- [33] . **Kwang HC, Lee HJ, Koo SY et al** (2010) Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem* 58:793–797
- [34] . **Macías-Sánchez MD, Mantell C, Rodríguez M et al** (2009) Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* 77:948–952
- [35] . **Pasquet V, Che'rouvrier J-R, Farhat F et al** (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem* 46:59–67
- [36] . **Zimmermann, U.** (1986). Electrical breakdown, electroporation, electrofusion. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 105, 176–257.
- [37] . **Foltz G** (2012) Algal lysis with pulsed electric fields. California Polytechnic State University, San Luis Obispo
- [38] . **Zbinden MDA, Sturm BSM, Nord RD et al** (2013) Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnol Bioeng* 110:1605–1615
- [39] . **Jayasooriya et al.** (2004). Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *International Journal of Food Properties*. 7, 2, 301-319
- [40] . **Barba F.J., Grimi N., Vorobiev E.** (2014). New Approaches for the Use of Non-conventional Cell Disruption Technologies to Extract Potential Food Additives and Nutraceuticals from Microalgae. *Food Eng Rev*. 7: p.p.45–62
- [41] . **Silve A., Kian C. , Papachristou I., Kubisch C., Nazarova N., Wustner R., Leber K., Strassner R., Frey W.** (2018).. Incubation time after pulsed electric field treatment of microalgae enhances the efficiency of extraction processes and enables the reduction of specific treatment energy. *Bioresource Technology* 269. p.p.179-187
- [42] . **Scherer D., Damaris Krust D., Frey W., Mueller G., Nick P. , Gusbeth C.,** (2019). Pulsed electric field (PEF)-assisted protein recovery from *Chlorella vulgaris* is mediated by an enzymatic process after cell death. *Algal Research*..41.101536
- [43] . **Chittapun S., Jonjaroen V., Khumrangsee K., Charoenrat T.** (2020). C-phycoyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research*. 46. 101789
- [44] . **Asavasanti et al.** (2011).. Permeabilization of plant tissues by monopolar pulsed electric fields: effect of frequency. *Journal of Food Science*, 76, p.p.98–11
- [45] . **Amiali M. and Ngadi M.O.** (2012) Microbial decontamination of food by Pulsed Electric Fields (PEFs), in *Microbial decontamination in food industry: Novel Methods and Applications*, Chap. 14, pp 407- 449, Woodhead Publishing Ltd. U.K.
- [46] . **De Boer K., Moheimani N. R., Borowitzka M. A, and Bahri P. A.,** (2012). Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: A review focused on energy consumption, *J. Appl. Phycol.*, vol. 24, no. 6, pp. 1681–1698
- [47] . **Bot F., Verkerk R., Mastwijk H., Anese M., Fogliano V., Capuano E.** (2018)The effect of pulsed electric fields on carotenoids bioaccessibility: the role of tomato matrix. *Food Chemistry*.
- [48] . **Connon R.** (2007) Culturing of *Chlorella vulgaris* - Standard Operating Procedure. *Daphnia*.
- [49] . **Amiali M; Ngadi M.O ;Raghavan V.G.S; Nguyen D-H.** (2006). Electrical Conductivities of Liquid Egg Products and Fruit Juices Exposed to High Pulsed Electric Fields. *Int. J. Food Properties*. 9: 533–540.
- [50] . **Aouir A., , Amiali M, Kirilova-Gachovska T, Benchabane A and Bitam A.** (2015)The Effect of Pulsed Electric Field (PEF) and Ultrasound (US) Technologies on the Extraction of Phycoproteins from *Arthrospira Platensis*. *IEEE Canada International Humanitarian Technology Conference (IHTC)*
- [51] . **Rajendran N., Karpanai Selvan K., Piriya S., Logeswari V., Kathiresan E., Tamilselvi A., Venison J.** (2014). Phytochemicals, antimicrobial and antioxidant screening from five different marine microalgae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* ISSN: 0974-2115
- [52] . **Dantas D.M.M, Costa R., Carneiro-da-Cunha M.G., Galvez A. O., Drummond A. R., Bezerra R.S.** (2015). Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*. Volume 4 | Issue 2 |
- [53] . **Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W.,** (1999).. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*. Vol 64. Issue
- [54] . **Wellburn A.R.** (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* Volume 144, Issue 3, , Pages 307-313
- [55] . **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M, Rice-Evans C.** (1997) Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, Pp. 1231–1237,
- [56] . **Geetha BV, Navasakthi R, Padmini E.** (2010) Investigation of Antioxidant Capacity and Phytochemical Composition of Sun *Chlorella* , An In vitro Study. *J Aquac Res Development*.; 1:104
- [57] . **Anchang K.A., Lewi D., Nji C.** (2016). Toxicological, phytochemical, and antibacterial assessment of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* powder in albino rats. a preliminary study. *Revista peruana de medicina integrativa*. 1(3):5-117

- [58] . **Drummond A. R., Bezerra R.S.**, (2015). Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences. Volume 4 | Issue 2 |
- [59] . **Wustner R., Leber K., Strassner R., Frey W.**, (2018). Incubation time after pulsed electric field treatment of microalgae enhances the efficiency of extraction processes and enables the reduction of specific treatment energy. *Bioresource Technology*. 269. p.p.179-187
- [60] . **Ekpo MA, Etim PC.** (2009). Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Sida acuta* on microorganisms from skin infections.. *Journal of Medicinal Plants Research*; 3(9), 621-624.
- [61] . **Qin S, Timoshkin I V, Maclean M, Wilson M P, MacGregor S J, Given M J, Anderson J G and Wang T.,** (2014).Pulsed electric field treatment of microalgae: Inactivation tendencies and energy consumption *IEEE Transactions on Plasma Science*. 1-6
- [62] . **El-fayoumy E.A., Shanab S.M. M., Shalaby E.A.**(2020) Metabolomics and Biological activities of *Chlorella vulgaris* grown under modified growth medium (BG11) composition. *Journal of Natural Sciences*.vol 19.1.
- [63] . **El makawy A.I., Abdel-Aziem S. H., Ibrahim F. M., Sharaf H. A., O. M. Abd-Elmoneim, A.M Darwish.** (2016) Potential Modulator Role of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* On Monosodium Glutamate Oxidative Stress, Genotoxicity, Apoptotic Gene Expression and Histopathological Alterations. *International Journal of PharmTech Research* . Vol.9, No.11, pp 161-177,
- [64] . **Choochote W. , Suklampoo L. , Ochaikul D..** (2013) Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of applied phycology*,
- [65] . **Hajimahmoodi M., Faramarzi M.A., Mohammadi N., Soltani N., Oveisi M.R., Nafissi-Varcheh N.,** (2010) Evaluation of antioxidant properties and total phenolic
- [66] . **Ahmed E.A.** (2016). Antimicrobial Activity of Microalgal Extracts Isolated From Baharia Oasis, Egypt. *Global. Advanced. Research. Journal of . Microbiology*. Vol. 5(3) pp.. 033-041,
- [67] . **Jayshree A., Jayashree S., Thangaraju N.,** (2016). *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Mediators. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8(5):575-581
- [68] . **Haoujar I. et al.,** (2019) The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules*.. 24, 4037.
- [69] . **Chaudhuri D., Ghate N., Deb S., Panja S., Sarkar R., Rout J., Mandal N.,** (2014) Assessment of the phytochemical constituents and antioxidant activity of a bloom forming microalgae *Euglena tuba*. *Biological Research*.. 47:24
- [70] . **Seghiri R., Kharbach M., Essamri A..** (2019) Functional Composition, Nutritional Properties, and Biological Activities of Moroccan *Spirulina* Microalga. *Journal of Food Quality*.Hindawi.
- [71] . **Manivannan K, Anantharaman P, Balasubramanian T.** (2012). Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p.p.342-346.
- [72] . **Boukhris S. et al.** (2017) The Potential of a Brown Microalga Cultivated in High Salt Medium for the Production of High-Value Compounds. *Hindawi . Biomedical Research International*.
- [73] . **Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al.** (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem* 47: 3954- 3962.
- [74] . **Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA.** (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4): 418-425.
- [75] . **Klejdus B, Lojková L, Plaza M, Snóblová M, Stěrbová D.** (2010). Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry.
- [76] . **Hosikian A., Lim S., Halim R., Danquah M. K.,** (2010).. Chlorophyll Extraction fromMicroalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. Hindawi.
- [77] . **Parniakov O., Barba F.J., Grimi N., Marchal L., Jubeau S., Lebovka N., Vorobiev E..** (2015) Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae nannochloropsis, *Algal Research*.. 8 128–134,
- [78] . **Raso V. and Heinz, J.** (2006). Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry. *Fundamentals and Applications*, Springer, New York., (Eds.),
- [79] . **Vorobiev, E., & Lebovka, N.,** (2008).. Pulsed-Electric-Fields-Induced Effects in Plant Tissues: Fundamental Aspects and Perspectives of Applications. *Food Engineering Series*, 39–81
- [80] . **Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F.,** (2011).. Enhancing Extraction Processes in the Food Industry. *Series: Contemporary Food Engineering*. CRC Press, Taylor & Francis LLC. p. 592.
- [81] . **Rego D., Costa L., Pereira M. T., Redondo L. M.,** (2012). Cell Membrane Permeabilization Studies of *Chlorella* sp. by Pulsed Electric Fields. *Ieee transactions on plasma science*.
- [82] . **Johnson, E.J.** (2002), The role of carotenoids in human health. *Nutritional. Clinic. Care*, 5, 56–65. [CrossRef] [PubMed]
- [83] . **Krinsky, N.I.; Mayne, S.T.; Sies, H. ,** (2004). *Carotenoids in Health and Disease*; Marcel Dekker: New York, NY, USA,
- [84] . **Fiedor, J.; Burda, K.,** (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, 466–488. [CrossRef] [PubMed]
- [85] . **Campenni L., Nobre B. P., Santos C. A., Oliveira A. C., Aires-Barros M. R., Palavra A. M. F., Gouveia L.** (2012)Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Bioenergy and biofuels*.

- [86] .**Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D.** (2006) Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Rev Int.*22:405–423
- [87] .**Syed S., Arasu A., Ponnuswamy I.** (2016). The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* Vol.7, No.1 , pp.185-190
- [88] .**Fadoul H.E.** (2014). Antimicrobial Activity of Extracts from Aquatic Algae Isolated From Salt Soil and Fresh Water in Thailand. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* Volume 2, Issue 11 . PP 149-152
- [89] .**El-Baky HHA, El Baz FK, El-Baroty GS.** (2008) Characterization of nutraceutical molecules in blue green alga *Spirulina maxima*. *J Med Plants Res;* 2(10): 292-300.
- [90] .**Ghasemi Y, Yazdi TM, Shafiee A, Amini M, Shokravi S, Zarrini G.** (2004) Parsiguine a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology.*42(4-5):318-322
- [91] .**Yu H, Jia S, Dai Y.** (2009) Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 21:127-133.
- [92] .**Mahanom Z., Azizah A.H., Dzulkifly M.H.**, (1990). Effect of different drying methods on concentration of several phytochemicals in herbal preparation 8medecinal plant leaves. *Malaysian Journal of Nutrition.*5: 47-54
- [93] .**Jaya Prakash goud M., Seshikala D., Singara Charya M.A.** (2007) Antibacterial activity and biomolecular composition of certain fresh water micro-algae from River Godavari (India). *International Journal on Algae* .9(4):350-358
- [94] .**Günerken E., D'Hondt E., Eppink M.H.M. , Garcia-Gonzalez L., Elst K , Wijffels R.H.,** (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances* 33. 243-260
- [95] .**Dunker, S., Wilhelm, C.** (2018) Cell wall structure of coccoid green algae as an important.
- [96] .**Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A., Brooks, MS-L.** (2019) Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. . *J. Appl. Phycol.* 31, 61-88.
- [97] .**Weltin-Chanes, J., Vélez-Ruiz, J. F., & Barbosa-Canovas, G. V.** (2003)Transport phenomena in food processing. Florida: CRC Press.
- [98] .**Salem Olfat MA, Hoballah EM, Ghazi Safia M, Hanna Suzy N.** (2014) Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasize on *Nostoc* sp. *Life Science Journal.*11(12): 752-758
- [99] .**Vehapi M., Yilmaz A., Özçimen D.** (2018), Antifungal activities of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* Microalgae cultivated in bold basal medium, wastewater and extract water against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Rom Biotechnol Lett* 1:1
- [100] .**De Morais MG, Vaz Bda S, de Morais EG, Costa JA.** (2015) Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Research International.*
- [101] .**Abo-State MAM, Shanab SMM, Ali HEA, Abdullah MA.** (2015), Screening of antimicrobial activity of selected Egyptian cyanobacterial species. *J Ecol Health Environ* 3:7–13
- [102] .**Pérez MJ, Falqué E, Domínguez H.** (2016) Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, 14:1–38
- [103] .**Stirk W.A., B 'alint P., Vambe M., Lov'asz C., Molna' r Z., van Staden J., Ö" rdo'g V.,** (2020). Effect of cell disruption methods on the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass. *Journal of Biotechnology.*
- [104] .**Dash P, Padhi SB.** (2012); Natural Antioxidant Production by *Oscillatoria* Sp. and *Microcystis* Sp. From Ponds of Puri District, Odisha. *International Journal of Microbiology Research.* 4(6):249-252.
- [105] .**Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao L et al.** (2012).Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, 125 (0): 175-181
- [106] .**Halim, R., Harun, R., Danquah, M.K., Webley, P.A.** (2012) Microalgal cell disruption for biofuel development. *Appl. Energy*. 91, 116-121

Communications



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة امحمد بوقرة بومرداس
مخبر البحث في التكنولوجيا الغذائية



Attestation de participation

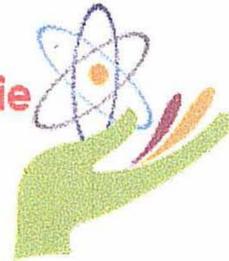
Le président de la 1^{ère} Ecole d'hiver de formation sur « l'Analyse de Cycle de Vie et l'Eco-Conception », organisée le 18 et 19 Février 2018, par le Laboratoire de Recherche Technologie Alimentaire (L.R.T.A) en partenariat avec; IANOR, GRALECC et la Direction du Commerce de la Wilaya de Boumerdès, atteste que :

Mme. ATTAL Fella - Sara

Co-auteurs : Berrouane N., Kord A., Benchabane A., Amiali M.

A présenté une communication affichée intitulée : Extraction des pigments de Chlorelle par Ultrasons.

1^{ère} Ecole d'hiver de
l'analyse de cycle de vie
& L'éco-conception 2018



Le président de l'école

عن مدير الجامعة وبتفويض منه
مدير مخبر التكنولوجيا الغذائية
إمضاء الأستاذة فلة بومرداس كريم



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE KASDI MERBAH



ATTESTATION

Mme. ATTAL Fella-Sara

A participé à la journée des sciences agronomiques, organisée par l'ENSA
le 24 avril 2022 dans le cadre de la célébration de la journée nationale
du savoir, avec une communication orale intitulée :

« Caractérisation nutritionnelle de la chlorelle »

Attal Fella-Sara, Berrouane Nour el Houda, Kord Affaf, Benchabane Ahmed, Amiali Malek

Le Président du comité d'organisation

Pr. DAOUDI Ali

مدير مساعد مكلف بالتكوين في الدكتوراه
و البحث العلمي و التطوير التكنولوجي
و الابتكار و ترقية المقاولاتية
الأستاذ: داودي علي

La journée du savoir



Le Directeur de l'ENSA

Pr. HARTANI Tarik

مدير المدرسة الوطنية العليا للفلاحة
بالنيابة
الأستاذ: حرطاني طارق



People's Democratic Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
National Higher School of Agronomics
Research Laboratory of Food Technology and Human Nutrition



INTERNATIONAL DAY OF FOOD TECHNOLOGY, NUTRITION AND HUMAN HEALTH
May 09, 2023 - Algiers

Certificate of participation

This is to certify that :

Fella Sara ATTAL

has successfully participated in this international event and presented the oral communication entitled :

« Elaboration d'une boisson fonctionnelle : Jus de fruits enrichi en chlorelle »

Co-authors : BERROUANE N., GUENOUN S., MEDJBOUR A., AMIALI M.

Pr. AMIALI Malek Ph. D. Ing.

President
JITANSH

Chairman of JITANSH



Pr. BENCHABANE Ahmed
ÉCOLE NATIONALE
SUPÉRIEURE D'AGRONOMIE

Chairman of the Scientific committee

مدير المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

الأستاذ: حرطاني طارق

Director of ENSA