



### Thèse de Doctorat

## Cécile LE GUILLARD

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : VENAM Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : Biologie des organismes Spécialité : Biotechnologies marines Unités de recherche : Laboratoire Bioraf<sup>he</sup> Unité BRM IFREMER de Nantes

> Laboratoire MMS EA 2160 Faculté des Sciences et Techniques Université de Nantes

Soutenue le 29 janvier 2016

### Application de l'hydrolyse enzymatique assistée par ultrasons à la macroalgue rouge *Grateloupia turuturu*

#### Étude de la liquéfaction de la biomasse et de l'extraction de la R-phycoérythrine

#### JURY

Rapporteurs :	Valérie STIGER-POUVREAU, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale (LEMAR) Nicolas GONDREXON, Professeur des Universités, Université Joseph Fourier (Laboratoire Rhéologie et Procédés)
Examinateurs :	Joël FLEURENCE, Professeur des Universités, Université de Nantes (MMS) (Président de Jury) Jean-Claude YVIN, Dr. Directeur R&D Centre Mondial D'Innovation Groupe Roullier Jean-Pascal BERGÉ, Dr. Directeur Scientifique, IDmer Justine DUMAY, Maître de Conférences, Université de Nantes (MMS)
Invité :	Raphaël VIBERT, Cofondateur et Dirigeant associé, SYNETUDE
Directeur de Thèse :	Jean-Pascal BERGÉ, Dr. Directeur Scientifique, IDmer
Co-encadrant de Thèse :	Justine DUMAY, Maître de Conférences, Université de Nantes (MMS)





## Thèse de Doctorat

## Cécile LE GUILLARD

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : VENAM Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : Biologie des organismes Spécialité : Biotechnologies marines Unités de recherche : Laboratoire Bioraf<sup>he</sup> Unité BRM IFREMER de Nantes

> Laboratoire MMS EA 2160 Faculté des Sciences et Techniques Université de Nantes

Soutenue le 29 janvier 2016

### Application de l'hydrolyse enzymatique assistée par ultrasons à la macroalgue rouge *Grateloupia turuturu*

Étude de la liquéfaction de la biomasse et de l'extraction de la R-phycoérythrine

### JURY

Rapporteurs :	Valérie STIGER-POUVREAU, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale (LEMAR) Nicolas GONDREXON, Professeur des Universités, Université Joseph Fourier (Laboratoire Rhéologie et Procédés)
Examinateurs :	Joël FLEURENCE, Professeur des Universités, Université de Nantes (MMS) (Président de Jury) Jean-Claude YVIN, Dr. Directeur R&D Centre Mondial D'Innovation Groupe Roullier Jean-Pascal BERGÉ, Dr. Directeur Scientifique, IDmer Justine DUMAY, Maître de Conférences, Université de Nantes (MMS)
Invité :	Raphaël VIBERT, Cofondateur et Dirigeant associé, SYNETUDE
Directeur de Thèse :	Jean-Pascal BERGÉ, Dr. Directeur Scientifique, IDmer
Co-encadrant de Thèse :	Justine DUMAY, Maître de Conférences, Université de Nantes (MMS)

#### Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux encadrants, qui ont dirigé et encadré cette thèse, M. Jean-Pascal Bergé et M<sup>me</sup> Justine Dumay. Merci de m'avoir confié ce travail. Moi qui, plus jeune, voulais déjà travailler sur les algues. Merci à tous les deux pour votre confiance, vos encouragements, votre enthousiasme, vos précieux conseils et votre soutien sans faille. Vous m'avez permis de tirer le positif de toutes situations, me permettant d'arriver jusqu'ici aujourd'hui. Votre optimisme m'a permis de toujours aller de l'avant et de garder confiance jusqu'à la fin. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de présenter ce travail, notre travail, de l'autre côté de l'Atlantique, jusqu'au Chili ! Merci Justine pour nos réunions régulières à MMS autour d'un bon petit thé. Merci JP, de Nantes à Lorient tu es resté présent. J'ai appris énormément au cours de ces trois années passées à vos côtés.

Je tiens maintenant à remercier le Docteur Valérie Stiger-Pouvreau et le Professeur Nicolas Gondrexon d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également le Docteur Jean-Claude Yvin d'avoir accepté d'examiner ce travail ainsi que le Professeur Joël Fleurence d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse en tant qu'examinateur. Je le remercie également pour son accueil au sein du laboratoire MMS, pour ses conseils et sa bienveillance.

Merci à M<sup>me</sup> Nathalie Bourgougnon et M. Jean-François Sassi d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse, merci pour leurs précieux avis et conseils.

Je remercie M. Raphaël Vibert et M. Arnaud Perrier de la société SYNETUDE de m'avoir permis de travailler avec le SONITUBE<sup>®</sup>. Un grand merci pour leurs nombreux conseils, leur aide, leur pédagogie et leur patience. Ils m'ont permis de découvrir le monde des ultrasons qui m'était encore inconnu il y a trois ans !

Merci à M. Régis Baron, second directeur du Laboratoire Bioraf<sup>he</sup>, de m'avoir donné les moyens de poursuivre mon travail de thèse dans de bonnes conditions, notamment pour la réalisation du plan d'expériences. Je le remercie également pour son aide mathématique.

Pour réaliser cette thèse il a fallu chercher Grateloupia sur la côte, ma gratitude à toutes celles et ceux qui ont plongé leurs mains et pieds, (voire plus !), dans l'eau plutôt fraîche de la Plage Valentin ! Merci pour ces bons moments passés sur la côte !

Un travail de thèse est rarement une entreprise solitaire, je peux dire que cette thèse est un vrai travail d'équipe, un immense MERCI à mes trois « Équipes Grateloupia » successives, sans qui je n'aurai pas pu réaliser ces nombreuses manips. Merci pour votre disponibilité ! L'équipe n°1 avec Claire, Sandrine et Amélie, les premières à avoir participé à cette aventure à mes côtés au laboratoire ! L'équipe n°2, avec Andrea et Marion, mes deux stagiaires, que je remercie pour leur investissement et leur bonne humeur au quotidien. Enfin, l'équipe n°3, avec Claire, Jojo et Jean-Yves, cette sacrée dernière équipe sans qui ce plan d'expériences n'aurait pas pu être réalisé. Un grand merci pour votre disponibilité, votre investissement, votre bonne humeur qui m'ont aidé à tenir lorsque les manips s'enchaînaient. Je n'oublierai jamais ces moments passés à la lumière de nos lampes

frontales ! Merci Jean-Yves, sans qui mes problèmes de pompes, de tuyaux et de fuite d'eau glycolée auraient virés au cauchemar ! Merci aussi à Isa pour ses magnifiques étiquettes !

Je remercie également l'ensemble des techniciens et chercheurs du laboratoire Bioraf<sup>he</sup> et du laboratoire EM<sub>3</sub>B qui se sont adaptés au labo lorsque mes manips s'enchaînaient. Merci à Jacqueline et à Corinne pour leurs analyses des sucres. Merci à Ewa de m'avoir initiée au subtil pliage de la capsule pour le CHN. Merci Claire pour ton soutien, ton aide et tes conseils pendant ces trois années ainsi que pour l'analyse des acides aminés. Merci à Marielle pour sa patience durant les heures passées ensemble pour construire et sortir la substantifique moelle de cette étude bibliométrique ! Merci à Anthony Massé, Maître de conférences au GEPEA et à Marthe Gilbert technicienne à Polytech Nantes de m'avoir fait découvrir l'ultrafiltration sur pilote. Merci pour votre gentillesse et votre enthousiasme dans cet essai ! Merci à Kévin Hardouin d'avoir pris de son temps pour l'analyse d'échantillons. Je remercie bien sûr mes relecteurs et relectrices !

Enfin, ces trois années auraient été difficiles sans les très bons moments passés avec mes collègues et amis d'MMS et d'IFREMER! Une thèse c'est beaucoup de travail mais aussi de très belles rencontres humaines.

Merci à l'« IFREMER team » pour les moments de détente et de papotage en salle café, sur « nos » marches, au Canotier, chez Fred et chez Isa ! Merci pour votre soutien, votre écoute, vos conseils et nos fous-rires ! L'IFREMER team c'est des doctorants, Sabrina, Gaëtan, Taous, Xavier, Anaïs et Adèle ; avec qui j'ai passé de très bons moments et qui m'ont aidé à faire passer les moins bons. Des contractuelles, Elodie et Karine, et des permanentes toujours présentes pour veiller sur leurs « petit(e)s » thésard(e)s : Sandrine et le trio « Fred-Isa-Claire ». Merci aussi à Romain, Mercedes, Javier, Minh Chau, Lou, Stan et Judith !

Je remercie également le groupe de doctorants (ou non doctorants) d'MMS, en particulier Mathilde, Nuria et Anthony ainsi qu'Astrid, Trang, Marta et Laurent, pour les moments passés ensemble à MMS, à la cafèt' de la fac et à l'extérieur. Merci Mathilde et Nuria pour ces bons moments en Bretagne et en Allemagne !

Merci aux coureurs qui se reconnaîtront, je pense que les bords de l'Erdre n'ont plus de secrets pour nous !

Je ne saurais jamais assez remercier mes proches, ma famille et mes amis, pour leur soutien. Merci à ceux et celles qui ont toujours été présents à mes côtés et qui ont toujours cru en moi. C'est aussi grâce à vous, qui me connaissez depuis toujours ou de longues années, que j'ai pu arriver jusqu'ici ! Merci aussi à mes deux nièces, Léna et Anna, pour ces bons moments passés lors de mes week-ends en Bretagne. Enfin, cette thèse m'a permis de rencontrer celui qui est aujourd'hui présent à mes côtés. Xavier, je ne saurais assez te remercier pour ton écoute, ton réconfort, ton optimisme et ton soutien inconditionnel.

« Merci ! »

### Avant propos

Cette thèse a été financée par la Région des Pays de la Loire dans le cadre du projet COSELMAR (COmpréhension des Socio-Écosystèmes Littoraux et MARins). Elle entre dans l'Axe 2.2 de ce projet portant sur la valorisation d'espèces marines invasives. Elle a été réalisée au sein de deux laboratoires impliqués dans COSELMAR :

- ➔ Le Laboratoire Bioressources marines et bioraffinerie par hydrolyse enzymatique (Bioraf<sup>he</sup>) dirigé par Régis Baron, au sein du Centre Atlantique IFREMER, Nantes
- ➔ Le Laboratoire Mer Molécules Santé (MMS) dirigé par le Professeur Yves-François Pouchus et codirigé par le Professeur Joël Fleurence, au sein de l'équipe CHIM dirigée par le Professeur Gilles Barnathan.

À ce jour, ce travail de thèse a donné lieu à la publication d'un chapitre de livre et à deux publications dans des journaux internationaux.

- Soft liquefaction of the red seaweed Grateloupia turuturu Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. Le Guillard Cécile, Bergé Jean-Pascal, Donnay-Moreno Claire, Bruzac Sandrine, Ragon Jean-Yves, Baron Régis, Fleurence Joël, Dumay Justine. 2016. Journal of Applied Phycology (Annexe 1, p.261)
- Ultrasound-Assisted Extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. Le Guillard Cécile, Dumay Justine, Donnay-Moreno Claire, Bruzac Sandrine, Ragon Jean-Yves, Fleurence Joël, Bergé Jean-Pascal. 2015. *Algal research* 12 : 522–528 (Annexe 2, p.275)
- Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. Dumay Justine, Morançais Michèle, Munier Mathilde, Le Guillard Cécile, Fleurence Joël. 2014. In Nathalie Bourgougnon éd. Advances in Botanical Research, Sea Plants. p. 321-343. Academic Press. (Annexe 3, p.285)

Ce travail de thèse a également donné lieu à deux communications dans des congrès nationaux et à trois communications dans des congrès internationaux.

- Valorisation protéique des macro-algues. Le Guillard Cécile, Bergé Jean-Pascal, Dumay Justine. 6ème Colloque Ponan/Cap Aliment. Transitions alimentaires : le cas des protéines. 26 Novembre 2013
- Development of an Ultrasound-assisted Enzymatic Hydrolysis Process to improve the extraction of Water-soluble Compounds from the red seaweed *Grateloupia turuturu*. Le Guillard Cécile, Bergé Jean-Pascal, Dumay Justine. Colloque annuel de la Société Phycologique de France. 24 novembre 2014
- Improving the Solubilization of Material using Ultrasound assisted Enzymatic Hydrolysis: The Case of a Red Seaweed. Le Guillard Cécile, Dumay Justine, Perrier Arnaud, Vibert Raphaël, Bergé Jean-Pascal. ESS14 - 14th Meeting of the European Society of Sonochemistry. Avignon, France. Du 2 au 6 juin 2014
- Development of an ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process for the liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* and its biomolecules recovery. Le Guillard Cécile, Bergé Jean-Pascal, Dumay Justine. TAFT 2015 -5th Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference, Nantes, France. Du 12 au 16 octobre 2015
- Development of an ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process for the liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* and its biomolecules recovery. Le Guillard Cécile, Bergé Jean-Pascal, Dumay Justine. V CLABA, V Latino-American Congress of Algal Biotechnology, Viña del Mar, Chili. Du 25 au 29 octobre 2015

## Table des matières

Liste des figures	XVII
Liste des tableaux	XXI
Liste des abréviations	XXIII
Introduction générale	1
Chapitre I : Étude bibliographique	7
I. Généralités sur les macroalgues	7
I.1. Les macroalgues en quelques chiffres	7
I.1.1. À l'échelle mondiale	7
I.1.2. Positionnement de la France	11
I.2. Utilisation des algues en tant que légume, condiment ou ingrédient	11
I.3. Autres applications : aquaculture et agriculture	
Il Caractérictiques biochimiques des masrealques rouges	1.4
II. Caracteristiques biochimiques des macroaigues rouges	
II.1. Les polysaccharides	
II.1.1. Les polysaccharides parietaux	15
II.1.1.1. Les polysaccharides de la phase squeiettique	
II.1.1.2. Les polysacchandes de la phase maincielle	10
II.1.2. Les polysaccitations	<u>10</u>
II.1.3.1 Proprietes et applications	<u>18</u> 18
II 1 3 2 Santé humaine	10
II.1.3.3. Activités biologiques.	
II.2. Les lipides	
II 2 1 Généralités	20
II.2.2. Intérêts en santé humaine	
II.3. Les protéines	
II 3.1 Généralités	22
II.3.2. Intérêts nutritionnels	
II.4. Les pigments	23
II.4.1. Les chlorophylles	
II.4.2. Les caroténoïdes.	
II.4.3. Les phycobiliprotéines	24
II.4.3.1. Phycobilisome et phycobiliprotéines	
II.4.3.2. La R-phycoérythrine	27
II.4.4. Propriétés et applications des phycobiliprotéines	31
II.4.4.1. Colorants	31
II.4.4.2. Biotechnologies : marqueurs fluorescents	

II.4.4.3. Activités biologiques	
II.5. Les minéraux et vitamines	33
II.5.1. Minéraux	<u>33</u>
II.5.2. Vitamines	<u>34</u>
III. Description du modèle d'étude : Grateloupia turuturu	35
III.1. Systématique et description	
III 1 1 Systématique	35
III 1 2 Description	<u>05</u> 36
III 2 Écologie et reproduction	<u></u>
	30
III 4. Espèce invesive ou proliférante 2	
III.4. Espèce invasive ou promerante :	40
III.6. Composás d'intérêt et petentielles voies de valerisation	
ni.o. Composes a interet et potentieries voies de valorisation	
IV. Les procédés d'extraction et les algues	46
IV.1. Des procédés conventionnels au développement de procédés innovants	46
IV.1.1. Les algues et les nouvelles techniques d'extraction	<u>46</u>
IV.1.2. Procédés et bioraffinerie de macroalgues	<u>50</u>
IV.2. Extraction assistée par hydrolyse enzymatique	51
IV.2.1. Généralités sur les enzymes	<u>51</u>
IV.2.1.1. Définition	51
IV.2.1.2. Classification	
IV.2.1.3. Facteurs physicochimiques et réactions enzymatiques	53
IV.2.2. Hydrolyse enzymatique & macroalgues	<u>54</u>
IV.2.2.1. L'extraction assistee par enzymes (EAE)	55 50
IV.2.2.2. Hydrolyse enzymalique specifique	
IV.2.2.5. LAL via rutilisation d'enzymes destinées aux macroalgues	
IV.2.3. Extraction de molécules d'intérêt & activités biologiques	<u> </u>
IV 2 3 2 Intérêt nutritionnel : amélioration de la digestibilité des algues	
IV 2.3.3 Bioéthanol : saccharification	
IV.3 Extraction assistée nar ultrasons	63
IV.3.1 Généralités sur les ultrasons	63
IV.3.2. Le phénomène de cavitation	
IV.3.3. Les réacteurs à ultrasons	
IV.3.3.1. Les réacteurs fermés	
IV.3.3.2. Les réacteurs ouverts	66
IV.3.4. Applications de l'extraction assistée par ultrasons (UAE)	67
IV.3.4.1. Principe, avantages et inconvénients	67
IV.3.4.2. Extraction assistée par ultrasons & algues	69
IV.4. Extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH)	71
IV.4.1. Généralités	71
IV.4.2. Le couplage ultrasons-enzyme(s)	<u>71</u>
IV.4.2.1. Ultrasons & enzymes	73
IV.4.2.2. Ultrasons & réaction d'hydrolyse	73
IV.4.3. Choix des paramètres de l'UAEH	<u>76</u>
IV.4.4. Applications aux végétaux supérieurs	76

IV.4.5. Intérêts de l'UAEH pour les macroalgues	77
V. Étude bibliométrique	79
V.1. Ressources et méthodologie	79
V.2. Résultats de l'analyse	
V.2.1. Les concepts de référence	
V.2.2. Répartition géographique des études du corpus	82
V.2.3. Co-occurences entre concepts	
V.2.4. Évolution temporelle des concepts de référence	<u>83</u>
V.2.5. Analyses ciblées	85
Chapitre II : Matériels & Méthodes	91
I. Matériel biologique : Grateloupia turuturu	91
II. Matériel enzymatique	91
III. Procédé d'extraction conventionnel de composés hydrosolubles	93
IV. Procédés d'extraction innovants de composés hydrosolubles	93
IV.1. Schéma général	
IV.2. Prétraitement des algues : broyage	94
IV.3. Préparation du mélange réactionnel	95
IV.4. Extraction assistée par hydrolyse enzymatique (enzyme-assisted extrac	tion, EAE).95
IV.5. Extraction assistée par ultrasons (ultrasound-assisted extraction, UAE).	
IV.6. Extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (ultraso enzymatic hydrolysis, UAEH)	und-assisted 96
IV.7. Paramètres suivis en cours d'extraction	96
IV.8. Prélèvements et fractionnement	97
IV.9. Schéma global des procédés étudiés	98
V. Analyses biochimiques	
V.1. Détermination de la matière sèche	
V.2. Détermination des cendres	100
V.3. Évaluation de la liquéfaction	
V.4. Analyse élémentaire : carbone et azote	101
V.5. Analyse de la composition en sucres	
V.5.1. Détermination de la teneur en sucres hydrosolubles	
V.5.2. Analyse des résidus glycosidiques	103
V.5.3. Détermination des masses molaires moyennes des polysaccharides	105
V.6. Analyse qualitative et quantitative des acides aminés	106
V.6.1. InVivo Labs : Règlement (CE) N° 152/2009	
V.6.2. Laboratoire Bioraf <sup>he</sup> : EZ:fasst <sup>TM</sup>	106
V.6.3. Expression des résultats	108
V.7. Détermination de la teneur en R-phycoérythrine	109
V.7.1. Concentration (mg.mL <sup>-1</sup> )	109
V.7.2. Rendement d'extraction	110
V.7.3. Stabilité de la R-PE à différentes températures	<u></u> 111
V.8. Détermination de la teneur en lipides totaux	

V.9. Détermination de la teneur en chlorure	
VI. Observations par microscopie optique	
VII. Outils statistiques	
VII.1. Expression et analyse des résultats	113
VII 2 Optimisation du procédé d'UAEH : méthodologia dos plans d'ovnérion	200 11 <i>4</i>
VII.2.1 Bringing de la méthodologie des plans d'expériences	11 /
VII 2 2 Paramètres étudiés	116
VII.2.3. Optimisation	
Chapitre III : Étude comparative de trois procédés d'extraction pour l liquéfaction de <i>Grateloupia turuturu</i> : EAE, UAE et UAEH	a 123
I. Contexte et objectifs de l'étude	123
II. Étude biochimique de Grateloupia turuturu	124
II.1. Étude des variations annuelles de la composition biochimique : 2013 et	2014124
II.2. Profil en acides aminés de Grateloupia turuturu	
II.2.1. Comparaison des laboratoires : InVivo Labs et laboratoire Bioraf <sup>he</sup>	131
II.2.2. Comparaison des années 2013 et 2014 : laboratoire Bioraf <sup>he</sup>	131
II.3. Réflexion sur la détermination du facteur de conversion N-protéines	
III. Liquéfaction de l'algue par EAE, UAE et UAEH	133
III.1. Comparaison des trois procédés : EAE, UAE et UAEH	133
III.2. Analyses biochimiques des fractions générées	138
III.2.1. Sucres hydrosolubles, composés carbonés et azotés	138
III.2.2. Influence de l'UAEH sur l'extraction des acides aminés	143
III.3. Observations par microscopie	145
IV. Conclusion	148
Chapitre IV : Influence de la température sur la liquéfaction de <i>Grate</i> <i>turuturu</i> et l'extraction de la R-phycoérythrine I. Contexte et objectifs de l'étude	<i>loupia</i> 151 151
II. Extraction conventionnelle des composés hydrosolubles & stabilité d	e la R-PE
vis-a-vis ut la leiliptialuit	
U.4. Entraction conventionnelle	450
II.1. Extraction conventionnelle	
II.1. Extraction conventionnelle.	<b>152</b> <u>152</u> 154
II.1. Extraction conventionnelle II.1.1. Les composés hydrosolubles II.1.2. Focus sur un composé d'intérêt : la R-phycoérythrine	<b>152</b> 152 154 156
II.1. Extraction conventionnelle II.1.1. Les composés hydrosolubles II.1.2. Focus sur un composé d'intérêt : la R-phycoérythrine II.2. Stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température	
<ul> <li>II.1. Extraction conventionnelle</li> <li>II.1.1. Les composés hydrosolubles</li> <li>II.1.2. Focus sur un composé d'intérêt : la R-phycoérythrine</li> <li>II.2. Stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température</li> <li>III. Liquéfaction de l'algue : effets procédés / températures</li> </ul>	
<ul> <li>II.1. Extraction conventionnelle</li> <li>II.1.1. Les composés hydrosolubles</li> <li>II.1.2. Focus sur un composé d'intérêt : la R-phycoérythrine</li> <li>II.2. Stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température</li> <li>III. Liquéfaction de l'algue : effets procédés / températures</li> <li>IV. Analyses biochimiques des fractions générées</li> </ul>	
<ul> <li>II.1. Extraction conventionnelle</li> <li><u>II.1.1. Les composés hydrosolubles</u></li></ul>	
<ul> <li>II.1. Extraction conventionnelle</li></ul>	
<ul> <li>II.1. Extraction conventionnelle</li></ul>	
<ul> <li>II.1. Extraction conventionnelle</li></ul>	

IV.2.2. Composés carbonés et azotés	<u>170</u>
V. Conclusion	171
Chapitre V : Optimisation de l'UAEH pour la liquéfaction de <i>Grateloupia turuturu</i> et l'extraction de la R-phycoérythrine	175
I. Contexte et objectifs	175
II. Composition du cocktail enzymatique	176
III. Détermination des conditions optimales de l'UAEH pour la liquéfaction de <i>Grateloupia turuturu</i> et pour l'extraction de la R-PE	177
III.1. Conduite du plan d'expériences	177
III.2. Détermination des conditions optimales pour la liquéfaction	179
III.3. Détermination des conditions optimales pour l'extraction de la R-PE	180
III 4. Résumé des conditions ontimales	184
IV. Validation de la prédiction de la liquéfaction de <i>Grateloupia turuturu</i> par l'U <i>P</i> en conditions optimisées	\ЕН 184
IV.1. Liquéfaction de l'algue	185
IV.2. Analyses des fractions : surnageants et culots	186
IV.2.1. Distribution du carbone et de l'azote de l'algue	<u>186</u>
IV.2.2. Analyses des sucres	<u>188</u>
IV.2.2.1. Sucres hydrosolubles	188
IV.2.2.2. Oses libres	188
IV.2.2.3. Détermination des masses molaires moyennes	191
IV.2.3. Les acides aminés	194
IV.2.3.1. Distribution des acides aminés de l'algue	194
IV.2.3.2. Profils en acides aminés	195
IV.2.4. Synthèse : composition biochimique de la fraction soluble finale (360 minutes)	<u>198</u>
V. Validation de la prédiction de l'extraction de la R-PE de <i>Grateloupia turuturu</i> UAEH en conditions optimisées	par 200
V.1. Liquéfaction de l'algue	200
V.2. Analyses des fractions : surnageants et culots	202
V.2.1. Rendements d'extraction de la R-PE	202
V.2.1.1. Comparaison avec les résultats du chapitre précédent	203
V.2.1.2. Comparaison avec la méthode d'extraction conventionnelle	204
V.2.2. Distribution du carbone et de l'azote de l'algue	205
V.2.3. Analyses des sucres	207
V.2.3.1. Sucres hydrosolubles	207
V.2.3.2. Oses libres	208
V.2.3.3. Détermination des masses molaires moyennes	210
V.2.4. Les acides aminés	<u>213</u>
V.2.4.1. Distribution des acides aminés de l'algue	213
V.2.4.2. Profils en acides aminés	215
V.2.5. Synthèse : composition biochimique de la fraction soluble finale (210 minutes)	<u>218</u>
VI. Conclusion	220
Conclusion générale & Perspectives	225

Bibliographie	233
Glossaire	257
Annexes	

## Liste des figures

Figure 1 : évolution de la production mondiale de macroalgues par cueillette et aquaculture de 1950 à 2013. D'après FAO, 2015
Figure 2 : évolution de la production mondiale par aquaculture des macroalgues vertes, rouges et brunes de 1950 à 2013. D'après FAO, 20159
Figure 3 : répartition de la production mondiale de macroalgues par aquaculture entre les principaux pays producteurs asiatiques, en 2013. Valeurs exprimées en %. D'après FAO, 2015 10
Figure 4 : exemples de produits alimentaires à base d'algues (Google images)13
Figure 5 : exemples de carrabioses constitutifs de la famille des kappa carraghénanes (kappa $\kappa$ et iota ı) et de la famille des lambda carraghénanes ( $\lambda$ ). D'après Usov, 201117
Figure 6 : représentation schématique de la structure du phycobilisome (Munier, 2013)25
Figure 7 : organisation des sous-unités $\alpha$ et $\beta$ constituant les trimères et hexamères des phycobiliprotéines (Munier, 2013)26
Figure 8 : structure chimique des chromophores de la R-phycoérythrine, PEB (phycoérythrobiline) et PUB (phycourobiline) (Munier, 2013)27
Figure 9 : spectre d'absorbance (en rose) et spectre de fluorescence (vert, excitation à 498 nm) caractéristiques de la R-PE (Munier, 2013)
Figure 10 : structure de la R-phycoérythrine. Sous-unités $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ associées à la phycoérythrobiline (PEB) et/ou à la phycourobiline (PUB) (Munier, 2013)28
Figure 11 : exemples d'extraits produits par la société GREENSEA®. De gauche à droite : allophycocyanine, R-phycocyanine et R-phycoérythrine. a. exposition à la lumière naturelle et b. émission de fluorescence (Greensea, 2015)
Figure 12 : photographie d'un thalle de <i>Grateloupia turuturu</i> dans son habitat naturel lors de la collecte effectuée au printemps 2014 à Batz-sur-Mer35
Figure 13 : spécimens de <i>Grateloupia turuturu</i> collectés sur les côtes portugaises, exemples de thalles présentant des morphologies différentes (Araújo <i>et al.</i> , 2011)
Figure 14 : photographies de <i>Grateloupia turuturu</i> dans son habitat naturel lors de la collecte effectuée au printemps 2014, à Batz-sur-Mer37
Figure 15 : cycle de développement de <i>Grateloupia turuturu</i> (Simon-Colin, 2001)38
Figure 16 : distribution de <i>Grateloupia turuturu</i> indiquée en vert, en allant du plus clair au plus foncé selon l'importance de sa présence ((Munier, 2013) d'après Guiry, 2013)
Figure 17 : le concept de bioraffinerie appliqué aux macroalgues rouges, différentes voies de valorisation possibles (Baghel <i>et al.</i> , 2015)
Figure 18 : schématisation de la réaction enzymatique. E (enzyme), S (substrat) et P (produit)52
Figure 19 : effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique (Combes et Monsan, 2009)
Figure 20 : représentation schématique d'une cellule piézo-électrique, effet piézo-électrique inverse (Pétrier <i>et al.</i> , 2008)
Figure 21 : phénomène de cavitation à proximité d'une surface solide. a : phases de compression et de dépression, b : augmentation du volume de la bulle de cavitation, c : implosion de la bulle de cavitation. D'après Pétrier <i>et al.</i> , 2008; Subhedar et Gogate, 2013

Figure 23 : réacteurs à ultrasons ouverts (l'échantillon traité est représenté en bleu ciel). a : réacteur à circulation, b : réacteur tubulaire et c : tube résonant (Pétrier *et al.*, 2008).......67

Figure 27 : répartition géographique mondiale des 277 publications du corpus bibliographique..82

Figure 34 : Exemple d'un spectre d'absorbance caractéristique de la R-PE. Extrait obtenu par extraction conventionnelle dans du tampon phosphate (dilution 1/5)......110

Figure 37 : profil des acides aminés obtenu par chromatographie en phase gazeuse (analyse réalisée au laboratoire Bioraf<sup>he)</sup> pour *Grateloupia turuturu* 2014. (E.I. : étalon interne)......129

Figure 41 : photographie des culots obtenus avec l'UAEH, à T0 min, 60 min, 180 min et 360 min. 137

Figure 43 : pourcentage relatif de chaque acide aminé pour *Grateloupia turuturu*, le Témoin et l'UAEH. Analyses effectuées par InVivo Labs. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types. n=2 pour l'UAEH et la condition Témoin, n=1 pour l'algue. AAE : acides aminés essentiels.

Figure 48 : cinétiques du gain de liquéfaction de *Grateloupia turuturu* sur 6 heures. Pour l'UAE et l'UAEH à 22 °C et à 40 °C. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3......159

 Figure 62 : répartition (%) des acides aminés de l'algue entre culot et surnageant à T0 et T210 minutes dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les étoiles indiquent une différence significative par rapport au T0 : \*\* pour p < 0,01 et \* pour p < 0,05. Analyses effectuées par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>......214

### Liste des tableaux

Tableau I : macroalgues autorisées pour la consommation humaine en France (CEVA, 2014)12
Tableau II : les quatre classes de phycobiliprotéines. D'après Munier, 2013
Tableau III : stabilité de la R-PE extraite de différentes espèces de macroalgues rouges, gammede pH dans laquelle elle est stable
Tableau IV : composition biochimique de <i>Grateloupia turuturu</i> , synthèse de différentes études43
Tableau V : exemples de composés isolés ou de propriétés biologiques attribuées à Grateloupiaturuturu ou au genre Grateloupia45
Tableau VI : les algues et les techniques d'extraction innovantes. Principes généraux, avantage(s) et inconvénient(s) par rapport aux techniques d'extraction conventionnelles. D'après Kadam <i>et al.</i> , 2013; Michalak et Chojnacka, 2014. Les notions de coût et de rentabilité dépendent de l'équipement utilisé et de la valeur ajoutée des composés extraits
TableauVII :liste non exhaustive de préparations enzymatiques commerciales(polysaccharidases) utilisées pour l'EAE de macroalgues rouges
Tableau VIII : exemples d'enzymes spécifiques aux polysaccharides pariétaux des macroalguesrouges. D'après Rhein-Knudsen et al., 2015
Tableau IX: liste des huit publications indexées au WOS en avril 2015 faisant référence àl'utilisation d'ultrasons et d'enzymes sur des macroalgues
Tableau X : caractéristiques des complexes enzymatiques composant le cocktail enzymatique : activités, valeurs de pH et de températures minimales (min), maximales (max) et optimales (opt)
Tableau XI : analyse des résidus glycosidiques par CPG. Gradients de températures appliqués
Tableau XII : capacité de détection par les deux laboratoires des 20 acides aminés présents cheztous les êtres vivants
Tableau XIII : calcul des valeurs réelles attribuées pour chaque niveau du plan d'expériences116
Tableau XIV : valeur réelle attribuée à chaque niveau pour les trois facteurs étudiés : puissance,température et débit
Tableau XV : matrice expérimentale de l'UAEH, pour la puissance, la température et le débit(points centraux)
Tableau XVI : composition biochimique proximale de <i>Grateloupia turuturu</i> effectuée sur deux années (2013 et 2014). Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à l'algue fraîche (Alg.F) et à l'algue sèche (Alg.S). Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types n=3, sauf pour l'azote, le carbone (n=2) et les acides aminés (n=1)
Tableau XVII : teneurs en oses de <i>Grateloupia turuturu</i> , en 2013 et 2014128
Tableau XVIII : facteurs de conversion azote-protéines (N-Prot) déterminés pour Grateloupiaturuturu (2013 et de 2014)
Tableau XIX : composition du cocktail enzymatique en terme d'azote, de carbone, de sucres hydrosolubles et d'oses totaux. Résultats exprimés en mg.g <sup>-1</sup> de cocktail enzymatique frais (CE.F) et en mg.g <sup>-1</sup> d'algue sèche (Alg.S) (2014) pour l'apport par le cocktail enzymatique. Les analyses ont été effectuées en triplicat, les valeurs moyennes obtenues après calculs sont présentées
Tableau XX : résultats du plan d'expériences après 6 heures concernant les deux réponses

Tableau XX : resultats du plan d'experiences après 6 heures concernant les deux reponses étudiées : la liquéfaction de l'algue (%) et l'extraction de la R-PE (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Les conditions de chaque essai sont rappelées (puissance (P), température (T) et débit (Q))......178

Tableau XXIII : résumé des conditions optimales pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-PE (puissance (P), température (T), débit (Q) et durée (D))......184

### Liste des abréviations

AA : acide aminé

AA<sub>algue</sub>: acides aminés de l'algue

AA<sub>détectés</sub> : acides aminés détectés

AAE : acide aminé essentiel

AAs: pourcentage d'acides aminés dans le surnageant lyophilisé

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie

AG : acide gras

AGMI : acide gras mono-insaturé

AGPI : acide gras poly-insaturé

Alg.F : algue fraîche

Alg.S : algue sèche

Biorafhe : Bioressources marines et bioraffinerie par hydrolyse enzymatique

C : carbone

Calgue : pourcentage de carbone dans l'algue sèche

CE.F : cocktail enzymatique frais

CEVA : Centre d'Étude et de Valorisation des Algues

COSELMAR : COmpréhension des Socio-Écosystèmes Littoraux et MARins

CPG : chromatographie en phase gazeuse

Cs: pourcentage de carbone dans le surnageant

D : durée

Da : dalton

DIF : détecteur à ionisation de flamme

E : enzyme

EAE : enzyme-assisted extraction (en langue anglaise) ou extraction assistée par enzyme(s), extraction assistée par hydrolyse enzymatique

EASIN : European Alien Species Information Network

EC : enzyme classification

EPA : acide eicosapentaénoïque

FAO : Food and Agriculture Organization (en langue anglaise) ou organisation pour l'alimentation et l'agriculture

Gain<sub>liq</sub> : gain de liquéfaction

h : heure

HCI : acide chlorhydrique

HPLC : high performance liquid chromatography (en langue anglaise) ou chromatographie en phase liquide à haute performance

HPSEC : high-performance size exclusion chromatography (en langue anglaise) ou chromatographie d'exclusion stérique haute performance

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

Ip : indice de polydispersité

MAAs : mycosporine like amino acids (en langue anglaise) ou acides aminés de type mycosporines

MAE : microwave-assisted extraction (en langue anglaise) ou extraction assistée par micro-ondes

MALS : multi-angle light scattering (en langue anglaise) ou détecteur à diffusion de lumière

Max : maximum

M<sub>c</sub>: matière (algue) non liquéfiée (culot)

MF : matière fraîche

min : minute

Min : minimum

M<sub>liq</sub>: matière (algue) liquéfiée (surnageant)

Mn : masse molaire moyenne en nombre

MMS : Mer Molécules Santé

MS : matière sèche

Mw : masse molaire moyenne en poids

N : azote

N<sub>algue</sub>: pourcentage d'azote dans l'algue sèche

NaOH : hydroxyde de sodium, soude

Nd : non détecté

N<sub>c</sub>: pourcentage d'azote dans le culot

Nq : non quantifié

Ns: pourcentage d'azote dans le surnageant

Opt : optimum

P : puissance

PEB : phycoérythrobiline

PLE : pressurized liquid extraction (en langue anglaise) ou extraction liquide sous pression

PUB : phycourobiline

Q : débit

Réf. : référence

RI : refractive index detector (en langue anglaise) ou détecteur réfractométrique

ROS : reactive oxygen species (en langue anglaise) ou espèces réactives de l'oxygène

R-PE : R-phycoérythrine

R<sub>R-PE</sub>: rendement d'extraction de R-phycoérythrine

rpm : rotations par minute

RSaa: rendement d'extraction des acides aminés dans la fraction soluble

 $RS_N$ : rendement d'extraction de l'azote dans la fraction soluble

RS<sub>c</sub>: rendement d'extraction du carbone dans la fraction soluble

RSM : response surface methodology (en langue anglaise) ou méthodologie des surfaces de réponse

SFE : supercritical fluid extraction (en langue anglaise) ou extraction au fluide supercritique

T : température

US : ultrasons

UAE : ultrasound-assisted extraction (en langue anglaise) ou extraction assistée par ultrasons

UAEH : ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (en langue anglaise) ou extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique

UNU : United Nations University (en langue anglaise) ou université des nations unies

UV : ultra-violet

W : watt

WHO : World Health Organization (en langue anglaise) ou organisation mondiale de la santé

WOS : Web of Science<sup>®</sup>

# Introduction générale

Les macroalgues constituent une ressource marine importante naturellement présente dans tous les océans. Depuis plusieurs dizaines d'années, la culture de ces algues ne cesse d'augmenter pour atteindre 24 millions de tonnes produites par aquaculture en 2013. En fonction des régions du globe, elles sont principalement destinées à l'alimentation humaine ou à l'industrie des phycocolloïdes pour la production d'épaississants et gélifiants connus sous les noms d'agars, carraghénanes et alginates. Outre leur intérêt nutritionnel, les macroalgues sont riches en composés possédant des activités biologiques d'intérêt pour des secteurs d'activités allant de l'agriculture à l'industrie pharmaceutique en passant par l'agroalimentaire, la cosmétologie, la nutraceutique et les applications biotechnologiques.

Parmi les macroalques présentes sur nos côtes, certaines ont été introduites accidentellement via des facteurs anthropiques (ostréiculture, aquaculture, marine marchande, etc.) et elles sont qualifiées d'espèces non-indigènes ou exotiques. Certaines d'entre elles s'adaptent particulièrement bien et vite à leur nouvel environnement, elles peuvent alors devenir proliférantes, envahissantes, voire même invasives. Il est donc primordial de trouver des voies d'exploitation et de valorisation pour ces biomasses qui demeurent le plus souvent inexploitées. C'est l'un des objectifs du projet régional COSELMAR, à savoir l'exploitation et la valorisation d'espèces marines invasives. La macroalque rouge non-indigène et proliférante Grateloupia turuturu est présente depuis les années 1990 sur les côtes bretonnes et ligériennes. Cette algue est actuellement non exploitée, notamment car elle ne figure pas parmi les algues autorisées en alimentation humaine en France, et constitue donc un matériel d'étude de premier choix. Elle a déjà fait l'objet de plusieurs études dans différents laboratoires. Au sein du laboratoire MMS, les travaux de recherche ont particulièrement porté sur l'étude de sa composition biochimique, sur sa valorisation en aquaculture, mais aussi et plus particulièrement sur l'extraction, la purification et la caractérisation d'un pigment fluorescent hydrosoluble de couleur rosepourpre présent chez toutes les macroalgues rouges : la R-phycoérythrine ou R-PE. La valeur ajoutée de ce pigment dépend de son degré de pureté et ses applications vont de l'utilisation en tant que marqueur fluorescent en biologie moléculaire à celle de colorant pour l'agroalimentaire ou la cosmétologie.

Néanmoins, l'essentiel de ces études ciblent l'extraction d'un composé en particulier, or la tendance actuelle est à la valorisation des biomasses dans leur ensemble. Ainsi, il a récemment été démontré qu'il est possible de valoriser certaines macroalgues rouges dans leur l'ensemble grâce à une cascade de procédés appliqués seuls ou combinés (bioraffinerie). Ces procédés doivent être adaptés à la biomasse et aux molécules recherchées, et être transposables du laboratoire à une plus grande échelle. Certaines techniques d'extraction présentent donc un potentiel élevé dans la valorisation des macroalgues par rapport aux techniques d'extraction plus conventionnelles (extraction solide-liquide, macération, distillation, *etc.*).

Parmi ces techniques d'extraction innovantes, l'hydrolyse enzymatique ou extraction assistée par hydrolyse enzymatique (EAE) a déjà montré son intérêt depuis plusieurs années pour la liquéfaction de macroalgues. La liquéfaction consiste ici à utiliser des enzymes qui vont permettre de solubiliser les composés de l'algue (protéines, sucres, *etc.*) en dégradant les principales structures constitutives de sa paroi : les polysaccharides. Parmi les composés solubilisés, un intérêt particulier est porté à la R-phycoérythrine, qui est à l'heure actuelle principalement extraite à partir d'algues lyophilisées, cryobroyées puis mises en suspension dans un milieu tamponné. Même si l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique de ce pigment s'est montrée efficace pour certaines macroalgues rouges, comme *Chondrus crispus* et *Palmaria palmata*, elle s'est avérée peu performante pour *Grateloupia turuturu*. Ceci est certainement dû à une composition pariétale différente, d'où une efficacité plus ou moins importante des enzymes utilisées.

L'application de l'extraction assistée par ultrasons (UAE) aux macroalgues est plus récente. Plusieurs travaux de recherche mentionnent cette technique comme une alternative aux méthodes d'extraction conventionnelles. Ainsi, quelques études ont montré le potentiel de l'UAE pour l'extraction de différentes molécules, telles que des polysaccharides sulfatés et des composés bioactifs issus de macroalgues brunes, vertes et rouges. Par rapport à l'hydrolyse enzymatique, ce procédé physique a l'avantage de ne pas être spécifique de la paroi de l'alque. Son utilisation peut donc être plus aisée lorsque la composition pariétale de la biomasse n'est pas bien connue, sa transposition d'une espèce à l'autre peut également être plus facile. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude ne mentionne l'utilisation des ultrasons pour l'extraction de la R-phycoérythrine de macroalques rouges, bien que l'intérêt de cette technique ait déjà été démontré pour l'extraction de pigments de végétaux supérieurs et de microalgues. De plus, l'utilisation d'un réacteur tubulaire à ultrasons, comme celui utilisé dans cette étude n'a, à notre connaissance, jamais été mentionnée pour les macroalgues. Ce type de réacteur ouvert a l'avantage de permettre la sonication en continu et de façon homogène du produit, contrairement aux réacteurs fermés (bains ou sondes à ultrasons) classiguement utilisés.

L'hydrolyse enzymatique et l'extraction par ultrasons peuvent être couplées de façon simultanée ou séquentielle. Des études récentes ont montré que l'association de ces deux procédés permettait d'améliorer l'extraction des polysaccharides, sucres et autres molécules de différents végétaux supérieurs. Le mécanisme de cette interaction positive, parfois qualifiée de synergie, n'est cependant pas encore élucidé. Il est généralement admis que la dégradation des matrices végétales sous l'action des ultrasons faciliterait la diffusion des enzymes au sein de la biomasse et donc l'accès à leur(s) substrat(s). D'autres mécanismes entreraient également en jeu, tels que l'amélioration des transferts de matière entre la biomasse et le milieu d'extraction ou encore des modifications de structure des enzymes et de leurs conditions optimales. L'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH) est innovante et en plein essor sur les végétaux terrestres, mais aussi sur les macroalgues où ce procédé en est à ses débuts. En effet, à notre connaissance et selon une étude bibliométrique effectuée récemment sur ce sujet, seulement cinq études ont utilisé ce couplage sur des macroalgues, dont trois à des fins analytiques et deux pour l'extraction de molécules par UAEH.

Le premier chapitre fera l'état des connaissances sur les macroalgues et les procédés d'extractions étudiés, le deuxième chapitre présentera les matériels et les méthodes utilisés pour mener à bien cette étude. Les résultats obtenus seront ensuite développés dans trois chapitres au sein desquels des éléments de réponse et de discussion seront apportés. Enfin, une conclusion générale et des perspectives seront émises pour la conduite de futurs travaux.

#### **O**BJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'objectif principal de ce travail de recherche est de sélectionner parmi trois procédés originaux celui qui permettrait de maximiser la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* pour en extraire le plus de composés, avec une attention particulière portée à la R-phycoérythrine. Les résultats de ces travaux sont présentés en trois chapitres représentatifs du cheminement suivi pour atteindre un procédé performant répondant à cet objectif.

## **1.** Étude comparative de trois procédés d'extraction pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* : EAE, UAE et UAEH

L'objectif de ce premier chapitre de résultats est d'effectuer une étude comparative de différents procédés en se basant sur la liquéfaction de l'algue et sur la composition biochimique des fractions obtenues. Il est donc nécessaire de caractériser la biomasse initiale, pour ce faire une étude préliminaire de la composition biochimique de *Grateloupia* 

*turuturu* introduit ce chapitre. Par la suite, les trois procédés étudiés EAE, UAE et leur couplage simultané (UAEH) ont été appliqués. Les taux de liquéfaction et la caractérisation biochimique des fractions solubles générées ont permis de pré-sélectionner les deux techniques les plus efficaces pour l'extraction des composés de cette macroalgue.

### 2. Effet de la température sur l'UAE et sur l'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* & l'extraction de la R-PE

Suite aux premiers résultats, les deux procédés retenus, l'UAE et l'UAEH, ont été appliqués à 22 °C et 40 °C. À ce stade de l'étude, en plus du taux de liquéfaction de l'algue, le rendement d'extraction de la R-PE est également pris en compte. À ce titre, une première étude portant sur l'extraction conventionnelle des composés hydrosolubles de l'algue, dont la R-PE, introduit ce chapitre. Elle est suivie d'une étude de stabilité du pigment à différentes températures au cours du temps. L'UAE et l'UAEH, à 22 °C et 40 °C, ont été comparées sur la base des taux de liquéfaction obtenus, de la composition biochimique des fractions et des rendements d'extraction de la R-PE, dans l'objectif de ne retenir qu'un seul de ces deux procédés. Des comparaisons ont également été réalisées par rapport à la technique d'extraction conventionnelle afin d'évaluer leurs efficacités.

## 3. Optimisation de l'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* & l'extraction de la R-PE

Les résultats du chapitre précédent ont permis de sélectionner l'UAEH pour faire l'objet d'une étude plus poussée. L'objectif est ici d'évaluer l'effet de trois paramètres sur la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-phycoérythrine, afin de déterminer les conditions permettant d'améliorer l'efficacité du procédé. Un plan d'expériences de type surface de réponses a été utilisé pour évaluer l'effet du débit, de la puissance et de la température. La conduite des expériences a permis de déterminer les conditions optimales pour chacun de ces paramètres. Enfin, des analyses biochimiques plus poussées ont été effectuées pour caractériser plus précisément les fractions solubles et insolubles obtenues suite à l'application de l'UAEH dans les conditions optimisées.

## **Chapitre I**

# Étude bibliographique

#### I. Généralités sur les macroalgues

Sous le terme « algues » sont regroupés différents organismes photosynthétiques. Il peut s'agir de bactéries (algues bleues ou cyanobactéries), d'organismes eucaryotes<sup>1</sup> pouvant être proches des plantes terrestres mais aussi être sans lien de parenté direct avec celles-ci. Communément, les algues sont définies comme étant des organismes photosynthétiques à chlorophylle *a*, autres que les plantes terrestres et généralement associés aux milieux humides. Elles sont présentes aussi bien en eaux de mer qu'en eaux douces. En plus de la chlorophylle, elles peuvent également posséder d'autres pigments, qui leur permettent de capter l'énergie lumineuse de longueurs d'onde différentes pour fabriquer de la matière organique par photosynthèse (Pérez, 1997; de Reviers, 2015). Les algues représentent la quasi-totalité des végétaux vivant en milieu marin, elles sont présentes dans toutes les mers du monde, fixées aux fonds marins ou flottant librement à la surface (Kornprobst, 2005). Communément, sont distinguées les microalgues et les macroalgues, appelées aussi grandes algues.

Le terme de macroalgue est un terme générique qui englobe les organismes aquatiques photosynthétiques pluricellulaires, le plus souvent visibles à l'œil nu (Kornprobst, 2005). La définition et la classification des algues, et donc des macroalgues, a évolué au cours du temps en fonction des connaissances liées au développement technologique (Kornprobst, 2005; Pérez, 1997). Ce terme n'a aucune valeur taxonomique, les macroalgues regroupant de nombreuses espèces issues de deux lignées évolutives distinctes (lignée verte et brune), elles peuvent être divisées en trois ensembles : les Chlorophyceae ou algues vertes, les Rhodophyceae ou algues rouges et les Phaeophyceae ou algues brunes (ADEME, 2014; Kornprobst, 2005).

#### I.1. Les macroalgues en quelques chiffres

#### I.1.1. À l'échelle mondiale

Les macroalgues présentes sur le marché mondial sont issues de la cueillette ou de l'aquaculture. Les évolutions de ces deux productions à l'échelle mondiale depuis les années 1950 sont représentées dans la Figure 1.

<sup>1</sup> regroupent tous les organismes, unicellulaires ou pluricellulaires, dont les cellules se caractérisent par la présence d'un noyau et de mithochondries



Figure 1 : évolution de la production mondiale de macroalgues par cueillette et aquaculture de 1950 à 2013. D'après FAO, 2015

Depuis les années 1970, la culture de macroalgues s'est particulièrement développée, dépassant très largement la cueillette. En effet, cette dernière s'est maintenue à un tonnage constant depuis plus de 60 ans (< 1 million de tonnes frais). En 2013, la cueillette ne représentait que 3,8 % du volume de macroalgues exploitées contre 96,2 % pour l'aquaculture. Concernant l'aquaculture, depuis les années 2000 la production ne cesse d'augmenter de façon considérable, le tonnage a été multiplié par un facteur 3,7 entre 2000 et 2013, avec respectivement 6,4 et 24 millions de tonnes. Ces dernières années, cette augmentation s'est particulièrement accentuée, avec 2,9 millions de tonnes supplémentaires entre 2011 et 2012 et 3,1 millions de tonnes supplémentaires entre 2012 et 2013.

L'évolution de la production aquacole présente des tendances bien différentes en fonction de la classe d'algue considérée, comme représenté dans la Figure 2.


Figure 2 : évolution de la production mondiale par aquaculture des macroalgues vertes, rouges et brunes de 1950 à 2013. D'après FAO, 2015

Les macroalgues vertes sont très peu cultivées. Depuis 2008, leur tonnage ne cesse de diminuer (26 133 tonnes en 2008) et elles représentaient seulement 0,06 % de la culture mondiale en 2013 avec 14 739 tonnes. Les macroalgues brunes ont été les plus cultivées depuis les années 1960 jusqu'à 2008, avec quelques fluctuations selon les années. En 2013 elles représentaient 34,2 % de la production mondiale avec 8,2 millions de tonnes. En 2010, cette production représentait 43 %. La production de macroalgues rouges est en constante augmentation depuis les années 2000, arrivant même à partir de 2008 à dépasser la production de macroalgues brunes. En 2013, la production de macroalgues rouges représentait 65,7 % de la production mondiale (15,8 millions de tonnes), contre 56,9 % en 2010. Sur le plan économique, la production mondiale de macroalgues était estimée à 5,5 milliards de dollars US en 2013 (FAO, 2015).

La culture d'algues est présente sur tous les continents, mais elle se concentre essentiellement en Asie, avec 99,2 % de la production (23,8 millions de tonnes en poids frais), suivie par l'Afrique avec 0,5 % (120 032 tonnes), l'Europe avec 0,17 % (40 684 tonnes), l'Océanie avec 0,09 % (21 920 tonnes) et les Amériques avec 0,06 % (13 311 tonnes) (FAO, 2015). Ce monopole de la production asiatique se répartissait en 2013, selon les données statistiques de la FAO, principalement entre quatre pays (Figure 3). Ainsi la

Chine est le principal producteur mondial avec 44,3 % de la production mondiale (10,6 millions de tonnes en poids frais), l'Indonésie la suit de près avec 38,7 % de la production mondiale (9,3 millions de tonnes), les Philippines en ont produit quant à elles 6,5 % soit 1,6 millions de tonnes et 4,7 % ont été produits par la République de Corée (1,1 millions de tonnes).



Figure 3 : répartition de la production mondiale de macroalgues par aquaculture entre les principaux pays producteurs asiatiques, en 2013. Valeurs exprimées en %. D'après FAO, 2015

En 2010, la production mondiale était concentrée sur neuf espèces, dont les principales sont : *Laminaria japonica* (Kombu) (33 % de la production mondiale), *Eucheuma* spp. (22 %), *Kappaphycus alvarezii* (12 %), *Undaria pinnatifida* (Wakamé) (10 %), *Porphyra* sp. (Nori) (7 %) et la Gracilaire commune (7 %) (Programme Breizh'alg, 2012).

À l'échelle mondiale, 89 % de la production est destinée au marché alimentaire, 7 % à la chimie fine et 4 % à l'industrie des phycocolloïdes<sup>2</sup> (agars, carraghénanes et alginates) (ADEME, 2014). En Europe, la tendance est toute autre puisque 1 % est utilisé en tant qu'algue légume, 24 % est destiné à l'agriculture et 75 % à l'industrie des phycocolloïdes (Hardouin *et al.*, 2014). En 2010, le marché mondial de l'industrie des phycocolloïdes était estimé à 1 milliard d'euros (Kraan, 2012).

<sup>2</sup> Macromolécules hydrosolubles extraites des algues, en solution aqueuse elles modifient les propriétés rhéologiques du produit dans lequel elles sont ajoutées (épaississant, gélifiant, stabilisant, *etc.*)

#### I.1.2. Positionnement de la France

En 2012, la France se positionnait au 10<sup>ème</sup> rang des producteurs mondiaux, avec 95 000 tonnes de macroalgues fraîches produites et récoltées, soit 0,6 % de la production mondiale (16 millions de tonnes de matière fraîche). Elle se plaçait alors en 2<sup>ème</sup> position en Europe, juste après la Norvège (ADEME, 2014).

Contrairement au marché mondial (Figure 1), en 2012 en France, près de la totalité des algues étaient issues de la collecte : 90 % sont prélevées en mer à l'aide de navires goémoniers, les 10 % restants sont prélevés sur les plages par des récoltants à pied (6000 tonnes par an environ). La culture de macroalgues ne représentait quant à elle que 50 tonnes de matière fraîche, avec principalement deux espèces de macroalgues brunes : *Undaria pinnatifida* (Wakamé) et *Saccharina latissima* (Kombu) (ADEME, 2014). Les algues récoltées sont aussi majoritairement des macroalgues brunes (95 %), avec 75 % de Laminaires dont 57 000 tonnes (60 %) de *Laminaria digitata* et 15 % de *Laminaria hyperborea,* le reste des collectes (6 %) correspond à des Fucales (*Fucus* spp. et *Ascophyllum nodosum*).

Ces algues sont essentiellement destinées au marché des phycocolloïdes (90 à 95 %), en particulier pour la production d'alginates, qui sont extraits des macroalgues brunes. Les phycocolloïdes produits en France représentent environ 20 % du marché mondial, grâce à la présence de deux firmes internationales assurant leur transformation : Dupont-Danisco et Cargill (ADEME, 2014).

# I.2. Utilisation des algues en tant que légume, condiment ou ingrédient

La consommation directe des algues en tant que légume est essentiellement retrouvée dans le Sud-Est asiatique, où elles sont traditionnellement très présentes dans le régime alimentaire. Par exemple, en Chine, premier pays consommateur d'algues en tant que légume, la consommation moyenne par an et par habitant s'élève à 8 kg d'algues fraîches (même ordre de grandeur que la consommation de salade en France) (ADEME, 2014).

En France, une filière de production se met en place dans les années 1980 avec une réglementation assortie (Marfaing et Lerat, 2007). A l'heure actuelle, 24 algues dont 3 microalgues sont autorisées en alimentation humaine. Le Tableau I présente les différentes espèces de macroalgues autorisées, parmi lesquelles figurent 8 algues brunes, 11 algues rouges et 2 algues vertes. Leur commercialisation sur le marché français nécessite qu'elles répondent à certains critères microbiologiques, elles ne doivent pas non plus dépasser

### certaines teneurs en métaux lourds et en iode (CEVA, 2014).

Macroalgues brunes	Macroalgues rouges	Macroalgues vertes		
Ascophyllum nodosum	Palmaria palmata (Dulse)	<i>Ulva</i> sp. (Laitue de mer)		
Fucus vesiculosus	Porphyra umbilicalis (Nori)	<i>Enteromorpha</i> sp. (Aonori)		
<i>Himanthalia elongata</i> (Spaghetti de mer)	Pyropia tenera * (Nori)			
Undaria pinnatifida (Wakame)	Pyropia yezoensi * (Nori)			
Laminaria digitata (Kombu)	Porphyra dioica (Nori)			
Laminaria saccharina (Kombu royal)	Porphyra purpurea (Nori)			
Laminaria japonica (Kombu)	Porphyra laciniata (Nori)			
<i>Alaria esculenta</i> (Atlantic wakame)	Pyropia leucosticta * (Nori)			
	<i>Chondrus crispus</i> (Pioca, Lichen)			
	Gracilaria verrucosa (Ogonori)			
	Phymatolithon calcareum (Maërl)			

Tableau I : macroalgues autorisées pour la consommation humaine en France (CEVA, 2014)

\* suite à un réarrangement taxonomique ces espèces n'appartiennent plus au genre *Porphyra*. Elles ont été transférées dans le genre *Pyropia* (AlgaeBase, 2016)

Dans le cadre du projet IDEALG, une étude du marché français des algues alimentaires a montré que ce marché pouvait être divisé en deux segments (Le Bras *et al.*, 2015a):

- Les produits d'inspiration asiatique (54 % du marché) : feuilles de Nori, algues sèches, soupes miso, sushis préparés.
- Les produits d'inspiration française (46 % du marché) : algues sèches et fraîches, tartinables et condiments.

Concernant les « produits d'inspiration française » (hors gélifiants et compléments alimentaires), les produits référencés se répartissent essentiellement entre les produits bruts peu transformés (30 %) (algues sèches, paillettes, bocaux, algues fraîches salées), les tartinables (21 %) (tartares d'algues, rillettes de poissons aux algues) et les condiments (17 %) (courts-bouillons, moutardes, produits à saupoudrer tels que sels et aromates), les autres produits sont par exemple des tisanes, des biscuits salés, des boissons et des soupes (Le Bras *et al.*, 2015b). Des exemples de produits sont présentés dans la Figure 4.

Produits d'inspiration française (peu transformés, tartinables, condiments,...)



Figure 4 : exemples de produits alimentaires à base d'algues (Google images)

# I.3. Autres applications : aquaculture et agriculture

Des études récentes ont montré l'intérêt des macroalgues pour supplémenter ou remplacer l'alimentation artificielle habituellement utilisée en aquaculture (farines végétales, soja par exemple) pour les poissons et mollusques (saumons et ormeaux notamment). L'apport d'algues améliorerait leur croissance ainsi que leur résistance à certains pathogènes, les macroalgues étant l'aliment naturel des ormeaux (Fleurence *et al.*, 2012; García-Bueno, 2015; Lozano *et al.*, 2015; Mæhre *et al.*, 2014; Mulvaney *et al.*, 2013). De plus, il est envisageable de valoriser les effluents aquacoles par la co-culture de

macroalgues dans des systèmes intégrés (IMTA pour Integrated multi-trophic aquaculture), pour la production de molécules d'intérêt commercial comme les phycobiliprotéines (Figueroa *et al.*, 2012; Fleurence *et al.*, 2012; García-Bueno, 2015). Les macroalgues sont également utilisées pour supplémenter le régime alimentaire du bétail en minéraux et vitamines. Il s'agit essentiellement de farines de macroalgues brunes (*Ascophyllum* et *Laminaria*) ou alors d'extraits utilisés en tant qu'additifs alimentaires pour la prévention de certaines maladies (McHugh, 2003; Michalak et Chojnacka, 2015). Par exemple, le groupe français Olmix développe et commercialise différents produits à base de macroalgues, qui sont notamment destinés à la nutrition et la santé animale (Clogenson, 2015; Stassi, 2015). Les propriétés revendiquées sont pour la plupart basées sur l'apport de polysaccharides marins sulfatés (exemples : DigestSea, SeaLyt et Searup). L'entreprise Setalg du Groupe Roullier commercialise elle aussi ce type de produits, à base d'algues brunes principalement (Algovert<sup>®</sup>, Fucopharm<sup>®</sup> et Ascopharm<sup>®</sup>).

Enfin, depuis des siècles les macroalgues servent d'amendement sur les champs (Kılınç *et al.*, 2013; McHugh, 2003). Elles sont de nos jours utilisées sous forme d'extraits destinés à la santé du végétal (macroalgues brunes essentiellement). Ainsi, au début des années 1990, ce marché valait 5 millions de dollars et a dû croître fortement ces dernières années avec le développement de l'agriculture raisonnée et biologique (Kılınç *et al.*, 2013). Ces extraits apportent des nutriments à la plante ou sont utilisés en tant que stimulants et régulateurs de croissance grâce à la présence de certaines molécules (cytokinines) et à leur teneur en minéraux. Les polysaccharides augmentent quant à eux les capacités de rétention d'eau des sols (Khan *et al.*, 2009; Michalak et Chojnacka, 2015). Différentes sociétés commercialisent ce type de produits destinés à la santé du végétal, avec par exemple : Maxicrop<sup>®</sup> (Royaume-uni), Seasol<sup>®</sup> (Australie), ou encore Vacciplant<sup>®</sup> proposé par la société Goëmar (France) et Lamivert<sup>®</sup> et Ascovert<sup>®</sup> produits par l'entreprise Setalg du Groupe Roullier (France).

# II. Caractéristiques biochimiques des macroalgues rouges

Les algues rouges ou Rhodophyceae peuvent être divisées en deux sous-classes : les Bangiophycideae et les Florideophycideae. Le nombre d'espèces est estimé aux environs de 4000 à 5000, elles sont principalement marines (Kornprobst, 2005; Usov, 2011). Les *Bangiophycideae* sont essentiellement monocellulaires avec quelques espèces pluricellulaires parmi lesquelles figurent les algues du genre *Porphyra*, qui possèdent un

thalle<sup>3</sup> rouge-brun constitué d'une seule couche de cellules. Les *Florideophycideae* sont quant à elles pour la plupart pluricellulaires et macroscopiques. Elles sont retrouvées aussi bien dans des baies abritées que sur des roches exposées, elles sont le plus souvent benthiques<sup>4</sup> (Kornprobst, 2005).

### II.1. Les polysaccharides

### II.1.1. Les polysaccharides pariétaux

La paroi des macroalgues présente deux phases : une phase cristalline ou squelettique incluse dans une phase amorphe ou matricielle. Contrairement aux végétaux terrestres, la phase matricielle est plus abondante que la phase squelettique avec la prédominance de polysaccharides polyanioniques par rapport aux polysaccharides neutres (Kloareg et Quatrano, 1988). L'espèce étudiée dans ce travail de thèse étant une algue rouge (appartenant à la sous-classe des *Florideophycideae*), la composition de ces deux phases sera décrite pour les macroalgues rouges.

# II.1.1.1. Les polysaccharides de la phase squelettique

Il s'agit de polysaccharides linéaires neutres sous forme de cellulose le plus souvent, mais certaines espèces possèdent également des xylanes et mannanes (Kornprobst, 2005). Ils ont un rôle structural en rigidifiant la paroi de l'algue (Craigie, 1990).

La cellulose est un polymère linéaire insoluble dans l'eau, constitué d'unités  $\beta$ -(1,4)-D-glucose. Les chaînes de  $\beta$ -(1,4)-D-glucose s'associent entre elles par des liaisons hydrogènes pour former des microfibrilles (Baldan *et al.*, 2001; Craigie, 1990; Kornprobst, 2005). Chez les végétaux supérieurs, la cellulose représente le plus souvent 30 % du poids sec, tandis que chez les macroalgues rouges elle constitue moins de 10 % du poids sec du thalle (Kloareg et Quatrano, 1988; Usov, 2011). Les xylanes sont des polymères du xylose, constitués d'unités  $\beta$ -(1,4)-D-xylose et/ou de  $\beta$ -(1,3)-D-xylose. Ils sont notamment retrouvés dans l'ordre des Palmariales telle que *Palmaria palmata* et des Nemaliales (Usov, 2011). Les mannanes sont des polymères linéaires composés d'unités  $\beta$ -(1,4)-D-mannose. Ils sont surtout retrouvés chez les Bangiales telles que *Porphyra umbilicalis et Pyropia tenera* (Craigie, 1990; Usov, 2011). En fonction du stade de développement, certaines espèces (Bangiales) sont dépourvues de cellulose, leur phase matricielle est alors composée de

<sup>3</sup> Tissu végétal composé de cellules non différenciées, dépourvu d'appareil vasculaire où l'on ne reconnaît ni feuilles, ni tiges, ni racines. Il constitue l'appareil végétatif des thallophytes

<sup>4</sup> Ensemble des êtres, fixes ou mobiles, pouvant vivre et se développer sur les substrats durs ou meubles des fonds des mers et des nappes d'eau douce

 $\beta$ -(1,3)-D-xylanes et de  $\beta$ -(1,4)-D-mannanes (Kloareg et Quatrano, 1988).

# II.1.1.2. Les polysaccharides de la phase matricielle

Ce sont les polysaccharides les plus abondants chez les macroalgues rouges puisqu'ils représentent de 30 à 70 % du poids sec du thalle. Il s'agit de polysaccharides sulfatés composés de galactose et/ou de 3,6-α-anhydrogalactose regroupés sous les dénominations de carraghénanes ou d'agars. Chez une même espèce, il y a le plus souvent prédominance d'un de ces deux polysaccharides, ce qui permet de distinguer deux grandes catégories de macroalgues rouges : les carraghénophytes et les agarophytes (Kornprobst, 2005).

Les polysaccharides matriciels interviennent dans les propriétés mécaniques des thalles, celles-ci varient en fonction de la composition de la phase matricielle mais aussi en fonction des proportions respectives de phase matricielle et de phase squelettique. Les polysaccharides matriciels peuvent être présents en proportions différentes selon la zone du thalle concernée, mais aussi en fonction des contraintes environnementales auxquelles les algues sont exposées (zones abritées ou exposées). Ils pourraient également protéger les algues de la dessiccation lors de leur période d'émersion et contribuer à la régulation de la pression osmotique (Kloareg et Quatrano, 1988).

• Les carraghénanes

Les carraghénanes sont caractérisés par la répétition de deux oses formant un diholoside, appelé carrabiose. Les deux principales familles de carraghénanes sont les lambda ( $\lambda$ ) et les kappa ( $\kappa$ ) carraghénanes, les iota (I) carraghénanes appartiennent à la famille des kappa. Pour les  $\lambda$  carraghénanes, le diholoside est composé de deux D-galactoses, tandis que pour les  $\kappa$  carraghénanes il est composé d'un D-galactose et d'un D-3,6-anhydrogalactose. Les carraghénanes sont tous fortement sulfatés (20 à 38 %) (Kloareg et Quatrano, 1988), les degrés de sulfatation diffèrent d'un carraghénane à l'autre, comme illustré dans la Figure 5 (Garon-Lardière, 2004; Kornprobst, 2005).



Figure 5 : exemples de carrabioses constitutifs de la famille des kappa carraghénanes (kappa  $\kappa$  et iota  $\iota$ ) et de la famille des lambda carraghénanes ( $\lambda$ ). D'après Usov, 2011

· Les agars

Les agars ont une structure de base définie par l'enchaînement de deux oses formant l'agarobiose. Ce diholoside est constitué d'une unité L-3,6-anhydrogalactose liée à un D-galactose. Cependant chez les algues rouges la structure réelle des agars est plus complexe avec la présence d'autres groupements tels que des esters sulfates, des méthoxyles ou des pyruvates. Les agars sont moins sulfatés que les carraghénanes, leur teneur en groupements sulfates varie de 1 à 5 % (Garon-Lardière, 2004; Kornprobst, 2005).

Enfin, chez certaines espèces de macroalgues rouges peuvent exister des hydrides d'agars et de carraghénanes, appelés « carragar » ou « DL-hybrides ». Ils ont été décrits chez différentes espèces appartenant aux Halymeniales et aux Gigartinales (Usov, 2011).

#### II.1.2. Les polysaccharides de réserve

Les macroalgues rouges peuvent stocker l'énergie sous forme d'amidon floridéen et de deux galactosylglycérols : le floridoside et l'isofloridoside. Il s'agit de glucides de réserve comme le glycogène chez les vertébrés supérieurs (Kornprobst, 2005).

L'amidon floridéen, parfois appelé rhodamylon, est un  $\alpha$ -1,4 glucane proche de l'amidon. Il est cependant plus ramifié avec des masses molaires moyennes allant de 100.10<sup>6</sup> à 200.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup> (Kornprobst, 2005). C'est un polymère d' $\alpha$ -D-glucopyranose de structure similaire à celle de l'amylopectine de l'amidon (Usov et Zelinsky, 2013), synthétisé et stocké au niveau du cytosol. Sa teneur varie d'une espèce d'algue à l'autre, il peut représenter 35 % du poids sec de l'algue. L'amidon floridéen est soluble dans l'eau et peut être hydrolysé par des enzymes dégradant l'amylose telles que les amylases (Usov et Zelinsky, 2013).

Le floridoside et l'isofloridoside sont deux galactosylglycérols qui se différencient par le site de liaison du glucose sur le glycérol, l'isofloridoside est présent sous deux formes (L-) et (D-). En plus de leur rôle de glucide de réserve, ils interviennent en tant que régulateurs osmotiques, ainsi la teneur en floridoside augmente avec la salinité du milieu et diminue avec celle-ci (Hellio *et al.*, 2004). Le pourcentage de floridoside varie de 2 à 8 % selon les espèces et peut atteindre jusqu'à 22,5 % (Kornprobst, 2005).

# II.1.3. Propriétés et applications

# II.1.3.1. Propriétés rhéologiques

Les principaux polysaccharides présents dans les macroalgues (alginates, agars et carraghénanes) sont utilisés pour leurs propriétés rhéologiques et regroupés sous le terme de phycocolloïdes. Les agars et carraghénanes extraits des macroalgues rouges sont connus depuis des siècles, les propriétés gélifiantes de l'agar ont été mises en évidence en 1658 au Japon, et celles des carraghénanes de *Chondrus crispus* sont connues depuis le début du XIX<sup>e</sup> siècle en Irlande (Kılınç *et al.*, 2013; Kraan, 2012).

• En agroalimentaire

Les phycocolloïdes sont présents dans de nombreux produits en tant qu'additifs alimentaires. Ainsi les carraghénanes sont regroupés sous la dénomination E407 et les agars sous la dénomination E406. Les agars et carraghénanes sont utilisés dans différents produits tels que des boissons chocolatées, des glaces, laits concentrés mais aussi dans des confitures, puddings, gelées et vinaigrettes (Cardozo *et al.*, 2007).

Le développement de films alimentaires «bioactifs» peut être une nouvelle voie de valorisation. Ainsi, de récentes études ont montré qu'il était possible de réaliser des films alimentaires à partir des polysaccharides sulfatés extraits des macroalgues rouges *Mastocarpus stellatus* (carraghénanes) (Blanco-Pascual *et al.*, 2014) et *Porphyra columbina* (Cian *et al.*, 2014). Ces films ont de bonnes propriétés mécaniques et résistent à l'eau. De plus, la présence de polysaccharides sulfatés et de pigments naturels leur confère des propriétés antioxydantes qui peuvent être augmentées par l'ajout d'un extrait de R-phycoérythrine (Chapitre I, II.4.3.2.) (Cian *et al.*, 2014). Enfin, certains de ces films peuvent être comestibles (Cian *et al.*, 2014), ce qui est un atout considérable dans la politique actuelle d'incitation au « zéro déchet zéro gaspillage » (Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, 2015).

### · En cosmétologie

Ces polysaccharides peuvent aussi être incorporés dans des produits cosmétiques en tant qu'agent hydratant, émollient, épaississant et stabilisateur d'émulsion. Ils constituent une source naturelle, importante, durable et bon marché pour le remplacement de certains ingrédients issus actuellement de l'industrie pétrochimique (Wang *et al.*, 2015b). Certains de ces polysaccharides sulfatés pourraient être utilisés en tant qu'anti-âge grâce à leurs propriétés antioxydantes (Bedoux *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015b).

#### En biotechnologies

L'agar est utilisé en microbiologie en tant que support de cultures bactériennes, il provient essentiellement du genre *Gelidium* (gélification à 34-35 °C) (McHugh, 2003). Lorsque les agars sont hautement purifiés il s'agit alors d'agarose, celle-ci est utilisée dans différentes techniques séparatives de biologie moléculaire (électrophorèse et chromatographie) (Cardozo *et al.*, 2007; Kraan, 2012).

### II.1.3.2. Santé humaine

Les polysaccharides algaux sont considérés comme des fibres alimentaires car ils ne peuvent pas être digérés par l'organisme humain, en effet celui-ci ne possède pas les enzymes digestives adaptées. Les polysaccharides hydrosolubles (agars et carraghénanes) permettent de réduire la glycémie et sont hypocholestérolémiants, tandis que les insolubles (cellulose, mannanes et xylanes) diminuent la durée du transit intestinal. Les macroalgues sont une très bonne source de fibres alimentaires puisqu'elles en contiennent de 33 à 50 %, avec une grande majorité de fibres hydrosolubles (Kraan, 2012; Lahaye, 1991; Mabeau et Fleurence, 1993).

Les agars et carraghénanes sont également utilisés par l'industrie pharmaceutique. Ainsi, les agars sont présents dans différents médicaments tels que des suppositoires, des laxatifs et des anticoagulants (Cardozo *et al.*, 2007). Les carraghénanes peuvent être utilisés dans la prévention et le traitement de certaines pathologies (rhumes, bronchites et toux chroniques) et sont utilisés depuis de nombreuses années pour ces propriétés (Kraan, 2012). Par exemple, les iota carraghénanes extraits de *Chondrus crispus* et contenus dans un spray nasal, aident à lutter contre le rhume et les virus qui en sont la cause en formant notamment une couche mince sur la muqueuse nasale (Ludwig *et al.*, 2013). Ce spray est commercialisé en France sous le nom de Surbronviral, le principe actif qu'il contient est le Carragelose<sup>®</sup>.

# II.1.3.3. Activités biologiques

Depuis plusieurs années des études se sont intéressées aux propriétés biologiques des polysaccharides sulfatés des macroalgues. Ces molécules présentent des activités biologiques nombreuses et variées pouvant faire l'objet d'applications thérapeutiques. D'après les données de la littérature, les polysaccharides sulfatés des macroalques possèdent différentes activités biologiques, telles que des activités antiproliférantes, anticoagulantes, antithrombotiques, antivirales, immunostimulantes, anti-inflammatoires, antioxydantes et anticholestérolémiantes (Costa et al., 2010; de Jesus Raposo et al., 2015; Jiao et al., 2011). En revanche, bien que leurs mécanismes d'action ne soient pas encore élucidés, il semblerait que leurs structures, leurs masses molaires et leurs degrés de sulfatation soient impliqués (Costa et al., 2010; de Jesus Raposo et al., 2015; Jiao et al., 2011). En effet, une étude réalisée sur des macroalques rouges et brunes a montré que les activités antioxydantes et anti-radicalaires augmentaient avec le degré de sulfatation (Rocha de Souza et al., 2007), il en est de même pour l'activité antiproliférante (Costa et al., 2010) et l'activité anticoagulante (Gómez-Ordóñez et al., 2014). Concernant les carraghénanes, les différentes propriétés biologiques recensées récemment sont des activités anti-inflammatoires, anticoagulantes, antithrombotiques, antivirales, anti-tumorales et antioxydantes (Prajapati et al., 2014).

### II.2. Les lipides

# II.2.1. Généralités

Les macroalgues rouges contiennent peu de lipides par rapport à leur teneur en polysaccharides. En effet, une étude a montré pour quatre macroalgues rouges collectées sur les côtes bretonnes des teneurs en lipides variant de 0,6 % (*Chondrus crispus*) à 3,4 % (*Porphyra umbilicalis*) du poids sec de l'algue (Fleurence *et al.*, 1994), mais des teneurs supérieures à 4 % ont déjà été décrites (Diniz *et al.*, 2011; Kendel *et al.*, 2013b). Elles contiennent, certes, moins de lipides que le soja (19 %), mais plus que certains légumes tels que la carotte (0,1 %) ou le piment (0,7 %) (Norziah et Ching, 2000).

Les acides gras peuvent être saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI). De façon générale, l'AGS majoritaire est l'acide palmitique (16:0) suivi par l'acide myristique (14:0) et le principal AGMI est l'acide oléique (18:1  $\omega$ 9)<sup>5</sup> (Fleurence *et al.*, 1994; Schmid *et al.*, 2014). Les macroalgues rouges sont riches en AGPI à 20 carbones du type

<sup>5</sup> Acide gras à 18 carbones, 1 double liaison placée en position 9

acide eicosapentaénoïque (EPA) (20:5  $\omega$ 3) et acide arachidonique (20:4  $\omega$ 6) qui peuvent représenter de 40 à 50 % des acides gras de l'algue (Kornprobst, 2005; Marfaing et Lerat, 2007). Une récente étude a démontré, qu'en fonction de l'algue, l'AGPI majoritaire peut être l'EPA (*Palmaria palmata* et *Ceramium virgatum*) ou l'acide arachidonique (*Gracilaria gracilis*) (Schmid *et al.*, 2014). *Palmaria palmata* est particulièrement intéressante par sa teneur la plus élevée en AGPI, soit près de 50 % des acides gras, contre 40 % pour les autres espèces étudiées. Parmi ces AGPI, l'EPA représente à lui seul 44 % des acides gras totaux soit en moyenne 0,5 % du poids sec de l'algue (Schmid *et al.*, 2014). Une telle teneur en EPA a déjà été décrite pour *Palmaria palmata* et pour *Porphyra umbilicalis*, avec respectivement 47 et 48 % des acides gras totaux soit 0,3 et 0,7 % du poids sec de l'algue (Fleurence *et al.*, 1994). *A contrario*, l'acide arachidonique est majoritaire pour *Gracilaria gracilis*, représentant selon la saison 16 à 48 % des acides gras, contre moins de 4 % pour l'EPA (Francavilla *et al.*, 2013).

Sur un plan quantitatif et qualitatif, les acides gras des macroalgues rouges varient avec la saison (Schmid *et al.*, 2014) et les paramètres environnementaux, tels que les nutriments, la salinité, la température et la luminosité (Kumari *et al.*, 2013).

#### II.2.2. Intérêts en santé humaine

La proportion élevée de ces AGPI  $\omega$ 6 et  $\omega$ 3 font des macroalgues rouges une source de lipides de haute qualité (Kumari *et al.*, 2013). Le ratio  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 est un indicateur de la qualité nutritionnelle des sources de lipides. En effet, son déséquilibre en faveur des acides gras  $\omega$ 6 serait en partie responsable de processus inflammatoires impliqués dans certaines maladies liées au style de vie (Mæhre *et al.*, 2014). À l'heure actuelle, dans les pays occidentaux ce ratio est fortement déséquilibré en faveur des  $\omega$ 6 (Mæhre *et al.*, 2014), c'est pourquoi les macroalgues avec un ratio  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 inférieur à 2 sont une bonne source d'acides gras  $\omega$ 3 (Kumari *et al.*, 2013; Schmid *et al.*, 2014). Par exemple, *Palmaria palmata* est une macroalgue rouge très intéressante car son ratio  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 est inférieur à 0,5 (Mæhre *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 2014).

De plus, les AGPI  $\omega$ 3 ont, dans leur ensemble, de nombreux effets bénéfiques pour la santé, en agissant contre certaines pathologies telles que l'arthrite, les troubles cardiovasculaires, la résistance à l'insuline (diabète), la dépression et certains cancers (Siriwardhana *et al.*, 2012). Ainsi, une alimentation plus riche en AGPI  $\omega$ 3 contribuerait à prévenir l'apparition de certaines de ces pathologies notamment les maladies cardiovasculaires et les cancers (Schmid *et al.*, 2014). De plus, la richesse en EPA de

• 21 •

certaines macroalgues rouges est d'autant plus intéressante que cet AGPI est nécessaire au bon développement fœtal, notamment du cerveau et de la rétine, et qu'il permet de diminuer le risque de maladies cardiovasculaires par son activité antioxydante et anti-inflammatoire (Swanson *et al.*, 2012).

# II.3. Les protéines

# II.3.1. Généralités

Les macroalgues rouges sont riches en protéines puisqu'elles représentent de 35 % (*Pyropia tenera*) à 45 % du poids sec de l'algue (*Palmaria palmata*), voire même jusqu'à 47 % (*Pyropia yezoensis*). Ces teneurs sont similaires à celles du soja, végétal connu pour sa richesse en protéines (35 % poids sec) (Conde *et al.*, 2013; Fleurence, 2004; Mabeau et Fleurence, 1993). À titre de comparaison, la teneur en protéines de la carotte est de 1,0 % et celle du brocoli de 4,1 % (Norziah et Ching, 2000). De plus, parmi les acides aminés constituant les protéines des macroalgues rouges, l'acide aspartique et l'acide glutamique ont été décrits comme les plus abondants chez différentes espèces (Dawczynski *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2011; Mæhre *et al.*, 2014; Wong et Cheung, 2000).

Cependant, cette teneur en protéines présente une forte variabilité saisonnière, pouvant aller par exemple de 9 à 25 % du poids sec de l'algue pour *Palmaria palmata*, les teneurs les plus faibles étant observées en été (Fleurence, 1999a). Cette variabilité saisonnière se traduit également au niveau de la composition en acides aminés (Fleurence, 2004; Galland-Irmouli *et al.*, 1999) ; elle pourrait être due à la variation de différents paramètres environnementaux (luminosité, température, salinité, *etc.*) (Conde *et al.*, 2013; Harnedy et FitzGerald, 2011).

### II.3.2. Intérêts nutritionnels

La qualité nutritionnelle des protéines peut être évaluée par le profil en acides aminés et par la teneur en acides aminés essentiels (AAE), acides aminés que l'homme ne peut pas synthétiser et qui doivent donc être apportés par l'alimentation. Certaines macroalgues rouges ont une composition en acides aminés proche de celle de l'ovalbumine (protéine de l'œuf servant de référence) et de légumineuses telles que le soja, elles ont donc une haute valeur nutritionnelle. C'est par exemple le cas de *Palmaria palmata* (Fleurence, 2004; Galland-Irmouli *et al.*, 1999), pour laquelle différentes études ont montré que cette algue rouge possède une composition protéique particulièrement intéressante avec un ratio

AAE/AAtotaux (%) d'en moyenne 35 ± 10 % (Fleurence, 2004; Galland-Irmouli *et al.*, 1999; Mæhre *et al.*, 2014), or ce ratio est de l'ordre de 47 % pour l'œuf et de 39 % pour le soja (Galland-Irmouli *et al.*, 1999). Un tel ratio a également été décrit chez d'autres macroalgues dont la macroalgue rouge *Vertebrata lanosa* (42 %) (Mæhre *et al.*, 2014). *Pyropia tenera* a, elle aussi, un profil en AAE proche de celui des légumineuses (Fleurence, 1999a) et de l'ovalbumine (Mabeau et Fleurence, 1993).

Cependant, même si les macroalgues rouges sont une bonne source de protéines pour l'alimentation humaine (Fleurence, 2004), des interactions entre protéines et polysaccharides réduisent considérablement leur digestibilité. En effet, l'être humain ne possède pas l'équipement enzymatique permettant de dégrader ces polysaccharides (Galland-Irmouli *et al.*, 1999), ceux-ci peuvent donc être qualifiés de facteurs anti-nutritionnels au même titre que certains inhibiteurs d'enzymes (Fleurence, 2004; Fleurence *et al.*, 2012). Néanmoins, la population japonaise semble posséder, dans sa flore intestinale, une bactérie qui synthétise des enzymes (porphyranases et agarases) capables de dégrader ces polysaccharides. Elle aurait acquis cette bactérie grâce à sa consommation traditionnelle d'algues telles que le Nori entrant dans la préparation des sushis (*Porphyra* spp.) (Hehemann *et al.*, 2010).

# II.4. Les pigments

Les pigments jouent un rôle indispensable dans la photosynthèse des végétaux terrestres et aquatiques. La photosynthèse a lieu dans les chloroplastes<sup>6</sup> au niveau de la membrane des thylakoïdes<sup>7</sup>. Elle est effectuée au sein de structures appelées photosystèmes (PS), il en existe deux types, PS I et PS II, qui sont composés de deux parties : une antenne collectrice qui absorbe les photons de la lumière et dont l'énergie est ensuite transmise au centre réactionnel, siège de différentes réactions. Les pigments contribuant à la photosynthèse des algues peuvent être divisés en trois grandes catégories : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines. Les phycobiliprotéines seront particulièrement détaillées car en lien direct avec ce travail de thèse.

# II.4.1. Les chlorophylles

Ce sont des pigments liposolubles à l'origine de la couleur verte des végétaux. La chlorophylle *a* est essentielle à la photosynthèse, elle est présente dans les antennes collectrices et dans les centres réactionnels. Elle intervient directement en captant une partie

<sup>6</sup> Organite cellulaire spécifique aux végétaux, il est impliqué dans la photosynthèse

<sup>7</sup> Système de membranes présent dans les chloroplastes et au niveau duquel sont présents les pigments impliqués dans la photosynthèse (directement ou indirectement)

de l'énergie lumineuse qu'elle transmet aux centres réactionnels, au niveau desquels des transferts d'électrons et différentes réactions permettent de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cette énergie servira alors à la synthèse de molécules organiques à partir de l'eau et du dioxyde de carbone. Il existe d'autres types de chlorophylles, qui ne sont pas impliquées directement dans la photosynthèse, mais qui contribuent à la collecte et au transfert des photons (antenne collectrice), parmi celles-ci la chlorophylle *d* serait retrouvée chez les Rhodophycées (Kornprobst, 2005; Lobban et Harrison, 1994).

# II.4.2. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments accessoires<sup>8</sup> liposolubles de couleur rouge-orangée voire jaune. Il s'agit des pigments les plus répandus dans la nature, aussi bien chez les algues, les plantes que les bactéries photosynthétiques (Kraan, 2013). Ils peuvent être divisés en deux catégories : les carotènes et les xanthophylles. Comme les chlorophylles, ils sont présents dans la membrane des thylakoïdes (Lobban et Harrison, 1994). Les algues rouges contiennent cependant peu de caroténoïdes, il s'agit d' $\alpha$  et de  $\beta$ -carotènes présents en proportions variables selon les espèces. Elles peuvent également posséder des xantophylles telles que la lutéine, la fucoxanthine et la zéaxanthine, la taraxanthine leur est cependant spécifique (Kornprobst, 2005). Chez les algues rouges, les caroténoïdes sont présents au niveau des centres réactionnels où ils jouent le rôle de protecteur en empêchant des réactions d'oxydation provoquées par l'exposition à la lumière (Kraan, 2013; Lobban et Harrison, 1994).

### II.4.3. Les phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines sont des pigments accessoires hydrosolubles, de nature protéique, et caractéristiques des Rhodophyta, Cyanophyta et Cryptophyta. Elles permettent d'élargir le spectre d'absorption de la chlorophylle *a* en absorbant à des longueurs d'onde complémentaires (Kraan, 2013; Lobban et Harrison, 1994).

<sup>8</sup> Pigments qui ne sont pas capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique

### II.4.3.1. Phycobilisome et phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines sont organisées au sein de structures particulières situées à la surface externe de la membrane des thylakoïdes : les phycobilisomes. Au sein du phycobilisome, différentes phycobiliprotéines sont présentes et organisées de façon spécifique : la phycoérythrine, la phycoérythrocyanine, la phycocyanine et l'allophycocyanine (Figure 6).



Figure 6 : représentation schématique de la structure du phycobilisome (Munier, 2013)

Les phycobiliprotéines transfèrent l'énergie lumineuse (photons) jusqu'au centre réactionnel où se situe la chlorophylle *a*. Cet assemblage de phycobiliprotéines, absorbant à des longueurs d'onde complémentaires, est très efficace puisqu'il permet de transférer la quasi-totalité de l'énergie lumineuse au centre réactionnel du photosystème II (> 95 %) (Glazer, 1989). Chez les Rhodophyta le phycobilisome a une structure globulaire, il est composé de bâtonnets organisés autour d'un domaine central constitué d'allophycocyanine, la cohésion de l'ensemble et la fixation à la membrane du thylakoïde est assurée par des polypeptides de liaison (Dumay *et al.*, 2014b).

Les phycobiliprotéines constitutives des bâtonnets varient d'une espèce d'algue à l'autre, mais l'organisation des bâtonnets en empilement de disques leur est commune. Chaque disque est en fait un trimère constitué de deux sous-unités qui constituent la partie protéique des phycobiliprotéines, leur taille varie selon l'espèce : la sous-unité α peut faire de 10 à 20 kDa et la sous-unité  $\beta$  entre 14 et 22 kDa. Ces deux sous-unités forment un monomère ( $\alpha\beta$ ), trois de ces monomères sont associés entre eux pour former un trimère ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> (un disque) et deux trimères sont associés pour donner l'hexamère ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> (Dumay *et al.*, 2014b; Munier, 2013) (Figure 7).



Figure 7 : organisation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  constituant les trimères et hexamères des phycobiliprotéines (Munier, 2013)

À chacune de ces sous-unités sont associés différents chromophores responsables de la couleur et des propriétés spectrales des phycobiliprotéines. Le Tableau II présente les quatre classes de phycobiliprotéines, les longueurs d'onde d'absorbance qui leur sont associées montrent bien la complémentarité de ces molécules.

Nom	Abréviation	Couleur	<b>Absorbance</b> λmax (nm)	
Allophycocyanine	APC	bleu-vert	650-660	
Phycocyanine	PC	bleu	610-625	
Phycoérythrocyanine	PEC	orange	560-600	
Phycoérythrine PE		rose-violet	490-570	

Tableau II : les quatre classes de phycobiliprotéines. D'après Munier, 2013

La phycoérythrine (PE) est la phycobiliprotéine majoritaire des Rhodophyta, elle est située aux extrémités des bâtonnets des phycobilisomes (Figure 6). Chez les macroalgues rouges, selon l'espèce considérée, elle est retrouvée sous deux formes : la B-phycoérythrine (B-PE) qui est spécifique à l'ordre des Bangiales et la R-phycoérythrine (R-PE) qui est plus largement répandue quel que soit l'ordre (Dumay *et al.*, 2014b).

II.4.3.2. La R-phycoérythrine

• Structure de la R-PE

La R-phycoérythrine (R-PE) possède deux types de chromophores responsables de ses propriétés spectrales : la Phycoérythrobiline (PEB) et la Phycourobiline (PUB) (Figure 8). Chaque chromophore est constitué d'une chaîne tétrapyrrolique, celle-ci est associée à la partie protéique du pigment par une liaison covalente au niveau d'un acide aminé particulier : la cystéine (Cys) (Dumay *et al.*, 2014b).



Figure 8 : structure chimique des chromophores de la R-phycoérythrine, PEB (phycoérythrobiline) et PUB (phycourobiline) (Munier, 2013)

Ces deux chromophores diffèrent par leur longueur d'onde d'absorption maximale, qui est comprise entre 530 et 565 nm pour la PEB et entre 490 et 498 nm pour la PUB (D'Agnolo *et al.*, 1994; Glazer, 1994). Ainsi, la R-PE présente deux pics maximum d'absorbance, à 540 et 565 nm, avec un épaulement à 498 nm. La R-PE a également des propriétés de fluorescence, son maximum d'émission de fluorescence est de 575 nm lorsqu'elle est excitée à 498 nm (Dumay *et al.*, 2014b) (Figure 9).



Figure 9 : spectre d'absorbance (en rose) et spectre de fluorescence (vert, excitation à 498 nm) caractéristiques de la R-PE (Munier, 2013)

La R-phycoérythrine présente en plus des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  une troisième sous-unité appelée  $\gamma$ , dont la taille est comprise entre 30 à 40 kDa (Jiang *et al.*, 1999; Senthilkumar *et al.*, 2013). Cette sous-unité est placée au centre de l'hexamère et contribue à augmenter la stabilité de la R-PE (Jiang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998), la R-PE a donc une structure en ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> $\gamma$ . La masse moléculaire de la R-PE est d'environ 240 kDa (Dumay *et al.*, 2014b; Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Senthilkumar *et al.*, 2013), mais il peut varier en fonction de l'espèce considérée (D'Agnolo *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2015c).

Ces trois sous-unités sont associées aux chromophores PEB et PUB comme indiqué dans la Figure 10. La sous-unité  $\alpha$  porte deux chromophores PEB, tandis que les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  ont à la fois le chromophore PUB et le chromophore PEB.



Figure 10 : structure de la R-phycoérythrine. Sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  associées à la phycoérythrobiline (PEB) et/ou à la phycourobiline (PUB) (Munier, 2013)

#### • Stabilité de la R-PE

La stabilité de ce pigment au pH, à la température et à la lumière a fait l'objet de plusieurs études. Les spectres d'absorbance et d'émission permettent notamment d'évaluer cette stabilité.

La R-PE est stable dans une large gamme de pH, de petites variations sont constatées selon les espèces considérées, comme indiqué dans le Tableau III. Un extrait de R-PE conserve sa couleur rose-rouge vif pour un pH compris entre 5 et 9 et prend une teinte violette pour des pH extrêmes (Orta-Ramirez *et al.*, 2000). Le pH modifie la conformation de la R-PE, celle-ci est agrégée en milieu acide, sous forme globulaire ou compactée en milieu relativement neutre, et dépliée pour des pH basiques (Ogawa *et al.*, 1991). Enfin, la R-PE peut maintenir ses propriétés spectrales sur une large gamme de pH, mais des modifications de sa structure (conformation tridimensionnelle) peuvent tout de même être observées. En effet, pour des pH extrêmes (< 3,5 et >10) il y aurait dissociation de l'hexamère en monomères avec une dénaturation partielle des sous-unités (Liu *et al.*, 2009).

Macroalgues	Gamme de pH	Références
Porphyra sp.	5 <b>-</b> 9	(Ogawa <i>et al.</i> , 1991)
Pyropia yezoensis	5 - 9	(Orta-Ramirez et al., 2000)
Polysiphonia urceolata	3,5 <b>-</b> 10	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
Palmaria palmata	3,5 <b>-</b> 9,5	(Galland-Irmouli <i>et al.</i> , 2000)
Grateloupia turuturu	3 - 10	(Munier <i>et al.</i> , 2014)

Tableau III : stabilité de la R-PE extraite de différentes espèces de macroalgues rouges, gamme de pH dans laquelle elle est stable

La R-PE est stable jusqu'à 40 °C voire 60 °C (Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Munier *et al.*, 2014), mais cette stabilité vis-à-vis de la température dépend aussi du pH. En effet, elle serait moins sensible à l'augmentation de la température pour des pH proches de la neutralité (entre 5 et 8) (Orta-Ramirez *et al.*, 2000).

Enfin, l'exposition à la lumière est un autre paramètre qui affecte sa stabilité, en effet à pH 7,1 après 48 heures d'exposition, la concentration en R-PE diminue de 70 % (Munier *et al.*, 2014).

• Variabilité saisonnière et géographique

Des études ont montré que la synthèse de la R-PE chez les macroalgues rouges est sujette à des variations géographiques (Munier *et al.*, 2013), mais aussi saisonnières. En effet, la R-PE est présente en quantité moins importante lorsque l'ensoleillement est intense (été) et inversement (Denis *et al.*, 2010; Francavilla *et al.*, 2013). Il a également été montré sur *Gracilaria lemaneiformis* que, plus l'algue est située en profondeur (de 0,5 à 3,5 mètres) plus elle synthétise de pigments photosynthétiques (phycoérythrine et chlorophylle *a*) pour compenser la faible luminosité (Xu et Gao, 2008)

• Extraction de la R-PE

Les méthodes d'extraction de la R-PE doivent prendre en compte les critères de stabilité précédemment évoqués. Dans la littérature, l'extraction de la R-PE est effectuée le plus souvent au tampon phosphate (pH 7 à 7,2 ; 20 à 50 mM), mais il existe des variations dans les prétraitements des algues. En effet, l'extraction de la R-PE peut s'effectuer à partir d'algues fraîches (Baghel *et al.*, 2015; Kravchenko *et al.*, 2013; Senthilkumar *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2009), d'algues soumises à un processus de congélation/décongélation (Liu *et al.*, 2009; Senthilkumar *et al.*, 2013), d'algues sèches (Orta-Ramirez *et al.*, 2000) ou encore d'algues lyophilisées et cryobroyées (Denis *et al.*, 2010; Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Munier *et al.*, 2014, 2015). Selon l'espèce d'algue et la technique d'extraction, la R-PE peut représenter jusqu'à 12,2 % des protéines totales de l'extrait (Galland-Irmouli *et al.*, 2000), 0,44 % de l'extrait sec (Munier *et al.*, 2014), 0,04 à 0,15 % de l'algue fraîche (Senthilkumar *et al.*, 2013) et de 0,30 % de l'algue sèche (Denis *et al.*, 2010).

L'extraction au tampon phosphate, sur algues lyophilisées et cryobroyées, est la plus fréquemment citée dans la littérature, mais ces prétraitements sont coûteux pour une transposition à l'échelle industrielle. Parmi les techniques d'extraction alternatives, l'hydrolyse enzymatique a déjà montré son intérêt (Dumay *et al.*, 2014b; Fleurence, 2003). Ce procédé sera développé dans la partie dédiée à cette technique (Chapitre I, IV.2. ).

#### II.4.4. <u>Propriétés et applications des phycobiliprotéines</u>

#### II.4.4.1. Colorants

Dans différentes industries (agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, textile,...) la demande de colorants d'origine naturelle ne cesse de croître, avec notamment 35 % d'augmentation entre 2005 et 2009 (Kraan, 2013). Parmi les phycobiliprotéines, la C-phycocyanine est principalement utilisée dans l'industrie agroalimentaire tandis que la R-PE est également retrouvée dans l'industrie cosmétique. Cependant leur utilisation reste limitée en raison de leur faible valeur tinctoriale et de la persistance limitée des colorations (Sekar et Chandramohan, 2008).

En tant que colorant alimentaire, elles sont retrouvées dans différentes denrées telles que des produits laitiers, glaces, gelées, boissons et chewing-gums (Sekar et Chandramohan, 2008). La phycoérythrine peut être incorporée pour donner une teinte rose-rouge, mais aussi pour apporter un effet visuel particulier grâce à sa fluorescence dans le jaune. Cette propriété peut être recherchée pour certains produits (bonbons, sodas,...), cependant le pigment n'est pas très stable dans les boissons alcoolisées. La phycocyanine est quant à elle incorporée dans des sodas et boissons alcoolisées, elle est très stable dans les produits secs (Dufossé *et al.*, 2005). À titre d'exemple, la société japonaise DIC LIFETEC CO. commercialise un colorant bleu, le Linablue<sup>®</sup>, extrait de la spiruline et contenant de la phycocyanine. Récemment, des études ont montré que la R-PE extraite de macroalgues rouges du genre *Gracilaria* peut être utilisée en temps que colorant dans des puddings (Sudhakar *et al.*, 2015) et des boissons gazeuses sucrées (Sudhakar *et al.*, 2014).

Ces propriétés colorantes sont également intéressantes en cosmétologie, la phycoérythrine peut être incorporée en tant que colorant rose-pourpre pour la formulation de maquillages (rouges à lèvres et eyeliners) et autres produits cosmétiques (Samarakoon et Jeon, 2012). Ce colorant naturel représenterait une alternative intéressante aux pigments synthétiques (Bedoux *et al.*, 2014).

### II.4.4.2. Biotechnologies : marqueurs fluorescents

Dès le début des années 1980, les phycobiliprotéines sont considérées comme une nouvelle classe de marqueurs fluorescents (Glazer, 1994). Certaines d'entre elles (APC et PE) ont une intensité de fluorescence bien supérieure (respectivement 7 à 14,5 fois plus) à celle de marqueurs fluorescents synthétiques courants (cyanine et fluorescéine) (Glazer, 1994). De plus, la phycoérythrine émet dans l'orange, zone spectrale où le bruit de fond est

faible, ce qui constitue un avantage certain (Dumay et al., 2014b; Fleurence, 2003). Les phycobiliprotéines sont donc utilisées pour le marquage et le tri cellulaire, en cytométrie en flux, en histochimie, en immunofluorescence (couplées à des anticorps) et en microscopie de fluorescence. Ainsi, les phycobiliprotéines et la phycoérythrine en particulier, ont contribué à plusieurs innovations dans ces domaines de pointe, il est par exemple possible d'effectuer trois à quatre marquages de couleurs différentes sur un même échantillon (Sekar et Chandramohan, 2008). Le développement de ces pigments est fortement encouragé par de potentielles applications dans les diagnostics de cancers et le suivi du VIH. Enfin, la phycoérythrine est un élément important en protéomique et génomique, dans la technologie dite des puces à ADN (DNA microarrays). En 2008, plus de 200 brevets ont été recensés pour des applications biotechnologiques des phycobiliprotéines (Sekar et Chandramohan, 2008). À titre d'exemple, parmi les produits et distributeurs présents sur ce marché peuvent être cités : PhycoLink<sup>®</sup> (PROzyme<sup>®</sup>), Flogen<sup>®</sup> (Febico) et Molecular Probes<sup>®</sup> (Life Technologies). Deux sociétés françaises produisent également des phycobiliprotéines : GREENSEA<sup>®</sup> (Figure 11) et Phyco-Biotech<sup>®</sup>. À titre indicatif, cette dernière produit un extrait de R-phycoérythrine (lyophilisée, Indice de pureté > 5) à partir de la macroalgue rouge Pyropia tenera, vendu 55 euros le mg.



Figure 11 : exemples d'extraits produits par la société GREENSEA<sup>®</sup>. De gauche à droite : allophycocyanine, R-phycocyanine et R-phycoérythrine. a. exposition à la lumière naturelle et b. émission de fluorescence (Greensea, 2015)

### II.4.4.3. Activités biologiques

Les phycobiliprotéines possèdent également des activités biologiques d'intérêt pour des applications thérapeutiques : activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, antitumorales, neuroprotectrices et hépatoprotectrices. En 2008, 17 brevets ont été recensés pour ces applications (Sekar et Chandramohan, 2008). L'activité antioxydante est particulièrement bien décrite. En effet, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont mis en avant les activités antioxydantes et anti-radicalaires des phycobiliprotéines, qui peuvent alors jouer un rôle dans la lutte contre les maladies liées au stress oxydant et au vieillissement

(diabète, cancers, arthrite, maladies cardiovasculaires...). Dans ce domaine, la recherche de molécules naturelles est en plein essor car elles n'ont pas ou peu d'effets indésirables (Sonani *et al.*, 2015). Ainsi, une récente étude a montré que les phycobiliprotéines extraites d'une cyanobactérie avaient des d'activités antioxydantes : la phycoérythrine piégeait les espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>9</sup>, tandis que la phycocyanine et l'allophycocyanine empêchaient aussi la formation de ces ROS. La phycoérythrine s'est également montrée efficace dans la lutte contre le vieillissement, d'après des tests *in vivo* effectués sur un nématode (Sonani *et al.*, 2014). Cependant, à ce jour, le ou les modes d'action des phycobiliprotéines pour cette activité anti-âge reste(nt) encore à élucider (Sonani *et al.*, 2015).

# II.5. Les minéraux et vitamines

### II.5.1. Minéraux

Les macroalgues sont dix à cent fois plus riches en minéraux que les végétaux supérieurs (Kraan, 2013). Or, les minéraux interviennent dans de nombreuses fonctions, allant de la minéralisation osseuse, à la régulation de la pression artérielle en passant par la lutte contre le stress oxydant (Mæhre *et al.*, 2014). La plupart des macroalgues ont des teneurs élevées en calcium, magnésium, phosphore, potassium, sodium et fer. Par exemple, les trois minéraux les plus retrouvés chez l'algue rouge *Palmaria palmata* sont le potassium (7 à 9 % du poids sec), le sodium (1,7 à 2,5 %) et le calcium (0,6 à 1,2 %) (Mabeau et Fleurence, 1993). De plus, par rapport aux végétaux supérieurs, les macroalgues contiennent de l'iode (Mabeau et Fleurence, 1993), celui-ci est nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes, mais un apport trop important peut être mauvais pour la santé (Kraan, 2013). Les macroalgues rouges contiennent de l'iode mais en faible quantité par rapport aux algues brunes. Par exemple, l'algue rouge *Palmaria palmata* en contiendrait moins de 0,1 % (poids sec) (Mabeau et Fleurence, 1993; Mæhre *et al.*, 2014; Marfaing et Lerat, 2007).

De nouveau, la composition en minéraux varie selon l'espèce et selon des facteurs environnementaux (Kraan, 2013; Mabeau et Fleurence, 1993). Une récente étude a décrit pour *Palmaria palmata* une teneur en minéraux de 42 % du poids sec contre seulement 29 % pour une autre macroalgue rouge *Vertebrata lanosa* (Mæhre *et al.*, 2014). D'après cette étude, chez ces deux macroalgues rouges les principaux minéraux diffèrent également.

<sup>9</sup> Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) sont des espèces radicalaires telles que des radicaux peroxydes (ROO<sup>+</sup>), anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et le radical hydroxyle (HO<sup>+</sup>)

Ainsi, *Palmaria palmata* contient deux fois moins de calcium que *Vertebrata lanosa* mais deux fois plus de phosphore, tandis que leur teneur en magnésium est proche. De plus, certaines macroalgues rouges dites calcaires (Lithothamne), sont particulièrement intéressantes du point de vue nutritionnel en raison de leur richesse en calcium et en magnésium, avec respectivement jusqu'à 34 et 3,3 % du poids sec (Marfaing et Lerat, 2007).

Cependant, la biodisponibilité de ces minéraux est réduite par certains polysaccharides, agars et carraghénanes notamment, qui ont une affinité particulière pour les cations tels que le calcium (Lahaye, 1991; Mabeau et Fleurence, 1993). Les algues sont riches en minéraux mais elles ont aussi la capacité de fixer certains métaux lourds (arsenic, cadmium, mercure,...), leur commercialisation doit donc respecter des teneurs maximales autorisées (Kraan, 2013).

### II.5.2. Vitamines

Les macroalgues sont une bonne source de vitamines hydrosolubles (B1, B2, B12 et C) et liposolubles (A, pro A, E, D et K), dont les teneurs varient selon les espèces et les paramètres environnementaux (Kraan, 2013). La présence de la vitamine B12 est particulièrement intéressante puisqu'elle est absente chez les végétaux terrestres (Kraan, 2013; Marfaing et Lerat, 2007). Elle est présente chez les macroalgues rouges, ainsi que la provitamine A (ou  $\beta$  carotène) et les vitamines B1 et B2 (Mabeau et Fleurence, 1993).

# III. Description du modèle d'étude : Grateloupia turuturu

#### III.1. Systématique et description

#### III.1.1. **Systématique**

Grateloupia turuturu est une macroalque rouge marine décrite pour la première fois en 1941 par Yamada (Yamada, 1941), d'où le nom de Grateloupia turuturu Yamada 1941. Cette algue est communément appelée la Grateloupe (Figure 12).

Grateloupia turuturu Yamada 1941				
Phylum	Rhodophyta	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		
Sous phylum	Eurhodophytina			
Classe	Florideophyceae			
Sous classe	Rhodymeniophycidae			
Ordre	Halymeniales			
Famille	Halymeniaceae			
Genre	Grateloupia	Figure 12 : photographie d'un thalle de <i>Grateloupia turuturu</i> dans son habitat naturel lors		
Espèce	Grateloupia turuturu	de la collecte effectuée au printemps 2014 à Batz-sur-Mer		

Batz-sur-Mei

Grateloupia turuturu est une macroalgue originaire du Japon. Son introduction en Europe date des années 1980 dans l'étang de Thau, par le biais de l'ostréiculture et de l'importation de naissains d'huîtres (Crassostrea gigas) (Verlaque et al., 2005). Elle s'est ensuite rapidement répandue en Bretagne dans les années 1990 (Plouguerné, 2006; Simon et al., 2001). Cette espèce, très polymorphe, a pendant plusieurs années été prise pour Grateloupia doryphora, originaire du Pérou (Simon et al., 2001; Villalard-Bohnsack et Harlin, 2001). Dans les années 2000, grâce au développement des outils de biologie moléculaire, il a été mis en avant que les populations présentes sur les côtes atlantiques européennes et américaines appartiennent à une seule et même espèce (Marston et Villalard-Bohnsack, 2002) : Grateloupia turuturu (Gavio et Fredericq, 2002). Enfin, d'après une communication orale lors du colloque annuel de la Société Phycologique de France, ces deux espèces pourraient être qualifiées d'espèces cryptiques<sup>10</sup> non-indigènes (Viard, 2014).

### III.1.2. Description

*Grateloupia turuturu* est une algue très polymorphe (Araújo *et al.*, 2011; D'Archino *et al.*, 2007; Stiger-Pouvreau et Thouzeau, 2015) (Figure 13), son thalle foliacé et dentelé peut être constitué d'une à plusieurs lames, peu épaisses, de texture douce et gélatineuse. Le thalle, de couleur rouge foncé à brunâtre, se dresse sur un stipe<sup>11</sup> court et possède un crampon<sup>12</sup> réduit (Munier, 2013; Plouguerné, 2006). Cependant, cette morphologie est très variable, comme observé sur différents sites de collecte de la côte portugaise (Araújo *et al.*, 2011) (Figure 13). Certains thalles possèdent une lame étroite à bords découpés avec quelques proliférations marginales, d'autres possèdent une lame très large, enfin certains peuvent être découpés en plusieurs lanières plus ou moins étroites (Plouguerné, 2006).



Figure 13 : spécimens de *Grateloupia turuturu* collectés sur les côtes portugaises, exemples de thalles présentant des morphologies différentes (Araújo *et al.*, 2011)

En Europe, les thalles font généralement entre 15 à 60 cm de long, mais un spécimen de 3 mètres de long a néanmoins été décrit en Bretagne, ce qui fait de *Grateloupia turuturu* une des algues rouges les plus grandes au monde (Simon *et al.*, 2001). Sur les côtes de Loire Atlantique, en fonction de la saison, la longueur et la largueur des thalles varient respectivement de 21 cm (Août) à 53 cm (Juin) et de 2 cm (Octobre) à 10 cm (Juin) (Denis *et al.*, 2010). L'aspect et l'épaisseur des thalles varient également selon la zone de collecte. Ainsi, pour deux zones géographiques proches, Le Croisic et Batz-sur-Mer, l'épaisseur du

<sup>10</sup> Espèces non distinguables d'un point de vue morphologique

<sup>11</sup> Partie du thalle située entre le crampon et la lame

<sup>12</sup> Organe de fixation présent chez certaines macroalgues

thalle est respectivement de 0,2 ou 0,1 mm, il est de couleur marron-verdâtre ou marronrouge et faiblement ou fortement visqueux. Ces différences peuvent notamment s'expliquer par les conditions environnementales (bathymétrie, hydrodynamisme et ensoleillement) (Munier, 2013; Munier *et al.*, 2013).

# III.2. Écologie et reproduction

*Grateloupia turuturu* se développe dans la zone de balancement des marées, partie du littoral où il y a alternance d'immersions et d'émersions. Elle est située entre la partie supérieure de la zone intertidale et le niveau moyen des basses mers de vive eau. Elle se développe principalement dans les cuvettes où l'eau subsiste à marée basse, que ce soit dans des zones abritées ou battues par le déferlement des vagues et de la houle. Elle se fixe alors aux différents substrats présents, qu'il s'agisse de rochers, cailloux ou coquillages fixes ou mobiles. Elle est capable de supporter de grandes variations de salinité et de température (Stiger-Pouvreau et Pagny, 2008). La Figure 14 présente des photographies de *Grateloupia turuturu* dans son environnement naturel lors de la collecte effectuée au printemps 2014 dans le cadre de ce travail de thèse.



Figure 14 : photographies de *Grateloupia turuturu* dans son habitat naturel lors de la collecte effectuée au printemps 2014, à Batz-sur-Mer.

Le cycle de développement de *Grateloupia turuturu* présente trois générations successives : le gamétophyte, le carposporophyte et le tétrasporophyte (Figure 15). Le gamétophyte produit les gamètes mâles ou femelles. Après fécondation, le gamétophyte femelle porte le carposporophyte, génération microscopique et parasite donnant au thalle un aspect granuleux. Celui-ci produit des carpospores, qui une fois libérés, vont donner des tétrasporophytes dont le thalle a un aspect peau d'orange. Les tétraspores formés seront ensuite libérés pour donner à leur tour des gamétophytes mâles et femelles (Plouguerné, 2006; Stiger-Pouvreau et Pagny, 2008).



Figure 15 : cycle de développement de Grateloupia turuturu (Simon-Colin, 2001)

## III.3. Distribution

Originaire du Japon, Grateloupia turuturu possède, à l'heure actuelle, une distribution à l'échelle mondiale (Figure 16). Ainsi, en France, elle est présente en Normandie (Lafontaine et al., 2011), en Bretagne (Gavio et Fredericg, 2002; Hellio et al., 2004; Plouguerné et al., 2008, 2006), en Loire-Atlantique (Denis et al., 2010; Kendel et al., 2013b; Munier et al., 2013) et en Méditerranée (Verlague et al., 2005). En Europe, elle est retrouvée en Irlande et Grande Bretagne (Hardy et Guiry, 2003), en Espagne (Figueroa et al., 2007), en Italie (Cecere et al., 2011) et au Portugal (Araújo et al., 2011; Rodrigues et al., 2015a). En Afrique, elle est retrouvée en Angola, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Liberia, Mauritanie, Namibie et au Sénégal (John, 2004). En Asie elle est présente sur les côtés coréennes (Kim et al., 2014), chinoises (Wang et al., 2012a; Yang et al., 2010) et bien sûr japonaises d'où elle est originaire (Gavio et Fredericq, 2002; Harada et al., 1997; Yamada, 1941). Grateloupia turuturu est aussi présente en Russie (Kozhenkova, 2009), en Nouvelle Zélande (D'Archino et al., 2007; Nelson, 2013) et en Tasmanie (Saunders et Withall, 2006). Différents travaux ont également rapporté sa présence en Amérique du Nord, en particulier sur la côte ouest des États-Unis (Janiak et Whitlatch, 2012; Mathieson et al., 2008; Villalard-Bohnsack et Harlin, 2001).



Figure 16 : distribution de *Grateloupia turuturu* indiquée en vert, en allant du plus clair au plus foncé selon l'importance de sa présence. ((Munier, 2013) d'après Guiry, 2013)

*Grateloupia turuturu* a une capacité d'adaptation, de fixation et de reproduction élevée (Stiger-Pouvreau et Pagny, 2008). Plusieurs vecteurs ont pu favoriser son introduction, l'aquaculture (importation de naissains d'huîtres par exemple), les eaux de ballastes et le commerce maritime international sont souvent mentionnés (D'Archino *et al.*, 2007; Saunders et Withall, 2006). De plus, la marée noire provoquée par le naufrage du navire pétrolier Erika, au large des côtes bretonnes en 1999, a facilité son développement en raison de la disparition de certains de ses prédateurs (oursins par exemple) (Barillé-Boyer *et al.*, 2004).

### III.4. Espèce invasive ou proliférante ?

Concernant la situation sur les côtes françaises, et plus particulièrement sur les côtes bretonnes et ligériennes, il semble que Grateloupia turuturu ne puisse pas être, à l'heure actuelle, qualifiée d'espèce invasive, mais plutôt de potentiellement invasive (Stiger-Pouvreau et Thouzeau, 2015). En effet, elle se répand et prolifère sur nos côtes, mais elle n'a pas d'impact écologique sur les autres espèces natives (Plouguerné, 2006; Stiger-Pouvreau et Pagny, 2008), le même constat ayant été fait pour l'étang de Thau (Verlague et al., 2005). Cependant, elle pourrait devenir invasive et représenter une menace potentielle pour d'autres espèces (Araújo et al., 2011), via la variation d'un ou de plusieurs paramètres environnementaux favorables à sa prolifération (Stiger-Pouvreau et Thouzeau, 2015). En 2011 en Italie, elle n'était pas encore considérée comme invasive et elle n'avait qu'un impact mineur sur les espèces natives, mais sa prolifération devait être surveillée (Cecere et al., 2011). Le gouvernement du Pays de Galles a, par exemple, fait réaliser en Juillet 2013 une étude de « surveillance » de la présence de Grateloupia turuturu dans un port et une marina voisine. Cette enquête a montré que Grateloupia turuturu n'est pas encore invasive mais qu'elle colonise de façon importante les pontons, bouées et autres structures flottantes, ce qui pourrait à terme avoir un impact économique sur les activités maritimes (Jennings et Wray, 2013).

Dans certaines régions du monde le terme « invasive » est employé, c'est le cas en Nouvelle Zélande (D'Archino *et al.*, 2007), Tasmanie (Saunders et Withall, 2006), et aux États-Unis dans le Golfe du Maine (Mathieson *et al.*, 2008) et dans la Baie de Narragansett sur l'Île-de-Rhodes (Harlin et Villalard-Bohnsack, 2001). La prolifération de *Grateloupia turuturu* pourrait, dans cette région, avoir des conséquences sur la flore et la faune native (Harlin et Villalard-Bohnsack, 2001; Janiak et Whitlatch, 2012; Mathieson *et al.*, 2008). Ainsi, différents documents sont mis à disposition du grand public pour qu'il contribue au suivi de l'invasion, par *Grateloupia turuturu*, du Golfe du Maine et de Long Island (Balcom, 2009; CRMC, 2015; Van Patten, 2006).

L'Union Européenne a également pris récemment des dispositions dans la lutte contre les espèces invasives non-indigènes appelées aussi exotiques. Ainsi, le Règlement Européen 1143/2014 portant sur les « espèces invasives exotiques » (végétales et animales, terrestres ou marines), publié au Journal Officiel en Novembre 2014 est entré en vigueur le 1<sup>er</sup> Janvier 2015. Un groupe de travail a été créé ainsi qu'une base de données dans laquelle *Grateloupia turuturu* est recensée (EASIN, 2015). De plus, depuis 2010, il existe un guide présentant les espèces invasives en Bretagne, le caractère proliférant de *Grateloupia turuturu* y est mentionné (GIP Bretagne Environnement, 2010).

# III.5. Composition biochimique

Le Laboratoire MMS étudie *Grateloupia turuturu* depuis plusieurs années, le Tableau IV présente certaines études ayant décrit sa composition biochimique pour différents sites de collecte appartenant à la même zone littorale. Dans ce travail de thèse les algues ont toujours été prélevées à Batz-sur-Mer.

La variabilité géographique de la composition biochimique de cette algue a été étudiée entre deux sites de prélèvements (Le Croisic et Batz-sur-Mer) situés dans la même zone littorale, en 2010 (Munier *et al.*, 2013) et en 2013 (Munier, 2013). Les résultats de cette étude (Tableau IV) montrent, pour ces deux années, des variations de la composition biochimique entre sites, qui peuvent être expliquées par les paramètres environnementaux (bathymétrie, hydrodynamisme et intensité lumineuse). Des variations ont également été observées pour un même site, entre 2010 et 2013, l'une des explications avancées est la différence d'ensoleillement entre ces deux années (Munier *et al.*, 2013).

Un suivi mensuel de la composition en sucres et protéines hydrosolubles de *Grateloupia turuturu* a été effectué au sein du laboratoire MMS. D'après cette étude, *Grateloupia turuturu* est plus riche en protéines hydrosolubles en Décembre et Janvier (9,5 et 9,3 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S respectivement) qu'en Mars ou Avril (4,2 et 4,4 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S respectivement). En revanche, la composition en sucres hydrosolubles n'est pas modifiée au cours de l'année (García-Bueno *et al.*, 2014). Une autre étude avait précédemment montré cette variation biochimique saisonnière, en terme de protéines totales (14,06 % Alg.S en Juillet-Août contre 27,50 % en Janvier-Février), de R-phycoérythrine (0,10 % en Août contre 0,52 % en Janvier), de fibres insolubles (8,99 Alg.S en Janvier-Février contre en 16,54 % Juillet-Août) et de cendres (16,16 % Alg.S en Janvier-Février contre 19,81 % en Septembre-Octobre). En revanche, les teneurs en matière sèche, en fibres solubles et en lipides totaux ne présentaient pas de variation. Néanmoins, le profil en acides gras variait quant à lui en

fonction de la saison. Ainsi, c'est en Février que la teneur en AGPI de *Grateloupia turuturu* était la plus élevée, notamment en EPA (C 20:5  $\omega$ 3) (Denis *et al.*, 2010). En 2013, l'absence de variation de la teneur en lipides totaux a été confirmée. En revanche, la teneur en AGPI représentait 20 % des acides gras en hiver et jusqu'à 31 % des acides gras en été. L'EPA était aussi l'AGPI majoritaire, toutes saisons confondues, avec une teneur maximale en été (16 % des AG), suivi par l'acide arachidonique également présent en plus grande proportion en été (11 % des AG). Le ratio moyen  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 déterminé pour *Grateloupia turuturu* était de 0,7, ce qui montre que cette algue est une source intéressante d'acides gras  $\omega$ 3 (Kendel *et al.*, 2013b).

	(Denis <i>et al.</i> , 2010)	(Munier e	et al., 2013)	(Muni	er, 2013)	(García-Bueno, 2015)
Site de collecte <i>Année</i>	Piriac-sur-Mer 2006	Le Croisic 2010	Batz-sur-Mer 2010	Le Croisic 2013	Batz-sur-Mer 2013	Batz-sur-Mer 2011-2012
Matière sèche	$9,5 \pm 0,2^{*}$	$12,8 \pm 0,7^{*}$	$6,5 \pm 0,1^{*}$	$14,5 \pm 0,8^{*}$	$9,7 \pm 1,5^{*}$	Nq
Cendres	$18,5 \pm 0,6$	$14,4 \pm 0,2$	$15,6 \pm 0,3$	29,7 ± 1,3	35,3 ± 0,4	$24,3 \pm 0,8$
Protéines totales	22,9 ± 2,0	$16,2 \pm 0,6$	21,8 ± 2	22,0 ± 0,3	27,4 ± 1,3	22,7 ± 2,7
Protéines hydrosolubles	Nq	$0,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	3,6 ± 0,3	Nq
R-PE	0,30 ± 0,03	0,12 ± 0,03	$0,44 \pm 0,02$	0,30 ± 0,01	$0,41 \pm 0,01$	Nq
Sucres hydrosolubles	Nq	$1,6 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	5,4 ± 0,7	$7,0 \pm 0,4$	Entre 1,0 et 1,5
Fibres alimentaires totales	60,4 ± 2,3	Nq	Nq	Nq	Nq	Nq
Lipides totaux	$2,6 \pm 0,1$	2,8 ± 0,5	$5,4 \pm 0,2$	2,7 ± 0,1	$4,4 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$

Tableau IV : composition biochimique de *Grateloupia turuturu*, synthèse de différentes études

Valeurs exprimées en % par rapport à la matière sèche de l'algue, sauf pour <sup>\*</sup>avec des valeurs exprimées en pourcentage de matière fraîche Nq : non quantifié

À l'heure actuelle, peu de travaux se sont attachés à la caractérisation des polysaccharides pariétaux de Grateloupia turuturu. Au laboratoire MMS, une précédente étude a démontré la présence d'agar, de cellulose, et de iota et kappa carraghénanes, via l'hydrolyse enzymatique de Grateloupia turuturu par des carraghénases, une agarase et une cellulase (Denis et al., 2009d). Dès 1977, il a été mis en avant, chez Grateloupia lanceola, la présence de polysaccharides de structure hybride entre agars et carraghénanes (Baeza et Matsuhiro, 1977), une telle structure hybride a ensuite été décrite chez Grateloupia indica (Sen et al., 2002). Une récente étude vient de confirmer, par des techniques de spectroscopie, la présence chez Grateloupia turuturu de polysaccharides hybrides agarcarraghénane (Rodrigues et al., 2015a). Le caractère hybride des polysaccharides de Grateloupia est également retrouvé pour les carraghénanes, avec des hybrides de kappaiota carraghénanes décrits chez Grateloupia indica ainsi que dans d'autres espèces de macroalques rouges (van de Velde et al., 2005; Wang et al., 2012b; Yang et al., 2011). Cependant, il faut rester prudent dans les comparaisons entre espèces car, au sein même du genre Grateloupia, il peut y avoir des polysaccharides de structures différentes avec notamment des variations en fonction du stade de développement et des conditions environnementales (Miller, 2005).

# III.6. Composés d'intérêt et potentielles voies de valorisation

Le Tableau V dresse une liste non exhaustive des études portant sur les différents composés d'intérêts décrits chez *Grateloupia turuturu* mais aussi chez d'autres espèces du genre *Grateloupia*. Les voies de valorisation associées à ces composées sont également indiquées. Cette liste a pour objectif de montrer le large panel d'activités potentielles et les voies de valorisation possibles, sachant que cette algue n'est pas autorisée à l'heure actuelle en Europe en alimentation humaine. Ainsi, *Grateloupia turuturu* et d'autres espèces de ce genre, présentent un potentiel de valorisation allant de l'activité anti-biofouling<sup>13</sup> à des applications pour la santé humaine. Certaines molécules pourraient servir de marqueurs dans l'identification de *Grateloupia turuturu* parmi les autres espèces du genre *Grateloupia* (Plouguerné *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Par exemple, les MAAs<sup>14</sup> présentes chez *Grateloupia lanceola* diffèrent de celles trouvées chez *Grateloupia turuturu*. Ainsi, *Grateloupia lanceola* possède essentiellement porphyra-334 tandis que *Grateloupia turuturu* contient essentiellement de la shinorine (Figueroa *et al.*, 2007).

<sup>13</sup> revêtement, peinture, traitement de surface ou dispositif utilisé sur un navire pour contrôler ou empêcher le dépôt d'organismes indésirables (bactéries, champignons, microalgues), ou anti-biosalissures

<sup>14</sup> Mycosporine like amino acids, petites molécules (Mw < 400 g.mol<sup>-1</sup>) présentes chez divers organismes, elles ont un rôle de protection contre les UV et un rôle d'antioxydant
## Tableau V : exemples de composés isolés ou de propriétés biologiques attribuées à Grateloupia turuturu ou au genre Grateloupia

	Noms d'espèce	Composé(s) bioactif(s) isolés	Propriété(s)	Référence(s)
Anti-biofouling	Grateloupia turuturu	Cholest-5-en-3-ol formate (ou cholesteryl formate) activité antibactérienne démontrée	Anti-biofouling	(Plouguerné <i>et al.</i> , 2008) (Plouguerné <i>et al.</i> , 2006)) (Plouguerné, 2006)
	Grateloupia turuturu	Floridoside et acide iséthionique	Anti-biofouling (bernacles)	(Hellio <i>et al.</i> , 2004)
Aquaculture	Grateloupia turuturu	Facteurs nutritionnels	Alimentation pour ormeaux (seule ou avec Palmaria palmata)	(Mulvaney <i>et al.</i> , 2013)
	Grateloupia turuturu	Non identifiés mais présence de floridoside, d'acide iséthionique et de N- méthyl-L-méthionine sulfoxide	Antibactérienne in vivo et in vitro (Vibrio harveyi)	(García-Bueno <i>et al.</i> , 2014)
Agroalimentaire & cosmétique	Grateloupia turuturu	R-phycoérythrine (R-PE)	Colorant Marqueur fluorescent	(Denis <i>et al.</i> , 2010) (Denis <i>et al.</i> , 2009c) (Munier <i>et al.</i> , 2014) (Munier <i>et al.</i> , 2015)
	Grateloupia doryphora	MAAs (3-4 mg.g <sup>-1</sup> sec): shinorine, palythine, mycosporine-glycine Anti-UV		(Huovinen <i>et al.</i> , 2004)
	Grateloupia lanceola	MAAs : Porphyra-334 (1-3 mg.g $^{-1}$ sec), Mycosporine-glycine et Palythine	Anti-UV	(Huovinen et al., 2006)
	Grateloupia lanceola Grateloupia turuturu	MAAs spécifiques à l'espèce	Anti-UV	(Figueroa <i>et al.</i> , 2007)
Santé	Grateloupia turuturu	Certains glycolipides (monogalactosyl diglycérols)	Antiproliférative	(Kendel, 2012)
	Grateloupia elliptica	Bromophénols (2,4,6-tribromophénol et 2,4-dibromophénol)	Antidiabétique (inhibition de l' $\alpha$ glucosidase)	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	Grateloupia lithophila	Non identifiés	Antibactérienne (souches résistantes aux traitements)	(Manikandan <i>et al.</i> , 2011)
	Grateloupia lanceolata	Non identifiés	Activité antioxydante et anti-adipogénèse (diminution des risques liés à l'obésité)	(Lee et al., 2011)
	Grateloupia indica	Polysaccharide sulfaté Antivirale (anti-herpétique		(Chattopadhyay et al., 2007)
	Grateloupia indica	Polysaccharide sulfaté hybride agar-carraghénane	haride sulfaté hybride agar-carraghénane Anticoagulante	
	Grateloupia livida	Non identifiés précisément (acides gras, stérols, esters d'acides organiques)	Anti-oxydante, anti-bactérienne large spectre et anti-parasitaire (schistosome)	(Jiang <i>et al.</i> , 2013)
	Grateloupia doryphora	Acide iséthionique N-méthyl-L-méthionine sulfoxide	Non identifiée	(Simon-Colin et al., 2002)
	Grateloupia turuturu	7 sesquiterpénoïdes cholestérol (cholest- 5-en-3-ol)	Non identifiée	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
	Grateloupia turuturu	Plusieurs acides gras insaturés originaux chez les algues	Non identifiée	(Kendel <i>et al</i> ., 2013a)

## IV. Les procédés d'extraction et les algues

## IV.1. Des procédés conventionnels au développement de procédés innovants

Les procédés d'extraction nécessitent, dans la plupart des cas, des étapes préliminaires à l'extraction proprement dite, ces prétraitements de la biomasse favorisant l'extraction des composés recherchés. Il peut s'agir d'étapes de rinçage(s), de tri, d'élimination du sable, du sel et autres particules (coquillages, épiphytes<sup>15</sup>,...). Le plus souvent, une étape de séchage est ensuite réalisée, soit à basse température (environ 35 °C) soit par lyophilisation, ce qui est préférable pour la préservation des composés sensibles. Ensuite, les algues sont souvent broyées pour augmenter la surface de contact entre les particules et le solvant et maximiser ainsi la diffusion des molécules dans ce solvant (Kadam *et al.*, 2013; Michalak et Chojnacka, 2014).

Les prétraitements peuvent parfois être plus poussés afin de maximiser le rendement d'extraction du procédé appliqué par la suite. Ainsi, des méthodes enzymatiques, chimiques ou encore mécaniques et physiques peuvent être utilisées pour induire la destruction cellulaire de la biomasse. Les molécules d'intérêt seront alors plus facilement accessibles lors de l'extraction. Parfois, ces prétraitements sont indispensables pour la faisabilité du procédé d'extraction, par exemple un broyage mécanique pour permettre la circulation d'un produit dans un système d'extraction (Michalak et Chojnacka, 2014).

## IV.1.1. Les algues et les nouvelles techniques d'extraction

Les composés bioactifs d'origine algale sont extraits principalement par des techniques conventionnelles, utilisant soit des solvants (extraction solide-liquide) soit une hydrolyse acide, neutre, ou basique, ou encore une hydrolyse par traitement hydrothermique (eau chaude). Traditionnellement, les techniques employées sont des extractions solide-liquide, liquide-liquide, par macération ou utilisant un extracteur tel que le Soxhlet. Ces méthodes d'extraction font souvent appel à des solvants organiques, or la tendance actuelle est à la réduction de l'utilisation de ces solvants. Elles sont également peu sélectives et peu reproductibles avec des rendements d'extraction souvent faibles (Kadam *et al.*, 2013; Michalak et Chojnacka, 2014). De nos jours, l'extraction au Soxhlet par solvant reste une des techniques les plus simples et déjà appliquée à l'échelle industrielle, mais les extractions sont longues et nécessitent de grandes quantités de solvant (Michalak et Chojnacka, 2014;

<sup>15</sup> Organisme animal ou végétal fixé, vivant sur une algue ou sur une plante

Wang et Weller, 2006).

Depuis quelques années, la demande de nouveaux produits issus des algues augmente, ce qui nécessite d'améliorer et de développer des technologies d'extraction innovantes. En effet, les macroalgues, en raison de la présence importante de polysaccharides qui compliquent l'extraction de leurs métabolites, représentent une biomasse d'intérêt suscitant le développement de nouvelles techniques d'extraction. Les attentes relatives à ces techniques innovantes sont nombreuses et concernent (Michalak et Chojnacka, 2014) :

- la rentabilité du procédé
- la rapidité d'extraction
- · la minimisation de l'impact environnemental et énergétique
- · l'augmentation des rendements d'extraction des composés ciblés
- · la préservation des co-produits d'extraction
- l'optimisation du procédé dans sa globalité (capacité de charge, température, étapes de séparation,...)
- la faisabilité du changement d'échelle (« scale-up »)

Parmi ces techniques innovantes, certaines sont déjà développées depuis plusieurs années et représentent une alternative intéressante aux méthodes conventionnelles pour l'extraction de molécules algales : l'extraction assistée par enzyme (EAE<sup>16</sup>), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE<sup>17</sup>), l'extraction assistée par ultrasons (UAE<sup>18</sup>), l'extraction aux fluides supercritiques (SFE<sup>19</sup>) et l'extraction liquide sous pression (PLE<sup>20</sup>). Ces techniques ont déjà montré leur intérêt pour l'extraction de différents composés de micro et de macroalgues tels que des acides gras, pigments, polysaccharides, vitamines, antioxydants et composés phénoliques (Castro-Puyana *et al.*, 2013; Meireles, 2013; Michalak et Chojnacka, 2014; Morais, 2013). Le Tableau VI présente ces cinq techniques avec leur principe général, leurs avantages et leurs inconvénients par rapport aux techniques conventionnelles. Deux de ces procédés d'extraction seront évoqués plus en détail par la suite, l'étude de ces deux procédés étant au cœur de ce travail de thèse.

<sup>16</sup> Enzyme-assisted extraction

<sup>17</sup> Microwave-assisted extraction

<sup>18</sup> Ultrasound-assisted extraction

<sup>19</sup> Supercritical fluid extraction

<sup>20</sup> Pressurized liquid extraction

Tableau VI : les algues et les techniques d'extraction innovantes. Principes généraux, avantage(s) et inconvénient(s) par rapport aux techniques d'extraction conventionnelles. D'après Kadam *et al.*, 2013; Michalak et Chojnacka, 2014. Les notions de coût et de rentabilité dépendent de l'équipement utilisé et de la valeur ajoutée des composés extraits.

	Principes généraux	Avantage(s)	Inconvénient(s)
• EAE Extraction assistée par hydrolyse enzymatique	<ul> <li>Enzymes dégradant la paroi des algues (polysaccharidases et/ou protéases)</li> <li>pH et températures optimum</li> </ul>	<ul> <li>Rendements élevés</li> <li>Action ciblée des enzymes : sélectivité</li> <li>Enzymes industrielles</li> <li>Enzymes de grade alimentaire utilisables</li> <li>Préservation des composés d'intérêt</li> <li>↓ la consommation de solvants</li> <li>Coûts relativement modérés</li> <li>Transposable à plus grande échelle</li> <li>Libération des composés hydro et liposolubles</li> </ul>	<ul> <li>Pas d'enzymes commerciales spécifiques à la paroi des algues</li> <li>Coût des enzymes, selon le type d'enzymes</li> </ul>
• MAE Extraction assistée par micro-ondes	<ul> <li>Ondes électromagnétiques (de 300 MHz à 300 GHz)</li> <li>Vibration des molécules d'eau</li> <li>température intracellulaire, t pression et destruction cellulaire</li> <li>Rupture des liaisons hydrogènes</li> <li>porosité des parois de l'algue</li> <li>les transferts de matière</li> </ul>	<ul> <li>Simple et rapide</li> <li>↓ la consommation de solvants</li> <li>↑ rendements d'extraction</li> <li>Rentabilité &gt; SFE</li> </ul>	<ul> <li>Non applicable aux composés thermo-sensibles</li> <li>Ajout d'une étape de séparation pour éliminer les particules solides</li> <li>Consommation énergétique</li> </ul>
• UAE Extraction assistée par Ultrasons	<ul> <li>Ondes ultrasonores (&gt; 20 kHz)</li> <li>Implosion de bulles de cavitation</li> <li>Forces de cisaillement</li> <li>Destruction cellulaire</li> <li>Rupture des parois de l'algue</li> <li>Homogénéisation du milieu, ↑ les transferts de matière</li> </ul>	<ul> <li>Simple</li> <li>accélère les cinétiques d'extraction</li> <li>↓ coûts</li> <li>Rentable</li> <li>↑ rendements d'extraction</li> <li>↓ la consommation de solvants</li> <li>Adaptée aux composés thermosensibles (dommages modérés)</li> <li>Coût des équipements relativement faible</li> <li>Appliquée à échelle industrielle</li> <li>Couplage possible avec d'autres techniques</li> </ul>	<ul> <li>Sondes et bains à ultrasons : propagation non-homogène et dissipation des ondes</li> <li>Consommation énergétique</li> </ul>
• SFE Extraction aux Fluides Supercritiques	<ul> <li>Fluide supercritique (CO₂ le plus souvent)</li> <li>Température et pression critiques</li> <li>Fluide à faible viscosité et diffusion élevée</li> <li>↑ les transferts de matière</li> </ul>	<ul> <li>↓ la consommation de solvants</li> <li>Rapidité</li> <li>↑ rendements d'extraction</li> <li>Sélectivité du CO<sub>2</sub></li> <li>Appliquée à échelle industrielle</li> </ul>	<ul> <li>Coûts d'investissement élevés</li> <li>Utilisation limitée à l'extraction de certains composés (faible polarité du CO<sub>2</sub>)</li> </ul>
• PLE Extraction liquide sous pression	<ul> <li>Températures (50 – 200 °C) et pressions élevées (3,5 – 20 MPa)</li> <li>Température des solvants &gt; à leur point d'ébullition</li> <li>1 température =&gt; 1 solubilité et↓ de la viscosité des solvants</li> <li>1 les transferts de matière</li> </ul>	<ul> <li>- la consommation de solvants</li> <li>- Large gamme de solvants possible (&gt; SFE)</li> <li>- Rapidité</li> <li>- Possibilité de remplacer les solvants organiques par de l'eau (eau subcritique)</li> </ul>	<ul> <li>Non applicable aux composés sensibles aux hautes températures et pressions</li> <li>Sélectivité &lt; SFE</li> <li>À développer pour l'échelle industrielle</li> </ul>

Le choix de la méthode la plus appropriée devra se faire en fonction de la macroalgue, des composés ciblés et du domaine d'utilisation de l'extrait. Par exemple, pour l'extraction de polysaccharides de macroalgues brunes, l'UAE, la MAE et l'EAE peuvent être appliquées (Hahn *et al.*, 2012). Cependant, le transfert à l'échelle industrielle de ces technologies innovantes est encore restreint, et des développements sont nécessaires pour permettre leur utilisation dans différents secteurs. De plus, ces procédés sont plus complexes, ils nécessitent donc un investissement plus élevé que les méthodes conventionnelles (Michalak et Chojnacka, 2014; Wang et Weller, 2006).

Ces différentes technologies peuvent parfois être combinées entre elles ou à des technologies conventionnelles, de manière séquentielle ou simultanée. Les ultrasons, notamment, constituent une technologie qui peut être aisément associée à d'autres procédés (Shirsath et al., 2012). Ainsi, l'extraction assistée par micro-ondes est parfois combinée aux ultrasons, ce qui permet de réduire les coûts et les durées d'extraction tout en augmentant les rendements (Kadam et al., 2013; Michalak et Chojnacka, 2014). L'utilisation simultanée MAE-UAE a ainsi montré son potentiel pour l'extraction d'huile de microalgues (Cravotto et al., 2008), de même, un prétraitement aux ultrasons permet d'augmenter l'efficacité de l'extraction par micro-ondes (MAE) de la pectine du raisin (Bagherian et al., 2011). Les ultrasons peuvent aussi être associés à l'extraction aux fluides supercritiques (UAE-SFE) (Kadam et al., 2013), comme cela a été décrit pour l'extraction d'isoflavones<sup>21</sup> de macroalques (ultrasons en prétraitement) (Klejdus et al., 2010). Parfois, plusieurs de ces procédés peuvent se trouver associés pour la valorisation de certaines biomasses, notamment les biomasses lignocellulosiques. Ainsi, une récente étude portant sur la bagasse de la canne à sucre, a montré que l'extraction de sucres fermentescibles par hydrolyse enzymatique (EAE) est améliorée lorsque le prétraitement de la biomasse combine UAE et SFE, plutôt que la SFE seule (Benazzi et al., 2013). Cependant, dans certains cas, la combinaison de ces procédés peut ne pas présenter d'intérêt. Ainsi, une étude a montré qu'un prétraitement de la macroalgue brune Sargassum muticum, par hydrolyse enzymatique (polysaccharidases ou protéases), n'améliorait pas l'extraction des composés phénoliques par rapport à la PLE seule (Sánchez-Camargo et al., 2016). Une autre étude, sur la balle de riz, vient de montrer que l'extraction des sucres fermentescibles n'était pas améliorée par le couplage simultané de l'hydrolyse enzymatique et des ultrasons (EAE-UAE) ou du CO<sub>2</sub> supercritique (EAE-SFE) (Moscon et al., 2014). De plus, les coûts supplémentaires engendrés par un deuxième procédé peuvent ne pas être compensés par l'augmentation du rendement d'extraction du composé ciblé. Par exemple, pour l'extraction

<sup>21</sup> Molécules présentes chez toutes les plantes, elles constituent une sous-famille des flavonoïdes qui est très étudiée pour leurs propriétés pseudo-æstogéniques (phytohormones)

de la lutéine de microalgues, il est économiquement préférable de ne pas ajouter une étape d'hydrolyse enzymatique à la sonication (Deenu *et al.*, 2013).

#### IV.1.2. Procédés et bioraffinerie de macroalgues

Le développement de différentes techniques d'extraction a permis depuis plusieurs années l'essor du concept de bioraffinerie appliqué à différentes biomasses végétales. Différentes définitions de ce concept existent, parmi lesquelles : « *bio-industries intégrées, mettant en œuvre différentes technologies pour fabriquer des produits chimiques, des biocarburants, des produits alimentaires pour l'homme et les animaux, des biomatériaux (y compris des fibres) et de l'énergie à partir de matières premières de la biomasse ». Le terme de bioraffinage est également associé à ce concept, et peut être défini comme « la séquence d'étapes permettant d'obtenir des molécules ou des matériaux à partir d'une biomasse brute. Il comporte des opérations de prétraitement et de fragmentation de la biomasse, puis celles de conversions et transformations successives, par des procédés biotechnologiques ou chimiques » (De Cherisey, 2010).* 

Les algues, notamment les macroalgues, se prêtent bien à une approche de type bioraffinerie (teneur élevée en matière carbonée et autres molécules d'intérêt), mais elles restent jusqu'à présent sous exploitées (Jung et al., 2013). L'industrie des phycocolloïdes a, certes, favorisé le développement de la culture des macroalgues rouges (Chapitre I, I.1.1.) mais seuls les polysaccharides sulfatés sont extraits. En effet, à l'heure actuelle, cette industrie ne valorise pas les nombreuses autres molécules d'intérêt, qui représentent pourtant une source non négligeable de bénéfices supplémentaires (Baghel et al., 2014). Ces dernières années des études se sont donc intéressées à ce sujet. Ainsi, en 2013, il a été fait mention de la production conjointe de bioéthanol et d'agar à partir de Gracilaria verrucosa (Kumar et al., 2013). Puis, en 2014, une étude a montré qu'il était possible de valoriser les résidus obtenus après extraction des kappa carraghénanes, pour la production de bioéthanol (Tan et Lee, 2014). De plus, une étude a récemment démontré la faisabilité d'une approche de bioraffinerie pour les macroalgues rouges, en l'appliquant à trois espèces d'agarophytes (Gelidiella acerosa, Gelidium pusillum et Gracilaria dura) (Baghel et al., 2015). Grâce à une succession de techniques d'extraction douces, la production de bioéthanol a pu être associée à l'extraction de différentes molécules à haute valeur ajoutée (R-PE, R-PC, lipides, minéraux, agar et cellulose), valorisables dans des secteurs allant du domaine pharmaceutique à l'agroalimentaire en passant par les biotechnologies (Baghel et al., 2015). La Figure 17 illustre le potentiel des macroalgues rouges par cette approche de bioraffinerie. Sur un plan économique, un procédé intégré tel que celui proposé par Baghel et al. permettrait de compenser le coût de production du bioéthanol par la co-extraction de molécules à haute valeur ajoutée (Baghel *et al.*, 2014, 2015).



Figure 17 : le concept de bioraffinerie appliqué aux macroalgues rouges, différentes voies de valorisation possibles (Baghel *et al.*, 2015)

## IV.2. Extraction assistée par hydrolyse enzymatique

## IV.2.1. Généralités sur les enzymes

## IV.2.1.1. Définition

Les enzymes sont des protéines globulaires hautement spécifiques, aussi bien du substrat que du type de réaction qu'elles catalysent. Le site actif correspond à la région de l'enzyme sur laquelle se fixe le ou les substrat(s) pour former le complexe enzyme-substrat ES (Mouranche et Costes, 1985; Sine, 2010). La reconnaissance enzyme-substrat et la réaction enzymatique peuvent être schématisées de façon simplifiée comme illustré dans la Figure 18.



Figure 18 : schématisation de la réaction enzymatique. E (enzyme), S (substrat) et P (produit)

La notion d'activité enzymatique nécessite une unité permettant de la quantifier. Ainsi, l'activité enzymatique, exprimée en unité internationale (UI), est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la libération d'une micromole de produit (P) ou la disparition d'une micromole de substrat (S) (si la réaction est stœchiométrique) par minute (µmol.min<sup>-1</sup>) (Sine, 2010).

### IV.2.1.2. Classification

La classification et la nomenclature des enzymes se basent sur trois grands principes : le nom de l'enzyme se termine par le suffixe « -ase » (sauf pour les systèmes multienzymatiques), le type de réaction catalysée et son code à plusieurs chiffres (EC pour Enzyme Classification number), attribué par la Commission des Enzymes afin de faciliter son identification (Sine, 2010). Cette classification a vu le jour en 1961, les enzymes sont ainsi réparties en six classes correspondant aux types de réaction qu'elles catalysent : les oxydoréductases (EC 1), les transférases (EC 2), les hydrolases (EC 3), les lyases (EC 4), les isomérases (EC 5) et les ligases (EC 6). Le deuxième chiffre correspond à la sous-classe et précise le type de groupement chimique ou de liaison concernée, le troisième chiffre correspond à la sous-sous-classe et détermine la nature précise des groupements chimiques en jeu ou les mécanismes réactionnels (s'ils sont connus), enfin, le quatrième chiffre est le numéro d'ordre d'enregistrement de l'enzyme dans la sous-sous-classe concernée (Mouranche et Costes, 1985; Sine, 2010). Par exemple, une cellulase possède le code EC 3.2.1.4, il s'agit d'une hydrolase (EC 3) (clivage de liaisons de type C-C, C-N, C-O,...) appartenant à la sous-classe des glycosylases (EC 3.2) et à la sous-sous classe des glycosidases (EC 3.2.1), c'est à dire qu'elle clive les liaisons glycosidiques, enfin il s'agit de la 4<sup>ème</sup> enzyme référencée dans les glycosidases (EC 3.2.1.4).

Des bases de données répertoriant les enzymes sont disponibles en ligne, par exemple la base de données généraliste ExplorEnz – The Enzyme Database, créée en 2005 par l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) compte à l'heure actuelle 6510 enzymes. Dans ce travail de thèse, les enzymes utilisées sont des hydrolases (EC 3) appartenant à la sous-classe des glycosylases (EC 3.2) et à la sous-sous-classe des glycosidases. À l'heure actuelle, 1682 enzymes sont référencées dans la classe des hydrolases (EC 3) (ExplorEnz, 2015). La base de données CAZy, créée en 1998, est un autre exemple de base. Elle est spécifique aux enzymes catalysant la dégradation, la modification ou la création de liaisons glycosidiques. Dans cette base, les enzymes sont classées différemment mais le code EC leur est toujours associé pour plus de lisibilité (CAZy, 2015).

## IV.2.1.3. Facteurs physicochimiques et réactions enzymatiques

Parmi les facteurs physicochimiques pouvant influencer les réactions enzymatiques, la température et le pH sont particulièrement importants.

La température est un paramètre essentiel pour l'activation des enzymes. En effet, l'augmentation de la température permet d'augmenter la vitesse des réactions enzymatiques en facilitant les réactions enzyme(s)-substrat(s). Cependant, les enzymes sont des macromolécules qui peuvent être dénaturées si l'élévation de la température est trop importante, provoquant une perte irréversible, partielle ou totale de leur activité. Il s'agit alors d'une inactivation par dénaturation thermique, provoquant des modifications structurales de la protéine. Il existe donc, pour chaque enzyme, une température au-delà de laquelle elle perd de son activité et peut être dénaturée (Figure 19a) (Combes et Monsan, 2009; Sine, 2010)

Concernant le pH, il influence également l'activité des enzymes en jouant sur la stabilité de l'enzyme et les cinétiques des réactions. Le plus souvent, le profil d'activité des enzymes par rapport au pH présente un profil en forme de cloche avec une dénaturation aux pH extrêmes. Néanmoins, lorsque le pH reste proche de l'optimal (zone de pH relativement restreinte) l'enzyme n'est pas altérée (Figure 19b). Ainsi, un pH très inférieur à l'optimal dégrade l'enzyme tandis qu'une température bien inférieure à l'optimal ne la dénature pas (Combes et Monsan, 2009; Sine, 2010).



Figure 19 : effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique (Combes et Monsan, 2009)

Les enzymes peuvent provenir de sources animales (pepsine et trypsine par exemple), végétales (papaïne par exemple) ou de microorganismes. Cette dernière source est la plus largement retrouvée, elle présente l'avantage d'autoriser des modifications génétiques de l'organisme pour changer les propriétés des enzymes qu'il produit. Les microorganismes producteurs d'hydrolases sont des bactéries, champignons ou levures.

### IV.2.2. Hydrolyse enzymatique & macroalgues

Différentes approches sont possibles pour l'hydrolyse enzymatique de macroalgues, en fonction des composés ciblés, des domaines d'application et des enzymes utilisées. Ainsi, l'extraction assistée par enzymes (EAE) utilise des enzymes commerciales et/ou industrielles tandis que l'hydrolyse enzymatique spécifique utilise, comme son nom l'indique, des enzymes spécifiques aux algues (Hardouin *et al.*, 2014).

Quelle que soit l'approche choisie, les principales étapes nécessaires à l'hydrolyse sont identiques. Les algues peuvent être préalablement broyées, séchées, lyophilisées ou simplement coupées grossièrement. Elles sont ensuite mises en suspension dans de l'eau ou dans une solution tampon qui permettra de maintenir le pH constant tout au long de l'hydrolyse. Les enzymes sont ensuite ajoutées au milieu, qui est maintenu à leur température optimale et sous agitation. Si le milieu n'est pas tamponné, le pH doit être suivi régulièrement et ajusté si nécessaire (Hammed *et al.*, 2013; Wijesinghe et Jeon, 2012).

### IV.2.2.1. L'extraction assistée par enzymes (EAE)

L'extraction assistée par enzyme (EAE) est l'approche la plus retrouvée dans la littérature. Dans ce cas, ce ne sont pas les composés recherchés qui sont hydrolysés mais les molécules qui empêchent leur extraction. Les enzymes sont ici utilisées au sens strict pour assister l'extraction des molécules d'intérêt (Hardouin *et al.*, 2014).

La composition et la structure pariétale des macroalgues est le principal obstacle à l'extraction et à la solubilisation de leurs composés. L'objectif de l'EAE est de dégrader cette structure pariétale pour faciliter la libération des molécules ciblées. Deux sous-classes d'enzymes sont principalement mentionnées : les glycosidases clivant les liaisons glycosidiques (EC 3.2) et les protéases clivant les liaisons peptidiques (EC 3.4). Les glycosidases sont communément appelées carbohydrases ou polysaccharidases ; le terme « polysaccharidase » sera employé dans la suite de ce travail.

Dans cette approche, ce sont essentiellement des préparations enzymatiques commerciales qui sont utilisées, elles n'ont pas été développées spécifiquement pour l'hydrolyse de macroalgues. Elles sont majoritairement issues de l'industrie agroalimentaire et sont obtenues à partir de microorganismes (bactéries ou champignons) par fermentation. L'utilisation de ces préparations enzymatiques commerciales, ou mixes enzymatiques, allie efficacité et faible coût de production, ce qui contre balance leur non spécificité (Hardouin *et al.*, 2014). De plus, ces préparations enzymatiques ont une ou plusieurs activités déclarées, et possèdent souvent des activités secondaires, certes moins importantes mais qui peuvent être soit intéressantes soit gênantes (Hardouin *et al.*, 2014).

L'EAE est principalement utilisée sur les macroalgues brunes et rouges, il peut s'agir de polysaccharidases, de protéases voir de la combinaison des deux. Cependant, comme il a été mentionné précédemment (Chapitre I, II.1.), les algues et notamment les macroalgues rouges ont une structure pariétale composée principalement de polysaccharides, or ces derniers sont difficiles à dégrader par les techniques conventionnelles. L'hydrolyse enzymatique de ces polysaccharides est donc un moyen de faciliter la libération des différentes molécules algales, protéiques ou autres (Fleurence, 1999b). C'est pourquoi, il a été choisi de présenter ici uniquement les préparations enzymatiques commerciales de type polysaccharidases mentionnées dans des études portant sur l'hydrolyse de macroalgues rouges. Ces enzymes peuvent aussi être utilisées pour les algues brunes et vertes puisqu'elles sont non-spécifiques. Le Tableau VII dresse une liste non-exhaustive de polysaccharidases destinées initialement à des applications industrielles, notamment dans l'industrie agroalimentaire. Elles sont choisies car elles sont actives dans des conditions douces de pH (4,5 à 7,0) et de température (40 à 60 °C) (Hardouin *et al.*, 2014).

Il existe d'autres polysaccharidases non-spécifiques commercialisées pour des applications à l'échelle du laboratoire. Par exemple, Onozuka R-10 (cellulase) et/ou Macerozyme R-10 (pectinases et hémicellulases) ont été utilisées pour l'hydrolyse enzymatique de la paroi de *Grateloupia turuturu* (Denis *et al.*, 2009b, 2009d) ou l'extraction de protoplastes<sup>22</sup> de *Grateloupia sparsa, filicina* et *turuturu* (Chen et Chiang, 1994; Lafontaine *et al.*, 2011). Des xylanases et cellulases ont également montré leur efficacité pour l'extraction de la R-phycoérythrine de *Palmaria palmata* et de *Gracilaria verrucosa* (Dumay *et al.*, 2013; Mensi *et al.*, 2012) et l'extraction des protéines de *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* et *Palmaria palmata* (Fleurence *et al.*, 1995). Enfin, une étude a montré qu'une alpha-amylase commerciale était capable de dégrader des kappa carraghénanes, bien qu'elle ne soit pas spécifique à l'hydrolyse de ce polysaccharide (Wu, 2012).

<sup>22</sup> Cellule végétale ou bactérienne dont la paroi a disparu, le protoplaste est alors limité par sa seule membrane plasmique. Ils sont obtenus principalement par digestion enzymatique.

## Tableau VII : liste non exhaustive de préparations enzymatiques commerciales (polysaccharidases) utilisées pour l'EAE de macroalgues rouges

Nom commercial	Numéro EC	Activité(s) revendiquée(s)	Macroalgue rouge	Références
<ul> <li>Celluclast<sup>®</sup> 1,5L FG (Novozymes<sup>®</sup>)</li> </ul>	EC 3.2.1.4	Cellulase	Palmaria palmata	(Lahaye et Vigouroux, 1992) (Fleurence <i>et al.</i> , 2002) (Joubert et Fleurence, 2008) (Wang <i>et al.</i> , 2010) (Harnedy et FitzGerald, 2013)
			Grateloupia filicina	(Athukorala <i>et al.</i> , 2008)
• <b>Pentosanase</b> (Lyven <sup>®</sup> )	•	Amylase et endo-ß-1,4- xylanase	Palmaria palmata	(Lahaye et Vigouroux, 1992)
• Shearzyme <sup>®</sup> 500 L (Novozymes <sup>®</sup> )	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-xylanase	Palmaria palmata	(Fleurence <i>et al.</i> , 2002) (Joubert et Fleurence, 2008) (Harnedy et FitzGerald, 2013)
• Ultraflo <sup>®</sup> L	EC 3.2.1.6	Endo-1,3(4)-ß-glucanase Activités secondaires : cellulase et xylanase	Grateloupia turuturu	(Denis <i>et al.</i> , 2009b)
(Novozymes <sup>®</sup> )			Grateloupia filicina	(Athukorala et al., 2008)
			Palmaria palmata	(Fleurence <i>et al.</i> , 2002) (Wang <i>et al.</i> , 2010)
• Viscozyme <sup>®</sup> L		Complexe multi-enzymes : arabanase, ß- glucanase, cellulase, hémicellulase et xylanase	Grateloupia filicina	(Athukorala <i>et al.</i> , 2008)
(Novozymes <sup>®</sup> )			Palmaria palmata	(Wang et al., 2010)
			Pterocladia capillaceae	(Fleita <i>et al.</i> , 2015)
			Osmundea pinnatifida	(Rodrigues et al., 2015b)
• Termamyl <sup>®</sup> 120 L	EC 3.2.1.1	α-amylase	Grateloupia filicina	(Athukorala <i>et al</i> ., 2008)
(Novozymes <sup>®</sup> )			Palmaria palmata	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
• AMG <sup>®</sup> 300 L	EC 3.2.1.3	Glucoamylase (glucane 1,4-alpha- glucosidase)	Grateloupia filicina	(Athukorala <i>et al.</i> , 2008)
(Novozymes <sup>®</sup> )			Palmaria palmata	(Wang <i>et al.</i> , 2010)

Ces enzymes (Tableau VII) sont utilisées pour hydrolyser la paroi algale, celle-ci étant constituée de différentes espèces macromoléculaires, les enzymes sont donc souvent employées en association pour maximiser les rendements d'extraction. Elles sont utilisées en cascade ou simultanément, dans ce cas il faut que les conditions optimales de chacune des enzymes soient proches (Hammed *et al.*, 2013). Ainsi, l'extraction de la R-PE est augmentée grâce à l'action synergique d'une cellulase et d'une xylanase (Mensi *et al.*, 2012). Pour *Palmaria palmata* l'association simultanée de deux préparations enzymatiques (Shearzyme<sup>®</sup> et Celluclast<sup>®</sup>) permet l'extraction des protéines de l'algue (Fleurence *et al.*, 2002; Harnedy et FitzGerald, 2013; Joubert et Fleurence, 2008). Ces synergies entre enzymes, notamment entre certaines préparations enzymatiques industrielles (Ultraflo<sup>®</sup> L et Celluclast<sup>®</sup> 1,5 L), ont également été décrites pour d'autres biomasses végétales comme le blé (Sørensen *et al.*, 2007, 2005).

## IV.2.2.2. Hydrolyse enzymatique spécifique

Les enzymes utilisées sont alors spécifiques de la molécule à hydrolyser, le produit d'intérêt obtenu à l'issu de l'hydrolyse étant le produit de la réaction catalysée par l'enzyme. Par exemple, des oligosaccharides ou sucres simples sont ainsi obtenus avec les polysaccharidases et des peptides ou acides aminés sont produits avec les peptidases. À l'heure actuelle, ces enzymes ne sont pas présentes sur le marché et leur utilisation est essentiellement destinée au domaine de la recherche, ou constitue des marchés de niche, peu déployés mais à forte valeur ajoutée. Ces enzymes sont isolées, identifiées et purifiées à partir d'organismes marins capables de dégrader la paroi des algues (Hardouin *et al.*, 2014; Rhein-Knudsen *et al.*, 2015). Il peut s'agir de microorganismes présents dans la flore intestinale d'animaux marins consommant ces algues (herbivores marins) (Gómez-Pinchetti et García-Reina, 1993), ou de microorganismes marins (bactéries et champignons) vivants en symbiose<sup>23</sup> avec ces algues (Martin *et al.*, 2014). Le Tableau VIII présente quelques enzymes spécifiques de l'hydrolyse de polysaccharides de macroalgues rouges ainsi que l'organisme dont elles ont été isolées. L'utilisation de ces enzymes spécifiques est également un moyen indirect de connaître la composition de la paroi des algues (Denis *et al.*, 2009).

<sup>23</sup> Association spécifique entre deux organismes ne pouvant vivre l'un sans l'autre, chacun d'eux tirant un bénéfice de cette association

Polysaccharide	Nom de l'enzyme	Numéro EC	Organisme
• к-carraghénane	к-carraghénase	EC 3.2.1.83	Pseudoalteromonas carrageenovora
• I-carraghénane	ı-carraghénase	EC 3.2.1.157	Zobellia galactanovorans
<ul> <li>λ-carraghénane</li> </ul>	λ-carraghénase	EC 3.2.1.162	Pseudoalteromonas carrageenovora
• Agar	α-agarase	EC 3.2.1.158	Thalassomonas agarivorans JAMP-A33
<b>J *</b>	β-agarase	EC 3.2.1.81	Alteromonas sp. SY37-12

Tableau VIII : exemples d'enzymes spécifiques aux polysaccharides pariétaux des macroalgues rouges. D'après Rhein-Knudsen *et al.*, 2015

#### IV.2.2.3. EAE via l'utilisation d'enzymes destinées aux macroalgues

Ces enzymes spécifiques (carraghénases et agarases) peuvent également être utilisées dans l'EAE pour faciliter l'extraction des diverses molécules de l'algue, la dégradation des agars et carraghénanes favorisant la libération des composés d'intérêt d'autre nature (protéines, pigments, *etc.*). Elles peuvent alors être associées entre elles ou à des enzymes commerciales.

Par exemple, il a été décrit que l'extraction des protéines de macroalques rouges par certaines de ces polysaccharidases n'était pas améliorée lorsqu'elles étaient utilisées seules : une κ-carraghénase est sans effet sur *Chondrus crispus* de même qu'une β-agarase sur Gracilaria verrucosa. En revanche, lorsqu'elles sont combinées à une cellulase commerciale, l'extraction des protéines est multipliée respectivement par un facteur 10 et 3. Cependant, dans cette même étude, pour Palmaria palmata, l'association xylanase-cellulase n'a quant à elle pas montré d'effet synergique, mais a au contraire diminué l'extraction des protéines par rapport à l'utilisation de chacune de ces deux enzymes séparément. La durée d'hydrolyse est également à prendre en compte, en effet en passant de 2 à 14 heures d'hydrolyse les rendements d'extraction peuvent être augmentés, inchangés voire diminués si les protéines sont dégradées au cours du temps (Fleurence et al., 1995). Plus récemment, une étude réalisée sur Grateloupia turuturu a testé et comparé plusieurs combinaisons d'enzymes : une cellulase (Onozuka-R10) associée à trois enzymes (une i-carraghénase, une  $\kappa$ -carraghénase ou une agarase). En fonction des objectifs ciblés : dégradation du thalle, extraction des sucres réducteurs indicateurs de la dégradation des polysaccharides pariétaux ou extraction de la R-PE ; une synergie entre ces enzymes a pu être observée,

mais l'utilisation de la cellulase seule s'est montrée préférable (dégradation de la surface du thalle) (Denis *et al.*, 2009d).

Qu'elle ait recours à des préparations enzymatiques industrielles, des enzymes commerciales ou des enzymes spécifiques, l'hydrolyse enzymatique de la paroi des macroalgues reste un procédé spécifique au phylum et à l'espèce considérée en raison de la variabilité des polysaccharides pariétaux. Il est donc nécessaire d'adapter et d'optimiser le procédé (choix des enzymes et conditions d'hydrolyse) pour chaque espèce considérée (Fleurence, 1999b).

#### IV.2.3. Propriétés des hydrolysats de macroalgues rouges

En considérant les macroalgues rouges, vertes et brunes ainsi que les polysaccharidases et les protéases, il ressort de la littérature que l'hydrolyse enzymatique des macroalgues permet d'extraire différentes molécules : polysaccharides, sucres simples, protéines, peptides bioactifs, acides aminés, polyphénols, pigments, *etc.*. Ces hydrolysats ont également été décrits comme possédant diverses propriétés biologiques telles que des activités antioxydantes, antivirales, anticoagulantes, antiprolifératives, antihypertensives et anti-inflammatoires (Hardouin *et al.*, 2014; Wijesinghe et Jeon, 2013, 2012). Parmi les différentes techniques utilisées à l'échelle industrielle, l'extraction par hydrolyse enzymatique semble l'une des méthodes les plus prometteuses pour l'extraction de molécules bioactives issues de macroalgues (Wijesinghe et Jeon, 2013). L'hydrolyse de macroalgues rouges par des polysaccharidases et/ou des protéases permet d'obtenir des extraits possédant des activités biologiques et contenant différents composés d'intérêt, des exemples sont cités cidessous.

#### IV.2.3.1. Extraction de molécules d'intérêt & activités biologiques

Protéines

L'utilisation combinée d'enzymes commerciales et spécifiques à la paroi des algues a permis d'augmenter l'extraction des protéines de *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* et *Palmaria palmata* (Fleurence *et al.*, 1995). L'hydrolyse enzymatique des polysaccharides pariétaux augmente l'extraction des protéines algales, comme celles de molécules à forte valeur ajoutée telles que les phycobiliprotéines (R-PE) (Fleurence, 1999a, 1999b). Ainsi, deux études ont montré que des polysaccharidases commerciales permettaient l'extraction de la R-PE de *Gracilaria verrucosa* (Mensi *et al.*, 2012) et de *Palmaria palmata* (Dumay *et al.*, 2013). D'autres études ont décrit l'augmentation de l'extraction des protéines de

*Palmaria palmata* grâce au couplage de deux polysaccharidases industrielles (Shearzyme<sup>®</sup> et Celluclast<sup>®</sup>) (Fleurence *et al.*, 2002; Harnedy et FitzGerald, 2013). De plus, en fonction des enzymes utilisées (β glucanase, xylanases et cellulases) les protéines extraites peuvent présenter des masses molaires différentes (Fleurence, 2003).

• Peptides bioactifs

L'obtention de peptides bioactifs se fait par protéolyse avec le plus souvent une étape préliminaire de dégradation des polysaccharides pariétaux (enzymatique, mécanique ou physique) (Wijesinghe et Jeon, 2012). Ces peptides bioactifs peuvent être obtenus à l'aide d'enzymes digestives (trypsine, pepsine), par fermentation, ou par des protéases isolées de microorganismes ou de plantes (Harnedy et FitzGerald, 2011; Samarakoon et Jeon, 2012). L'obtention de peptides bioactifs a été décrite pour différentes algues rouges. Par exemple, la protéolyse (pepsine) de *Pyropia yezoensis* donne des peptides bioactifs à activité antihypertensive (Samarakoon et Jeon, 2012). L'hydrolyse par des protéases (trypsine et alcalase) des protéines de *Porphyra columbina* a montré un enrichissement des hydrolysats en peptides de faibles masses molaires, possédant des activités antioxydantes et antihypertensives (Cian *et al.*, 2012).

Polysaccharides sulfatés

L'hydrolyse par des polysaccharidases industrielles (Viscozyme<sup>®</sup> L, Celluclast<sup>®</sup> 1,5 L, AMG<sup>®</sup> 300 L, Termamyl<sup>®</sup> 120 L et Ultraflo<sup>®</sup> L) des polysaccharides sulfatés de *Grateloupia filicina* a montré la présence dans tous les hydrolysats de composés à activité anticoagulante (Athukorala *et al.*, 2008). De plus, une étude récente a comparé l'hydrolyse par différentes polysaccharidases (Viscozyme<sup>®</sup> L, β-glucanase et β-galactosidase) de polysaccharides sulfatés extraits de la macroalgue rouge *Pterocladia capillacea*. L'hydrolysat obtenu avec l'enzyme Viscozyme<sup>®</sup> L avait l'activité antioxydante et antibactérienne la plus élevée. Cette enzyme étant un complexe multi-enzymatique (Tableau VII), l'association de différentes activité antioxydante pour des extraits issus de l'hydrolyse enzymatique (Viscozyme<sup>®</sup> L) d'*Osmundea pinnatifida*, cette activité serait notamment due à la présence de sucres sulfatés (Rodrigues *et al.*, 2015b).

## • Polyphénols

Une étude a montré que l'hydrolyse de *Palmaria palmata* par des protéases (Umamizyme en particulier) favorisait l'extraction des polyphénols. Les hydrolysats obtenus possédaient des activités antioxydantes dues à ces polyphénols, mais aussi à la présence

de polysaccharides (Wang et al., 2010).

• Activité antivirale

Les extraits obtenus par hydrolyse enzymatique (polysaccharidase) de la macroalgue rouge *Solieria chordalis*, ont montré une activité antivirale significative (activité antiherpétique anti *Herpes simplex* virus Type 1, HSV-1) qui serait liée à la présence de groupements sulfates (Hardouin *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont récemment été obtenus sur *Chondrus crispus* grâce à l'action de deux polysaccharidases (Ultraflo<sup>®</sup> ou cellulase), permettant l'extraction de molécules d'intérêt contre l'HSV-1 (Kulshreshtha *et al.*, 2015).

#### IV.2.3.2. Intérêt nutritionnel : amélioration de la digestibilité des algues

L'obstacle majeur à la digestibilité des algues par l'organisme humain vient principalement de leur composition pariétale, les polysaccharides interagissent avec les protéines réduisant ainsi l'accès des enzymes digestives à ces protéines (Galland-Irmouli *et al.*, 1999; Marrion *et al.*, 2005). L'hydrolyse enzymatique peut apporter une réponse en dégradant ces polysaccharides. Ainsi, la digestibilité des protéines de *Palmaria palmata* est améliorée de 80 % lorsqu'elle a été préalablement dégradée par la combinaison d'une xylanase (Shearzyme<sup>®</sup>) et d'une cellulase (Celluclast<sup>®</sup>). L'hydrolyse enzymatique permettrait donc d'augmenter la digestibilité des algues et d'améliorer leur valeur nutritionnelle (Fleurence, 2004; Fleurence *et al.*, 2002). Une autre étude sur *Palmaria palmata* a montré qu'une préparation enzymatique commerciale (Pentosanase) peut, grâce à son activité xylanase, liquéfier la paroi de cette algue (Lahaye et Vigouroux, 1992). Les techniques fermentaires peuvent également augmenter la digestibilité de *Palmaria palmata*, grâce à certains microorganismes capables de dégrader les polysaccharides de l'algue, via la production d'enzymes (xylanases) (Fleurence, 2004; Marrion *et al.*, 2003).

## IV.2.3.3. Bioéthanol : saccharification

L'extraction assistée par hydrolyse enzymatique est un procédé souvent mentionné dans les études portant sur la bioraffinerie de macroalgues (Hardouin *et al.*, 2014). En effet, les enzymes industrielles sont utilisées pour l'étape de saccharification<sup>24</sup> permettant ensuite la fermentation. Ainsi, une récente étude a montré que des polysaccharidases industrielles (Viscozyme<sup>®</sup> L, Spirizyme<sup>®</sup>, AMG<sup>®</sup> et Lactozym<sup>®</sup>) pouvaient être utilisées pour la saccharification de macroalgues. Après saccharification et fermentation, c'est avec les

<sup>24</sup> Transformation de polysaccharides tels que la cellulose ou l'amidon en sucres plus simples comme le glucose

macroalgues rouges que le rendement en bioéthanol le plus élevé a été atteint (Hong *et al.*, 2014).

## IV.3. Extraction assistée par ultrasons

## IV.3.1. Généralités sur les ultrasons

En 1880, Pierre et Jacques Curie ont mis en évidence la piézo-électricité. C'est sur la base de ce phénomène que le sonar a été développé par Langevin, figurant ainsi comme la première application des ultrasons. À partir des années 1950, leur utilisation se développe pour des procédés de nettoyage industriel. Depuis, leur intérêt a été démontré dans différents domaines d'application : nettoyage de surfaces, procédés (extraction solide-liquide, filtration, atomisation, découpe, *etc.*), biologie et médecine (diagnostic médical, thérapeutique, *etc.*), chimie (sonochimie) (Mason et Lorimer, 2002a; Pétrier *et al.*, 2008).

Les ultrasons sont des ondes vibratoires inaudibles par l'homme, se propageant dans les solides, liquides ou gaz. Parmi les grandeurs physiques caractéristiques des ondes ultrasonores, on retrouve principalement :

- La fréquence (f) (exprimée en kHz)
- La puissance (P) qui permet de déterminer l'énergie ultrasonore transmise au milieu (exprimée en W)
- L'intensité ultrasonore qui correspond à la puissance rapportée à la surface de la sonotrode (exprimée en W.m<sup>-2</sup> ou W.cm<sup>-2</sup>)
- La puissance ultrasonore volumique qui correspond à la puissance rapportée au volume irradié (exprimée en W.m<sup>-3</sup> ou W.L<sup>-1</sup>)

Le domaine ultrasonore peut être divisé en trois catégories : les ultrasons de basse fréquence (16-20 à 100 kHz), les ultrasons de haute fréquence (f > 100 kHz) et les ultrasons de très haute fréquence (f > 1 MHz). La puissance est le deuxième critère qui permet de distinguer les ultrasons de faible puissance (P < 1 W) et les ultrasons dits de puissance (P > une dizaine de W). Dans ce travail de thèse, les ultrasons de basse fréquence et de puissance ont été utilisés. La génération de ces ondes vibratoires se fait via un transducteur, il s'agit le plus souvent de céramiques piézo-électriques pour des ondes de fréquence supérieures à 20 kHz. L'application d'un courant alternatif entre les deux faces polarisées de la céramique crée dans le milieu une succession de phases de compression et de décompression à l'origine des vibrations (Figure 20). La propagation des ondes ultrasonses

se fait via l'extrémité d'un émetteur appelé sonotrode, cette extrémité est en contact avec la surface ou le milieu à traiter (Pétrier *et al.*, 2008).



Figure 20 : représentation schématique d'une cellule piézo-électrique, effet piézo-électrique inverse (Pétrier *et al.*, 2008)

## IV.3.2. Le phénomène de cavitation

La cavitation ultrasonore ou cavitation acoustique est à l'origine des phénomènes physiques et chimiques associés à la propagation des ondes ultrasonores dans un milieu. Elle est associée à la formation de bulles de cavitation (Pétrier *et al.*, 2008). La Figure 21 propose une illustration de ce phénomène, à proximité d'une surface solide, comme une matrice végétale.



Figure 21 : phénomène de cavitation à proximité d'une surface solide. a : phases de compression et de dépression, b : augmentation du volume de la bulle de cavitation, c : implosion de la bulle de cavitation. D'après Pétrier *et al.*, 2008; Subhedar et Gogate, 2013

Les bulles de cavitation se forment dans un milieu soumis aux ultrasons en raison des changements de pression (compression/dépression) (Figure 21a). Ces bulles de cavitation possèdent une cavité gazeuse dont le volume diminue dans les phases de compression et augmente dans les phases de dépression. La répétition de ces phases (Figure 21b) augmente considérablement le volume de la bulle et de sa cavité jusqu'à atteindre une taille critique (10 à 1000 fois le volume initial) suivie de son implosion (Figure 21c). Cette implosion induit instantanément et localement des températures et des pressions très élevées (supérieures à 2000 °C et 800 bars). Lorsque ces bulles rencontrent une surface solide ou des particules en suspension, elles se déforment et leur implosion crée un micro jet liquide projeté à grande vitesse, créant des forces de cisaillement et des points d'impact sur la surface du solide (Figure 21c). Au cours de ce phénomène, la formation d'espèces radicalaires et des collisions entre particules en suspension dans le milieu peuvent avoir lieu. Ces bulles de cavitation sont donc, en présence d'une surface solide, un moyen de modifier l'intégrité d'une surface solide et d'augmenter les transferts de matière avec le milieu (Pétrier *et al.*, 2008).

L'occurrence de ce phénomène de cavitation dépend de certains paramètres, tels que la viscosité du milieu, les propriétés physiques du liquide et la température. La puissance, l'intensité et la fréquence ultrasonore interviennent également, elles sont liées au type de réacteur à ultrasons utilisé (taille et géométrie) (Mason, 1992; Pétrier *et al.*, 2008).

#### IV.3.3. Les réacteurs à ultrasons

Il existe différents types de réacteurs à ultrasons, ils peuvent être fermés ou ouverts.

### IV.3.3.1. Les réacteurs fermés

Ils se présentent sous trois formes, les bains, les sondes et les transducteurs immergés ou réacteur *in situ*. Dans les études portant sur l'extraction assistée par ultrasons, les bains et les sondes sont les plus mentionnés.

Les bains ou bacs à ultrasons sont le plus souvent rectangulaires et les transducteurs sont disposés sur la surface extérieure (Figure 22a) (Pétrier *et al.*, 2008). Les bains à ultrasons sont simples d'utilisation et leur coût modéré. Ils sont largement répandus notamment pour le nettoyage (fréquences comprises entre 20 et 45 kHz). En revanche, la régulation de la température dans ces systèmes est difficile et l'agitation nécessaire à l'homogénéisation du milieu peut perturber la propagation des ondes (Mason et Lorimer, 2002b). De plus, une étude a montré, à l'échelle du laboratoire, qu'il était possible de mettre

en série trois bains à ultrasons pour la sonication en continu d'une solution (Gondrexon *et al.*, 1999). Enfin, il existe des réacteurs de type bain à ultrasons d'une capacité de 30 à 1000 L pour des applications à plus grande échelle, notamment dans l'industrie agroalimentaire (Chemat *et al.*, 2011; Pingret *et al.*, 2012).



Figure 22 : réacteurs à ultrasons fermés (l'échantillon traité est représenté en bleu ciel). a : bain, b : sonde et c : sonde de type « *cup horn* ». D'après Pétrier *et al.*, 2008

Les sondes à ultrasons sont des émetteurs immergés dans la solution irradiée, par contact direct (Figure 22b) ou indirect (Figure 22c). Elles peuvent également être immergées par dessous, il s'agit de *cup-horn* (Figure 22c). Les sondes permettent de traiter des petits volumes car l'énergie émise à leur extrémité n'est pas transmise de façon homogène (Mason et Lorimer, 2002b; Mason, 1992). De plus, il peut y avoir une érosion de l'extrémité de la sonde provoquant un relargage de particules métalliques dans la solution, ce qui est évité avec l'irradiation indirecte (Mason et Lorimer, 2002b). Il est possible de contrôler la température grâce à la circulation d'un fluide réfrigérant (Pétrier *et al.*, 2008).

#### IV.3.3.2. Les réacteurs ouverts

Il existe différentes formes de réacteurs ouverts. La sonotrode peut plonger dans une cellule dans laquelle le liquide circule, il s'agit alors d'un réacteur à circulation (Figure 23a). Lorsque le milieu circule dans un tube avec des émetteurs situés de part et d'autre, il s'agit d'un réacteur tubulaire (Figure 23b). Il existe également des tubes résonnants de géométrie cylindrique qui vont transférer l'énergie sur l'ensemble de l'axe du tube, ce qui permet de réduire les phénomènes d'érosion (Figure 23c) (Mason, 1992; Pétrier *et al.*, 2008) ; c'est le cas du SONITUBE<sup>®</sup>, commercialisé par la société SYNETUDE, et utilisé dans ce travail de thèse. Cet appareil permet une meilleure homogénéité de traitement (maximale dans l'axe du tube), l'intensité du phénomène de cavitation est alors trois fois plus élevée qu'avec une

sonde de type « *cup-horn* » (Faïd *et al.*, 1998). Il existe peu de réacteurs sur le marché permettant de passer du laboratoire à l'échelle pilote voire à l'échelle industrielle, le SONITUBE<sup>®</sup> permet ce changement d'échelle. Ce réacteur ouvert transmet une énergie de cavitation homogène au liquide en circulation et son utilisation nécessite peu de maintenance. Des essais préliminaires ont montré que le SONITUBE<sup>®</sup> (400 W, 35 kHz) est plus efficace qu'une sonde à ultrasons (400 W) pour la lyse cellulaire en vue de la production de biogaz (Levêque *et al.*, 2014).



Figure 23 : réacteurs à ultrasons ouverts (l'échantillon traité est représenté en bleu ciel). a : réacteur à circulation, b : réacteur tubulaire et c : tube résonant (Pétrier *et al.*, 2008)

Le principal avantage des réacteurs ouverts est qu'ils permettent de traiter des volumes importants avec une homogénéité de traitement, grâce à la circulation du milieu. Ils sont donc une approche intéressante pour des applications industrielles, à condition que le milieu à irradier puisse être pompé et circuler correctement dans le système (Mason, 1992).

### IV.3.4. Applications de l'extraction assistée par ultrasons (UAE)

#### IV.3.4.1. Principe, avantages et inconvénients

Depuis plusieurs dizaines d'années, l'extraction assistée par ultrasons a fait les preuves de son efficacité dans le domaine de l'extraction du végétal par rapport aux techniques conventionnelles (Shirsath *et al.*, 2012; Vinatoru *et al.*, 1997). En effet, elle permet d'extraire, plus rapidement et plus facilement, différents composés d'origine végétale, tout en diminuant la température et la consommation de solvants. Les extractions sont alors de plus courte durée pour des rendements souvent plus élevés (Chemat *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 2011; Shirsath *et al.*, 2012).

Le principe de l'extraction assistée par ultrasons est basé sur le phénomène de cavitation ultrasonore expliqué précédemment (Figure 31). En effet, la propagation des ondes ultrasonores dans le solvant d'extraction induit la formation de bulles de cavitation, celles-ci en implosant à proximité des parois végétales favorisent l'extraction des composés, comme illustré dans la Figure 24. Différents éléments expliquent cette efficacité de l'extraction par sonication (Chemat *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 2011; Shirsath *et al.*, 2012) :

- amélioration de la diffusion du solvant à la surface de la biomasse
- amélioration du transfert de matière et de chaleur
- · destruction des parois cellulaires
- diminution de taille des particules ce qui augmente les surfaces d'échange
- amélioration de la pénétration du solvant au sein de la biomasse
- amélioration de la diffusion des molécules dans le solvant

L'utilisation de cette technique d'extraction doit prendre en considération les paramètres affectant le phénomène de cavitation cités précédemment (Chapitre I, IV.3.2. ).



Figure 24 : principe de la destruction cellulaire par sonication. a : rupture de la paroi cellulaire induite par la cavitation, b : diffusion du solvant dans la cellule et extraction des composés (Shirsath *et al.*, 2012)

Cette technologie a fait ses preuves pour l'extraction de différentes molécules végétales (huiles essentielles, composés aromatiques, antioxydants, pigments, polyphénols, *etc.*) aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle (Chemat *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 2011; Shirsath *et al.*, 2012). La transposition à plus grande échelle de

l'extraction assistée par ultrasons est possible dans certaines configurations, comme cela a été démontré pour l'extraction des polyphénols du marc de pomme (Pingret *et al.*, 2012; Virot *et al.*, 2010).

Malgré de nombreux avantages, les ultrasons peuvent parfois, dans certaines conditions, modifier, altérer voire dégrader certains composés : changement de couleur, dégradation de certains antioxydants (acide ascorbique) ou oxydation de lipides (Pingret *et al.*, 2013). Comme pour tout procédé, les paramètres d'extraction doivent donc être adaptés aux composés ciblés et à leur(s) utilisation(s) ultérieure(s).

## IV.3.4.2. Extraction assistée par ultrasons & algues

L'intérêt porté aux ultrasons pour l'extraction de molécules algales est relativement récent par rapport aux végétaux supérieurs. Ceci peut s'expliquer par la découverte et la connaissance plus récentes des composés d'intérêt issus des micro et des macroalgues. Les ultrasons peuvent être utilisés aussi bien sur les microalgues que sur les macroalgues (Morais, 2013).

### Macroalgues

L'application des ultrasons aux macroalgues comme technique d'extraction à part entière, c'est à dire « l'extraction assistée par ultrasons » au sens strict, est récente puisqu'elle remonte à 2010-2013. Cette technologie présenterait un fort potentiel pour l'extraction de composés bioactifs de macroalgues en raison notamment de sa faisabilité industrielle (Kadam *et al.*, 2013; Michalak et Chojnacka, 2014).

Ainsi, sur les macroalgues brunes, les ultrasons sont applicables pour l'extraction des fucoïdanes<sup>25</sup> (Hahn *et al.*, 2012) et de différents composés bioactifs (acides uroniques, phlorotannins<sup>26</sup>, fucoïdanes) d'*Ascophyllum nodosum* (Kadam *et al.*, 2015b). Ils ont aussi permis d'améliorer l'extraction de composés antioxydants (composés phénoliques) d'*Ecklonia cava* (Lee *et al.*, 2013).

Pour les macroalgues rouges, une étude a montré que les ultrasons favorisaient l'extraction de la taurine de *Pyropia yezoensis*. Celle-ci n'est pas altérée par les ultrasons et cette technique présente l'avantage de réduire la durée et la température d'extraction par rapport à la méthode conventionnelle utilisée par les auteurs (Wang *et al.*, 2015a). Il a également été démontré que les ultrasons favorisaient l'extraction des polysaccharides

<sup>25</sup> Polysaccharides sulfatés des macroalques brunes

<sup>26</sup> Composés phénoliques des macroalgues brunes

sulfatés de *Gracilaria birdiae*, les extraits obtenus ayant alors une activité antioxydante (Fidelis *et al.*, 2014). Les ultrasons peuvent également être utilisés après l'extraction de polysaccharides de macroalgues rouges pour augmenter leur activité antioxydante, ce qui a été décrit pour les polysaccharides extraits de *Pyropia yezoensis* (Zhou *et al.*, 2012, 2008).

Cependant, les ultrasons peuvent parfois se montrer moins efficaces que d'autres techniques, comme l'hydrolyse enzymatique. Ainsi, une récente étude vient de comparer l'hydrolyse enzymatique et l'extraction assistée par ultrasons des composés de trois macroalques (verte, rouge et brune). Il est ressorti de cette étude que l'hydrolyse enzymatique, selon l'algue et les enzymes utilisées, permettait d'extraire le plus de composés avec les activités biologiques les plus élevées (Rodrigues et al., 2015b). Dans une autre étude, les ultrasons ont été employés comme prétraitement (étape de saccharification) de la macroalgue verte Ulva rigida, pour la libération de sucres réducteurs destinés à la production de biogaz. Parmi les différentes techniques employées, les ultrasons ne se sont pas montrés efficaces contrairement à l'hydrolyse enzymatique (Karray et al., 2015). D'autres auteurs ont également fait ce constat pour deux macroalques brunes (Saccharina latissima et Laminaria digitata) : les ultrasons seuls n'ont pas permis d'améliorer l'extraction des lipides, sucres réducteurs et protéines. En revanche, couplés avec une hydrolyse acide à chaud (HNO<sub>3</sub> 4 %, 120 °C) les rendements d'extraction étaient augmentés (Vanegas et al., 2014). L'ajout de particules abrasives (billes de silice ou sable) peut améliorer l'effet des ultrasons, comme cela a été démontré pour l'extraction des protéines et des polysaccharides d'une macroalgue verte filamenteuse du genre Cladophora (Woods et al., 2011). Il a également été décrit que les ultrasons pouvaient présenter un intérêt dans l'analyse des composés élémentaires présents à l'état de trace dans les macroalgues. En présence d'acide chlorhydrique, les ultrasons augmentaient la détection de différents métaux tels que l'aluminium, le fer, le zinc et l'arsenic. L'analyse était aussi plus rapide, plus efficace et plus écologique en évitant l'utilisation d'acide fluorhydrique (Domínguez-González et al., 2005).

### • Microalgues

Les ultrasons sont plus couramment employés sur les microalgues. Ils sont principalement utilisés en tant que technique de destruction cellulaire (Jeon *et al.*, 2013). La lyse cellulaire par sonication permet, selon la microalgue étudiée, d'extraire différentes molécules d'intérêt (Morais, 2013) : des lipides (Cravotto *et al.*, 2008), des polysaccharides (Kurd et Samavati, 2015), du glucose (Zhao *et al.*, 2013), des pigments tels que la C-phycocyanine (Moraes *et al.*, 2011), la chlorophylle (Kong *et al.*, 2014) et le  $\beta$ -carotène (Dey et Rathod, 2013).

## IV.4. Extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH)

### IV.4.1. Généralités

Les procédés d'extraction peuvent être appliqués seuls ou combinés afin d'améliorer leurs performances. L'hydrolyse enzymatique peut être intensifiée par des procédés mécaniques, physiques ou biologiques qui lui sont associés de façon séquentielle ou simultanée (Chapitre I, IV.1.1.) (Hardouin *et al.*, 2014). Le couplage simultané avec des ultrasons a été retenu dans cette étude car cette combinaison a déjà montré son efficacité dans l'intensification de l'hydrolyse enzymatique de différentes biomasses végétales.

Les ultrasons peuvent intensifier différents procédés biologiques dans lesquels les enzymes sont impliquées. En effet, le couplage ultrasons-enzymes est appliqué pour stimuler des réactions enzymatiques dans plusieurs domaines : l'industrie textile, les réactions de fermentation, l'assainissement des eaux, les synthèses organiques, l'agroalimentaire, l'extraction de molécules d'intérêt ou encore l'énergétique avec l'hydrolyse de polymères végétaux tels que la cellulose et les composés lignocellulosiques pour la production de biocarburants (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015; Kwiatkowska *et al.*, 2011). Dans ce travail de thèse, les polysaccharides pariétaux de l'algue seront la cible du couplage ultrasons-enzymes afin de faciliter l'extraction des composés de l'algue. Aussi, les études portant sur l'extraction et l'hydrolyse de polysaccharides de biomasses végétales seront les principales références mentionnées. Il faut également noter ici que la majorité des travaux portant sur le couplage ultrasons-enzyme(s) utilisent des polysaccharidases.

Les ultrasons et l'hydrolyse enzymatique peuvent être appliqués simultanément ou séparément. Les études appliquent le plus souvent les deux procédés de façon simultanée, ce qui permet un gain de temps non négligeable en plus d'améliorer les rendements d'extraction (Wu *et al.*, 2014).

### IV.4.2. Le couplage ultrasons-enzyme(s)

Bien que certaines études vont jusqu'à mentionner une synergie entre les ultrasons et les enzymes (Easson *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014), à l'heure actuelle, le mécanisme de cette interaction positive est complexe et reste encore non élucidé. Ceci est dû, en partie, à un nombre restreint de travaux dans ce domaine, mais aussi aux différences de paramètres (type de réacteurs, fréquence, puissance, enzyme, substrat, *etc.*) entre études rendant difficiles, voire impossibles, les comparaisons (Delgado-Povedano et Luque de Castro,

2015).

L'essentiel des études utilisant les ultrasons pour l'extraction de composés, que ce soit en présence d'enzymes (UAEH) ou en absence d'enzymes (UAE), mentionne uniquement la puissance affichée sur le générateur, or celle-ci ne correspond pas à la puissance réellement transmise à l'échantillon. Sa détermination nécessite de connaître le type de sonotrode, la taille (diamètre) et le rendement de l'appareil qui peut être déterminé par calorimétrie (Barton et al., 1996; Kadam et al., 2015b; Szabó et Csiszár, 2013); communication personnelle, SYNETUDE). Différents facteurs interviennent dans la transmission de la puissance ultrasonore à l'échantillon. Par exemple, pour un bain à ultrasons, la puissance réellement transmise au mélange dépendra du niveau de remplissage du bain par le liquide transmettant les ultrasons (eau le plus souvent) et dans lequel l'échantillon sera disposé, du volume d'échantillon par rapport à ce fluide, du type de contenant (facteur de transmission) et de la position de celui-ci dans le bain à ultrasons (distance entre la source ultrasonore et l'échantillon) (communication personnelle, SYNETUDE ; (Barton et al., 1996)). Pour une sonde à ultrasons, seule une mesure de calorimétrie sur l'échantillon peut permettre d'estimer la puissance réellement transmise (communication personnelle, SYNETUDE; (O'Donnell et al., 2010)). De plus, la position de la sonde dans l'échantillon semble pouvoir influencer l'efficacité de la sonication (Dey et Rathod, 2013). Parfois, certaines études travaillent en mode pulsé ce qui complexifie d'autant plus les comparaisons (Dey et Rathod, 2013; Zhou et al., 2008). Lorsque la puissance réellement transmise au produit est connue, il faut ensuite prendre en compte la durée de traitement (détermination de l'énergie transmise) et le volume ou le poids d'échantillon traité.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes trouvés confrontés à cette difficulté de comparaison, car l'essentiel des études ne fournit pas les informations permettant d'apprécier l'énergie réellement transmise à l'échantillon. Des éléments de discussion seront tout de même apportés par rapport à d'autres études, en sachant qu'il ne s'agit pas d'une comparaison au sens strict en raison de ces différences de conditions opératoires. Ici, il a donc été décidé d'exprimer l'énergie réellement apportée à l'échantillon en W.h.kg<sup>-1</sup> de mélange réactionnel, avec la prise en compte du rendement énergétique du réacteur à ultrasons (SONITUBE<sup>®</sup>) (de l'ordre de 85 %, une réelle calorimétrie n'ayant malheureusement pas pu être effectuée pour des raisons techniques et matérielles), de la durée de traitement et du poids de mélange réactionnel traité.

Néanmoins, d'après les données de la littérature, il semble que les ultrasons agiraient sur l'hydrolyse enzymatique à deux niveaux : au niveau de l'enzyme et au niveau de la réaction d'hydrolyse dans sa globalité.

#### IV.4.2.1. Ultrasons & enzymes

La plupart des travaux recensés étudient le mécanisme d'action des ultrasons sur l'activité des enzymes de type polysaccharidases. L'augmentation d'activité de ces enzymes soumises aux ultrasons a été décrite dans différentes études (Barton *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2013; Sulaiman *et al.*, 2010), elle pourrait être expliquée par une meilleure stabilité du site actif de l'enzyme via des modifications au niveau de leurs structures secondaires (Bashari *et al.*, 2013). Cependant, une étude a montré qu'une cellulase commerciale préalablement traitée par des ultrasons était ensuite moins active en présence de son substrat. En revanche, lorsque cette même enzyme est soumise aux ultrasons en présence de son substrat, le rendement d'hydrolyse est augmenté. Il semble donc que l'amélioration du transfert de matière induit par la sonication compense l'éventuel effet négatif direct des ultrasons sur l'activité de cette enzyme (Szabó et Csiszár, 2013).

Les ultrasons auraient également un effet au niveau de certains facteurs impliqués dans l'activité des enzymes. En effet, ils peuvent diminuer la température nécessaire à l'activation des enzymes, de 40 % pour une amyloglucosidase (Leaes *et al.*, 2013a) à 80 % pour une amylase (Souza et al., 2013). D'autres études ont, quant à elles, montré que la température optimale de l'enzyme peut être inchangée en présence d'ultrasons mais son activité est tout de même augmentée (Bashari *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011). Enfin, les ultrasons modifieraient également le comportement des enzymes vis-à-vis du pH (Leaes *et al.*, 2013a).

Plusieurs paramètres peuvent modifier l'effet des ultrasons sur les enzymes : la nature de l'enzyme, le substrat, les paramètres de sonication et le type de réacteur utilisé. À l'heure actuelle, il ne peut donc pas y avoir de généralisation d'un mécanisme d'action (Özbek et Ülgen, 2000; Szabó et Csiszár, 2013).

### IV.4.2.2. Ultrasons & réaction d'hydrolyse

Outre l'effet des ultrasons sur l'enzyme proprement dite, leur effet positif sur l'hydrolyse enzymatique peut s'expliquer par le phénomène de cavitation, qui induit (Subhedar et Gogate, 2013; Yachmenev *et al.*, 2009) :

- une amélioration de la diffusion des enzymes dans le milieu
- une dégradation de la surface de la biomasse

- une meilleure pénétration des enzymes
- une amélioration des transferts de matière : pénétration des enzymes et diffusion des produits d'hydrolyse dans le milieu
- · une meilleure accessibilité au substrat
- une prévention de l'agglomération des enzymes en homogénéisant le milieu

Une étude a également montré, par des observations en microscopie électronique à balayage, que la surface des parois végétales d'une graminée soumise au couplage ultrasons-enzymes présentait des perforations qui, selon les auteurs, faciliteraient l'entrée des enzymes (Easson *et al.*, 2011).

D'après ces éléments, la Figure 25 illustre ce qui pourrait se passer, de façon hypothétique, à la surface de biomasses végétales lorsqu'elles sont soumises à l'UAEH. L'implosion des bulles de cavitation va dégrader la paroi et faciliter ainsi l'accès des enzymes à leur substrat tout en permettant la diffusion dans le milieu d'extraction des composés et des produits de la réaction d'hydrolyse.



Figure 25 : hypothèse schématique de ce qui pourrait se passer au niveau d'une paroi végétale soumise à l'UAEH. a : formation de bulles de cavitation dans le milieu. b : implosion des bulles de cavitation à la surface de la paroi. c : dégradation de la paroi, s'accompagnant de la diffusion des enzymes dans la biomasse et de l'extraction dans le milieu de molécules et des produits d'hydrolyse

#### IV.4.3. Choix des paramètres de l'UAEH

L'objectif de cette étude étant d'intensifier l'hydrolyse enzymatique par les ultrasons, les enzymes doivent préservent leur(s) activité(s). Or, les ultrasons peuvent aussi être utilisés pour dégrader ou inactiver des enzymes, par exemple dans l'agroalimentaire (O'Donnell *et al.*, 2010), lorsque la nature du produit ne permet pas une inactivation thermique (± 100 °C, une dizaine de minutes) (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015).

Le choix des paramètres de sonication et d'hydrolyse est donc très important pour que l'hydrolyse enzymatique soit intensifiée et non diminuée. Différents facteurs doivent être considérés, ils devront être adaptés aux enzymes, aux composés ciblés et à la biomasse : le type de réacteur (sonde, bain, réacteur tubulaire,...), la fréquence, l'intensité, la puissance, la durée de sonication et la température (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015; Subhedar et Gogate, 2013). Dans la majorité des études, lorsque la puissance et l'intensité ultrasonore sont augmentées, le risque d'inactiver les enzymes augmente également (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015; Kwiatkowska *et al.*, 2011). Ainsi, la fréquence ne devrait pas dépasser 50 à 100 kHz, au risque d'inactiver les enzymes (Rehman *et al.*, 2013; Subhedar et Gogate, 2013).

En se plaçant dans des conditions adaptées, le couplage utrasons-enzymes peut donc permettre : d'accélérer l'hydrolyse (Liao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Peña-Farfal *et al.*, 2005), d'abaisser la température d'hydrolyse (Leaes *et al.*, 2013a) et d'utiliser moins d'enzymes (Lunelli *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2013).

### IV.4.4. Applications aux végétaux supérieurs

Depuis une dizaine d'années, de plus en plus d'études utilisent l'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH) pour améliorer l'extraction de différentes molécules d'origine végétale.

Le couplage ultrasons-enzymes est employé pour faciliter, accélérer ou augmenter les rendements d'extraction obtenues dans l'étape de saccharification de biomasses végétales lignocellulosiques, connues pour être particulièrement difficiles à dégrader (Rehman *et al.*, 2013; Subhedar et Gogate, 2013; Yachmenev *et al.*, 2009). Cette étape de saccharification doit être la plus efficace possible pour maximiser par la suite la production d'éthanol (Kwiatkowska *et al.*, 2011). Dans ces études, les enzymes utilisées sont des

polysaccharidases, principalement des cellulases (Lunelli *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2013; Yachmenev *et al.*, 2009), des amylases et des amyloglucosidases (Leaes *et al.*, 2013b). Une étude a ainsi montré que le rendement d'extraction des sucres fermentescibles des résidus du manioc passait de 60 % pour l'hydrolyse enzymatique seule à 82 % en présence d'ultrasons (Leaes *et al.*, 2013b). Il a également été rapporté, sur une graminée, une augmentation de 7,5 % des sucres réducteurs libérés par rapport à l'utilisation des enzymes seules (Easson *et al.*, 2011). L'UAEH a également permis d'augmenter l'extraction des sucres fermentescibles de la bagasse de la canne à sucre (Lunelli *et al.*, 2014).

L'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique a également montré son efficacité dans l'extraction de différentes molécules végétales. Par exemple, les rendements d'extraction de pigments (lutéoline et apigénine) du céleri sont 26 à 32 fois supérieurs à ceux obtenus conventionnellement (sans enzymes et sans ultrasons) (Zhang *et al.*, 2011). L'UAEH favoriserait également l'extraction de polysaccharides végétaux, tels que les polysaccharides hydrosolubles des baies de Goji (Liu *et al.*, 2014). Les polysaccharides extraits ont parfois des activités antioxydantes (Wu *et al.*, 2014) qui sont augmentées grâce au couplage (Chen *et al.*, 2012).

#### IV.4.5. Intérêts de l'UAEH pour les macroalgues

L'UAEH s'est montrée performante sur différentes biomasses végétales, dont certaines particulièrement difficiles à hydrolyser, même avec des enzymes adaptées. Il est donc envisageable que ce couplage soit une solution intéressante pour faciliter la dégradation de la paroi des macroalgues et l'extraction de molécules. En effet, les ultrasons pourraient compenser la non-spécificité d'action des enzymes, puisqu'à l'heure actuelle il n'existe pas de préparations enzymatiques commerciales spécifiques aux macroalgues.

À notre connaissance, et d'après les résultats d'une étude bibliométrique présentés ci-dessous, très peu de travaux se sont intéressés à l'application des ultrasons et des enzymes pour dégrader la paroi des macroalgues, qui constitue le principale obstacle à l'extraction de leurs composés.

Deux études ont néanmoins montré que l'hydrolyse enzymatique de macroalgues assistée par ultrasons présentait un intérêt pour des applications analytiques afin d'améliorer le dosage de certaines molécules. Ainsi, l'analyse de la composition élémentaire de *Palmaria palmata* a gagné en précision grâce à ce couplage, avec un rendement d'extraction proche de 100 % pour certains éléments lorsque les ultrasons étaient couplés à la pepsine, et de l'ordre de 80 % quand ils étaient couplés à la trypsine ou à l' $\alpha$ -amylase. De plus, le couplage

a également permis de diviser par 12 la durée d'extraction de ces composés ce qui représente un gain de temps indéniable (Peña-Farfal *et al.*, 2005). Plus récemment, l'UAEH a permis de faciliter l'analyse de la teneur en iode de cinq macroalgues (brunes, rouges et vertes). Cette analyse est particulièrement délicate car les composés iodés sont associés aux protéines au niveau de certains acides aminés, d'où la nécessité d'une technique d'extraction performante. Parmi les polysaccharidases et protéases testées, la pancréatine (protéase) s'est montrée la plus efficace combinée aux ultrasons, en permettant l'extraction de 76 à 87 % des composés iodés (Romarís-Hortas *et al.*, 2013).

L'intérêt de l'UAEH pour les macroalgues ne se cantonne pas à des applications analytiques. En effet, deux études ont montré que ce procédé peut, au même titre que sur les végétaux supérieurs, favoriser l'extraction et la production de molécules d'intérêt de macroalgues.

En 2014, une étude utilisant les ultrasons en présence d'enzyme(s) protéolytique(s) a noté une amélioration des rendements d'extraction des polysaccharides sulfatés de la macroalgue rouge *Gracilaria birdiae*, ainsi que de leurs activités biologiques (antioxydante et anticoagulante). Qui plus est, en se plaçant en milieu basique, l'efficacité de l'UAEH était encore augmentée (Fidelis *et al.*, 2014).

Enfin, comme pour les biomasses lignocellulosiques, il vient d'être montré sur la macroalgue verte *Ulva rigida* qu'il était possible d'intensifier et d'accélérer sa saccharification en combinant simultanément les ultrasons et un cocktail enzymatique (amyloglucosidase,  $\alpha$ -amylase et cellulase). En effet, avec l'UAEH, en seulement 30 minutes le rendement d'extraction du glucose de l'algue est apparu trois fois plus élevé qu'avec les enzymes seules. De plus, l'UAEH a permis d'atteindre en seulement une heure le rendement d'extraction obtenu après 24 heures d'hydrolyse enzymatique. Cette étude a également montré que les ultrasons étaient un moyen d'intensifier la production de bioéthanol dans un procédé en une seule étape. En effet, lorsque la saccharification, la fermentation et la sonication sont combinées simultanément, le rendement d'éthanol obtenu en trois heures est plus élevé (1,3 fois) que celui obtenu en 48 heures sans ultrasons (Korzen *et al.*, 2015).

# V. Étude bibliométrique

## V.1. Ressources et méthodologie

Une étude bibliométrique a été réalisée en collaboration avec la bibliothèque La Pérouse du Centre Atlantique IFREMER. L'objectif de cette étude est d'avoir une vision globale sur la thématique de ce travail de thèse, c'est à dire de voir l'évolution des publications et des concepts, quels sont les pays les plus représentés sur la thématique, depuis quand ces concepts sont apparus ainsi que les interactions entre eux, s'il y en a.

Pour ce faire, la base de données bibliographique du Web of Science<sup>®</sup> (WOS) a été utilisée. Il s'agit d'une source d'informations scientifiques mais aussi une ressource de « référence » pour la production d'indicateurs bibliométriques. Le logiciel d'infométrie Intellixir a ensuite été utilisé, il permet de nombreuses représentations cartographiques à partir d'un corpus de données bibliographiques.

Cette étude a été réalisée en Avril 2015 à partir des données du WOS pour les publications dites de rang A. Une première recherche a été effectuée à partir de groupes de mots-clés contenant différents termes tels que : algae / seaweed / red seaweed / Rhodophyceae / *Grateloupia / Grateloupia turuturu /* phycoerythrin / R-PE / Plant / vegetable / sonication / ultrasound / cavitation / enzymes / enzymatic hydrolysis / enzymatic extraction / protease / carbohydrase / polysaccharidase / ultrasound assisted enzymatic extraction / UAEE / ultrasound assisted enzymatic hydrolysis / UAEH / liquefaction / solubilization / extraction / degradation.

Ces mots-clés ont été combinés de façon à mieux cibler les publications entrant dans la thématique. Les références obtenues par le WOS ont toutes été triées après la lecture de leur résumé, afin de ne conserver que les plus pertinentes. Ce sont au final 277 références (réf.) qui ont été retenues et qui ont fait l'objet de l'étude bibliométrique dont les résultats sont présentés ci-dessous.

## V.2. Résultats de l'analyse

## V.2.1. Les concepts de référence

Les concepts sont extraits automatiquement de la notice source (titre, résumé et motsclés de la publication), ces concepts peuvent être regroupés par l'utilisateur pour former un concept de référence. Les concepts de référence se distinguent des concepts par la présence de crochets de part et d'autre.

Dans cette étude, les 50 principaux concepts dont les concepts de référence matérialisés par des crochets, sont indiqués dans la Figure 26. Parmi les 277 publications retenues, le concept de référence qui revient le plus souvent est « algae », suivi par « seaweed ». Viennent ensuite les concepts « ultrasound-sonication », « enzymatic hydrolysis » et « extraction ». Dans une moindre mesure, sont également retrouvés « bioactivities », « biomass », « carbohydrate », « optimisation-optimum », « disruption ». Enfin, d'autres termes reviennent même s'ils sont moins fréquents : « seaweed polysaccharides », « red seaweed », « microalgae », « lipid » et « biofuel ».
Agarase | **[Algae]** | Bacteria | Bacteria | [Bioactivities] | [Biofuel] | [Biomass] | Carbohydrase | [Carbohydrate] | Carbon | Cerevisiae | Conversion | [Disruption] | Endo | **[Enzymatic hydrolysis]** | Ethanol production | **[Extraction]** | [Food] | Gel | Gracilaria | [Grateloupia] | Harvest | Hydroxyl | [Industrial] | Inhibitory | [Lipid] | [Microalgae] | Molecular mass | Molecular weight | Oligosaccharide | [Optimisation-Optimum] | [Pigment] | [Polysaccharide] | [Pretreatment] | [Protein] | [Red seaweed] | Residue | [R-PE Phycoerythrin] | Saccharomyce cerevisiae | Sea | [Seaweed enzymology] | [Seaweed polysaccharide] | **[SeaWeed]** | Solid | Technology | [Ultrasonic enzymatic extraction] | [Ultrasonic extraction] | **[Ultrasound-Sonication]** | Ulva | Water soluble |

Figure 26 : étude bibliométrique, visualisation des 50 principaux concepts et concepts de référence (indiqués entre crochets)

#### V.2.2. Répartition géographique des études du corpus

Les 277 publications sélectionnées constituant ce corpus sont issues de laboratoires présents principalement dans trois régions du globe, comme illustré dans la Figure 27. L'Asie est en première position avec la Chine, la Corée du Sud, l'Inde et le Japon, suivie de l'Europe avec en première place la France, suivie par l'Espagne et le Royaume-Uni et enfin les États-Unis. La Chine et la Corée du Sud apportent chacune 46 publications, la France en apporte quant à elle 33.



Figure 27 : répartition géographique mondiale des 277 publications du corpus bibliographique

#### V.2.3. <u>Co-occurences entre concepts</u>

Les co-occurrences ont pour intérêt de mettre en avant les publications communes à deux concepts. En se fixant un minimum de 40 co-occurrences, cette étude bibliométrique a permis de montrer que parmi les 277 publications retenues, plus de 150 sont présentes sous le concept de référence « enzymatic hydrolysis » et une centaine sont co-occurrentes avec le concept « seaweed ». En revanche, il n'y a pas de relation entre les concepts « ultrasound-sonication » et « seaweed ». Ceci montre que l'hydrolyse enzymatique est beaucoup plus développée sur les macroalgues que les techniques de sonication. En revanche, 45 publications sont communes au concept « microalgae » (52 réf.) et au concept « ultrasound-sonication » (124 réf.) ce qui confirme que les ultrasons sont pour le moment plus appliqués sur les microalgues que sur les macroalgues.

#### V.2.4. Évolution temporelle des concepts de référence

L'évolution des 25 premiers concepts de référence, de 1975 à avril 2015, est présentée dans la Figure 28.

En s'intéressant plus particulièrement aux quatre principaux concepts relatifs à la thématique de cette thèse, il ressort que le concept « ultrasonic extraction » est relativement récent. Les travaux associés ont été publiés essentiellement à partir de 2010 avec trois publications, en 2014 le nombre d'articles publiés est passé à six. En avril 2015 déjà cinq publications étaient indexées dans le WOS, ce qui laisse penser qu'à la fin de cette année le nombre d'articles relatifs à ce concept sera plus élevé qu'en 2014. Le concept « ultrasound-sonication » a émergé en 2005 avec trois publications. Le nombre de publications recouvrant ce domaine ne cesse d'augmenter avec 33 publications en 2014 et déjà 21 en avril 2015. Concernant le concept « enzymatic hydrolysis », d'après ces 277 publications, c'est à partir des années 1990 que ce concept s'est développé (2 réf. en 1995). L'essentiel des publications datent du début des années 2000, avec un nombre d'articles de plus en plus important à partir de 2010. En effet, le nombre de références est passé de 6 à 33 entre 2010 et 2014. D'après le concept « seaweed », l'augmentation des articles relatifs aux macroalgues est marquée depuis les années 2010. En effet, entre 2010 et 2014 les publications liées à ce concept sont passées de 7 à 29.

La thématique de cette thèse est donc récente au regard de ces données portant sur les 277 références retenues pour cette étude.



Figure 28 : évolution temporelle des 25 premiers concepts et concepts de référence. Les rectangles bleus indiquent les quatre principaux concepts de ce travail de thèse

#### V.2.5. Analyses ciblées

Ce travail de thèse porte sur deux procédés, l'hydrolyse enzymatique et l'extraction assistée par ultrasons, appliqués seuls ou combinés sur des macroalgues. Parmi les 277 références retenues il a été décidé de réaliser deux études ciblées. Pour ce faire, des champs personnalisés ont été créés et combinés, les concepts relatifs à chacun de ces champs sont sélectionnés.

La première étude ciblée a concerné l'hydrolyse enzymatique avec pour objectif de déterminer dans ce corpus bibliographique quelle catégorie d'enzyme est la plus retrouvée. Des champs personnalisés ont été créés et combinés de la façon suivante : [Enzymatic hydrolysis] + [Polysaccharidase] + [Protease] + [Enzymes for seaweed]. Cette étude montre que ce sont bien les polysaccharidases seules (33 réf.) qui sont les plus utilisées dans ce corpus, suivies par les polysaccharidases spécifiques aux algues (20 réf.) telles que les carraghénases et les agarases, et enfin les protéases (3 réf.). Des combinaisons polysaccharidases sont également observées (15 réf.). Dans une moindre mesure des combinaisons de polysaccharidases spécifiques et non spécifiques sont retrouvées (8 réf.).

La deuxième étude ciblée a pour objectif de cartographier les publications relatives à chacun des deux procédés étudiés et à leur combinaison. Pour ce faire des champs personnalisés ont été créés et combinés : [Ultrasound-sonication] + [Ultrasonic extraction] + [seaweed] + [enzymatic hydrolysis]. La Figure 29 présente la cartographie des études et leurs interactions, quand il y en a, avec différents champs personnalisés.



Figure 29 : analyse ciblée des études portant sur l'hydrolyse enzymatique et/ou les ultrasons appliqués aux macroalgues. Les cercles noirs indiquent les publications dans lesquelles il est question de macroalgue, d'hydrolyse enzymatique et d'ultrasons.

D'après la Figure 29, 98 publications sur les 277 sont relatives à l'hydrolyse enzymatique de macroalgues, ce qui montre que ce procédé est déjà bien implanté dans le domaine des macroalgues. Seulement 29 publications mentionnent à la fois les macroalgues et les ultrasons, neuf d'entre elles sont à proprement parlé de l'extraction assistée par ultrasons ([Ultrasonic extraction]) appliquée aux macroalgues. Les éléments entourés en noir indiquent le nombre de publications associant les trois ou quatre champs personnalisés : [Ultrasound-sonication] et/ou [Ultrasonic extraction] + [seaweed] + [enzymatic hydrolysis]. Il n'y a que huit publications pour lesquelles il est question à la fois d'hydrolyse enzymatique, d'ultrasons et de macroalgues.

Cette analyse, via des champs personnalisés, met bien en avant le côté innovant de l'application des ultrasons et des enzymes sur les macroalgues. De plus, parmi ces huit études, toutes ne portent pas sur l'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH) au sens strict. En effet, comme indiqué dans le Tableau IX, ces huit publications peuvent être séparées en deux catégories :

les études qui comparent les deux procédés sans les combiner

 les études qui réalisent l'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique de façon simultanée ou séquentielle. Parmi ces études certaines utilisent ce procédé à des fins analytiques, d'autres pour extraire des composés d'intérêt en vue de leur valorisation.

Cette étude bibliométrique a donc permis de mettre en évidence le caractère innovant de l'application simultanée des enzymes et des ultrasons sur les macroalgues. En effet, d'après le Tableau IX, fin 2012 au début de ce travail de thèse, il n'y avait que deux publications indexées dans le WOS pour lesquelles les ultrasons et les enzymes étaient combinés et utilisés sur des macroalgues à des fins analytiques. Les deux premières publications faisant mention d'un procédé d'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH), sur les macroalgues, datent seulement de 2014 et 2015.

	Référence	Macroalgue(s)	Application(s) et Objectif(s)	Conclusion(s) étude
Hydrolyse	(Karray <i>et al.</i> , 2015)	Ulva rigida	<b>Production de biogaz</b> Comparaison de prétraitements (chimiques ; hydrolyse enzymatique glucanase et β-glucosidase ; ultrasons)	Méthode retenue : hydrolyse enzymatique
enzymatique et ultrasons	(Kadam <i>et al.</i> , 2013)	Macroalgues	<b>Revue de synthèse</b> sur les nouvelles technologies d'extraction potentielles pour les macroalgues	Intérêt des ultrasons et de l'hydrolyse enzymatique.
<u>separes</u>	(Hahn <i>et al.</i> , 2012)	Macroalgues brunes	<b>Revue de synthèse</b> sur les nouvelles techniques d'extraction des fucoïdanes de macroalgues brunes	Intérêt des ultrasons et de l'hydrolyse enzymatique.
	(Romarís-Hortas <i>et al.</i> , 2013)	Plusieurs espèces : rouges, vertes et brunes	Analytique (acides aminés iodés et iodures) Comparaison de prétraitements (extraction alcaline par microondes ; hydrolyse enzymatique protéases / polysaccharidases ; ultrasons + pancréatine)	Méthode retenue : couplage des ultrasons et de l'hydrolyse enzymatique en utilisant la pancréatine.
	(Narukawa <i>et al.</i> , 2012)	3 macroalgues brunes et 1 rouge	Analytique (arsenic inorganique) Comparaison de procédés d'extraction (hydrolyse acide/alcaline ; ultrasons seuls ; enzymes pepsine / amylase ; pepsine+ultrasons ; combinaisons de méthodes)	Méthode retenue : extraction assistée par ultrasons dans de l'eau
Hydrolyse enzymatique et ultrasons	(Peña-Farfal <i>et al</i> ., 2005)	Palmaria palmata	<b>Analytique</b> (composition élémentaire, métaux) Comparaison de prétraitements (hydrolyse enzymatique pepsine / α-amylase / tryspine; extraction acide par micro- ondes ; UAEH)	Méthode retenue : couplage des ultrasons et de l'hydrolyse enzymatique en utilisant la pepsine. La durée d'extraction passe alors de 6 h à 30 min, rendements proches de 100 %
<u>combinés</u>	(Fidelis <i>et al</i> ., 2014)	Gracilaria birdiae	Extraction de polysaccharides sulfatés bioactifs Comparaison de procédés d'extraction (hydrolyse enzymatique (protéases) +/- ultrasons, dans de l'eau ou en milieu alcalin)	Méthode retenue : intérêt du couplage ultrasons+protéases que ce soit en milieu aqueux ou alcalin. Activités anticoagulantes et antioxydantes des polysaccharides sulfatés plus marquées en milieu alcalin
	(Korzen <i>et al.</i> , 2015)	Ulva rigida	<b>Production de bioéthanol en une seule étape</b> Comparaison de l'hydrolyse enzymatique (amyloglucosidase+amylase+cellulase) seule et combinée aux ultrasons pour l'extraction du glucose servant à la fermentation	Intérêt du couplage simultané enzymes + ultrasons pour la libération du glucose : gain de temps et rendements plus élevés. Ce même constat est fait pour enzymes+ultrasons+fermentation (en simultané)

Tableau IX: liste des huit publications indexées au WOS en avril 2015 faisant référence à l'utilisation d'ultrasons et d'enzymes sur des macroalgues

## **Chapitre II**

## Matériels et Méthodes

## I. Matériel biologique : Grateloupia turuturu

Les algues ont été collectées au cours de deux prélèvements d'environ 100 kg chacun effectués aux printemps 2013 et 2014, dans la zone intertidale de la Côte Atlantique (Plage Valentin, Batz-sur-Mer (44)). Une fois prélevées, les algues sont disposées dans des caisses (Figure 30) afin d'éliminer un maximum d'eau, une fois remplies ces caisses sont placées dans un conteneur isotherme, à l'abri de la lumière.



Figure 30 : collecte de Grateloupia turuturu

Les algues, conservées au frais lors du transport, ont été triées au laboratoire afin d'éliminer les autres espèces et les épiphytes. Elles ont rapidement été essorées et épongées sur papier absorbant avant d'être conditionnées dans des sacs, mis sous vide (Boulanger INV 40), puis stockés à - 20°C. La contenance unitaire des sacs est de 500 à 700 g.

### II. Matériel enzymatique

Les enzymes utilisées dans ce travail de thèse sont des complexes enzymatiques industriels. Elles ont été sélectionnées afin de répondre au mieux aux contraintes liées à la fois à la préservation de la R-PE et à l'application des différents procédés étudiés, soit une température optimale proche de 40 °C et un pH de l'ordre de 5,5. D'après les préconisations des fournisseurs et la complémentarité des activités principales et secondaires, quatre complexes enzymatiques ont été retenus. Leurs caractéristiques sont indiquées dans le Tableau X. À titre informatif, l'activité exprimée en unité par g (U/g) est indiquée lorsque

l'information était disponible auprès du fournisseur, il en est de même pour le numéro E.C. sous lequel est classé chacune de ces quatre enzymes. Deux complexes sont sous forme de poudre et deux autres sont sous forme liquide.

Ces quatre complexes enzymatiques ne sont pas purifiés, d'où la mention d'activités dites secondaires pour certains d'entre eux (Tableau X). Ils sont initialement destinés à différentes applications industrielles :

- l'industrie des jus (fruits et légumes) (Sumizyme MC)
- la production de vin (Sumizyme TG)
- l'industrie brassicole (Ultraflo<sup>®</sup> XL)
- l'industrie valorisant les déchets végétaux lignocellulosiques (Multifect<sup>®</sup> CX 15L)

Tableau X : caractéristiques des complexes enzymatiques composant le cocktail enzymatique : activités, valeurs de pH et de températures minimales (min), maximales (max) et optimales (opt)

	Activité(s)		рН			Température(s) (°C)		
	Principale(s)	Secondaire(s)	Min	Мах	Opt	Min	Max	Opt
Sumizyme TG	ß-1.3- glucanase							
EC 3.2.1.6 (poudre)	Botrytis glucanase	-	3,5	8	4	40	50	50
Takabio	(100 U/g) <sup>1</sup>							
Sumizyme MC		_						
EC 3.2.1.15 (poudre)	Polygalacturonase (PGU (ELS) 2 000 U/a) <sup>2</sup>	Protéase Amylase	5	6	5	40	45	45
Takabio	( ( ) , g)	,,						
Multifect <sup>®</sup> CX 15L	Cellulase							
EC 3.2.1.4 (liquide)	(2200-2800 CMCU/g) <sup>3</sup> ß glucosidase	-	4	6	5	35	65	55
DuPont™	(450-775 U/g)							
Ultraflo <sup>®</sup> XL	<b>ß glucanase (endo- 1,3(4-))</b> (500 BGU/g)⁴							
EC 3.2.1.6 (liquide)		Xylanase α amylase	Nd	Nd	6	40	65	Nd
Novozymes®		a anylase						

<sup>1</sup> unités par g ; <sup>2</sup> unités poly galacturonase; <sup>3</sup> unités carboxyméthylcellulose; <sup>4</sup> unités bêta-glucane

Afin de déterminer la composition biochimique de ce cocktail enzymatique, une solution aqueuse de ces quatre complexes enzymatiques a été réalisée en respectant les proportions utilisées lors des expérimentations. Une partie a été lyophilisée et une autre conservée à - 20 °C pour analyses.

## III. Procédé d'extraction conventionnel de composés hydrosolubles

Il s'agit d'une extraction solide-liquide effectuée à partir d'algues lyophilisées réduites en poudre par cryobroyage dans de l'azote liquide. Cette poudre d'algue est mise en suspension dans un solvant d'extraction, selon un ratio de 1/20 (m/v), déterminé précédemment au laboratoire (Munier, 2013). Le solvant habituellement employé dans le laboratoire est du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) (Denis, 2009; Munier, 2013). L'eau du réseau ajustée à pH 5,5 (HCl 6 M) a également été utilisée car il s'agit du solvant d'extraction dans lequel les procédés étudiés ont été réalisés. L'extraction est effectuée pendant 20 min à 4 °C, les suspensions sont ensuite centrifugées à 25000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Chaque extraction est effectuée en triplicat.

### IV. Procédés d'extraction innovants de composés hydrosolubles

#### IV.1. Schéma général

Trois procédés d'extraction ont été développés, au sein d'un même système, sur des bases communes. La Figure 31 propose un schéma général (a) présentant les éléments constituant la base du système. La photographie (b) du système illustre les différents éléments :

- un réacteur en verre à double enveloppe d'une capacité de 5 L (A)
- un réacteur tubulaire à ultrasons (SONITUBE<sup>®</sup>) (B1) et son générateur (B2)
- une pompe péristaltique (Leroy<sup>®</sup> Somer ; Heidolph PD 5006 SP standard) (C)
- un agitateur à pales pour l'homogénéisation du mélange réactionnel (Stuart<sup>®</sup> Overhead Stirrer SS20) (D)
- deux échangeurs de chaleur montés en parallèle : un groupe froid (Hitema<sup>®</sup> ESE 010) (E) et un bain marie (Memmert) (F) permettant de réguler, manuellement, la température dans le réacteur grâce à la circulation de glycol dans la double enveloppe. Un système de vannes permet de passer rapidement de l'un à l'autre
- deux sondes de température placées en sortie des ultrasons/entrée du réacteur (Hanna instruments checktemp 1) et dans le réacteur.



L'ensemble du système est placé dans une pièce climatisée, à l'obscurité.

Figure 31 : a : schéma du système; b : photographie de l'ensemble du système. (A) réacteur en verre à double enveloppe, (B1) et (B2) SONITUBE<sup>®</sup>, (C) pompe péristaltique, (D) agitateur à pales, (E) groupe froid et (F) bain marie

#### IV.2. Prétraitement des algues : broyage

Les algues nécessitent d'être broyées afin de permettre leur mise en suspension et la circulation du mélange dans le système. Le broyage est effectué, après décongélation partielle, à l'aide d'un broyeur à couteaux (Microcut Stephan MC 15, couteau taille 1). Les algues, une fois broyées, sont réparties dans des sacs (500 à 700 g par sac) mis sous vide puis stockés à - 20 °C.

#### IV.3. Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est composé d'algues broyées dispersées dans de l'eau du robinet (20 % d'algues humides, p/p). Le pH initial du mélange est mesuré puis ajusté à pH 5,5 ± 0,1 par l'ajout d'HCl 6 M. Tous les essais ont été effectués avec 650 à 660 g d'algues broyées soit 3250 à 3300 g de mélange réactionnel. Pour chaque essai, environ 100 g du lot d'algues broyées sont réservés à 4 °C, afin de déterminer ultérieurement les teneurs en eau et en cendres.

Le mélange est ensuite introduit dans le réacteur, homogénéisé sous agitation modérée (100 rpm), puis mis en circulation après réglage de la pompe péristaltique au débit souhaité (L.h<sup>-1</sup>). Les mesures de débit sont effectuées en triplicat à l'aide d'une éprouvette graduée et d'un chronomètre. La réalisation de l'ensemble de ces étapes préliminaires nécessite une trentaine de minutes, à l'obscurité, durée pendant laquelle les algues broyées sont dispersées dans l'eau.

## IV.4. Extraction assistée par hydrolyse enzymatique (enzyme-assisted extraction, EAE)

Après préparation du mélange réactionnel et ajustement du débit, les enzymes sont ajoutées lorsque la température dans le réacteur est proche de 40 °C, ce qui détermine le début (T0) de l'expérimentation. La quantité d'enzymes ajoutée a été fixée, pour l'ensemble de ce travail, à 1 % de chaque enzyme par rapport au poids d'algue humide, soit 0,2 g de chaque enzyme pour 100 g de mélange (0,2 % p/p). Les essais sont réalisés en excès d'enzymes, l'objectif de ce travail n'étant pas d'optimiser le ratio enzyme/substrat.

#### IV.5. Extraction assistée par ultrasons (ultrasound-assisted extraction, UAE)

Le réacteur à ultrasons est un réacteur tubulaire (SONITUBE® 35 kHz, SYNETUDE SAS) (Figure 32). Il se présente sous la forme d'un cylindre dans lequel le mélange réactionnel circule en continu. Un transducteur (ou émetteur) permet de générer les ondes ultrasonores, l'amplitude de ces ondes est ajustée mécaniquement au niveau du booster, ces ondes vibratoires sont ensuite transmises à une cellule de sonication appelée sonotrode. C'est au niveau de la sonotrode, et sur l'ensemble de la surface du tube, que le mélange réactionnel est soumis aux ultrasons. Au niveau du générateur, l'amplitude peut être réglée de 50 à 100 %, correspondant à une puissance comprise entre 200 et 400 W environ. Le rendement énergétique du SONITUBE® est de l'ordre de 85 %. La sonotrode a un volume interne de 70 mL pour une surface interne (extrémités de la sonotrode incluses) de 14530

mm<sup>2</sup> (communication personnelle SYNETUDE).



Figure 32 : schéma du SONITUBE<sup>®</sup>. Les flèches bleues représentent la propagation des ultrasons. a : section horizontale ; b : section verticale

L'extraction assistée par ultrasons est démarrée (T0) après ouverture de la vanne d'arrivée d'air comprimé servant au refroidissement du transducteur, et la mise en service du générateur à ultrasons.

# IV.6. Extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis, UAEH)

Il s'agit de la combinaison simultanée de l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique (EAE) et de l'extraction assistée par ultrasons (UAE). Dans l'UAEH, le procédé débute (T0) lorsque les quatre complexes enzymatiques composant le cocktail enzymatique sont ajoutés puis le SONITUBE<sup>®</sup> allumé.

#### IV.7. Paramètres suivis en cours d'extraction

Au cours du temps, différents paramètres sont suivis et/ou contrôlés afin de s'assurer de la bonne mise en œuvre des extractions :

Suivi et régulation des températures

La température à l'intérieur du réacteur est mesurée de façon continue afin de maintenir la température de consigne (± 1 °C). A chaque prélèvement, les températures en sortie du SONITUBE<sup>®</sup>, dans la pièce, et au niveau de l'échangeur de chaleur sont également relevées.

<u>Remarque</u> : il convient de prendre en considération l'échauffement du mélange réactionnel en cours de sonication et d'adapter en conséquence la température de l'eau glycolée au sein de la double enveloppe. Cette régulation est effectuée manuellement tout au long des essais. L'objectif est d'atteindre la température désirée dans le réacteur au bout d'une durée similaire de traitement (20 à 30 minutes), ceci quels que soient les paramètres d'extraction (débit, puissance et température). Plus la puissance de consigne du SONITUBE<sup>®</sup> est élevée, plus l'échauffement est rapide et important.

• Suivi du pH

Les mesures de pH sont réalisées au cours du temps à l'aide d'une sonde de pH couplée à une sonde de température permettant de prendre en compte les variations de températures au cours des extractions (Radiometer analytical TitraLab<sup>®</sup> 854).

• Suivi de la puissance

Les variations de puissance indiquées au niveau du générateur d'ultrasons sont relevées au cours du temps en prenant les valeurs (minimales et maximales) affichées. Ces valeurs permettront de calculer l'énergie reçue (E en W.h) par le mélange à la fin de l'extraction (Equation 1), cette énergie peut ensuite être rapportée au poids de mélange traité (E' en W.h.kg<sup>-1</sup>) (Equation 2).

$$E = P \cdot t$$
 Equation 1

Avec, E : énergie reçue (W.h) ; P : puissance reçue (W) ; t : durée de sonication (h)

$$E' = E/M$$
 Equation 2

Avec, E' : énergie apportée au kilo de mélange réactionnel (W.h.kg<sup>-1</sup>) ; E : énergie reçue (W.h); M : poids de mélange réactionnel traité (kg).

• Suivi du débit

Le débit est mesuré à deux reprises, avant le début de l'extraction et juste après l'avant dernier prélèvement.

#### IV.8. Prélèvements et fractionnement

Des prélèvements d'environ 30 mL sont réalisés, à intervalles réguliers, en sortie du SONITUBE<sup>®</sup>. Après mesure du pH, ils sont pesés puis centrifugés pendant 30 minutes à 15500 g et 20 °C (Beckman Coulter Avanti<sup>®</sup> J-E Centrifuge). Les deux phases (culot et

surnageant) sont séparées, pesées puis stockées à - 20°C.

En fin d'expérimentation, le reste de mélange réactionnel contenu dans le réacteur est récupéré puis centrifugé pendant 30 minutes à 8200 g et 20 °C (la centrifugeuse ne permettant pas d'atteindre des vitesses supérieures à 8200 g pour des gros volumes).

<u>Remarque</u> : aucune différence probante n'a été constatée entre les deux vitesses de centrifugation. Les résultats présentés ont tous été obtenus sur des prélèvements centrifugés à 15500 g.

Le système est nettoyé en faisant circuler une solution diluée de soude pendant quelques dizaines de minutes, plusieurs rinçages à l'eau sont ensuite effectués.

#### IV.9. Schéma global des procédés étudiés

La Figure 33 résume schématiquement les principales étapes des trois procédés d'extraction étudiés (EAE, UAE et UAEH). Dans la mesure du possible toutes les étapes sont effectuées à l'obscurité. La préparation du mélange réactionnel et le fractionnement des prélèvements sont des étapes identiques pour les trois procédés. L'extraction témoin se différencie uniquement par l'absence d'enzymes et d'ultrasons.



Figure 33 : résumé schématique des procédés d'extraction étudiés dans ce travail de thèse : EAE, UAE et UAEH, (E : enzymes et US : ultrasons).

## V. Analyses biochimiques

#### V.1. Détermination de la matière sèche

La détermination de la teneur en matière sèche (MS) des échantillons est réalisée selon deux méthodes. Les analyses sont effectuées en triplicat.

La matière sèche est déterminée par gravimétrie, à partir de  $10 \pm 1$  g d'échantillon humide et broyé, pesé dans une coupelle métallique placée ensuite pendant 24 heures dans une étuve réglée à  $105 \pm 2$  °C. La teneur en matière sèche est exprimée en pourcentage d'algue fraîche (Alg.F) ou d'échantillon frais (MF). Cette technique est certes la plus précise, mais elle est dénaturante. C'est pourquoi, les échantillons disponibles en faible quantité et dont la composition ne doit pas être altérée, sont lyophilisés (Cryotec, type pilote 1.5 CCPS) pendant 72 heures. La lyophilisation permet ainsi de déterminer, par gravimétrie, la matière sèche estimée (MS <sub>estimée</sub>) exprimée en pourcentage d'algue fraîche (% Alg.F) ou d'échantillon frais (MF).

#### V.2. Détermination des cendres

La teneur en cendres est déterminée de façon gravimétrique à partir de  $10 \pm 1$  g d'échantillon frais ou  $1 \pm 0,1$  g d'échantillon lyophilisé. L'échantillon est pesé dans un creuset, qui est ensuite disposé dans un four à moufle à 550 °C pendant une nuit (Furnace 62700, Barnstead Thermolyne). La teneur en cendres est exprimée en pourcentage d'algue sèche (% Alg.S) ou en pourcentage d'échantillon sec (% MS). Les analyses sont effectuées en triplicat.

#### V.3. Évaluation de la liquéfaction

Le terme de liquéfaction a été choisi pour exprimer la solubilisation des algues au cours des différents procédés d'extraction. Le pourcentage de matière liquéfiée est déterminé, pour les extractions conventionnelles et les procédés étudiés, après lyophilisation des culots et surnageants, selon l' Equation 3.

$$M_{iiq} = \frac{m_1}{m_1 + m_2} . 100$$
 Equation 3

Avec,  $M_{liq}$ : matière (algue) liquéfiée (%);  $m_1$ : masse de surnageant ou extrait lyophilisé (g);  $m_2$ : masse de culot lyophilisé (g)

Une autre grandeur est également calculée, il s'agit du gain de liquéfaction, exprimé en pourcentage. Il permet de standardiser les résultats en soustrayant pour chaque temps le pourcentage de matière déjà solubilisée à T0 (Equation 4). Ainsi, le gain de liquéfaction dû au procédé peut être estimé, ce qui permet la comparaison des procédés entre eux. Pour l'EAE, l'UAE et l'UAEH, un suivi cinétique du gain de liquéfaction est effectué.

$$Gain_{liq} = M_{liqTx} - M_{liqT0}$$
 Equation 4

Avec, Gain<sub>liq</sub> : gain de liquéfaction, matière liquéfiée au temps  $T_x$  par rapport au  $T_0$  (%);  $M_{iiqTx}$  : matière liquéfiée au temps x (%) et  $M_{iiqT0}$  : matière liquéfiée au temps 0 (%).

#### V.4. Analyse élémentaire : carbone et azote

Les teneurs en azote total et en carbone sont déterminées par analyse élémentaire, par combustion des échantillons, selon une méthode adaptée de la méthode de Dumas (Dumas, 1831; INRA, 2014). Cette technique présente l'avantage d'utiliser une petite quantité d'échantillon (de l'ordre du mg) et de quantifier de façon simultanée la teneur en azote et en carbone.

<u>Remarque</u> : le dosage de l'azote via l'analyse élémentaire a déjà été utilisé pour l'étude de la composition azotée de macroalgues (Lourenço et al., 2002).

La composition en azote total pourra être reliée à la teneur en protéines, tandis que la composition en carbone pourra être associée aux composés protéiques mais aussi majoritairement aux composés carbonés, tels que les polysaccharides, qui sont très présents chez les macroalgues (Chapitre I, II.1., p.15).

Les échantillons lyophilisés sont préalablement placés quelques heures dans une étuve à 70 °C afin d'éliminer toute trace d'eau résiduelle. Après refroidissement dans un dessiccateur, ils sont pesés  $(1,5 - 5 \text{ mg}, \text{ précision au } \mu\text{g})$  dans des petites capsules en étain. Ces capsules sont ensuite introduites dans un réacteur constitué par un tube vertical en quartz maintenu à la température de 950 °C et dans lequel passe un courant d'hélium. A l'introduction de l'échantillon, le courant d'hélium est automatiquement enrichi par une quantité déterminée d'oxygène pur, provoquant ainsi la combustion éclair (ou combustion flash) à une température d'environ 1800 °C de la capsule et de l'échantillon. Les gaz de combustion, entraînés par le courant d'hélium, passent sur un catalyseur d'oxydation qui les transforme en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>x</sub>O<sub>y</sub>. Ces gaz passent alors par un deuxième tube en quartz maintenu à la température de 750 °C puis sur un deuxième catalyseur (colonne de réduction en cuivre réduit) qui va réduire les oxydes d'azote en azote élémentaire et piéger l'excès d'oxygène. En sortie de ce tube, sont retrouvés en plus du gaz vecteur, les gaz N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O qui sont alors entraînés par un courant d'hélium dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse (CPG) où ils sont séparés et détectés par un détecteur à conductivité thermique (FLASH 2000 NC Organic Elemental Analyzer - Thermoscientific). Les produits non dosés sont piégés. Les chromatogrammes sont intégrés à l'aide du logiciel Eager Xperience for FLASH, et exprimés par rapport au poids sec d'échantillon (%). Pour chacun des échantillons l'analyse est répétée deux à trois fois.

Les résultats sont également exprimés en terme de rendement d'extraction par rapport au carbone et à l'azote présents dans l'algue. Par exemple, pour l'azote, le rendement d'extraction dans la fraction soluble ( $RS_N$ ) est calculé selon l'Equation 5, et exprimé en pourcentage.

$$RS_{N} = \frac{N_{S.} M_{liq}}{N_{algue}}$$
 Equation 5

Avec,  $M_{liq}$ : le pourcentage de matière liquéfiée,  $N_s$ : le pourcentage d'azote de l'échantillon (surnageant lyophilisé) et  $N_{algue}$  le pourcentage d'azote dans l'algue sèche .

Pour certains échantillons le dosage a également été effectué sur le culot (fraction insoluble). La même équation a alors été appliquée, en remplaçant le pourcentage de matière liquéfiée (M<sub>liq</sub>) par le pourcentage de matière non solubilisée (M<sub>c</sub>), et le pourcentage d'azote dans la fraction soluble par le pourcentage d'azote dans le culot (N<sub>c</sub>). Ainsi la répartition, entre culot et surnageant, de l'azote total de l'algue est obtenue.

Le même raisonnement a été appliqué pour l'analyse du carbone. Le rendement d'extraction du carbone dans la fraction soluble ( $RS_c$ ) est alors calculé selon (Equation 6).

$$RS_{c} = \frac{C_{S} M_{liq}}{C_{algue}}$$
 Equation 6

Avec,  $M_{liq}$ : le pourcentage de matière liquéfiée,  $C_s$ : le pourcentage de carbone de l'échantillon (surnageant lyophilisé) et  $C_{algue}$  le pourcentage de carbone dans l'algue sèche.

#### V.5. Analyse de la composition en sucres

#### V.5.1. Détermination de la teneur en sucres hydrosolubles

Il s'agit d'un dosage colorimétrique des sucres hydrosolubles totaux (oses totaux) présents dans les surnageants. La méthode utilisée est celle de Dubois (Dubois *et al.*, 1956) modifiée par Chaplin (Chaplin, 1986), et développée pour le dosage des hexoses. Cette méthode est sensible et reproductible. Elle se base sur le développement d'une coloration orangée lorsque des sucres sont mis en présence de phénol et d'acide sulfurique concentré, c'est la formation de furfural ou d'hydroxylméthyl furfural qui est responsable de cette coloration.

Dans un tube à hémolyse en verre contenant 200 µL d'échantillon ou de standard sont ajoutés, sous hotte, 200 µL de phénol (5 % m/v), puis 1 mL d'acide sulfurique concentré (97 %) au distributeur automatique en faisant attention à ne pas toucher les parois du tube. Après 10 minutes à température ambiante, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex, puis les tubes sont de nouveau laissés à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance des solutions est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm. Le glucose est utilisé comme standard, la gamme de concentration est comprise entre 0 et 150 µg.mL<sup>-1</sup>. Les réactions colorimétriques sont effectuées en triplicat. Les résultats sont exprimés en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S.

Cependant, cette réaction colorimétrique n'est pas spécifique aux hexoses, c'est pour cela qu'elle est utilisée pour le dosage des sucres dits « totaux ». En effet, les aldoses, cétoses, et acides uroniques induisent également la coloration. Il faut noter que certains composés non glucidiques, tels que les protéines et des ions métalliques, peuvent interférer. Afin d'identifier les sucres en présence, l'analyse des résidus glycosidiques a également été effectuée sur certains échantillons.

#### V.5.2. Analyse des résidus glycosidiques

Les résidus glycosidiques sont identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après leur libération par méthanolyse, sous forme de méthylglycosides *O*-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling *et al.* (Kamerling *et al.*, 1975) modifiée par Montreuil *et al.* (Montreuil *et al.*, 1986). Cette analyse est quantitative et qualitative, elle est effectuée sur les surnageants lyophilisés et sur les poudres d'algue de 2013 et 2014. Différents standards sont utilisés et traités de la même manière que les échantillons analysés. Pour chacun des échantillons la méthanolyse et l'analyse sont répétées trois fois.

• Méthanolyse et sylilation

Les résidus glycosidiques (ou oses libres) sont, dans un premier temps, libérés de l'échantillon par méthanolyse. Quemener *et al.* ont démontré que la méthanolyse acide est plus appropriée qu'une hydrolyse acide pour l'analyse des oses constitutifs des polysaccharides d'algues rouges (agars et carraghénanes) (Quemener *et al.*, 1995). Dans un tube en verre, l'échantillon lyophilisé est solubilisé dans de l'eau ultra-pure à 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Après solubilisation totale, 20  $\mu$ L d'étalon interne (myo-inositol à 1 mg.mL<sup>-1</sup>) sont ajoutés et l'ensemble est mis à évaporer. Après évaporation complète, la méthanolyse est effectuée pendant 4 heures à 100 °C après ajout de 500  $\mu$ L de MeOH/HCI 3N. Il est important de noter que, pour la poudre d'algue, il reste après méthanolyse des particules algales en

suspension, ce qui montre que toute l'algue n'a pas été hydrolysée.

Le méthanolysat est ajusté à pH 6-7 par ajout de carbonate d'argent et les éventuelles osamines (sucres aminés) sont N-acétylées par ajout d'anhydride acétique (24 heures à l'obscurité, à température ambiante).

Après élimination du chlorure d'argent formé, les méthylglycosides sont triméthylsilylés pendant 3 heures en présence de pyridine et de Sylon, afin de les rendre plus volatiles et plus résistants à la température. Les méthylglycosides triméthylsilylés sont alors amenés à sec sous courant d'azote, puis repris dans du dichlorométhane. Cette solution est ensuite filtrée (0,45 µm) pour être analysée en CPG.

#### · Identification et quantification par CPG

L'analyse est effectuée par un chromatographe (HP-6890, Hewlett-Packard) équipé d'un injecteur direct (injection « on-column »). Un volume de 1 µL d'échantillon est injecté (température de 50 °C dans la chambre d'injection). La colonne est une colonne apolaire en silice fondue (CP-Sil-5CB, Chrompack). L'élution des composés est effectuée selon 3 gradients de températures (Tableau XI). En sortie de colonne, les composés volatils sont entraînés dans un courant d'hélium vers un détecteur à ionisation de flamme (DIF) dont la température est de 300 °C, celui-ci est relié à un système d'acquisition et de traitement du signal (logiciel HP). Le chromatogramme de l'échantillon est interprété à partir des chromatogrammes obtenus pour chaque standard, les pics sont alors identifiés selon leur temps de rétention. L'étalon interne permet de donner un coefficient de réponse à chaque standard, ce coefficient est appliqué à chaque espèce détectée, ce qui permet de la quantifier. Les résultats sont exprimés par rapport au poids sec de l'échantillon (%) et aussi en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S.

	Temps (min)Température(s) (°C)	
1.	1	50 °C
2.	3,5	+ 20 °C / min jusqu'à 120 °C
3.	60	+ 2 °C / min jusqu'à 240 °C
4.	4	+ 10 °C / min jusqu'à 280 °C
5.	10	280 °C

Tableau XI : analyse des résidus glycosidiques par CPG. Gradients de températures appliqués

#### V.5.3. Détermination des masses molaires moyennes des polysaccharides

La masse molaire moyenne des polysaccharides est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute performance, également appelée High-Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC), selon le protocole de Chopin *et al.* (Chopin *et al.*, 2015). Le système chromatographique d'analyse est constitué par une chaîne HPLC Shimadzu Prominence <sup>™</sup>. L'analyse est effectuée sur des échantillons lyophilisés (surnageants) préalablement solubilisés à 2 mg.mL<sup>-1</sup> dans de l'eau ultra-pure. Les échantillons sont filtrés (0,45 µm) avant injection (100 µL).

Le principe de l'HPSEC repose sur la séparation des composés en fonction de leur taille ou plus précisément de leur volume hydrodynamique (prise en compte de la conformation spatiale des molécules). Les molécules sont éluées dans une colonne remplie d'une phase stationnaire. Plus les molécules sont petites plus elles pénètrent dans cette phase, elles seront donc éluées en dernier avec un temps de rétention plus long, c'est l'inverse pour les grosses molécules. Les colonnes utilisées pour l'analyse sont : la précolonne servant à préserver l'intégrité de la colonne (Aquagel PL Aquagel-OH-Mixte 8 µm ; 7,5 x 50 mm ; Agilent) et la colonne (PL Aquagel-OH-Mixte 8 µm ; 7,5 x 300 mm ; Agilent) dont le domaine de séparation est compris entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>7</sup> g.mol<sup>-1</sup>. Les molécules sont éluées par un tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M contenant 0,03 % d'azoture de sodium, le débit d'élution pour cette phase mobile est de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

En sortie de colonne, une triple détection est réalisée par : un détecteur UV (Shimadzu,  $\lambda$  : 280 nm), suivi d'un détecteur à diffusion de lumière (Dawn Heleos II <sup>TM</sup>, Wyatt Technology.Inc) encore appelé Multi-Angle Light Scattering (MALS) puis d'un détecteur réfractométrique (RI) (Optilab <sup>TM</sup>, Wyatt Technology.Inc). Le traitement des données recueillies est effectué à l'aide du logiciel Astra<sup>TM</sup> version 6.1.2.84, les masses molaires moyennes des polysaccharides sont ainsi déterminées (incrément d'indice de réfraction utilisé pour les calculs dn/dc = 0,145 mL.g<sup>-1</sup>).

Les résultats sont exprimés en masse molaire moyenne en poids (Mw), l'indice de polydispersité ( $I_p$ ) est également indiqué, il permet d'estimer la distribution et la dispersion des masses molaires. Il s'agit du rapport de la masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ) et de la masse molaire en nombre (Mn).

#### V.6. Analyse qualitative et quantitative des acides aminés

L'analyse de la composition en acides aminés a été effectuée sur des échantillons lyophilisés dans deux laboratoires différents : au laboratoire BIORAF<sup>he</sup> et en sous-traitance auprès de la société InVivo Labs (www.invivo-labs.com). Il sera précisé dans les résultats par quel laboratoire l'analyse a été effectuée. Pour chacun des échantillons l'analyse est effectuée une fois.

#### V.6.1. InVivo Labs : Règlement (CE) N° 152/2009

L'analyse qualitative et quantitative de la composition en acides aminés est effectuée par le laboratoire InVivo Labs selon la méthode préconisée dans le règlement européen 152/2009 du 27/01/2009 portant sur la « fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux ».

Cette méthode permet la détection de la quasi totalité des acides aminés, après hydrolyse acide de l'échantillon (HCl 6M, 23 heures) en présence de phénol. Les acides aminés sont analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

En revanche, pour la détection du tryptophane total, l'hydrolyse de l'échantillon est effectuée en milieu alcalin (solution Ba(OH)<sub>2</sub> saturée, 110 °C, 20 heures). En effet le tryptophane est dégradé lors de l'hydrolyse acide. L'analyse est également réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La recherche du tryptophane total a été effectuée uniquement sur la poudre d'algues de 2013. À notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de travaux récents sur l'analyse de la composition en acides aminés issus de la biomasse (tryptophane inclus) pour l'algue rouge *Grateloupia turuturu*.

Les acides aminés pouvant être détectés par le laboratoire InVivo Labs sont indiqués dans le Tableau XII ; ils sont au nombre de 18 en incluant le tryptophane. Il faut noter que les analogues hydroxylés des acides aminés (hydroxyproline et hydroxylysine) ne sont pas dosés, de même que la glutamine et l'asparagine qui sont convertis en acide glutamique et en acide aspartique lors de l'hydrolyse acide.

#### V.6.2. Laboratoire Bioraf<sup>he</sup> : EZ:fasst<sup>™</sup>

L'analyse qualitative et quantitative de la composition en acides aminés est effectuée, après hydrolyse acide des échantillons, selon le protocole du kit EZ:faast™ (EZ:faast GC-FID Protein Hydrolysate Kit), utilisé au laboratoire. Ce kit est commercialisé par Phenomenex<sup>®</sup>. Il présente l'avantage d'être rapide (moins de 20 minutes/échantillon) et contient l'ensemble des réactifs permettant la préparation de l'hydrolysat, la dérivation des acides aminés et leur analyse en chromatographie phase gazeuse (CPG) sur une colonne (Zebron ZB-AAA GC column, Phenomenex<sup>®</sup>) également fournie dans le kit EZ:faast<sup>™</sup>.

Dans un premier temps, l'échantillon (± 10 mg) est hydrolysé dans une ampoule scellée en présence d'HCl 6M (200 µL), à chaud (110 °C), pendant 18 heures. L'échantillon hydrolysé est ensuite ramené à sec sous courant d'azote, puis dilué dans 2,5 mL d'eau ultrapure. À partir de cette dilution, la procédure indiquée dans le kit EZ:faast™ est suivie (ajout d'une quantité connue d'étalon interne, séparation sur résine, dérivation des acides aminés, extraction en phase organique des acides aminés dérivés). La phase organique (supérieure) contenant les acides aminés dérivés est analysée en CPG (Perkin Elmer AUTOSYSTEM XL GC), 2 µL sont injectés. Les composés sont élués de la colonne (Zebron ZB-AAA GC column, Phenomenex<sup>®</sup>) selon un gradient de température de 32 °C / minute (de 110 °C à 320 °C). En sortie de colonne, les composés volatils sont entraînés dans un courant d'hélium vers un détecteur à ionisation de flamme (DIF) dont la température est de 320 °C.

Les chromatogrammes sont intégrés et interprétés à l'aide du logiciel Galaxie Chromatography Data System (V1.9.3.2 ; Varian). Les acides aminés sont identifiés d'après leurs temps de rétention et quantifiés grâce aux courbes d'étalonnage. Les résultats sont exprimés par rapport au poids sec d'échantillon (%).

Les acides aminés pouvant être détectés par la méthode EZ:faast sont indiqués dans le Tableau XII, ils sont au nombre de 16. Par rapport au dosage avec InVivo Labs, l'arginine et le tryptophane ne sont pas dosés. Il faut noter que l'analogue hydroxylé de la proline, l'hydroxyproline (Hyp), est dosé et pris en compte dans les acides aminés totaux. Dans les deux méthodes, la glutamine et l'asparagine ne sont pas détectés car convertis en acide glutamique et aspartique.

	InVivo Labs	BIORAF <sup>he</sup> (EZ:Faast)
Cyst(é)ine (Cys)	Х	Х
Méthionine (Met)	х	Х
Lysine (Lys)	Х	Х
Thréonine (Thr)	Х	Х
Alanine (Ala)	Х	Х
Arginine (Arg)	Х	-
Acide aspartique (Asp)	Х	Х
Asparagine (Asn)	-	-
Acide glutamique (Glu)	Х	Х
Glutamine (Gln)	-	-
Glycine (Gly)	Х	Х
Histidine (His)	Х	Х
Isoleucine (Ile)	Х	Х
Leucine (Leu)	Х	Х
Phénylalanine (Phe)	Х	Х
Proline (Pro)	Х	Х
Serine (Ser)	х	Х
Tyrosine (Tyr)	х	Х
Valine (Val)	х	Х
Tryptophane (Try)	X*	-

Tableau XII : capacité de détection par les deux laboratoires des 20 acides aminés présents chez tous les êtres vivants

\* : avec hydrolyse en milieu alcalin

X : détecté - : non détecté

#### V.6.3. Expression des résultats

Les résultats sont également exprimés en terme de rendement d'extraction par rapport aux acides aminés présents dans l'algue, selon le même raisonnement que pour le carbone et l'azote. Le rendement d'extraction des acides aminés (RS<sub>aa</sub>) dans la fraction soluble est alors calculé selon l'Equation 7, et exprimé en pourcentage par rapport aux acides aminés présents dans l'algue (AA<sub>algue</sub>).

$$RS_{aa} = \frac{AA_{S} M_{liq}}{AA_{algue}}$$
 Equation 7

Avec, M<sub>liq</sub>: le pourcentage de matière liquéfiée, AA<sub>s</sub>: le pourcentage d'acides aminés présents dans l'échantillon (surnageant lyophilisé) et AA<sub>algue</sub>: le pourcentage d'acides aminés dosés dans l'algue sèche.

Pour certains échantillons, le dosage a également été effectué sur le culot (fraction insoluble) (RC<sub>aa</sub>), la même équation a été appliquée, en remplaçant le pourcentage de matière liquéfiée (M<sub>liq</sub>) par le pourcentage de matière non solubilisée (M<sub>c</sub>) et le pourcentage d'acides aminés dans le surnageant (AA<sub>s</sub>) par le pourcentage d'acides aminés dosés dans le culot (AA<sub>c</sub>). Ceci permet d'obtenir la répartition, entre culot et surnageant, des acides aminés de l'algue.

Sur le plan qualitatif, chaque acide aminé détecté et quantifié a également été ramené à la totalité des acides aminés dosés dans l'échantillon, un pourcentage relatif de chaque acide aminé est ainsi calculé.

#### V.7. Détermination de la teneur en R-phycoérythrine

#### V.7.1. Concentration (mg.mL<sup>-1</sup>)

La détermination de la concentration en R-PE dans les différentes fractions solubles obtenues est effectuée par spectrophotométrie (Shimadzu UV-1800, UV-VIS Spectrophotometer). Les mesures ont été effectuées tous les nm, de 200 à 800 nm, à température ambiante, dans des cuves UV (Cuve-UV semi-micro, BRAND<sup>®</sup>).

La R-PE possède trois pics d'absorption caractéristiques, à 498 nm, 540 nm et 565 nm (Figure 34). L'allure du spectre d'absorption est également un outil permettant d'évaluer le niveau de préservation de la R-PE (D'Agnolo *et al.*, 1993; Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Munier *et al.*, 2014).



Figure 34 : Exemple d'un spectre d'absorbance caractéristique de la R-PE. Extrait obtenu par extraction conventionnelle dans du tampon phosphate (dilution 1/5).

L'absorbance du pic à 565 nm est retrouvée dans l'équation de Beer et Eshel (1985) (Beer et Eshel, 1985) qui est utilisée, au laboratoire, pour le calcul de la concentration en R-PE (Equation 8).

$$[R - PE] = [(A_{565} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0.20] \cdot 0.12$$
 Equation 8

Avec, [R-PE] : concentration en R-PE (mg.mL<sup>-1</sup>) ;  $A_{565}$  : absorbance à 565 nm;  $A_{592}$  : absorbance à 592 nm et  $A_{455}$  : absorbance à 455 nm.

#### V.7.2. Rendement d'extraction

La teneur en R-PE est exprimée en mg.g<sup>-1</sup> d'algue sèche (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) d'après l'Equation 9. Ce rendement d'extraction par rapport à l'algue sèche ( $R_{R-PE}$ ) permet de comparer la quantité de R-PE extraite quel que soit le procédé et les conditions d'extraction. Il permet également la comparaison avec les travaux de la littérature.

$$R_{R-PE} = \frac{\frac{[R-PE]}{m} \cdot M}{MS}$$
 Equation 9

Avec,  $R_{R-PE}$ : rendement d'extraction de la R-PE (mg.g<sup>-1</sup> Alg .S); [R-PE]: concentration en R-PE (mg.mL<sup>-1</sup>); m : masse d'1 mL d'extrait ou du surnageant (g); M : masse d'extrait ou de surnageant (ramené par rapport au volume total de mélange réactionnel) (g); MS : masse

d'algue sèche (g)

#### V.7.3. <u>Stabilité de la R-PE à différentes températures</u>

L'étude de stabilité de la R-PE à différentes températures a été effectuée à partir d'un extrait aqueux obtenu selon le procédé d'extraction conventionnel des composés hydrosolubles (Chapitre 2, III., p. 93). L'extrait est réparti dans des tubes (4 séries de 15 tubes, n=3), placés à l'obscurité, à différentes températures : 4 °C, 25 °C, 30 °C et 40 °C. L'étude est effectuée sur 360 minutes, des mesures de la concentration en R-PE ([R-PE] en mg.mL<sup>-1</sup>) sont faites pour l'extrait initial, et après 30, 70, 120, 240 et 360 minutes. Les résultats sont ramenés en R<sub>R-PE</sub> (mg.g<sup>-1</sup> MS). Ces résultats sont ensuite rapportés par rapport à la teneur en R-PE de l'extrait initial afin de déterminer, pour chaque temps, un pourcentage de R-PE préservée, selon l'Equation 10.

$$R - PE_{préservée} = \frac{R_{R-PE, T_x}}{R_{R-PE, initial}} . 100$$
 Equation 10

Avec,  $R_{R-PE, initial}$ : rendement d'extraction de la R-PE de l'extrait initial (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S);  $R_{R-PE,Tx}$ : le rendement d'extraction de la R-PE au temps X pour la température considérée

#### V.8. Détermination de la teneur en lipides totaux

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch *et al.* (Folch *et al.*, 1957). Il s'agit d'une extraction solide-liquide, à froid, par un mélange de solvant chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Le chloroforme permet d'extraire les lipides apolaires et le méthanol les lipides polaires. Les extractions sont effectuées en triplicat sur la poudre d'algue obtenue par cryobroyage (assimilée à une poudre d'algue sèche).

Dans un erlenmeyer, 1 g de la poudre d'algue est préalablement réhydratée par ajout de 3 volumes d'eau. L'extraction est ensuite effectuée par ajout de 20 volumes de la solution chloroforme/méthanol (2/1), pendant 1 heure. Les composés solides, non lipidiques et non solubilisés par le mélange chloroforme/méthanol, sont éliminés par filtration sous vide sur verre fritté. Le filtrat est ensuite transféré dans une ampoule à décanter, dans laquelle est ajoutée une solution de NaCl à 2 %, à raison de 0,2 volume par rapport au volume total de chloroforme/méthanol utilisé. L'ampoule est agitée à plusieurs reprises, puis la décantation est effectuée à température ambiante jusqu'à la formation de deux phases bien distinctes. La phase inférieure (organique) contenant les lipides est récupérée dans un ballon

préalablement taré, le solvant est ensuite éliminé par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor Heidolph 94200 Bioblock Scientific – pompe Julabo F10 AESLaboratoire). Le ballon est placé sous un courant d'azote pour éliminer toute trace résiduelle de solvant, il est ensuite pesé. La teneur en lipides est calculée par méthode gravimétrique et exprimée en pourcentage d'algue sèche (% Alg.S). L'extraction est effectuée en triplicat.

#### V.9. Détermination de la teneur en chlorure

La teneur en chlorure est basée sur le dosage des ions chlorures par argentimétrie, au moyen d'un analyseur automatique des chlorures (Chlorimètre Modèle 926, Corning) (Navarro *et al.*, 2007). Le principe est basé sur la précipitation des ions chlorures (Cl<sup>-</sup>) en présence d'ions argent (Ag<sup>+</sup>) sous forme de chlorure d'argent (AgCl). Lorsque l'ensemble des ions Cl<sup>-</sup> ont précipités, les ions Ag<sup>+</sup> se trouvent alors libres en solution et induisent un changement de conductivité de la solution. Ce changement est détecté automatiquement par l'analyseur et le résultat est affiché. Le dosage est effectué en triplicat sur la poudre d'algue (2013 et 2014) obtenue par cryobroyage (assimilée à une poudre d'algue sèche).

Préalablement à l'analyse, 2 g d'échantillon sec (m) sont dilués dans 150 mL d'eau ultra-pure, l'ensemble est broyé (Ultra Turrax<sup>®</sup> IKA<sup>®</sup> T18 Basic). La solution obtenue est portée à ébullition pendant 10 minutes. Après refroidissement elle est homogénéisée puis filtrée sur laine de verre, la verrerie et la laine de verre sont rincés à l'eau ultra-pure pour avoir un volume final de 200 mL. Le dosage est effectué sur 0,5 mL de filtrat. Une solution standard de NaCl à 200 mg.L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup> est utilisée pour calibrer le chlorimètre. Le dosage est réalisé en triplicat.

Le chlorimètre donne une valeur de concentration en ions chlorure en mg.L<sup>-1</sup>. Cette valeur est ramenée en g de NaCl pour 100 g d'échantillon sec en utilisant l'Equation 11, en faisant l'hypothèse que les ions chlorures sont majoritairement associés au chlorure de sodium de l'eau de mer (le Cl<sup>-</sup> et le Na<sup>+</sup> étant les ions majoritairement présents).

$$[NaCI] = \frac{N}{m} \cdot 2 \cdot 1,6482 \cdot 10^{-2}$$
 Equation 11

Avec, N : la concentration en Cl<sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>), m : la masse d'échantillon (en g) et 1,6482 correspond au rapport de la masse molaire du NaCl sur la masse molaire du Cl.

## VI. Observations par microscopie optique

Des observations par microscopie optique ont été réalisées pour les trois procédés développés dans cette étude (EAE, UAE et UAEH). Des prélèvements (non centrifugés) dédiés à la microscopie ont été effectués à T 0 min, 180 min et 360 min, afin de comparer l'aspect des morceaux de thalle d'un procédé à l'autre et au cours du temps. L'aspect de la fraction solubilisée (présence de particules en suspension ou non) est également observée.

Après homogénéisation du prélèvement, une goutte est disposée entre lame et lamelle, l'ensemble est placé sous le microscope. Ce dernier est équipé d'une caméra permettant la prise de photos (EVOS<sup>®</sup> XL Core Cell Imaging System). Les observations sont effectuées successivement avec deux objectifs : x 10 et x 100 (objectif à immersion), avec un oculaire x 10, d'où un grossissement final de G x 100 et G x 1000. Pour chaque objectif et chaque prélèvement, 5 à 10 photos sont prises, les plus représentatives de l'ensemble du prélèvement ont été sélectionnées pour illustration.

### **VII. Outils statistiques**

#### VII.1. Expression et analyse des résultats

Les moyennes et écarts types sont donnés pour chaque résultat. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque expérimentation. Certaines analyses n'ont pas été effectuées en triplicat, pour des raisons techniques et/ou économiques, ceci est précisé dans les résultats.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Sigmastat 3.1. La comparaison de deux échantillons a été effectuée avec un t-test (p < 0,05). Des analyses de variance à un facteur ont été effectuées (One-Way ANOVA) pour la comparaison de plus de deux échantillons. La mise en évidence des différences entre échantillons a ensuite été réalisée en appliquant le test de comparaison multiple de Holm-Sidak. Les différences sont considérées comme significatives pour une valeur de p inférieure à 0,05.

# VII.2. Optimisation du procédé d'UAEH : méthodologie des plans d'expériences

#### VII.2.1. Principe de la méthodologie des plans d'expériences

La méthodologie des plans d'expériences a été développée par les sciences agronomiques pour aider à organiser et choisir les essais lorsque le nombre de paramètres étudiés est important (Goupy, 1996).

Sur le plan de la terminologie, la grandeur d'intérêt est généralement notée *y*, elle est appelée réponse. Les variables étudiées et qui peuvent modifier cette réponse sont appelées facteurs (k), ces facteurs pourront prendre différentes valeurs appelées niveaux (Goupy, 2013). La méthodologie des plans d'expériences est un outil qui vise à aider l'expérimentateur dans le choix des expériences à réaliser. Pour se faire, les niveaux de tous les facteurs vont varier conjointement, ce qui présente différents avantages (Goupy, 1996) :

- diminution du nombre d'essais
- nombre d'essais raisonnable pour un plus grand nombre de facteurs étudiés
- détection des interactions entre facteurs
- modélisation des résultats
- précision des résultats améliorée
- optimisation des résultats

Les plans d'expériences permettent donc la recherche de l'efficacité maximale avec un nombre d'expériences minimum, d'où un gain de temps et une réduction du coût des essais (Goupy, 2013).

Suite aux premiers résultats obtenus et présentés dans les chapitres III et IV, le procédé d'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH) a été retenu. L'objectif de cette étude est d'utiliser la méthodologie des plans d'expériences comme un outil pour l'optimisation de l'UAEH en terme de liquéfaction de *Grateloupia turuturu* (réponse 1) et d'extraction de la R-PE (réponse 2). Pour ce faire, un plan central composite a été utilisé, ce type de plan est développé selon la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) et permet d'établir des modèles mathématiques polynomiaux du second degré. Depuis une dizaine d'années, l'utilisation de ces plans pour surface de réponse s'est

répandue à l'extraction de composés de différentes biomasses marines, telles que les poissons (Dumay *et al.*, 2009), mollusques (Kechaou *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2015), microalgues (Deenu *et al.*, 2013) et macroalgues (Dumay *et al.*, 2013; Kadam *et al.*, 2015b; Mensi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015a).

Le plan central composite rend possible la modélisation des résultats, selon un modèle quadratique avec interactions. Les facteurs (k) choisis doivent être quantitatifs et maîtrisés précisément, en effet les valeurs des niveaux sont fixées par le plan. Tous les facteurs pour lesquels l'influence quadratique est testée possèdent cinq niveaux (Benoist *et al.*, 1994). Dans le cas d'un plan central composite à trois facteurs (le cas ici), le modèle du second degré s'écrit selon l'Equation 12. Les  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  sont les niveaux des facteurs étudiés, *y* est la réponse ;  $a_0$  est le terme constant (valeur de la réponse au point central) ; les valeurs  $a_1$ ,  $a_2$  et  $a_3$  correspondent aux coefficients du modèle, c'est à dire à l'effet linéaire du facteur 1, 2 et 3 respectivement ; les interactions entre deux facteurs (ordre 2) correspondent aux coefficients  $a_{12}$ ,  $a_{13}$  et  $a_{23}$  ; les coefficients  $a_{11}$ ,  $a_{22}$  et  $a_{33}$  associés aux variables  $x_1^2$ ,  $x_2^2$  et  $x_3^2$  permettent l'étude de l'effet quadratique.

Equation 12

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + a_{33} x_3^2$$

Les plans composites centrés sont constitués de trois parties (Benoist *et al.*, 1994; Goupy, 2013):

- Un plan orthogonal ou plan factoriel avec 2<sup>k</sup> points factoriels (2 niveaux par facteur : 1 et + 1). Il permet l'analyse des interactions entre facteurs et détermine le modèle.
- Un point central du domaine expérimental (0 ; 0 ; 0). C'est le seul point répété, il permet d'estimer la variance de répétabilité du procédé, supposée ensuite constante dans tout le champ expérimental.
- Un ensemble de 2.k points en étoile (2 niveaux par facteur : α et + α), situés à une distance α du centre du domaine.

Le domaine de variation des facteurs va de [-  $\alpha$  ; +  $\alpha$ ] et chaque facteur a 5 niveaux (-  $\alpha$  ; -1 ; 0 ; + 1 ; +  $\alpha$ ) calculés selon le Tableau XIII (Benoist *et al.*, 1994).

Niveaux	Valeurs			
- α	Min			
- 1	$\frac{\textit{Min}+\textit{Max}}{2} - \frac{1}{\alpha}(\textit{Max}-\frac{\textit{Min}+\textit{Max}}{2})$			
0	$\frac{Min + Max}{2}$			
+1	$\frac{\textit{Min}+\textit{Max}}{2} + \frac{1}{\alpha}\left(\textit{Max} - \frac{\textit{Min}+\textit{Max}}{2}\right)$			
+α	Max			
Ici $\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,68$				

Tableau XIII : calcul des valeurs réelles attribuées pour chaque niveau du plan d'expériences

#### VII.2.2. Paramètres étudiés

L'UAEH est le couplage de deux procédés qui possèdent chacun des paramètres influençant leur efficacité. Ils peuvent leurs être communs (température, teneur en eau du mélange,...) ou non (ratio enzymes/substrat, puissance, débit,...). Parmi ces paramètres, appelés facteurs dans le cadre du plan d'expériences, trois d'entre eux ont été retenus :

- la température (T en °C): facteur important dans l'activité des enzymes, elle peut aussi impacter le phénomène de cavitation. De plus, la stabilité de la R-PE à la température est un élément important à prendre en considération.
- le débit (Q en L.h<sup>-1</sup>) : il modifie le temps et la fréquence de passage du mélange dans la sonotrode.
- la puissance (P en W) : elle est liée à l'énergie ultrasonore transmise au mélange réactionnel, ce qui peut impacter l'activité des enzymes et le niveau de déstructuration de la paroi de l'algue.

Les autres facteurs contrôlables, tels que la composition du cocktail enzymatique (Tableau X), la concentration en enzymes et le ratio eau/biomasse sont maintenus constants. Les essais du plan sont menés sur six heures, avec des prélèvements réguliers toutes les 10 minutes la première demi-heure, puis toutes les heures.

Chaque facteur possède cinq niveaux, les niveaux Min (- 1,68) et Max (+ 1,68) sont connus (fixés par les essais préalables et par les contraintes techniques du système). Les valeurs réelles des niveaux normalisés (-1, 0 et +1) sont obtenues sur la base du Tableau
XIII. La valeur réelle attribuée à chaque facteur pour ses 5 niveaux est indiquée dans le Tableau XIV. Pour la puissance, sachant que le réglage du générateur sur 100 % correspond à 400 W et 50 % à 200 W, le générateur est réglé sur 60 % pour 241 W, 75 % pour 300 W et 90 % pour 359 W.

Niveaux	Puissance (W)	Température (°C)	Débit (L.h <sup>-1</sup> )
- 1,68	200	20	65
- 1	241	24	97
0	300	30	145
+ 1	359	36	193
+ 1,68	400	40	225

Tableau XIV : valeur réelle attribuée à chaque niveau pour les trois facteurs étudiés : puissance, température et débit.

Le Tableau XV présente les conditions utilisées pour mailler le domaine expérimental. Un total de N essais avec  $2^k$  point factoriels + 2.k points en étoiles et 5 points centraux va induire la réalisation de 19 essais (N=  $2^k$  + 2.k + 5 = 19). Les cinq répétitions du point central permettent d'estimer l'erreur expérimentale du procédé. La matrice expérimentale est randomisée afin de limiter autant que possible l'influence potentielle de facteurs perturbateurs non maîtrisés tels que l'hygrométrie, la pression atmosphérique, *etc.* (Tableau XV).

Numéro de l'essai	Puissance	Température	Débit
1	+ 1	- 1	- 1
2	0	- 1,68	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	- 1	- 1	+ 1
7	0	+ 1,68	0
8	+ 1	- 1	+ 1
9	0	0	- 1,68
10	- 1	+ 1	+ 1
11	0	0	0
12	- 1	+ 1	- 1
13	0	0	0
14	+ 1	+ 1	+ 1
15	- 1,68	0	0
16	0	0	+ 1,68
17	+ 1,68	0	0
18	+ 1	+ 1	- 1
19	- 1	- 1	- 1

Tableau XV : matrice expérimentale de l'UAEH, pour la puissance, la température et le débit (points centraux)

Les deux réponses étudiées sont la liquéfaction de l'algue ( $M_{liq}$  en %) et le rendement d'extraction de la R-PE ( $R_{R-PE}$  en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Un suivi au cours du temps de ces deux réponses est réalisé permettant ainsi d'observer le comportement cinétique. Les données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus v.5 Experimental Design.

#### VII.2.3. Optimisation

Les résultats expérimentaux issus de ces 19 essais sont saisis dans le logiciel Statgraphics Plus v.5 Experimental Design afin de déterminer les conditions optimales. De nouveaux essais sont réalisés dans les conditions optimales trouvées par le logiciel, en trois répétitions, et les résultats expérimentaux comparés aux résultats prédits par le modèle. Il faut noter qu'après réalisation du plan d'expérience (Chapitre V), il a été observé que les conditions permettant simultanément une liquéfaction maximale de l'algue et une extraction maximale de la R-PE (les deux réponses mesurées) semblaient peu compatibles, ce qui a conduit à la réalisation de deux optimisations séparées :

- une optimisation de la liquéfaction de l'algue
- une optimisation de l'extraction de la R-PE

### Chapitre III

# Étude comparative de trois procédés d'extraction pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* : EAE, UAE et UAEH

#### I. Contexte et objectifs de l'étude

Ce chapitre porte sur l'étude de trois procédés pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* afin d'en extraire le plus de composés. Ces trois procédés sont : l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique (EAE pour enzyme-assisted extraction), l'extraction assistée par ultrasons (UAE pour ultrasound-assisted extraction) et l'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH pour ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis). La nouveauté de ce travail réside dans la recherche de l'intensification de l'hydrolyse enzymatique par couplage simultané avec des ultrasons. Qui plus est, l'essentiel des études utilisant des ultrasons est effectué dans des réacteurs fermés (bains ou sondes à ultrasons) ; cette étude met en œuvre quant à elle un réacteur à ultrasons tubulaire, permettant une sonication homogène et continue du produit. Enfin, la biomasse algale utilisée ici est humide et broyée, c'est à dire relativement peu transformée, contrairement à la majorité des travaux de la littérature qui porte sur des algues séchées pulvérisées (Wang *et al.*, 2015a), broyées (Lee *et al.*, 2013), lyophilisées et broyées (Denis *et al.*, 2009b) ou encore des algues lyophilisées puis cryobroyées (García-Bueno *et al.*, 2014; Munier *et al.*, 2013).

L'objectif de ce chapitre est d'effectuer une étude comparative des différents procédés étudiés en se basant sur la liquéfaction de l'algue et sur la composition biochimique des fractions solubles obtenues. Cette étude devra permettre d'identifier le ou les procédé(s) les plus efficaces, ceux pour lesquels des travaux complémentaires devront être effectués par la suite. Les résultats de ce chapitre ont tous été obtenus à partir des algues collectées en 2013. Les trois procédés et les extractions témoins ont été réalisés sur des algues humides et broyées, à une température de 40 ± 1 °C, à l'obscurité et à un débit de 50 L.h<sup>-1</sup>. Lorsque le procédé étudié nécessitait des ultrasons (UAE et UAEH), le générateur a été réglé sur 100 %, soit 400 W, afin d'évaluer l'effet des ultrasons dans les conditions les plus poussées. Lorsque des enzymes ont été utilisées (EAE et UAEH), 1 % de chaque complexe enzymatique par rapport au poids d'algue humide a été introduit dans le mélange réactionnel. Les extractions ont toutes été conduites pendant six heures, avec des prélèvements réguliers.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Applied Phycology* (Annexe 1, p.261) : Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. Cécile Le Guillard, Jean-Pascal Bergé, Claire Donnay-Moreno, Sandrine Bruzac, Jean-Yves Ragon, Régis Baron, Joël Fleurence, Justine Dumay. 2016. *Journal of Applied Phycology.* 

#### II. Étude biochimique de Grateloupia turuturu

### II.1. Étude des variations annuelles de la composition biochimique : 2013 et 2014

Le Tableau XVI présente la composition proximale de *Grateloupia turuturu* pour les collectes effectuées en 2013 et 2014. Bien que ce chapitre ne porte que sur des algues de 2013, les deux années sont présentées ici afin de pouvoir déterminer si la composition de la biomasse présente des variations d'une année à l'autre, en terme de : matière sèche, cendres, sels (chlorure de sodium), matière azotée (N) et carbonée (C), acides aminés et lipides.

Tableau XVI : composition biochimique proximale de *Grateloupia turuturu* effectuée sur deux années (2013 et 2014). Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à l'algue fraîche (Alg.F) et à l'algue sèche (Alg.S). Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types n=3, sauf pour l'azote, le carbone (n=2) et les acides aminés (n=1).

	Grateloupia turuturu	
	2013	2014
Matière sèche (% Alg.F)	$14,17 \pm 0,10$	14,81 ± 0,10 *
Cendres (% Alg.S)	$30,69 \pm 0,75$	27,46 ± 0,11 *
Chlorure de sodium (% Alg.S)	$16,77 \pm 0,90$	12,44 ± 0,24 *
Azote total (N) (% Alg.S)	$3,62 \pm 0,07$	$4,12 \pm 0,00$
Acides aminés (AA) (% Alg.S)	18,44 (18,68) <sup>a</sup> 12,26 <sup>b</sup>	14,31 <sup>b</sup>
Carbone total (C) (% Alg.S)	29,11 ± 0,53	31,77 ± 0,17
Oses totaux (% Alg.S)	22,40 ± 2,23	17,29 ± 3,09
Lipides totaux (% Alg.S)	3,25 ± 0,6	$3,55 \pm 0,18$

<sup>a</sup> InVivo Labs, <sup>b</sup> Laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

\* Résultats significativement différents (p < 0,05). Pour la teneur en N, C et AA les analyses statistiques n'ont pas été effectuées car n < 3

Si la teneur en matière sèche des algues prélevées en 2014 s'avère légèrement plus élevée que celle des algues de 2013 (14,8 % et 14,2 % Alg.F respectivement, p < 0,05), ces deux valeurs sont globalement très proches l'une de l'autre. En revanche, elles sont différentes de celles précédemment déterminées pour des collectes antérieures effectuées dans la même zone littorale (Figure 35) voire sur le même site (Batz-sur-Mer) : 9,5 % en 2006 à Piriac-sur-Mer (Denis *et al.*, 2010), 12,8 % en 2010 au Croisic et 6,5 % à Batz-sur-Mer (Munier *et al.*, 2013). Des différences non négligeables sont donc constatées pour le

même site de prélèvement (Batz-sur-Mer).

De la même façon, le contenu en minéraux (cendres) varie de façon significative (p < 0,05) entre 2013 (30,7 % Alg.S) et 2014 (27,5 % Alg.S). Des travaux antérieurs font état d'une teneur moyenne en minéraux de 15 % Alg.S : 15,6 % (Batz-sur-Mer), 14,4 % (Le Croisic) (Munier *et al.*, 2013) et 18,5 % (Piriac-sur-Mer) (Denis *et al.*, 2010). Toutefois, dans ces études, les algues ont été rincées à l'eau de mer puis à l'eau distillée, et parfois à l'eau du robinet. Au cours de ces rinçages, sont éliminées de la surface des thalles d'éventuelles traces de sable, de sels mais aussi les exsudats polysaccharidiques excrétés par les algues après collecte (Miller, 2005).



Figure 35 : zone de collecte de *Grateloupia turuturu* pour les études effectuées ces dernières années par le laboratoire MMS. Les sites de collecte sont encadrés. Le site concerné dans ce travail de thèse, Batz-Sur-Mer, est encadré en bleu

Vraisemblablement, les étapes de rinçage contribuent à éliminer certains métabolites de l'algue. Il a en effet été constaté chez *Palmaria palmata*, une perte de différents composés tels que des sels, des protéines et des xylanes lors du rinçage à l'eau distillée (Marrion *et al.*, 2003). Les teneurs en cendres deux fois plus élevées trouvées dans cette étude peuvent donc être expliquées par l'absence de rinçage et par la prédominance du chlorure de sodium, qui représente en moyenne la moitié de la teneur en cendres. Cependant, le rinçage des algues ne serait pas la seule explication possible. En effet, une autre étude réalisée sur des thalles collectés en 2013, à Batz-sur-Mer, a montré une teneur en cendres de 35,3 % Alg.S, soit plus du double qu'en 2010. Dans les deux cas, les algues étaient pourtant rincées. D'après cette étude, les variations observées entre 2010 et 2013, notamment pour les cendres, pourraient être dues à la variabilité des facteurs environnementaux en particulier la durée d'ensoleillement (Munier, 2013). Ici, les algues sont plus riches en sel en 2013 qu'en 2014, ce qui pourrait également être dû à des paramètres environnementaux.

Qu'il s'agisse de la composition en acides aminés (AA) (dosage au laboratoire Bioraf<sup>he</sup>) ou en azote, les algues collectées en 2014 présentent des teneurs un peu plus élevées que celles de 2013 (+ 14,3 % d'N et + 13,8 % d'AA). De précédentes études ont montré qu'en 2006 et 2010 *Grateloupia turuturu* contenait entre 20,3 % et 26,4 % Alg.S de protéines totales (Denis *et al.*, 2010; Munier *et al.*, 2013). La conversion en protéines totales des teneurs en azote, via l'utilisation du facteur N-protéines de 6,25, permet de constater que les algues utilisées dans ce travail de thèse ont une composition protéique similaire à ces études (22,6 % Alg.S en 2013 et 25,8 % Alg.S en 2014). Malgré la variabilité géographique de la composition de cette algue (Munier *et al.*, 2013), des teneurs similaires ont été rapportées en 2012 sur les côtes portugaises (22,5 %) (Rodrigues *et al.*, 2015a). Les résultats portant sur les acides aminés et l'azote total seront détaillés dans les parties suivantes.

Le pourcentage de carbone total est une donnée intéressante car, chez les macroalgues rouges, les polysaccharides représentent de 30 à 70 % du poids sec du thalle et sont donc la principale source de carbone (Kornprobst, 2005). Les autres sources de carbone, protéines et lipides, représentent respectivement chez les macroalgues rouges de 8 à 47 % de la matière sèche (Fleurence, 2004) et de 0,6 à 3,4 % de la matière sèche (Fleurence *et al.*, 1994)

Concernant les teneurs en oses totaux, il n'y a pas de différence significative entre 2013 et 2014, avec respectivement 22,4  $\pm$  2,2 % et 17,3  $\pm$  3,1 % Alg.S. Ces résultats sont

cependant sous-estimés car la méthanolyse n'a pas permis de solubiliser la totalité de la poudre d'algue. C'est ce que confirme une étude récente où la teneur en sucres totaux de *Grateloupia turuturu* a été estimée, par différence, à 43,2 % Alg.S (Rodrigues *et al.*, 2015a). Néanmoins, les valeurs trouvées ici sont comparables à celles obtenues après hydrolyse acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) d'autres espèces de macroalgues rouges, avec des teneurs en sucres totaux comprises entre 16,8 et 27,7 % Alg.S (Diniz *et al.*, 2011).

Le dosage des oses par chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet l'identification des oses en présence, un profil osidique de l'échantillon peut ainsi être établi. Un exemple de chromatogramme obtenu pour la poudre d'algue est présenté dans la Figure 36.



Figure 36 : profil osidique obtenu par chromatographie en phase gazeuse, pour *Grateloupia turuturu* (2014)

La répartition des oses identifiés chez *Grateloupia turuturu* est détaillée dans le Tableau XVII, et révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux années. La prédominance du galactose chez le genre *Grateloupia* est connue et s'explique par la nature de ses polymères, des galactanes sulfatés, composés à 80 % de galactose (Miller, 2005).

	Grateloupia turuturu		
	2013	2014	
Oses totaux (% Alg.S)	22,40 ± 2,23	$17,29 \pm 3,09$	
Xylose (% relatif)	Nd*	1,7	
Galactose (% relatif)	87,5	86,4	
Glucose (% relatif)	12,5	11,9	
Glucose (% relatif)	87,5 12,5	86,4 11,9	

Tableau XVII : teneurs en oses de Grateloupia turuturu, en 2013 et 2014

\* Non détecté

Les teneurs en lipides ne présentent pas non plus de différence significative entre 2013 (3,3 % Alg.S) et 2014 (3,6 % Alg.S), elles sont en accord avec une étude antérieure (3,7 % Alg.S) (Kendel *et al.*, 2013b). Des teneurs plus faibles ont cependant été rapportées en 2006 sur les côtes ligériennes (2,6 % Alg.S) (Denis *et al.*, 2010) et en 2012 sur les côtes portugaises (2,2 % Alg.S) (Rodrigues *et al.*, 2015a).

Il s'avère que, pour les composés étudiés, *Grateloupia turuturu* présente une composition biochimique relativement similaire en 2013 et 2014. De plus, cette composition est en accord avec les résultats retrouvés fréquemment dans la littérature.

#### II.2. Profil en acides aminés de Grateloupia turuturu

Dans la littérature, très peu d'études se sont attachées à déterminer la composition en acides aminés de cette algue (Arasaki et Mino, 1973; Fujiwara-Arasaki *et al.*, 1984). Par ailleurs, ces travaux présentent uniquement la composition en acides aminés des protéines extraites en milieu alcalin (NaOH). Or, ici l'analyse des acides aminés a été réalisée après hydrolyse acide de l'algue brute (poudre d'algue), ce qui ne permet pas la comparaison des résultats, mais aboutit à des données originales enrichissantes. La Figure 37 est un exemple de profil d'acides aminés obtenu par CPG.

Chapitre III : Étude comparative de trois procédés d'extraction pour la liquéfaction de Grateloupia turuturu : EAE, UAE et UAEH



Figure 37 : profil des acides aminés obtenu par chromatographie en phase gazeuse (analyse réalisée au laboratoire Bioraf<sup>he</sup>) pour *Grateloupia turuturu* 2014. (E.I. : étalon interne)

D'après la composition biochimique de *Grateloupia turuturu* (Tableau XVI), le pourcentage d'acides aminés par rapport à la matière sèche de l'algue se situe en 2013, entre 18,4 % (InVivo Labs) et 12,3 % (Laboratoire Bioraf<sup>he</sup>). Il est de 14,3 % en 2014 (Laboratoire Bioraf<sup>he</sup>). Ces valeurs restent dans le même ordre de grandeur que celles trouvées pour d'autres espèces d'algues rouges : de 17,3 à 16,2 % Alg.S pour le genre *Hypnea* (Wong et Cheung, 2000) et 14,4 % Alg.S pour *Palmaria palmata* (Mæhre *et al.*, 2014).

Les profils en acides aminés de *Grateloupia turuturu* sont présentés dans la Figure 38. Quels que soient l'année et le laboratoire d'analyse, deux acides aminés sont majoritaires : l'acide aspartique (Asp) (incluant l'asparagine) et l'acide glutamique (Glu) (incluant la glutamine). Ceci a déjà été démontré pour d'autres espèces d'algues rouges (Diniz *et al.*, 2011; Lourenço *et al.*, 2002; Mæhre *et al.*, 2014; Wong et Cheung, 2000). Ces deux acides aminés pourraient contribuer à la saveur et au goût spécifique des algues. Ils ont même été qualifiés d'« acides aminés Umami », l'Umami étant une des cinq saveurs de base du goût (Peinado *et al.*, 2014).



Figure 38 : profil en acides aminés de *Grateloupia turuturu*. Résultats pour 2013 et 2014 selon le laboratoire d'analyse. L'hydroxylysine (Hyl) n'est pas détectée, l'hydroxyproline (Hyp) est détectée par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>, le tryptophane et l'arginine sont détectés uniquement par InVivo Labs. n=1. AAE : acides aminés essentiels.

Sur un plan qualitatif, cette algue contient tous les acides aminés que l'homme ne peut pas synthétiser, il s'agit d'acides aminés essentiels (AAE). Ces neuf acides aminés essentiels : tryptophane (Try), histidine (His), isoleucine (Ile), leucine (Leu), lysine (Lys), méthionine (Met), phénylalanine (Phe), thréonine (Thr) et valine (Val), sont encadrés sur la Figure 38 (FAO/WHO/UNU, 2007).

Le ratio AAE/AA<sub>détectés</sub> permet d'approfondir l'étude de la qualité nutritionnelle de cette algue. Pour les algues de 2013, il est de 38 % (39 % avec le tryptophane) d'après InVivo Labs et de 45 % d'après le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>. Pour les algues de 2014 il est de 44 % (laboratoire Bioraf<sup>he</sup>). Ces ratios sont proches de celui déjà décrit pour l'algue rouge *Palmaria palmata* (35,8 % Alg.S) (Galland-Irmouli *et al.*, 1999).

Ainsi, comme l'algue rouge *Palmaria palmata, Grateloupia turuturu* présente un intérêt nutritionnel élevé avec une teneur en AAE proche de celle de l'œuf et du soja (Fleurence, 2004; Galland-Irmouli *et al.*, 1999). Cependant, contrairement à *Palmaria palmata,* elle n'est

pas encore autorisée, en France, pour l'alimentation humaine (CEVA, 2014).

#### II.2.1. Comparaison des laboratoires : InVivo Labs et laboratoire Biorafhe

D'après le Tableau XVI, en 2013 InVivo Labs détecte 6,18 % Alg.S d'acides aminés de plus que le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>. Les profils en acides aminés (Figure 38), permettent de mieux comprendre l'origine de cette différence. Ainsi, le tryptophane (Try) et l'arginine (Arg) ont seulement été dosés par InVivo Labs (Figure 38). *Grateloupia turuturu* contient il est vrai peu de tryptophane (0,24 % Alg.S), mais contient 1,44 % Alg.S d'arginine (Arg) qui représente près de 8 % des acides aminés détectés. La non détection de l'arginine par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup> entraîne donc une sous estimation de la teneur totale en acides aminés. De plus, de façon générale, les teneurs en acides aminés sont toujours moins élevées avec le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>, ceci est très marqué pour trois acides aminés en particulier : la tyrosine (Tyr), la lysine (Lys) et la cystéine (Cys).

Ces observations mettent en avant la difficulté de comparer des résultats obtenus avec des méthodes d'analyse différentes. Pour des raisons pratiques et économiques les analyses ont, par la suite, toutes été effectuées au laboratoire Bioraf<sup>he</sup>.

#### II.2.2. Comparaison des années 2013 et 2014 : laboratoire Biorafhe

En 2014, ce sont près de 2 % Alg.S d'acides aminés qui sont détectés en plus par rapport à 2013 (Tableau XVI), ce qui peut s'expliquer par des teneurs plus élevées des deux acides aminés majoritaires (Asp et Glu) (Figure 38) : + 0,4 % Alg.S et + 0,6 % Alg.S respectivement. La différence restante (1 % Alg.S) se répartit sur l'ensemble des acides aminés. Il est possible que ces différences soient liées à des facteurs environnementaux tels que la lumière, la salinité, la disponibilité de l'azote, la température,... qui sont connus pour influencer la composition des algues, notamment en acides aminés (Conde *et al.*, 2013; Galland-Irmouli *et al.*, 1999).

#### II.3. Réflexion sur la détermination du facteur de conversion N-protéines

Forts des résultats obtenus précédemment (Tableau XVI), il est désormais possible de calculer le facteur de conversion Azote - Protéines (N-Prot) spécifique à *Grateloupia turuturu*. Ce facteur sert à convertir la teneur en azote total d'un échantillon (déterminé par la méthode de Kjeldahl ou par analyse élémentaire) en protéines totales. Il a été établi pour la première fois par Jones en 1931 (Jones, 1931) et il est très largement employé quelle que soit la biomasse. Il a été déterminé sur la base de deux hypothèses : les protéines contiennent en

général 16 % d'azote, d'où un N-Prot de 6,25 (100/16), et la quantité d'azote non protéique est négligeable. Des études ont déjà déterminé des facteurs spécifiques pour des microalgues (Lourenço *et al.*, 1998) et différentes espèces de macroalgues rouges, vertes et brunes (Diniz *et al.*, 2011; Lourenço *et al.*, 2002), mais il n'a jamais été déterminé pour *Grateloupia turuturu*.

Le Tableau XVIII présente les N-Prot calculés (rapport de la teneur en acides aminés sur la teneur en azote total), en 2013 et 2014, pour les deux laboratoires d'analyse des acides aminés. Les algues de 2014 n'ont pas été analysées par le laboratoire InVivo Labs d'où l'absence de N-Prot.

Tableau XVIII : facteurs de conversion azote-protéines (N-Prot) déterminés pour *Grateloupia turuturu* (2013 et de 2014)

	2013	2014	
InVivo Labs	5,09 (5,16)*	/	
Laboratoire Bioraf <sup>he</sup>	3,39	3,47	

()\* en incluant le tryptophane

Quels que soient l'année et le laboratoire d'analyse, les facteurs N-Prot calculés ici pour *Grateloupia turuturu* sont inférieurs à 6,25 (Tableau XVIII). En effet, les algues contiennent de l'azote non protéique (pigments et azote inorganique), ce qui explique ces plus faibles valeurs (Lourenço *et al.*, 2002). Un facteur N-Prot de 4,92  $\pm$  0,59 a ainsi été établi pour les macroalgues (Lourenço *et al.*, 2002). Des facteurs spécifiques à chaque *phylum* ont également été déterminés : 5,38  $\pm$  0,50 pour les macroalgues brunes, 5,13  $\pm$  0,39 pour les macroalgues vertes et 4,59  $\pm$  0,54 pour les macroalgues rouges (Lourenço *et al.*, 2002). Tous phyla confondus il s'avère que pour les algues, l'azote non protéique représente en moyenne 24,2 % de l'azote total (Diniz *et al.*, 2011). Chez les macroalgues rouges l'azote non protéique peut même représenter jusqu'à 30,5 % de l'azote total (Diniz *et al.*, 2011). Fort logiquement, InVivo Labs quantifiant plus d'acides aminés, le facteur de conversion correspondant est plus élevé que celui établi à partir des analyses du laboratoire Bioraf<sup>the</sup>, avec respectivement 5,09 et 3,39 hors tryptophane.

Si le tryptophane est pris en compte, ce facteur N-Prot s'établit alors à 5,16 et semble spécifique à *Grateloupia turuturu* collectée en 2013 (Tableau XVIII). Il conviendrait néanmoins de procéder à la validation de ce facteur de conversion en multipliant les analyses d'acides aminés à l'aide du protocole le plus exhaustif, et en étudiant

l'éventuel effet de la variabilité saisonnière.

Depuis plus de dix ans, la surestimation des teneurs en protéines totales des algues a été démontrée et des facteurs spécifiques calculés. Néanmoins, ils ne sont jamais utilisés dans la littérature, le facteur décrit par Jones (6,25) leur est préféré. La multiplication des facteurs N-Prot pourrait complexifier les comparaisons entre études. Pour y remédier, il faudrait indiquer : le pourcentage d'azote total et/ou les acides aminés totaux, la teneur en protéines calculée avec le facteur 6,25 et avec un facteur plus adapté (au phylum ou à l'espèce). Pour les algues, l'utilisation de facteurs N-Prot spécifiques, du moins au phylum, devrait être encouragée.

#### III. Liquéfaction de l'algue par EAE, UAE et UAEH

#### III.1. Comparaison des trois procédés : EAE, UAE et UAEH

Les cinétiques de liquéfaction de *Grateloupia turuturu* au cours du temps, obtenues avec les trois procédés, sont comparées avec celle du Témoin et présentées sur la Figure 39.



Figure 39 : cinétiques de liquéfaction pour les trois procédés étudiés et la condition témoin, à 40 °C. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3

Quelles que soient les conditions expérimentales, une augmentation régulière de la liquéfaction est observée avec néanmoins des allures différentes selon le procédé (Figure 39).

En l'absence d'enzymes et d'ultrasons (Témoin), la liquéfaction de l'algue augmente progressivement à partir de 120 minutes pour atteindre, après 360 minutes, une valeur de 8  $\pm$  1 %. L'ajout d'enzymes (EAE), accélère et augmente de façon conséquente la liquéfaction, conduisant à un doublement du gain par rapport au Témoin en fin d'expérimentation (19  $\pm$  1 %). Cette évolution est encore plus marquée en présence d'ultrasons seuls (UAE), avec un gain de liquéfaction de 26,9  $\pm$  6 % atteint après six heures de traitement. Par ailleurs, les ultrasons semblent accélérer le processus de liquéfaction puisque trois heures suffisent pour atteindre la valeur obtenue en six heures avec les enzymes seules (EAE).

Lorsque les enzymes et les ultrasons sont appliqués simultanément (UAEH), la cinétique de liquéfaction est encore différente. Ainsi, une forte et rapide augmentation est constatée sur les trois premières heures, elle est plus modérée l'heure qui suit, pour ensuite tendre vers un plateau à partir de quatre heures. Sur ces trois dernières heures, le gain de liquéfaction est en moyenne de  $40 \pm 1$  %. Une heure d'un tel traitement suffit pour atteindre 20 % de gain de liquéfaction, valeur obtenue en quatre heures de traitement par l'UAE et jamais atteinte avec l'EAE ou le Témoin.

En terme d'efficacité, il est possible de hiérarchiser les traitements étudiés ici : Témoin < EAE < UAE < UAEH. Les complexes enzymatiques utilisés s'avèrent donc moyennement efficaces dans ces conditions, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de leur absence de spécificité et de la basse température utilisée ici (40 °C), assez éloignée de leur optima (Tableau X). Le traitement aux ultrasons s'avère plus performant, permettant d'atteindre une meilleure liquéfaction de l'algue. Cette observation a déjà été faite pour l'alque brune *Ecklonia cava*. En effet, les ultrasons ont permis de diviser par 4 la durée de l'extraction par rapport à la méthode conventionnelle (Lee et al., 2013). Néanmoins, c'est sans conteste l'utilisation combinée des enzymes et des ultrasons qui est de loin la plus efficace. Le gain de temps constaté grâce à ce couplage, a déjà été démontré pour l'extraction de composés issus de baies de Goji (Liu et al., 2014) et de l'algue rouge Palmaria palmata (Peña-Farfal et al., 2005). Il pourrait s'expliquer, en partie, par une synergie enzymes-ultrasons, comme cela a déjà été décrit sur d'autres biomasses végétales pour l'extraction de polysaccharides et de sucres réducteurs (Easson et al., 2011; Wu et al., 2014). En effet, à 120 minutes, le gain de liguéfaction combiné de l'EAE et de l'UAE atteint 24 % contre 31 % pour l'UAEH. Ces résultats laissent supposer un effet synergique, dans

ces conditions, entre enzymes et ultrasons.

<u>Remarque</u> : un suivi du pH a permis de constater sa relative stabilité au cours du temps, avec au maximum une augmentation de 0,5 unité. Par ailleurs et à titre indicatif, pour les procédés UAE et UAEH la puissance délivrée au mélange varie entre 300 et 340 W (prise en compte du rendement de l'ordre de 85 % du SONITUBE<sup>®</sup>). L'énergie apportée au mélange réactionnel après 6 heures de sonication était donc comprise entre 1800 et 2040 W.h (soit 6480 à 7344 kJ). En ramenant au poids de mélange réactionnel initial (± 3,3 kg) cela correspond à une énergie apportée par kilogramme comprise entre 545 et 618 W.h.kg<sup>-1</sup>. En considérant les prélèvements effectués au cours des essais, environ 19 % du volume initial est soutiré, le poids final de mélange était donc d'environ 2,7 kg, soit une énergie apportée par kilogramme légèrement plus importante et comprise entre 670 et 760 W.h.kg<sup>-1</sup>.

La Figure 40 représente le pourcentage final (après six heures) de composés solubilisés pour les trois procédés et le Témoin. Par rapport au Témoin (54,60 ± 1,09 %), les trois procédés (EAE, UAE et UAEH) permettent d'augmenter le taux final de composés présents en solution, avec respectivement : 71,36 ± 0,80 % ; 73,72 ± 0,54 % et 90,71 ± 0,13 %. La différence observée entre l'EAE et l'UAE est cependant faible. Ces valeurs finales sont cohérentes avec les cinétiques de gain de liquéfaction décrites précédemment (Figure 39).



Figure 40 : pourcentages de matière liquéfiée après 360 minutes pour les trois procédés d'extraction (EAE, UAE et UAEH) et la condition témoin. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les lettres différentes indiquent une différence significative avec p < 0,05

Cette augmentation de la liquéfaction, par hydrolyse enzymatique (polysaccharidases ou protéases industrielles), a été décrite en 2010 pour l'algue rouge Palmaria palmata. Parmi les enzymes testées, une protéase (Umamizyme) a permis d'atteindre le plus haut rendement d'extraction des composés de cette algue (76 %), suivie par deux polysaccharidases (68 % pour Ultraflo<sup>®</sup> et 66 % pour Celluclast<sup>®</sup>) (Wang et al., 2010). Les 71,36 % trouvés ici sont du même ordre de grandeur que les valeurs atteintes dans cette étude. En ce qui concerne Grateloupia turuturu, des travaux précédents sur des algues broyées après séchage ou lyophilisation ont montré que des polysaccharidases, spécifiques aux algues (Denis et al., 2009d) ou commerciales (Denis et al., 2009b), induisaient la dégradation du thalle et la production d'oligosaccharides. À l'issue de ces travaux, les auteurs recommandent l'utilisation d'une cellulase pour hydrolyser cette algue. Néanmoins, il a été récemment montré que l'extraction des protéines d'une autre algue rouge, Palmaria palmata, par une xylanase était tout aussi efficace sur une biomasse humide grossièrement broyée (Dumay et al., 2013). Le pourcentage de matière en solution observé ici à l'aide du cocktail enzymatique (71,36 %, Figure 40) démontre la faisabilité de l'hydrolyse enzymatique de Grateloupia turuturu humide et broyée.

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est développée depuis plusieurs dizaines d'années sur des biomasses végétales diverses (Mason *et al.*, 2011; Vinatoru *et al.*, 1997). En revanche, sur les macroalgues cette technologie est relativement nouvelle. Les travaux sont donc peu nombreux et récents.

Par exemple, en 2015, une étude s'est intéressée aux rendements d'extraction de la matière sèche, obtenus par EAE et UAE, sur trois macroalgues : une rouge (*Osmundea pinnatifida*), une brune (*Sargassum muticum*) et une verte (*Codium tomentosum*) (Rodrigues *et al.*, 2015b). La comparaison des résultats obtenus par EAE (deux polysaccharidases et deux protéases) et par UAE, a mis en avant de meilleurs rendements pour l'EAE. Ainsi, pour l'algue brune et l'algue verte il faudrait privilégier des polysaccharidases. En revanche, pour l'algue rouge, une cellulase et une protéase s'avèrent intéressantes. Dans les conditions expérimentales de l'étude, l'UAE n'apparaissait pas satisfaisante par rapport à la méthode conventionnelle, avec moins de 50 % des composés d'*Osmundea pinnatifida* solubilisés. *A contrario*, deux autres études ont décrit pour des algues brunes, *Ascophyllum nodosum* (Kadam *et al.*, 2015a) et *Ecklonia cava* (Lee *et al.*, 2013), une augmentation de la solubilisation des composés grâce aux ultrasons. Sous l'action des ultrasons, les composés de l'algue seraient extraits en deux temps. Dans un premier temps, il y aurait solubilisation des composés présents à la surface des thalles puis, dans un deuxième temps, intensification du transfert de matière induisant une meilleure diffusion des composés

matriciels dans le solvant d'extraction (Kadam *et al.*, 2015b). Il apparaît donc que la composition pariétale de l'algue influence fortement les procédés d'hydrolyse enzymatique mais aussi des ultrasons. Concernant l'UAE, il est très difficile de comparer les résultats entre études en raison de la variation de différents paramètres : type de réacteur à ultrasons, fréquence, puissance, volume irradié, durée de traitement, *etc.*.

Parmi les trois procédés étudiés, l'extraction assistée par ultrasons et hydrolyse enzymatique (UAEH) est la plus efficace, avec près de 91 % de matière passée en solution (Figure 40), ce qu'illustre bien la Figure 41.



Figure 41 : photographie des culots obtenus avec l'UAEH, à T0 min, 60 min, 180 min et 360 min.

Les travaux portant sur l'utilisation du couplage enzymes-ultrasons ont essentiellement été réalisés sur des végétaux supérieurs, avec majoritairement l'utilisation de polysaccharidases (Easson *et al.*, 2011; Leaes *et al.*, 2013b; Lunelli *et al.*, 2014; Yachmenev *et al.*, 2009) et parfois de mélanges polysaccharidases - protéases (Wu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011). La plupart de ces études ne portent pas sur l'extraction des composés dans leur ensemble, mais ciblent certaines molécules : polysaccharides (Liu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Yachmenev *et al.*, 2009), sucres fermentescibles (Leaes *et al.*, 2013b; Lunelli *et al.*, 2014) et sucres réducteurs (Easson *et al.*, 2011). La comparaison avec les résultats de liquéfaction obtenus ici est donc délicate.

Quelques rares travaux utilisant ce couplage ont été publiés sur des macroalgues. Ainsi, deux études ont démontré l'intérêt de ce procédé à des fins analytiques (Peña-Farfal *et al.*, 2005; Romarís-Hortas *et al.*, 2013), et deux autres pour l'extraction de composés. Ces dernières ciblaient les polysaccharides sulfatés d'une algue rouge *Gracilaria birdiae* (Fidelis *et al.*, 2014) et la libération du glucose d'une algue verte *Ulva rigida* pour la production de bioéthanol (Korzen *et al.*, 2015). Les conclusions de ces études seront plus longuement détaillées dans la partie portant sur l'analyse biochimique des fractions. Selon les procédés mis en œuvre, des différences de viscosité ont été constatées. Ainsi pour le témoin et l'EAE, la viscosité apparente était élevée induisant une séparation culot/surnageant délicate. La présence de carraghénanes chez *Grateloupia turuturu*, polysaccharides sulfatés dont la température de gélification est comprise entre 30 et 45 °C (Venegas-Sanchez *et al.*, 2013), explique certainement cela. En revanche, lorsque les ultrasons sont appliqués (UAE et UAEH), les prélèvements apparaissent plus liquides avec une séparation aisée des phases. En 2013, une étude a montré que les ultrasons pouvaient diminuer la viscosité (forces de cisaillement) des solutions d'agar, de kappa et iota carraghénanes ; la fréquence ultrasonore permettant cette diminution de viscosité variait d'un polysaccharide testé à l'autre. Néanmoins, ce phénomène était réversible avec un retour rapide (5 minutes) à la viscosité initiale (Venegas-Sanchez *et al.*, 2013).

Ces changements de viscosité seraient dus à des ruptures de liaisons au sein des polysaccharides. En effet, les ultrasons provoqueraient la rupture de liaisons hydrogène des carraghénanes (Venegas-Sanchez *et al.*, 2013). Une autre étude, portant sur les polysaccharides de l'algue rouge *Pyropia yezoensis*, a quant à elle expliqué cette diminution de viscosité par la rupture de liaisons glycosidiques (Zhou et Ma, 2006). Ces liaisons rompues (glycosidiques et hydrogène) pourraient donc favoriser la libération des composés matriciels et aussi l'entrée des enzymes, ce qui serait en accord avec les 74 % de matière solubilisée par l'UAE et les 91 % par UAEH. De plus, la dégradation des polysaccharides de *Pyropia yezoensis* par sonication nécessiterait une énergie d'activation plus faible que par hydrolyse enzymatique (Zhou et Ma, 2006).

#### III.2. Analyses biochimiques des fractions générées

#### III.2.1. Sucres hydrosolubles, composés carbonés et azotés

Les fractions solubles obtenues après 360 minutes ont toutes été analysées. Leur composition en termes de sucres hydrosolubles, de rendement d'extraction en carbone et en azote est présentée dans la Figure 42. Afin de s'affranchir des sucres apportés par le cocktail enzymatique (EAE et UAEH), la teneur en sucres totaux a été dosée et estimée à 427,43 mg.g<sup>-1</sup> de cocktail enzymatique. Pour ne pas surestimer les résultats de l'EAE et de l'UAEH, et pouvoir les comparer au témoin et à l'UAE, les sucres apportés par les enzymes ont été soustraits dans les résultats présentés dans la Figure 42a, pour l'EAE et l'UAEH.

<u>Remarque</u> : les complexes enzymatiques apportent beaucoup de sucres, ce qui est cohérent avec les informations obtenues auprès des fournisseurs (Communications personnelles,

Novozymes<sup>®</sup> et Takabio) : Sumizyme TG contient 50 % de dextrines, Sumizyme MC contient 79 % de maltodextrines, Ultraflo<sup>®</sup> XL contient 30 % de glycérol et 20 % de sorbitol, pour Multifect CX<sup>®</sup> 15 L l'information n'a pas été communiquée.

L'extraction des sucres hydrosolubles (Figure 42a) n'est pas augmentée de façon significative par l'hydrolyse enzymatique avec un rendement d'extraction de 150 ± 10 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S contre 133 ± 5 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S pour le Témoin. Ce résultat va à l'encontre de précédentes études, qui ont montré que des enzymes spécifiques aux macroalgues (Denis *et al.*, 2009d) et des enzymes commerciales (Denis *et al.*, 2009b) permettaient la libération des sucres (hydrosolubles et réducteurs) de *Grateloupia turuturu*. Une de ces études, réalisée dans les mêmes conditions (40 °C, 6 heures), a même décrit que l'extraction solide-liquide (Témoin) permettait d'extraire un peu plus de 150 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S de sucres hydrosolubles (ce qui est cohérent avec les 133 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S trouvés ici). En revanche, l'enzyme la plus performante (Ultraflo<sup>®</sup> L) permettait d'extraire 250 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S de sucres hydrosolubles, mais sur des algues préalablement séchées et broyées (Denis *et al.*, 2009b).



Figure 42 : analyses biochimiques des fractions hydrosolubles. a : sucres hydrosolubles (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) ; b : rendement d'extraction à T360 pour le carbone (couleur) et augmentation de ce rendement (T360 – T0) (hachures); c : rendement d'extraction à T360 pour l'azote (couleur) et augmentation de ce rendement (T360 – T0) (hachures). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les différences significatives (p < 0,05) sont indiquées par des lettres différentes.

L'extraction assistée par ultrasons permet quant à elle d'augmenter significativement l'extraction des sucres hydrosolubles (296 ± 37 mg.g<sup>-1</sup>) par rapport au Témoin et à l'EAE. Dans ces conditions expérimentales, les ultrasons sont donc plus efficaces que les enzymes. Cependant, deux études récentes ont fait des constats différents. Ainsi, pour l'algue rouge *Osmundea pinnatifida*, les ultrasons n'ont pas permis d'extraire plus de sucres que l'extraction solide-liquide à chaud, contrairement à l'hydrolyse par une cellulase (Rodrigues *et al.*, 2015b). Il en est de même sur l'algue verte *Ulva rigida* où l'hydrolyse enzymatique (solution enzymatique d'*Aspergillus niger*) s'est avérée la plus efficace, bien que la sonication ait tout de même permis d'extraire plus de sucres hydrosolubles que la condition Témoin (Karray *et al.*, 2015).

Des trois procédés, l'UAEH est celui qui a conduit à extraire le plus de sucres hydrosolubles, 439 mg.g<sup>-1</sup>Alg.S, soit 3,3 fois plus de sucres extraits par rapport au Témoin (Figure 42a). Ces résultats sont cohérents avec les taux de liquéfaction (Figure 40). L'intérêt de ce couplage ultrasons-enzymes pour l'extraction des sucres (polysaccharides, sucres fermentescibles et réducteurs) a déjà été démontré chez des végétaux supérieurs (Chen et al., 2012; Leaes et al., 2013b; Liu et al., 2014; Lunelli et al., 2014; Yachmenev et al., 2009). Seules deux des études appliquant l'UAEH sur des macroalques se sont intéressées à l'extraction des sucres. La première étude a montré sur l'algue rouge Gracilaria birdiae, que l'extraction de polysaccharides sulfatés n'était pas améliorée par les ultrasons. En revanche, lorsque des protéases étaient combinées à la sonication, l'extraction des polysaccharides sulfatés était multipliée par 5.8 par rapport au Témoin (22 °C). L'ajout de NaOH à 0.1 M permettait même de rendre la sonication efficace par rapport au Témoin (x 2,5) et d'augmenter plus fortement l'efficacité du couplage (x 15,9). D'après les auteurs, le NaOH agirait au niveau de la matrice extracellulaire en clivant les interactions polysaccharidescomposés phénoliques (Fidelis et al., 2014). Cette étude ne précise cependant pas si ce couplage était simultané ou séquentiel, or, il a été récemment démontré (sur la citrouille) qu'une combinaison simultanée était plus efficace qu'une combinaison séquentielle (sonication puis hydrolyse enzymatique ou inversement) (Wu et al., 2014).

En 2015, une seconde étude sur l'algue verte *Ulva rigida* a comparé l'hydrolyse enzymatique avec le couplage simultané enzymes-ultrasons (Korzen *et al.*, 2015). L'objectif de cette étude était de produire du bioéthanol à partir du glucose libéré au cours de l'hydrolyse de l'amidon de l'algue. L'intérêt du couplage simultané ultrasons et polysaccharidases (α amylase, amyloglucosidase et cellulase) a de nouveau été démontré. En effet, la libération du glucose était 3,1 fois plus élevée par rapport à l'hydrolyse

enzymatique conventionnelle. De plus, un gain de temps considérable a été observé grâce à l'association de ces deux procédés : 24 heures étaient nécessaires pour l'hydrolyse enzymatique conventionnelle, contre seulement 1 heure lorsque les ultrasons étaient ajoutés. Ce gain de temps par rapport à l'EAE a également été rapporté récemment pour l'extraction, par UAEH, de polysaccharides d'un mollusque bivalve *Corbicula fluminea* (Liao *et al.*, 2015).

En ce qui concerne les composés carbonés (Figure 42b), quel que soit le procédé utilisé, leur extraction est significativement augmentée par rapport au Témoin (44,58  $\pm$  0,69 %) : 66,45  $\pm$  9,10 % (EAE), 61,86  $\pm$  0,28 % (UAE) et 92,27  $\pm$  0,34 % (UAEH). Aucune différence significative n'a été constatée entre l'EAE et l'UAE. L'UAEH a de nouveau permis d'extraire le plus de matière carbonée issue de l'algue, ce qui est cohérent avec les résultats précédents (liquéfaction et sucres hydrosolubles). Le calcul de la différence de rendements entre la fin et le début des procédés (T360-T0), correspondant aux barres hachurées sur le graphique, permet de s'affranchir d'un éventuel « biais enzymes ». Ainsi, l'EAE augmente l'extraction du carbone de 20,24  $\pm$  4,89 %, l'UAE de 27,32  $\pm$  0,80 % et l'UAEH de 51,69  $\pm$  9,31 %.

Concernant l'extraction des composés azotés (Figure 42c), les rendements d'extraction suivent les mêmes tendances que celles du carbone, à savoir que les trois procédés permettent d'augmenter de façon significative l'extraction de l'azote par rapport au Témoin (41,05  $\pm$  0,69). Il n'y a pas de différence significative entre l'EAE et l'UAE (54,98  $\pm$  6,24 % et 53,11  $\pm$  0,44 %), le couplage (UAEH) s'avère être le procédé permettant d'atteindre le taux d'extraction le plus élevé (73,95  $\pm$  1,16 %). Ces résultats sont eux aussi en accord avec les précédentes observations. De plus, les augmentations sont bien dues à l'effet procédé et non à l'ajout des enzymes puisque les différences entre T360 et T0 aboutissent aux mêmes tendances : absence de différence entre EAE (17,82  $\pm$  3,37 %) et UAE (12,79  $\pm$  1,47 %) et meilleure efficacité pour le couplage (34,45  $\pm$  4,12 %). Pour le Témoin, l'extraction de l'azote est augmentée de seulement 1 % (celle du carbone de 7 %, Figure 42b), ce qui montre bien la difficulté d'accès au contenu matriciel de *Grateloupia turuturu*, d'où la nécessité de procédés adaptés.

Contrairement aux sucres hydrosolubles, l'hydrolyse enzymatique augmente l'extraction de l'azote et du carbone de l'algue par rapport au Témoin. La température de 40 °C, bien qu'inférieure aux préconisations des fournisseurs, permettrait donc une libération de ces composés. Or, une précédente étude, sur l'extraction des protéines de *Palmaria palmata*, a montré qu'une xylanase pouvait être active à une température inférieure à celle

recommandée par le fournisseur (Dumay *et al.*, 2013). Dans cette étude, la xylanase était même plus efficace à 25 °C qu'à 40 °C (température indiquée par le fournisseur).

Plusieurs études ont démontré l'intérêt de l'hydrolyse enzymatique (protéases ou polysaccharidases) pour l'extraction des protéines de différentes espèces de macroalgues rouges (Fleurence *et al.*, 1995; Hardouin *et al.*, 2013; Joubert et Fleurence, 2008; Wijesinghe et Jeon, 2013). En revanche, peu d'études emploient les ultrasons à cette fin, bien que l'utilisation d'un bain à ultrasons (1 heure) ait été évoquée, il y a quelques années, pour faciliter l'extraction des protéines de *Palmaria palmata* lyophilisée et broyée (Galland-Irmouli *et al.*, 1999). Néanmoins, le sujet n'étant pas l'extraction en elle-même, aucune comparaison n'avait été faite avec une extraction sans ultrasons.

Les avis divergent concernant l'efficacité du couplage enzyme-ultrasons. Ainsi, une récente étude a établi une action positive des ultrasons et du couplage protéases-ultrasons pour l'extraction des protéines de l'algue rouge *Gracilaria birdiae* (Fidelis *et al.*, 2014). À l'inverse, une deuxième étude a, quant à elle, remarqué que les ultrasons étaient inefficaces, tandis que les enzymes permettaient d'augmenter l'extraction des composés azotés, les protéases étant plus efficaces que les polysaccharidases (Rodrigues *et al.*, 2015b). Cette absence d'efficacité des ultrasons sur l'extraction des protéines (en milieu acide, HNO<sub>3</sub> 4 %), avait par ailleurs déjà été démontrée sur deux algues brunes S*accharina latissima* et *Laminaria digitata* (Vanegas *et al.*, 2014).

Pour résumer, **I'UAEH est le procédé qui permet d'extraire le plus de sucres hydrosolubles, de composés azotés et carbonés, ce qui est cohérent avec les résultats de liquéfaction observés**. Il est cependant difficile de comparer ces résultats avec ceux de la littérature. En effet, comme l'ont souligné les auteurs d'une récente revue, plusieurs paramètres influents diffèrent d'une étude à l'autre : la nature de la biomasse (végétaux supérieurs/algues (rouges, brunes ou vertes), les enzymes utilisées (polysaccharidases et/ou protéases), le type de réacteur à ultrasons et les paramètres de sonication (température, fréquence, puissance, durée de traitement, volume traité) (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015).

#### III.2.2. Influence de l'UAEH sur l'extraction des acides aminés

Il a été montré précédemment que le procédé permettant d'extraire le plus d'azote était l'UAEH (Figure 42c). Afin de pouvoir évaluer plus précisément cette extraction, l'analyse des acides aminés a donc été réalisée sur des échantillons obtenus après six heures : d'UAEH, de condition Témoin, ainsi que sur l'algue collectée en 2013. Il s'avère que l'UAEH permet d'extraire  $54,02 \pm 0,19$  % des acides aminés de *Grateloupia turuturu* tandis que dans la condition Témoin, seulement  $25,79 \pm 0,57$  % en sont extraits. L'UAEH permettrait donc de multiplier par 2,1 la teneur en acides aminés de la fraction soluble (contre 1,8 pour l'azote).

<u>Remarque</u> : ce facteur, plus élevé pour les acides aminés, peut être dû à une surestimation induite par les acides aminés apportés par les complexes enzymatiques. Par ailleurs, en 2013, une étude a montré sur cinq espèces d'algues (dont deux algues rouges Palmaria palmata et Porphyra umbilicalis) que les ultrasons permettaient d'intensifier l'extraction par hydrolyse enzymatique (protéase) de composés iodés présents sous forme d'acides aminés iodés (iodotyrosine) (Romarís-Hortas et al., 2013).

Sur un plan qualitatif, le profil des acides aminés (Figure 43) permet de constater que les 17 acides aminés détectés chez *Grateloupia turuturu* sont retrouvés dans les fractions solubles, avec ou sans UAEH. L'acide aspartique et l'acide glutamique sont majoritairement présents, comme chez l'algue brute. Le ratio AAE/AA<sub>détectés</sub> est de 34 % pour le Témoin et l'UAEH mais il est un peu plus élevé pour l'algue brute (38 %), ce qui signifie que certains acides aminés seraient plus difficiles à extraire. Il s'avère que les fractions solubles (Témoin et UAEH) contiennent une plus grande proportion de cystéine (Cys), acide aspartique (Asp), alanine (Ala), acide glutamique (Glu), glycine (Gly) et sérine (Ser) qui sont des acides aminés non essentiels. En revanche, par rapport à l'algue brute, pour l'UAEH et le Témoin, certains acides aminés sont moins bien représentés. C'est le cas des AAE suivants : l'histidine (His), la leucine (Leu) et la phénylalanine (Phe).

La comparaison des acides aminés extraits avec l'UAEH et la condition Témoin, indique que l'UAEH augmenterait la proportion de trois AAE : l'isoleucine (IIe), la thréonine (Thr) et la valine (Val) ; ainsi que celle de l'acide aspartique (Asp) et glutamique (Glu). En revanche, d'autres acides aminés semblent être en proportion moins importante : la leucine (Leu), la lysine (Lys), la phénylalanine (Phe), l'arginine (Arg) et la tyrosine (Tyr).



Figure 43 : pourcentage relatif de chaque acide aminé pour *Grateloupia turuturu*, le Témoin et l'UAEH. Analyses effectuées par InVivo Labs. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types. n=2 pour l'UAEH et la condition Témoin, n=1 pour l'algue. AAE : acides aminés essentiels.

Peu de travaux comparent les procédés d'extraction selon les profils en acides aminés des extraits obtenus. Une récente étude, sur le marc de raisin, a néanmoins montré que l'UAE était une méthode intéressante pour l'extraction des acides aminés par rapport à la technique conventionnelle de macération, avec une extraction non sélective des acides aminés (Carrera *et al.*, 2015).

#### III.3. Observations par microscopie

Afin de visualiser l'effet des différents procédés sur les thalles de *Grateloupia turuturu*, des prélèvements on été observés en microscopie, avant l'application du procédé et après 180 et 360 minutes (Figure 44). Quels que soient le traitement et sa durée, une dégradation du thalle est observée avec la présence de débris cellulaires en suspension. De telles observations ont déjà été rapportées après l'hydrolyse enzymatique de *Grateloupia turuturu* (Denis *et al.*, 2009b). Par rapport à l'EAE, l'extraction par ultrasons semble induire une plus importante dégradation à 180 et à 360 minutes, avec la formation de « trous » au sein du

thalle (flèches noires). Ces observations sont cohérentes avec celles effectuées sur d'autres tissus végétaux soumis à des ondes ultrasonores (Easson *et al.*, 2011; Toma *et al.*, 2001).

Parmi les trois procédés, le couplage ultrasons-enzymes semble le plus efficace. En effet, les fragments de thalles sont difficiles à distinguer parmi les débris cellulaires en suspension, comme le montrent les photographies UAEH-1 et UAEH-2 (Figure 44). Ces observations confortent l'idée que la sonication induit la dégradation de la surface du thalle, grâce à l'implosion des bulles de cavitation, ce qui devrait faciliter la meilleure pénétration des enzymes (Mason *et al.*, 2011; Toma *et al.*, 2001). Ces deux phénomènes conduisent ainsi à l'intensification de la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*.



Figure 44 : observations en microscopie optique des prélèvements pour les trois procédés (EAE, UAE et UAEH) à T0 (A et B), 180 (-1) et 360 (-2) minutes. a : G x 100 (échelle de 200 µm). b : G x 1000 (échelle de 20 µm). Les flèches indiquent des exemples de zones de détérioration du thalle

#### **IV.** Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer que les thalles de *Grateloupia turuturu*, collectés à Batz-sur-Mer aux printemps 2013 et 2014, ne présentaient pas de compositions biochimiques très différentes. Pour la première fois une analyse de la composition en acides aminés a été effectuée sur cette algue. Elle a démontré que *Grateloupia turuturu* contient les vingt acides aminés protéinogènes, avec une prédominance de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, les neufs acides aminés essentiels sont également présents. Avec un ratio AAE/AA <sub>détectés</sub> de l'ordre de 40 %, *Grateloupia turuturu* présente donc un intérêt nutritionnel intéressant bien que n'étant pas encore autorisée en alimentation humaine en Europe.

Un facteur de conversion azote-protéines spécifique à *Grateloupia turuturu* (N-Prot = 5,16) a pu être établi. Cette valeur reste à confirmer, mais elle pourrait substituer le facteur 6,25 habituel, qui a tendance à surestimer les protéines totales de l'algue.

Parmi les trois procédés étudiés dans ce chapitre, il ressort que **l'extraction assistée** par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH) est la plus prometteuse puisqu'elle a permis de solubiliser plus de 90 % des composés de l'algue. Ce niveau élevé de liquéfaction est associé aux meilleurs rendements d'extractions des sucres hydrosolubles, de l'azote et du carbone de *Grateloupia turuturu*. Ainsi, par rapport au Témoin et après six heures de traitement, des facteurs multiplicatifs de 1,7 pour la liquéfaction de l'algue, de 3,3 pour les sucres, de 1,8 pour l'azote et de 2,2 pour le carbone ont été déterminés. L'extraction des acides aminés a quant à elle été plus que doublée (x 2,1).

L'étude des cinétiques a révélé que, dans ces conditions (UAEH), il n'est pas nécessaire de procéder à un traitement au-delà de quatre heures et qu'il semble y avoir une synergie entre les enzymes et les ultrasons.

Ce premier chapitre avait pour objectif de comparer trois procédés et d'établir s'il y avait un intérêt ou non dans le couplage de l'EAE et de l'UAE pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*, afin de maximiser l'extraction de ses composés. **En ce sens, l'UAE et surtout l'UAEH se sont montrées efficaces**. Aussi, convient-il maintenant de rechercher l'intérêt que peuvent apporter ces deux procédés sur l'extraction de molécules cibles à haute valeur ajoutée, telles que la R-phycoérythrine (R-PE). Cette étude fait l'objet du chapitre suivant.

### **Chapitre IV**

Influence de la température sur la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-phycoérythrine

#### I. Contexte et objectifs de l'étude

Le Chapitre III a permis de sélectionner deux procédés pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* : l'extraction assistée par ultrasons (UAE) et l'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH).

Dans ce chapitre, l'effet de la température sur ces deux procédés (UAE et UAEH) sera évalué en quantifiant le taux de liquéfaction de l'algue et en qualifiant les fractions solubles obtenues, avec une attention particulière pour la R-phycoérythrine (R-PE), composé d'intérêt présent dans cette algue.

L'intérêt des ultrasons pour l'extraction de pigments et colorants d'origine naturelle a déjà été démontré (Shirsath *et al.*, 2012). En ce qui concerne la phycoérythrine, la sonication permet l'extraction de la B-PE à partir de microalgues grâce à la destruction cellulaire qu'elle provoque par le biais du phénomène de cavitation (Benavides et Rito-Palomares, 2006). En revanche, à notre connaissance, une seule étude relate l'utilisation d'ultrasons pour accélérer l'extraction de la R-PE à partir d'une macroalgue rouge, en l'occurrence *Heterosiphonia japonica*, mais sans en évaluer l'effet sur le rendement d'extraction (Sun *et al.*, 2009).

En ce qui concerne l'utilisation d'enzymes pour extraire la R-PE de macroalgues rouges, les résultats varient selon les études. Certains auteurs ont mis en évidence une action positive des enzymes, notamment sur *Palmaria palmata* (Dumay *et al.*, 2013; Joubert et Fleurence, 2008) et sur *Gracilaria verrucosa* (Mensi *et al.*, 2012). À l'inverse, il semblerait que ce procédé ne donne pas satisfaction pour extraire la R-PE de *Grateloupia turuturu*, que ce soit avec des enzymes commerciales et industrielles (Denis *et al.*, 2009b) ou des polysaccharidases spécifiques à la paroi des algues rouges (Denis *et al.*, 2009d).

Il s'agira donc, dans ce chapitre, de déterminer si l'UAE et l'UAEH peuvent faciliter l'extraction de la R-PE des thalles de *Grateloupia turuturu* humides et broyés.

Une première étude portant sur l'extraction conventionnelle des composés hydrosolubles de l'algue, dont la R-PE, et sur la stabilité de ce pigment à différentes températures, introduit ce chapitre. Ensuite, les procédés d'UAE et d'UAEH ont été testés à deux températures,  $22 \pm 1$  °C et  $40 \pm 1$  °C, sur *Grateloupia turuturu* humide et broyée. Les expérimentations ont été réalisées à l'obscurité, à un débit de 50 L.h<sup>-1</sup> et une puissance de 400 W. Pour l'UAEH, 1 % de chaque complexe enzymatique, par rapport au poids d'algue

humide, a été introduit dans le mélange réactionnel. Les extractions ont été conduites sur 6 heures, avec des prélèvements réguliers.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans *Algal Research* (Annexe 2, p.275) : Ultrasound-Assisted Extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. Le Guillard Cécile, Dumay Justine, Donnay-Moreno Claire, Bruzac Sandrine, Ragon Jean-Yves, Fleurence Joël, Bergé Jean-Pascal. 2015. *Algal Research* 12: 522–528.

## II. Extraction conventionnelle des composés hydrosolubles & stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température

Cette étude a été effectuée sur les poudres d'algue de 2013 et de 2014. Deux solvants d'extraction ont été retenus : le tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) et l'eau du réseau ajustée à pH 5,5 (HCl 6 M). L'eau du réseau (pH 5,5) a été utilisée afin de comparer les rendements d'extraction du procédé conventionnel à ceux de l'UAE et de l'UAEH en s'affranchissant d'un éventuel effet solvant, tandis que le tampon phosphate (pH 7,1) est utilisé dans les précédentes études effectuées au laboratoire (Denis *et al.*, 2010; Munier *et al.*, 2013).

#### II.1. Extraction conventionnelle

#### II.1.1. Les composés hydrosolubles

L'extraction des composés hydrosolubles (Figure 45a), avec la méthode conventionnelle au tampon phosphate, permet d'extraire autant de composés en 2014 qu'en 2013 (29,36  $\pm$  0,10 % et 31,22  $\pm$  0,98 % respectivement). En revanche, avec l'eau du réseau, l'extraction est légèrement plus faible en 2014 (26,55  $\pm$  0,52 %) qu'en 2013 (29,74  $\pm$  1,43 %). D'après ces résultats, entre ces deux années, il n'y a pas de différence importante pour le passage en solution des composés de *Grateloupia turuturu*.

Le solvant d'extraction semble également ne pas avoir une influence très marquée sur l'extraction des composés hydrosolubles. En effet, il n'y a qu'une légère différence significative entre les deux solvants, pour 2014 :  $26,55 \pm 0,52$  % pour l'extraction à l'eau du réseau et 29,36  $\pm$  0,10 % au tampon phosphate, mais aucune différence n'est observée pour 2013.


Figure 45 : extraction conventionnelle de composés hydrosolubles, à l'eau du réseau (pH 5,5) et au tampon phosphate (pH 7,1). a : pourcentage de matière en solution. b : rendement d'extraction de la R-PE (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les différences significatives (p < 0,05) sont indiquées par des lettres différentes. c : exemples de spectres d'absorbance pour 2013 et 2014 (dilution 1/5).

#### II.1.2. Focus sur un composé d'intérêt : la R-phycoérythrine

Le dosage de la R-PE dans les fractions solubles modère cependant ces propos (Figure 45b). Un effet solvant sur l'extraction de la R-PE est observé, puisque pour les deux années le tampon phosphate permet d'atteindre des rendements d'extraction plus élevés  $(3,25 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1} \text{ Alg.S en 2013 et 1,90 mg.g}^{-1} \text{ Alg.S en 2014})$  que l'eau du réseau à pH 5,5  $(2,64 \pm 0,14 \text{ mg.g}^{-1} \text{ Alg.S en 2013 et de 1,64 } \pm 0,17 \text{ mg.g}^{-1} \text{ Alg.S en 2014})$ . Les valeurs trouvées ici mettent également en avant la variabilité de la teneur en R-PE de l'algue sur ces deux années.

Parmi tous les solvants d'extraction mentionnés dans la littérature, le tampon phosphate est le plus retrouvé (Denis et al., 2010; Galland-Irmouli et al., 2000; Munier et al., 2014; Niu et al., 2013; Senthilkumar et al., 2013) parfois additionné d'azoture de sodium (Liu et al., 2005; Sun et al., 2009) ou de chlorure de sodium (Orta-Ramirez et al., 2000; Rossano et al., 2003). Une étude a comparé l'extraction à l'eau distillée et au tampon phosphate de la R-PE de Grateloupia turuturu, mais elle n'a pas constaté de différence entre ces deux solvants (Denis et al., 2009a). Néanmoins, une étude récente, comparant trois solvants pour l'extraction des phycobiliprotéines de Gracilaria crassa humide et broyée, a fait ressortir que le rendement d'extraction de la R-PE est le plus élevé avec de l'eau distillée (pH 7), suivi par le tampon phosphate (pH 6,8) et l'eau de mer (pH 8,13) (Sudhakar et al., 2015). Il est vrai que, dans notre étude, le pH de l'eau du réseau est ajusté à 5,5 et est donc inférieur à celui du tampon phosphate (7,1), de l'eau distillée ou de l'eau de mer. Néanmois, plusieurs auteurs ont montré que la R-PE était stable dans une large gamme de pH : 3,5 à 9,5 pour Palmaria palmata (Galland-Irmouli et al., 2000) et de 5 à 9 pour Porphyra (Ogawa et al., 1991; Orta-Ramirez et al., 2000) voire même de 3,5 à 10 pour Polysiphonia urceolata (Liu et al., 2009). Récemment, une étude a montré que la R-PE extraite de Grateloupia turuturu était également stable vis-à-vis du pH, dans une gamme allant de 3 à 10 (Munier et al., 2014). Il semble donc que la différence de pH ne puisse pas, à elle seule, expliquer les différents rendements d'extraction observés.

Ainsi, la composition du solvant d'extraction pourrait elle aussi influencer les rendements d'extraction de la R-PE, les sels présents dans les solutions tamponnées pouvant favoriser l'extraction de composés ioniques, comme les protéines en général, et la R-PE en particulier. De plus, il a été montré que l'ajout de NaCl permettait d'augmenter la stabilité de la R-PE (Munier, 2013; Sudhakar *et al.*, 2015). La présence naturelle de ce sel dans l'eau de mer fait donc de celle-ci un solvant d'extraction potentiellement intéressant.

L'extraction de la R-PE varie également de façon significative entre les deux années d'étude (Figure 45b). En effet, quel que soit le solvant, les rendements d'extraction sont les plus élevés pour l'année 2013. Par rapport à l'année 2014, en 2013 le  $R_{R-PE}$  est 1,6 fois plus élevé avec l'eau du réseau et 1,7 fois plus élevé avec le tampon phosphate.

Différentes études portant sur l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu* collectée dans la même zone littorale (Figure 35, p. 125) et suivant le même protocole d'extraction (tampon phosphate), font état de rendements allant de 1,2 à 5,3 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S (Denis *et al.*, 2010; Munier *et al.*, 2013, 2015). Les valeurs trouvées ici sont donc cohérentes avec ces travaux. La variabilité géographique et saisonnière de la teneur en R-PE de cette algue a déjà été démontrée précédemment (Denis *et al.*, 2010; Munier *et al.*, 2013). Ainsi, *Grateloupia turuturu* (Denis *et al.*, 2010) mais aussi d'autres algues rouges (*Palmaria palmata, Gracilaria gracilis*) (Francavilla *et al.*, 2013; Galland-Irmouli *et al.*, 2000) contiennent des plus grandes concentrations de R-PE en automne-hiver (Octobre à Janvier). Ceci s'expliquerait par une meilleure disponibilité de l'azote sur cette période et par une énergie lumineuse moins intense qu'en été. En effet, les protéines, telles que la R-PE, seraient dégradées par une énergie lumineuse trop importante (Galland-Irmouli *et al.*, 1999).

<u>Remarque</u> : l'extraction de la R-PE peut être effectuée à partir d'algues fraîches, congelées ou encore lyophilisées, mais l'extraction sur algues lyophilisées et cryobroyées est la plus courante (Dumay et al., 2014b).

Pour compléter ces éléments, des exemples de spectres d'absorption sont présentés dans la Figure 45c. Ces spectres sont également le reflet des différences constatées précédemment, entre année et solvant d'extraction. Parmi les trois pics caractéristiques de la R-PE (498, 540 et 565 nm), pour l'extraction au tampon phosphate, le pic à 565 nm est plus intense en 2013 qu'en 2014. Ce pic correspond, avec celui à 540 nm, au chromophore Phycoérythrobiline (PEB). Le pic à 498 nm correspond quant à lui à la Phycourobiline (PUB) (Glazer, 1994).

Récemment, des travaux portant sur la purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu* ont mis en évidence la présence d'une R-PE de 260 kDa et d'une R-PE de 60 kDa (Munier, 2013; Munier *et al.*, 2015). Ces travaux ont montré que le pic d'absorption maximale se situait à 565 nm pour la R-PE de 260 kDa, et à 540 nm pour la R-PE de 60 kDa. Au vu de ces éléments, il semblerait donc que l'extrait de l'année 2013 contiendrait principalement de la R-PE de 260 kDa, tandis que la R-PE de 60 kDa prédominerait dans l'extrait de 2014 (Figure 45c).

#### II.2. Stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température

L'étude de stabilité de la R-PE à différentes températures a été réalisée sur un extrait conventionnel, avec de l'eau du réseau, à partir de poudre d'algue de 2013. Les procédés étudiés dans ce chapitre (UAE et UAEH) étant appliqués pendant six heures, il a donc été nécessaire d'évaluer la stabilité de la R-PE sur cette durée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de R-PE préservée (R-PE<sub>préservée</sub>) par rapport au temps initial et sont présentés sur la Figure 46.



Figure 46 : étude de stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température. Pourcentage de R-PE préservée, dans des extraits conventionnels placés à 4, 25, 30 et 40 °C, pendant 360 minutes. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3

Quelle que soit la température, le pourcentage de R-PE<sub>préservée</sub> dans les extraits diminue régulièrement au cours du temps. Aucun plateau n'est atteint au bout de 6 heures. Les évolutions sont globalement similaires, avec une dégradation marquée pendant les 30 premières minutes, suivie par une moindre diminution.

Une corrélation positive apparaît entre la température employée et le niveau de dégradation de la R-PE. En effet, après 30 minutes à 4 °C, 94  $\pm$  0,5 % de la R-PE est préservée contre seulement 61  $\pm$  0,2 % à 40 °C, avec des valeurs intermédiaires à 25 et 30

°C (92 ± 0,2 % et 86 ± 0,8 % respectivement). À la fin de l'étude (6 heures), les pourcentages de R-PE<sub>préservée</sub> sont respectivement de 86 ± 1,2 %, 79 ± 1,3 %, 63 ± 1,3 % à 26 ± 0,6 %, pour 4, 25, 30 et 40 °C. Il apparaît qu'une augmentation de 10 °C de la température (de 30 à 40 °C), a induit une forte diminution de la teneur en R-PE. En effet, après 6 heures, les extraits contenaient 63 ± 1,3 % de R-PE<sub>préservée</sub> à 30 °C contre 26 ± 0,6 % à 40 °C. Ces résultats mettent donc en avant l'effet négatif du couplage temps d'exposition / température sur la préservation de la R-PE.

<u>Remarque</u> : la dégradation de la R-PE observée ici à 40 °C pourrait expliquer pourquoi, lors de précédentes études, l'hydrolyse enzymatique de Grateloupia turuturu n'était pas apparue satisfaisante après 6 heures d'exposition à cette température (Denis et al., 2009b, 2009d).

Plusieurs auteurs ont étudié la stabilité thermique de la R-PE. Ainsi, il a été mis en évidence que la R-PE extraite de *Palmaria palmata* est instable à une température supérieure à 60 °C (Galland-Irmouli *et al.*, 2000). Une autre étude, menée sur *Grateloupia turuturu*, précise même que 70 % de la R-PE est dénaturée à cette température mais que ce pigment est relativement stable après une heure d'exposition à 40 °C (Munier *et al.*, 2014). Ici, après 60 minutes à 40 °C, la perte de 55 % de la R-PE initialement présente dans l'extrait ne va pas dans le sens de ces travaux. Les conditions opératoires variables entre les études expliquent certainement ces différences de stabilité, notamment le pH qui peut influencer la stabilité thermique de ce pigment (Orta-Ramirez *et al.*, 2000).

Les spectres d'absorbance (Figure 47) apportent également des éléments de discussion. Après 6 heures, une diminution de l'absorbance globale est constatée avec l'élévation de la température. En revanche, tous les pics ne sont pas affectés de la même manière. En effet, parmi les trois pics caractéristiques de la R-PE, celui à 498 nm correspondant à un des deux chromophores de la R-PE (la phycourobiline, PUB) (Glazer, 1994), présente une meilleure stabilité vis-à-vis de l'augmentation de la température. Ces observations sont en accord avec de précédentes études (D'Agnolo *et al.*, 1993; Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Munier *et al.*, 2014) et cette perte de stabilité du pigment pourrait être liée à des modifications de la structure tertiaire de la protéine, plus précisément à une diminution du nombre d'hélices alpha (D'Agnolo *et al.*, 1993).



Figure 47 : étude de stabilité de la R-PE vis-à-vis de la température. Spectres d'absorbance de la R-PE, pour l'extrait initial (T0) et après 360 minutes à 4, 25, 30 et 40 °C. Exemple de spectres pour un des triplicats. (dilution 1/4)

# III. Liquéfaction de l'algue : effets procédés / températures

Les cinétiques de liquéfaction de l'algue, pour les deux procédés et aux deux températures étudiées, sont présentées sur la Figure 48.



Figure 48 : cinétiques du gain de liquéfaction de *Grateloupia turuturu* sur 6 heures. Pour l'UAE et l'UAEH à 22 °C et à 40 °C. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3

Pour trois des quatre conditions opératoires (UAE 22 °C et 40 °C, UAEH 22 °C), les allures des courbes sont similaires avec une augmentation régulière de la liquéfaction au cours du temps. En revanche, et comme détaillé dans le Chapitre III, l'UAEH à 40 °C présente une cinétique différente, avec une augmentation rapide suivie d'un ralentissement tendant vers un plateau dès 4 heures ( $40 \pm 1$  % de gain de liquéfaction).

<u>Remarque</u> : comme indiqué dans le Chapitre III, le suivi du pH au cours du temps révèle sa relative stabilité avec une augmentation maximale de 0,5 unité pH. L'énergie délivrée au mélange (W.h) et l'énergie apportée par kilogramme de mélange réactionnel (W.h.kg<sup>-1</sup>) sont les mêmes que celles précédemment mentionnées (Chapitre III, III.1. ).

Les pourcentages de matière passée en solution après 6 heures de procédés sont présentés sur la Figure 49.



Figure 49 : pourcentages de matière liquéfiée après 360 minutes pour l'UAE et l'UAEH à 22 °C et 40 °C. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les différences significatives (p < 0,05) sont indiquées par des lettres différentes

Quelle que soit la température, et après 6 heures de traitement, l'UAE et l'UAEH permettent d'extraire au moins deux fois plus de composés hydrosolubles que l'extraction conventionnelle sur poudre d'algue lyophylisée et cryobroyée (Figure 45a). Ainsi, une extraction classique avec de l'eau du réseau à pH 5,5 (année 2013) permet d'extraire près de 30 % des composés de *Grateloupia turuturu*, alors que pas moins de 73 % sont retrouvés dans les extraits obtenus par traitement aux ultrasons (UAE), allant même jusqu'à 84 à 91 % dans les extraits obtenus par traitement combiné ultrasons-enzymes (UAEH 22 °C et 40 °C respectivement).

Pour l'UAE, aucune différence significative n'est observée entre 22 °C et 40 °C (respectivement 73,53  $\pm$  3,62 % à 22 °C et 73,72  $\pm$  0,54 % à 40 °C, Figure 49). La liquéfaction de *Grateloupia turuturu*, par sonication, ne semble donc pas être influencée dans cette gamme de températures, ce que confirme l'observation des cinétiques de liquéfaction (Figure 48). Ces résultats vont à l'encontre des observations faites dans d'autres études (Pingret *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2014). En effet, l'augmentation de la température peut permettre d'améliorer l'efficacité de la sonication bien qu'au-delà d'une certaine température cette augmentation serait contre-productive. Elle provoquerait une altération du phénomène de cavitation, due à une diminution de l'implosion des bulles de

cavitation et à une trop forte pression de vapeur du milieu réactionnel (Pingret *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2014). De plus, certains composés pourraient être dégradés à partir d'une température trop élevée (cas des polyphénols) (Pingret *et al.*, 2012). Il est vraisemblable que l'écart de température étudié ici (22 – 40 °C) ne soit pas suffisant pour observer un effet de la température sur la sonication.

Lorsque les complexes enzymatiques sont ajoutés au milieu (UAEH), l'augmentation de température du mélange réactionnel permet d'extraire, de façon significative, plus de composés ( $83,61 \pm 1,95 \%$  à 22 °C et 90,71 ± 0,13 % à 40 °C) (Figure 49). Ceci s'explique probablement par une température (40 °C) plus proche de la température optimale des enzymes (Tableau X, p.92). De plus, quelle que soit la température, la présence des enzymes permet d'augmenter la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* par rapport à la sonication seule, ce qui est en accord avec les résultats du Chapitre III.

Il semblerait donc que les ultrasons aient permis de diminuer la température de travail des enzymes, puisqu'elles seraient actives à 22 °C (84 % de composés solubilisés), alors qu'à 40 °C les enzymes (EAE) solubilisaient que 71 % des composés de l'algue (Chapitre III, Figure 40).

Des études ont précédemment fait état d'une diminution de l'énergie d'activation (température) des enzymes sous l'action des ultrasons : 40 % pour une amyloglucosidase (Leaes *et al.*, 2013a) et 80 % pour une amylase avec une activité trois fois plus élevée (Souza *et al.*, 2013). Plusieurs pistes ont été évoquées pour expliquer ce phénomène. Ainsi, la sonication agirait en modifiant le comportement des enzymes vis-à-vis de la température mais également du pH. De plus, il semblerait que l'effet des ultrasons sur l'activité des enzymes soit bénéfique jusqu'à une certaine température, au-delà de laquelle elles perdraient de leur efficacité (Leaes *et al.*, 2013a; Souza *et al.*, 2013). Enfin, les ultrasons augmenteraient l'activité des enzymes sans en modifier pour autant la température optimale. Par exemple, la température optimale d'une dextranase (50 °C) est inchangée en présence d'ultrasons, mais l'activité de l'enzyme est multipliée par un facteur 1,3 (Bashari *et al.*, 2013). Le même constat avait été fait précédemment pour une protéase végétale (alliinase) (Wang *et al.*, 2011).

Il semble donc que, pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*, **les ultrasons permettent d'activer les enzymes pour des températures plus basses** que celles préconisées par les fournisseurs et que plus la température est proche de l'optima des complexes enzymatiques, plus le couplage est efficace. Dans tous les cas, l'intensification de la liquéfaction de l'algue par les ultrasons est notable, contribuant à améliorer la teneur en composés solubles des extraits par rapport à la méthode d'extraction conventionnelle. Or, cette dernière est coûteuse et peu adaptée pour une transposition à l'échelle industrielle (Dumay *et al.*, 2014b), d'où l'intérêt de développer de nouveaux procédés d'extraction.

# IV. Analyses biochimiques des fractions générées

#### IV.1. Extraction de la R-phycoérythrine

Les rendements d'extraction de la R-PE ( $R_{R-PE}$ ) ont été déterminés sur 6 heures pour les quatre conditions testées (Figure 50) : UAE et UAEH à 22 °C et 40 °C.



Figure 50 : cinétiques des rendements d'extraction de la R-PE pour l'UAE et l'UAEH à 22 °C et 40 °C. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3

#### IV.1.1. <u>Comparaison avec l'extraction conventionnelle</u>

D'après les résultats obtenus dans l'étude préliminaire, l'extraction conventionnelle avec l'eau du réseau (pH 5,5), à partir des algues de 2013, permet d'avoir un  $R_{R-PE}$  de 2,64 ± 0,14 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S. Cet ordre de grandeur est ici atteint dès le début des expérimentations, puisque le  $R_{R-PE}$  initial varie de 2,23 à 2,68 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S selon les expérimentations (Figure 50).

<u>Remarque</u> : comme précisé dans le Chapitre II (IV.3., p.95), la préparation du mélange réactionnel prend une trentaine de minutes, durée pendant laquelle les algues sont en suspension dans l'eau, ce qui peut expliquer le début d'extraction de la R-PE observé ici.

Les procédés d'UAEH et d'UAE à 22 °C conduisent à des  $R_{R-PE}$  plus élevés que l'extraction conventionnelle à l'eau du réseau (2,64 ± 0,14 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) et similaires à l'extraction au tampon phosphate (3,25 ± 0,03 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). En effet, au bout d'une heure de traitement par les ultrasons seuls (UAE) le  $R_{R-PE}$  obtenu est de 3,28 ± 0,10 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, et il est de 3,61 ± 0,26 mg.g<sup>-1</sup> et de 3,62 ± 0,32 mg.g<sup>-1</sup> après respectivement une et deux heures d'un traitement combiné (UAEH). De plus, ces procédés réalisés sur l'algue humide broyée présentent tous deux l'avantage d'éviter certains prétraitements indispensables pour l'extraction conventionnelle (lyophilisation et cryobroyage) qui prennent du temps et ajoutent des étapes supplémentaires.

#### IV.1.2. Comparaison de l'UAE et de l'UAEH à 22 °C et 40 °C

Au cours de la première heure, deux tendances opposées sont constatées : l'augmentation du rendement d'extraction de la R-PE à 22 °C et la diminution de ce rendement à 40 °C (Figure 50).

À 40 °C, la diminution du R<sub>R-PE</sub> pendant la première heure est similaire pour les deux procédés mais ensuite les évolutions diffèrent. Ainsi, pour l'UAE, le R<sub>R-PE</sub> continue de chuter jusqu'à la fin du traitement, faisant d'elle la méthode d'extraction la plus dénaturante (1,00  $\pm$  0,03 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S après 6 heures). Cette diminution de la teneur en R-PE à 40 °C est cohérente avec l'étude de stabilité du pigment (Figure 46). Bien que plus dénaturantes, ces conditions permettent cependant d'avoir un pourcentage final de R-PE préservée plus élevé que celui de l'extrait conventionnel placé à 40 °C pendant 6 heures (39  $\pm$  3 % vs 26  $\pm$  0,6 %). Concernant l'UAEH à 40 °C, un changement de tendance est observé au bout de deux heures avec une légère augmentation et l'amorce d'un plateau. La moyenne des R<sub>R-PE</sub> obtenus sur les trois dernières heures de traitement est de 1,81  $\pm$  0,01 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, soit un rendement significativement plus élevé (p < 0,05) en présence d'enzymes que sans enzymes, avec après 6 heures 1,79  $\pm$  0,32 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S et 1,00  $\pm$  0,03 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, respectivement. À cette température (40 °C), par rapport à une sonication seule, l'apport de complexes enzymatiques apparaît donc bénéfique pour extraire la R-PE de *Grateloupia turuturu*.

À 22 °C, le  $R_{R-PE}$  augmente pendant la première heure, pour les deux procédés, puis diminue progressivement. À cette température, l'ajout des complexes enzymatiques ne

permet pas de constater de différence significative avec l'UAE. Les rendements d'extraction les plus élevés sont obtenus après 60 minutes d'UAE ( $3,28 \pm 0,10 \text{ mg.g}^{-1} \text{ Alg.S}$ ) et après 60 à 120 minutes d'UAEH (respectivement  $3,61 \pm 0,26 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $3,62 \pm 0,32 \text{ mg.g}^{-1}$ ), sans différence significative entre les deux procédés. Quel que soit le traitement appliqué, la température de 22 °C semble donc préférable pour l'extraction de la R-PE.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour tenter d'expliquer ces résultats :

Hypothèse n° 1, **la R-PE qui vient d'être extraite de l'algue permettrait de compenser, voire de surpasser, les pertes engendrées au cours du procédé**. Dans ce cas, à 22 °C, cette hypothèse serait vérifiée uniquement jusqu'à la deuxième heure. À 40 °C la compensation n'aurait lieu que pour l'UAEH, à partir de 120 minutes.

Hypothèse n° 2, **la R-PE extraite dans la fraction soluble serait plus sensible aux ultrasons que la R-PE présente dans l'algue**. D'où une dénaturation au cours du temps si la sonication est prolongée.

Hypothèse n° 3, **Ia R-PE serait plus stable à la température dans les fractions solubles obtenues par UAE et UAEH, que dans les extraits conventionnels**, grâce à la co-extraction de composés protecteurs. En effet, l'UAE et l'UAEH permettent de solubiliser plus de composés que la méthode conventionnelle (Figure 45a). De plus, à 40 °C avec l'UAEH, le R<sub>R-PE</sub> cesse de diminuer à partir de 120 minutes. Or, dans ces conditions le taux d'extraction des composés est le plus élevé.

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) de colorants et pigments naturels a déjà été rapportée dans la littérature (Shirsath *et al.*, 2012).

Pour les pigments de microalgues, cette technologie s'est avérée performante à plusieurs reprises, avec une augmentation des rendements d'extraction par rapport aux techniques habituelles. C'est notamment le cas pour les caroténoïdes de la spiruline avec un doublement du rendement d'extraction et une réduction marquée du temps de traitement (8 minutes contre 24 heures) (Dey et Rathod, 2013). Les rendements d'extraction ont également été augmentés pour deux pigments de la microalgue verte *Chlorella vulgaris* : la chlorophylle (Kong *et al.*, 2014) et la lutéine (Deenu *et al.*, 2013). En revanche, sur une autre microalgue (*Phaeodactylum tricornutum*), une étude a montré que l'extraction de la fucoxanthine était inchangée en présence d'ultrasons (Kim *et al.*, 2012). Les ultrasons ont cependant amélioré l'extraction de phycobiliprotéines de microalgues : phycoérythrine et

phycocyanine de phytoplancton (Lawrenz *et al.*, 2011), C-phycocyanine de la spiruline (Moraes *et al.*, 2011) et B-phycoérythrine de *Porphyridium cruentum* (Benavides et Rito-Palomares, 2006). Une étude fait même état de l'extraction de la R-PE de la macroalgue rouge *Heterosiphonia japonica*, en utilisant une sonde à ultrasons. Cependant, cette étude ne portait pas sur la technique d'extraction proprement dite, elle ne décrit donc pas l'effet des ultrasons sur la R-PE (Sun *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces travaux laissent à penser que les pigments, y compris les pigments algaux, sont relativement stables aux ultrasons. Néanmoins, la comparaison avec les résultats obtenus ici est délicate en raison des paramètres opératoires différents. D'autre part, il y existe peu de travaux portant sur l'influence de la température sur l'extraction de pigments par ultrasons (UAE). Toutefois, une récente étude sur l'extraction de pigments hydrosolubles des fleurs de Bougainvilliers a montré que l'UAE permettait d'atteindre des rendements plus élevés que la méthode conventionnelle, avec un double effet de la température : un effet positif en augmentant la solubilisation de la matière (dont les pigments) et un effet négatif, car au-delà d'une certaine température le phénomène de cavitation est moins efficace et la température peut induire une altération du pigment (Maran et al., 2015). Il semblerait en effet que la température soit plus dénaturante que les ultrasons en raison de la sensibilité des pigments vis-à-vis de la température (Dey et Rathod, 2013; Maran et al., 2015). Cependant, et pour faire le lien avec notre hypothèse n°2 formulée cidessus, il est possible qu'une exposition trop longue de la R-PE aux ultrasons, même à basse température (22 °C), induise une détérioration du pigment, d'où une diminution du rendement d'extraction (Maran et al., 2015). La comparaison des rendements obtenus au cours du temps (Figure 50) suggère en effet qu'un procédé court est préférable pour l'extraction de la R-PE, puisqu'à 22 °C avec l'UAEH, 31 % de la R-PE est dénaturée entre 60 et 360 minutes.

À notre connaissance, à ce jour seules deux études mentionnent l'UAEH comme méthode d'extraction de pigments. La première étude porte sur l'extraction de la lutéine de la microalgue verte *Chlorella vulgaris* en comparant deux procédés : l'UAE et l'UAEH (Deenu *et al.*, 2013). Cependant, dans cette étude l'UAEH est séquentielle, c'est à dire que l'hydrolyse enzymatique (polysaccharidase commerciale) a été réalisée avant l'extraction par sonication. D'après les auteurs, il ressort qu'avec l'UAE il est préférable d'arrêter l'extraction au bout de 5 heures de procédé, afin d'éviter la dégradation du pigment et donc la diminution de rendement, ce qui va dans le sens de l'hypothèse n°2. De plus, comme constaté ici pour la R-PE, les deux procédés (UAE et UAEH séquentielle) ont augmenté l'extraction de la lutéine par rapport à la méthode conventionnelle. La lutéine après sonication ne présentait aucune

modification de couleur ni de structure, démontrant ainsi une relative stabilité de ce pigment aux ultrasons. Malgré une petite augmentation du rendement d'extraction de la lutéine avec l'UAEH séquentielle, les conclusions de cette étude sont en faveur de l'UAE car la faible augmentation du rendement d'extraction de la lutéine ne compenserait pas le coût d'une étape supplémentaire d'hydrolyse enzymatique.

La deuxième étude porte sur l'extraction de flavonoïdes du céleri (apigénine et lutéoline) par couplage simultané ultrasons-enzyme (UAEH) (pectinase). Une augmentation de l'extraction de ces deux molécules, par rapport à la méthode conventionnelle, a été constatée (Zhang *et al.*, 2011). En revanche, après 30 minutes de sonication, le rendement d'extraction diminuait, ce qui a été attribué à la dégradation de l'enzyme. Un procédé en deux étapes a donc été retenu : UAEH pendant les 30 premières minutes puis arrêt des ultrasons pour poursuivre par une hydrolyse enzymatique pendant 24 heures. Ces résultats s'opposent plutôt à ceux obtenus ici, à savoir qu'à 40 °C à partir de 120 minutes l'UAEH semble plus favorable à l'extraction de la R-PE que l'UAE, ce qui peut être attribué à l'activité des enzymes.

La sensibilité des molécules vis-à-vis de la température et des ultrasons dépend bien sûr de la nature de ces molécules, mais aussi des paramètres expérimentaux. Comme formulé dans l'hypothèse n°1, les composés sensibles sont souvent difficiles à préserver intacts au cours des procédés. Il s'agit donc d'un équilibre entre extraction et dégradation. L'extraction assistée par ultrasons doit donc être utilisée avec précaution lorsqu'il s'agit de composés sensibles (tels que des pigments), les paramètres d'extraction devant être adaptés et optimisés en conséquence (Roselló-Soto *et al.*, 2015; Shirsath *et al.*, 2012).

Pour résumer, l'UAE et l'UAEH permettent, à 22 °C, d'atteindre en 1 à 2 heures des  $R_{R-PE}$  similaires voire supérieurs à ceux de l'extraction conventionnelle. À 40 °C, quel que soit le procédé, une diminution des  $R_{R-PE}$  est observée dès le départ, mais en présence d'enzymes (UAEH) cette diminution s'arrête à partir de deux heures pour tendre vers un plateau, ce qui pourrait être attribué à l'activité des complexes enzymatiques.

#### IV.2. Sucres hydrosolubles, composés carbonés et azotés

Les différentes fractions solubles obtenues ont été caractérisées en terme de rendements d'extraction des sucres hydrosolubles, de l'azote et du carbone (Figure 51). Comme mentionné dans le chapitre précédent, les sucres apportés par les enzymes ont été soustraits afin de ne pas surestimer les teneurs trouvées dans les fractions.



Figure 51 : analyses biochimiques des fractions hydrosolubles à 22 °C et à 40 °C pour l'UAE et l'UAEH. a : sucres hydrosolubles (mg.g<sup>-1</sup> MS) ; b : rendement d'extraction à T360 pour le carbone (couleur) et augmentation de ce rendement (T360 – T0) (hachures) ; c : rendement d'extraction à T360 pour l'azote (couleur) et augmentation de ce rendement (T360 – T0) (hachures). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les différences significatives (p < 0,05) sont indiquées par des lettres différentes.

#### IV.2.1. Sucres hydrosolubles

Les teneurs en sucres hydrosolubles (Figure 51a) des fractions obtenues avec l'UAE à 22 °C (255 ± 14 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) et à 40 °C (296 ± 37 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) indiquent que le procédé de sonication n'est pas significativement influencé par la température, du moins pour les deux températures testées ici. Différentes études ont pourtant rapporté un effet positif de l'augmentation de la température sur l'UAE de sucres de biomasses algales. Il a ainsi été constaté une augmentation de l'extraction de polysaccharides hydrosolubles d'une microalgue en passant de 55 à 95 °C (Kurd et Samavati, 2015), ainsi qu'une libération plus élevée des sucres réducteurs à 30 °C plutôt qu'à 20 °C chez la macroalgue verte *Ulva rigida* (cette augmentation n'étant toutefois plus vérifiée au delà de 30 °C) (Karray *et al.*, 2015). Enfin, il a été décrit que la dégradation par sonication des polysaccharides constitutifs de l'algue rouge *Pyropia yezoensis* est plus facile à 60 et 45 °C qu'à 30 °C (Zhou et Ma, 2006).

Lorsque les complexes enzymatiques sont ajoutés (UAEH), l'augmentation de la température (40 °C) devient alors un facteur qui influence positivement l'extraction des sucres hydrosolubles (Figure 51a). En effet à 40 °C, 439 ± 16 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S de sucres hydrosolubles sont extraits contre deux fois moins à 22 °C (210 ± 14 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Concernant l'effet des enzymes, à 22 °C leur ajout ne semble pas intensifier la solubilisation des sucres de l'algue, bien qu'une petite augmentation de la liquéfaction soit constatée (Figure 49). En revanche, à 40 °C l'ajout des complexes enzymatiques (UAEH) permet d'extraire 1,5 fois plus de sucres que l'UAE (respectivement 439 ± 16 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S et 296 ± 37 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) (Figure 51a). Parmi les quatre conditions étudiées, c'est donc l'UAEH à 40 °C qui a extrait le plus de sucres hydrosolubles. C'est également dans ces conditions que le taux de liquéfaction le plus élevé a été atteint (Figure 49).

Des études ont déjà montré que l'extraction de sucres par UAEH pouvait être influencée, positivement ou négativement, par la température. Ainsi, l'augmentation de la température aurait un effet positif sur l'UAEH pour l'extraction de polysaccharides et de sucres fermentescibles de différentes biomasses végétales, mais aurait un effet négatif à partir d'une certaine valeur (50 - 60 °C) (Liu *et al.*, 2014; Lunelli *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Cet effet négatif pourrait être lié à la dénaturation des enzymes (Liu *et al.*, 2014; Lunelli *et al.*, 2014; Lunelli *et al.*, 2014) et/ou à une altération du phénomène de cavitation, comme mentionné précédemment pour la liquéfaction (Wu *et al.*, 2014). Ces observations seraient également valables pour l'extraction de polysaccharides issus de certaines biomasses animales. En effet, l'extraction par ultrasons en présence de papaïne, des polysaccharides d'un bivalve a été augmentée lorsque la température passait de 35 à 60 °C mais l'effet inverse était observé au-delà de

65 °C (Liao *et al.*, 2015).

Un rapprochement peut être fait entre les rendements d'extraction de la R-PE (Figure 50) et l'extraction des sucres hydrosolubles. Si les sucres sont les principales molécules co-extraites lors de l'extraction par EAE de la R-PE de Gracilaria verrucosa (Mensi et al., 2012), il semble que ces sucres puissent diminuer la solubilité de la R-PE lors de l'hydrolyse enzymatique de Grateloupia turuturu (Denis et al., 2009d). D'après l'hypothèse n°3 formulée précédemment, l'extraction d'un plus grand nombre de molécules pourrait contribuer à la préservation du pigment. Or, l'extraction des sucres hydrosolubles (poly, oligo ou monosaccharides) est significativement plus élevée avec l'UAEH à 40 °C qu'à 22 °C, ce qui pourrait expliquer la stabilisation du R<sub>R-PE</sub> constatée à partir de 120 minutes à 40 °C (Figure 50). Un éventuel effet des sucres issus de Grateloupia turuturu sur la stabilité de la R-PE n'a néanmoins jamais été décrit jusqu'à présent. Cependant, des éléments d'explication peuvent être suggérés. Ainsi il y a plus de 20 ans, une étude a montré que la R-PE de l'algue rouge Gracilaria longa était plus résistante à la température en présence de glucanes non chargés (dextrane) (D'Agnolo et al., 1993). Plus récemment, une étude effectuée au laboratoire a comparé l'effet de différents conservateurs alimentaires sur la stabilité de la R-PE extraite de Grateloupia turuturu. Parmi les conservateurs étudiés, le saccharose et l'acide ascorbigue, se sont montrés particulièrement intéressants (Munier, 2013).

<u>Remarque</u> : le saccharose diminue la disponibilité de l'eau pour les microorganismes et l'acide ascorbique est un additif alimentaire (E300) utilisé pour ses propriétés antioxydantes. L'utilisation de ce dernier a fait l'objet d'un brevet en 2005, portant sur la photo-stabilisation de phycobiliprotéines (dont la B-PE) de Porphyridium cruentum dans un extrait aqueux (Minard, 2005).

Enfin, si les activités antibactériennes et antioxydantes des polysaccharides de macroalgues sont connues (Michalak et Chojnacka, 2015), des études ont montré que les ultrasons (UAE) pouvaient augmenter l'activité antioxydante des polysaccharides de l'algue rouge *Pyropia yezoensis (Zhou et al., 2012, 2008)*. La diminution de taille des polysaccharides expliquerait principalement cette augmentation de l'activité antioxydante (Cheung *et al., 2012; Zhou et al., 2012, 2008*). L'hydrolyse enzymatique de polysaccharides permet également d'augmenter leur activité antioxydante, comme décrit récemment pour la macroalgue rouge *Pterocladia capillacea* (Fleita *et al., 2015*). C'est donc fort logiquement que la combinaison des ultrasons et des enzymes soit à même de moduler l'activité antioxydante de polysaccharides. Ceci a été décrit chez la citrouille (Wu *et al., 2014*), mais

aussi chez un bivalve pour lequel il a été démontré une plus grande efficacité du couplage (UAEH) par rapport à l'enzyme seule (EAE) (Liao *et al.*, 2015).

Pour résumer, il est donc possible d'envisager que le procédé d'UAEH intensifie l'extraction et/ou la modification de composés, tels que des polysaccharides, dont les activités joueraient un rôle en faveur d'une meilleure stabilité de la R-PE.

#### IV.2.2. Composés carbonés et azotés

Les rendements d'extraction de l'azote et du carbone issus de *Grateloupia turuturu*, après 6 heures, sont indiqués sur la Figure 51b et c.

L'extraction par UAE du carbone de l'algue ne semble pas influencée par la température (60,46 ± 2,56 % à 22 °C et 61,86 ± 0,28 % à 40 °C ) (Figure 51b). En revanche, l'ajout des complexes enzymatiques (UAEH) permet d'augmenter l'extraction des composés carbonés, ce qui est d'autant plus marqué lorsque la température passe de 22 °C (83,31 ± 1,58 %) à 40 °C (92,27 ± 0,34 %). Ces résultats sont en accord avec l'extraction des sucres hydrosolubles et la liquéfaction de l'algue. L'UAEH permet donc d'extraire plus de carbone lorsque l'on se rapproche de la température recommandée par les fournisseurs d'enzymes. D'après la comparaison des différences de rendement entre T0 et T360 (T360-T0, barres hachurées), à 40 °C c'est bien le procédé d'UAEH en lui même qui permet d'extraire plus de carbone que l'UAE (respectivement + 51,69 ± 9,31 % et + 27,32 ± 0,80 % de carbone extrait par rapport à T0). Il ne s'agit donc pas d'une augmentation due à la présence des enzymes. En revanche, les résultats pour T360-T0 ne montrent pas de différence significative entre l'UAE 22 °C, l'UAE 40 °C et l'UAEH 22 °C.

Pour l'extraction par UAE de l'azote (Figure 51c), un constat similaire peut être fait : l'extraction de l'azote par sonication n'est pas influencée significativement par la température (54,71 ± 1,20 % à 22 °C et 53,11 ± 0,44 % à 40 °C). Les différences de rendement d'extraction entre T0 et T360 vont également dans ce sens. Ces observations ne coïncident cependant pas avec d'autres études. En effet, il a été décrit récemment que l'extraction par UAE, des acides aminés du raisin, était améliorée par une augmentation de la température (de 10 à 70 °C). En revanche, au-delà de 70 °C (80 et 90 °C) aucune différence n'est constatée (Carrera *et al.*, 2015). Une autre étude a également montré que la température optimale d'extraction par sonication de la taurine de *Pyropia yezoensis* était de 40 °C, sachant que le domaine considéré était compris entre 20 et 60 °C (Wang *et al.*, 2015a). Une augmentation significative (d'un facteur 2,2 à 22 °C et de 2,6 à 40 °C) du rendement d'extraction des composés azotés est observée lorsque les complexes enzymatiques sont ajoutés (UAEH). Les résultats pour T360-T0 confirment que cette augmentation est bien due au procédé et non pas à la composition en azote des enzymes. Enfin, il ne semble pas y avoir d'effet de la température sur l'UAEH de l'azote de l'algue, contrairement à ce qui a été trouvé pour le carbone (Figure 51b).

# V. Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer que l'extraction conventionnelle de la R-PE était influencée par le choix du solvant, le tampon phosphate étant plus adapté que l'eau du réseau à pH 5,5. La variabilité saisonnière de la teneur en R-PE de *Grateloupia turuturu* a également été confirmée. En revanche, ces deux paramètres ne semblent pas affecter l'extraction des composés hydrosolubles dans leur ensemble.

La stabilité de la R-PE à l'égard de la température a également été étudiée. Le niveau de dégradation de la R-PE extraite est influencé par l'augmentation de la température et la durée d'exposition. De ce fait, il se peut que l'efficacité d'un procédé pour l'extraction de la R-PE soit sous-estimée par la dégradation thermique du pigment au cours du temps.

L'UAE et l'UAEH ont, quelle que soit la température, permis d'extraire en moins d'une heure deux fois plus de composés hydrosolubles que la méthode conventionnelle. L'UAEH à 40 °C s'avère être le procédé le plus efficace pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* avec près de 91 % de composés passés en solution. Les fractions solubles ainsi obtenues se révèlent être plus riches en sucres hydrosolubles, composés carbonés et azotés.

Un composé hydrosoluble a été ciblé en particulier : la R-phycoérythrine. Conformément à l'étude préalable de stabilité, les deux procédés doivent être appliqués à 22 °C. À cette température, aucune différence n'est observée entre l'UAEH et l'UAE. Cependant, il serait préférable de choisir l'UAEH car l'extraction des composés hydrosolubles est plus importante avec ce procédé. Il a également été démontré que celui-ci doit être assez court (60 à 120 minutes) afin d'éviter la dégradation de la R-PE. Ainsi, entre 60 et 120 minutes, **l'UAEH à 22 °C a permis d'extraire 1,4 fois plus de R-PE que l'extraction conventionnelle** à l'eau du réseau (pH 5,5), et il a aussi permis d'atteindre un R<sub>R-PE</sub> similaire à la méthode conventionnelle au tampon phosphate. Il s'agit donc d'un procédé efficace pour l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu*. Ce chapitre avait pour objectif de déterminer l'effet de la température sur l'UAE et l'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et pour l'extraction de la R-PE. **Parmi les deux procédés étudiés, l'UAEH est à privilégier car il permet d'extraire plus de composés, dont certains pourraient être à même de protéger la R-PE ou d'être eux aussi valorisés.** Les paramètres opératoires doivent cependant être adaptés en fonction des objectifs recherchés. En effet, un procédé court (1 à 2 heures) à 22 °C est préférable pour extraire la R-PE, tandis qu'un procédé plus long (4 à 6 heures) à 40 °C est plus adapté pour la liquéfaction de l'algue. D'autres paramètres sont également à intégrer, parmi lesquels figurent le débit de circulation du mélange et la puissance des ultrasons. Cette étude fera l'objet du chapitre suivant.

# **Chapitre V**

# Optimisation de l'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-phycoérythrine

# I. Contexte et objectifs

À l'issue du Chapitre IV, l'UAEH a été retenue pour poursuivre ce travail afin d'améliorer l'efficacité de ce procédé vis-à-vis de la liquéfaction de l'algue *Grateloupia turuturu* et de l'extraction de la R-phycoérythrine.

Ce chapitre a pour objectif d'étudier l'influence de certains paramètres de l'UAEH afin d'optimiser l'extraction de l'ensemble des composés de l'algue et plus particulièrement celle de la R-PE, le chapitre précédent ayant montré que l'augmentation de la température avait un double effet : positif sur la liquéfaction de l'algue et négatif sur l'extraction de la R-PE.

La méthodologie des plans d'expériences sera utilisée dans ce chapitre pour optimiser les deux réponses étudiées, liquéfaction de l'algue et extraction de la R-PE, selon un plan de type surface de réponse. Ces plans sont couramment utilisés pour optimiser l'extraction de composés, aussi bien par hydrolyse enzymatique (Dumay *et al.*, 2013; Kechaou *et al.*, 2015; Mensi *et al.*, 2012), par UAE (Deenu *et al.*, 2013; Kadam *et al.*, 2015b) ou par UAEH (Chen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014). Plusieurs paramètres, notamment ceux liés aux enzymes et/ou aux ultrasons, peuvent moduler l'efficacité de l'UAEH. Les paramètres liés aux ultrasons sont importants à prendre en considération pour l'intensification de réactions telles que l'hydrolyse enzymatique (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015; Shirsath *et al.*, 2012; Subhedar et Gogate, 2013). Dans cette étude, les paramètres retenus sont : la puissance des ultrasons, la température et le débit de circulation du mélange réactionnel dans le système.

La composition biochimique du cocktail enzymatique utilisé dans ce travail de thèse a par ailleurs été approfondie, elle introduit ce chapitre.

Des analyses complémentaires ont été réalisées, sur les fractions obtenues, par rapport aux chapitres précédents, telles que la caractérisation des oses et des acides aminés ainsi que la détermination des masses molaires des sucres extraits. Les expérimentations ont été conduites sur *Grateloupia turuturu* humide et broyée (collecte de 2014), 1 % de chaque enzyme par rapport au poids d'algue humide est introduit dans le mélange réactionnel.

# II. Composition du cocktail enzymatique

Dans les chapitres précédents, la teneur en sucres hydrosolubles du cocktail enzymatique a été indiquée. Dans ce chapitre, cette composition a été approfondie en terme de carbone, d'azote et de résidus glycosidiques (oses libres). Le Tableau XIX présente les résultats des analyses en mg.g<sup>-1</sup> de cocktail enzymatique frais (CE.F) et en mg.g<sup>-1</sup> d'algue sèche (Alg.S). Ces teneurs, ramenées par rapport à l'algue sèche, correspondent à l'apport de ces composés par le cocktail enzymatique. Comme pour les sucres hydrosolubles, ces apports ont été soustraits des fractions solubles afin de ne pas surestimer leur composition et les rendements d'extraction. Ce raisonnement est basé sur l'hypothèse que les enzymes sont principalement présentes dans la fraction soluble.

Tableau XIX : composition du cocktail enzymatique en terme d'azote, de carbone, de sucres hydrosolubles et d'oses totaux. Résultats exprimés en mg.g<sup>-1</sup> de cocktail enzymatique frais (CE.F) et en mg.g<sup>-1</sup> d'algue sèche (Alg.S) (2014) pour l'apport par le cocktail enzymatique. Les analyses ont été effectuées en triplicat, les valeurs moyennes obtenues après calculs sont présentées.

	Composition du cocktail	Apport par le cocktail		
	enzymatique	enzymatique		
	(mg.g <sup>-1</sup> CE.F)	(mg.g <sup>-1</sup> Alg.S)		
Azote	10,50	2,85		
Carbone	248,73	67,62		
Sucres hydrosolubles	427,43	116,19		
Oses libres (total)	420,08	114,20		
Xylose	14,62 (3,48 %)*	3,97		
Mannose	15,87 (3,78 %)*	4,32		
Galactose	25,09 (5,97 %)*	6,82		
Glucose	349,50 (83,20 %)*	95,01		
Acide galacturonique	15,00 (3,57 %)*	4,08		

\* Pourcentage relatif de chaque ose par rapport aux oses totaux

Le cocktail enzymatique se compose à plus de 40 % de sucres hydrosolubles (427,43 mg.g<sup>-1</sup> CE.F), ce qui est confirmé par la teneur en oses libres (420 mg.g<sup>-1</sup> CE.F). Cinq oses sont détectés : le xylose, le mannose, le galactose, le glucose et l'acide galacturonique. Le glucose prédomine largement et représente plus de 83 % des oses totaux. Ceci est cohérent avec les informations obtenues auprès des fournisseurs, qui ont indiqué des teneurs élevées en dextrines (polymères de glucose) et maltodextrines (polymères pouvant être composés de différents oses dont le glucose). Les autres oses sont beaucoup moins présents avec 6 %

de galactose, puis environ 3,5 % de xylose, mannose et acide galacturonique. Le carbone et l'azote sont présents en quantités plus faibles avec 248,73 mg.g<sup>-1</sup> CE.F pour le premier (soit 25 % du cocktail enzymatique) et seulement 10,50 mg.g<sup>-1</sup> CE.F pour l'azote (soit 1 %). Ce dernier représente la partie protéique du cocktail enzymatique, c'est à dire les enzymes. Compte tenu de ces teneurs élevées en sucres, il apparaît opportun de soustraire ces apports de la composition des fractions, afin d'éviter toute surestimation.

<u>Remarque</u> : chez Grateloupia turuturu, l'ose majoritaire est le galactose (86,4 % des oses totaux) tandis que le glucose ne représente que 11,9 % (Chapitre III, Tableau XVII, p.128).

Un spectre d'absorbance d'une solution de ce cocktail enzymatique a permis de s'assurer que les complexes enzymatiques n'absorbaient pas dans l'intervalle de longueurs d'onde de la R-phycoérythrine (450-600 nm), évitant donc la surestimation de la teneur en R-PE en présence des enzymes.

# III. Détermination des conditions optimales de l'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et pour l'extraction de la R-PE

Pour les 19 essais, les conditions expérimentales suivantes ont été maintenues constantes : quantité de mélange réactionnel (3250-3300 g), 1 % de chaque enzyme par rapport au poids d'algue humide, ajustement du mélange réactionnel à pH 5,5 (2,5-2,7 mL d'HCl 6M) et réalisation des expérimentations dans une pièce climatisée (17 °C) placée à l'obscurité. Les essais ont tous été conduits sur six heures avec des prélèvements réguliers.

### III.1. Conduite du plan d'expériences

Les deux réponses étudiées sont la liquéfaction de l'algue (%) et l'extraction de la R-PE (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Les valeurs finales obtenues après six heures de traitement sont présentées dans le Tableau XX. Tableau XX : résultats du plan d'expériences après 6 heures concernant les deux réponses étudiées : la liquéfaction de l'algue (%) et l'extraction de la R-PE (mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Les conditions de chaque essai sont rappelées (puissance (P), température (T) et débit (Q)).

Numéro de l'essai	Conditions			Liquéfaction	Extraction	
	<b>P</b> (W)	<b>T</b> (°C)	<b>Q</b> (L.h <sup>-</sup> 1)	de l'algue (%)	<b>de la R-PE</b> (mg.g <sup>-1</sup> Alg.S)	
1	359	24	97	75,76	3,80	
2	300	20	145	68,85	4,06	
3	300	30	145	72,16	3,10	
4	300	30	145	74,84	3,11	
5	300	30	145	78,74	3,00	
6	241	24	193	68,41	3,65	
7	300	40	145	82,93	2,51	
8	359	24	193	75,39	3,89	
9	300	30	65	76,55	3,43	
10	241	36	193	70,11	2,64	
11	300	30	145	73,61	3,22	
12	241	36	97	74,45	2,58	
13	300	30	145	70,97	3,12	
14	359	36	193	78,68	2,46	
15	200	30	145	69,03	2,82	
16	300	30	225	71,53	2,96	
17	400	30	145	81,58	3,22	
18	359	36	97	81,34	2,71	
19	241	24	97	67,21	3,63	

Points centraux

Ces résultats indiquent que, pour les conditions testées, la liquéfaction est la plus élevée pour 300 W, 40 °C et 145 L.h<sup>-1</sup> (82,93 %) (essai n°7), mais aussi que dans ces conditions, le rendement d'extraction de la R-PE est parmi les plus faibles (2,51 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). De façon similaire, en considérant cette fois l'extraction de la R-PE, la valeur maximale est obtenue pour 300 W, 20°C et 145 L.h<sup>-1</sup> (4,06 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) (essai n°2), mais le pourcentage de matière solubilisée devient alors bien plus faible (68,85 %). Seule la température diffère entre ces deux essais (20 ou 40 °C). Ceci confirme les résultats du précédent chapitre, qui montraient qu'une faible température est à privilégier pour l'extraction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une faible température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable pour la liquéfaction de la la liquéfaction de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable plus de la R-PE tandis qu'une température plus élevée est souhaitable plus de la la

L'objectif initial de la réalisation de ce plan était d'optimiser simultanément la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-PE. Compte tenu des observations précédentes, un compromis acceptable semble difficile à trouver. Aussi, a-t-il été choisi de réaliser une optimisation pour chacune des deux réponses.

#### III.2. Détermination des conditions optimales pour la liquéfaction

Les résultats de liquéfaction de l'algue (Tableau XX) ont été analysés et affinés en prenant en compte la durée du procédé (D) comme variable supplémentaire. Les cinétiques de liquéfaction ont alors été exploitées à l'aide d'un modèle polynomial du second degré avec interaction d'ordre 1. La régression et l'analyse des facteurs influents (en ne prenant que les valeurs de p inférieures à 0,05) ont été effectuées à partir d'une analyse par modèle linéaire généralisé. L'Equation 13 décrit la cinétique de liquéfaction, le R<sup>2</sup> ajusté du modèle est alors de 96,41 %.

Equation 13

$$y = 66,124 + 2,469 \text{ x P} + 1,897 \text{ x T} + 7,483 \text{ x D} + 0,292 \text{ x P}^2 - 1,861 \text{ x D}^2 + 1,103 (\text{P x D}) + 0,775 (\text{D x T})$$

Parmi les quatre variables étudiées, seul le débit (Q) s'est avéré être non influent, tandis que pour les autres, des corrélations positives ont été trouvées avec le taux de liquéfaction de l'algue. Les conditions optimales prédites par le modèle sont indiquées dans le Tableau XXI. Le coefficient de régression (R<sup>2</sup> ajusté) permet d'estimer la qualité globale d'ajustement entre les données et les prédictions.

	Conditions optimales				R² ajusté du modèle	Valeur prédite
	<b>P</b> (W)	<b>T</b> (°C)	<b>Q</b> (L.h <sup>-1</sup> )	D (min)	(%)	(%)
Liquéfaction de l'algue	400	40	65	360	96,41	86,95

Tableau XXI : conditions optimales pour les quatre variables (puissance (P), température (T), débit (Q) et durée (D)) et le taux de liquéfaction (%) prédit par le modèle.

Le débit n'ayant pas d'influence, il a été fixé arbitrairement à la valeur la plus basse du domaine d'étude, à savoir **65 L.h**<sup>-1</sup>. Dans la littérature, compte tenu des modes opératoires impliquant des réacteurs fermés, sans circulation, ce paramètre n'est que rarement évoqué. Une étude portant sur l'extraction des sucres de la microalgue du genre *Chlorella* sp, à l'aide d'un réacteur à ultrasons, a déjà mentionné l'influence du débit de recirculation. Parmi les trois valeurs étudiées (55, 91 et 126 L.h<sup>-1</sup>), le débit moyen permettait d'obtenir les meilleurs rendements (Zhao *et al.*, 2013). Les résultats observés ici diffèrent quelque peu puisque,

malgré la grande plage de débits testés (de 65 à 225 L.h<sup>-1</sup>), aucune influence significative n'a été observée. Cependant, les conditions opératoires (biomasse, type de réacteur à ultrasons, puissance, durée, ...) sont trop différentes pour permettre la comparaison.

Les trois variables influentes (température, puissance et durée) ont quant à elles été fixées aux niveaux les plus élevés du domaine expérimental, c'est à dire **40** °**C**, **400 W** et **360 minutes**. Dans ces conditions, après 360 minutes d'UAEH, le pourcentage de matière liquéfiée prédit par le modèle devrait être de 86,95 % (R<sup>2</sup> ajusté de 96,41 %).

Dans la littérature, ces trois variables sont souvent étudiées pour les procédés faisant intervenir les ultrasons. Il a ainsi été montré que l'extraction de polysaccharides par UAEH était améliorée avec l'augmentation de la puissance ultrasonore, de la température et de la durée d'extraction, mais qu'au-delà d'une valeur limite, l'effet inverse était obtenu (Chen et al., 2012; Liao et al., 2015; Liu et al., 2014; Wu et al., 2014). Ces mêmes constats ont également été faits sur des microalgues, concernant l'extraction par UAE du glucose de Chlorella sp (600 à 1000 W, 20 à 80 minutes) ou des polysaccharides de Spirulina platensis (50 à 100 W, 55 à 95 °C, 5 à 35 minutes) (Kurd et Samavati, 2015; Zhao et al., 2013). Concernant les macroalgues, une corrélation positive a été mise en évidence entre le passage en solution des composés (matière sèche solubilisée) de l'algue brune Ascophyllum nodosum et la puissance ultrasonore délivrée au milieu par la sonde (Kadam et al., 2015a). Il a même été décrit par la suite que l'extraction de différentes molécules (composés phénoliques, fucose et acide uronique) est améliorée par l'augmentation de la puissance ultrasonore délivrée au milieu (9 à 100 W) et pour la durée maximale de traitement (25 minutes) (Kadam et al., 2015b). Une influence positive de l'augmentation de la puissance a également été mentionnée pour l'extraction de la taurine de Pyropia yezoensis, avec un bain à ultrasons dont la puissance allait de 100 à 300 W (Wang et al., 2015a).

### III.3. Détermination des conditions optimales pour l'extraction de la R-PE

À l'instar de la détermination des conditions optimales pour la liquéfaction, des essais de modélisation plus poussée ont été réalisés en introduisant la durée comme quatrième facteur. Il s'est avéré qu'aucun des modèles appliqués n'a permis de traduire de façon satisfaisante et robuste l'ensemble des cinétiques d'extraction de la R-PE, celles-ci variant fortement selon les conditions opératoires (voir les exemples sur la Figure 52).



Figure 52 : cinétiques des rendements d'extraction pour la R-PE ( $R_{R-PE}$  en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) obtenues pour quelques essais

Pour les essais n°7 et n°15, le pic de R-PE est obtenu après 30 minutes, il est suivi d'une diminution pouvant être brusque (n°15) ou plus modérée (n°7). Pour les essais n°4 et n°17, une augmentation est observée pendant la première heure, suivie par une diminution régulière du  $R_{R-PE}$  sur les 5 heures suivantes. Pour l'essai n°19, l'augmentation du rendement est marquée pendant la première heure, puis plus progressive jusqu'à la troisième heure, avec ensuite l'apparition d'un plateau. Enfin, pour les essais n°2 et n°8, les rendements augmentent pendant 2 à 3 heures puis tendent vers une phase stationnaire, voire légèrement descendante.

Ces cinétiques différentes sont vraisemblablement le résultat de phénomènes combinés d'extraction et de dégradation ou de précipitation du pigment au cours du temps, mais elles sont aussi liées aux conditions initiales de température (la température du mélange réactionnel à T0 est adaptée en fonction des conditions expérimentales du plan d'expériences, Chapitre II. IV.7., p.96). Il est donc difficile de trouver un seul modèle permettant de traduire correctement cette diversité de cinétiques.

Les données des 19 essais expérimentaux ont donc été analysées séparément pour chaque temps. L'analyse des résultats a montré que les  $R_{R-PE}$  les plus élevés sont obtenus entre 120 et 240 minutes. Pour ces trois temps (120, 180 et 240 minutes), l'augmentation de la température est un paramètre qui affecte négativement le  $R_{R-PE}$ , ce qui est cohérent avec

les travaux antérieurs (Munier et al., 2014) et les conclusions du chapitre précédent. Les autres facteurs se sont tous révélés non influents, mis à part un effet quadratique négatif observé à 180 minutes pour la puissance ( $P^2$ ) (avec p = 0,02). Les équations permettant de modéliser le modèle (avec p inférieur à 0,05) à 120, 180 et 240 minutes, en ne considérant que les paramètres influents, sont les suivantes :

$$R_{R-PE}$$
 T120 = 3,312 - 0,535 x T Equation 14

$$R_{R-PE}$$
 T180 = 3,340 - 0,585 x T - 0,096 x  $P^2$  Equation 15

$$R_{R-PE}$$
 T240 = 3,232 - 0,583 x T Equation 16

L'optimisation de l'extraction de la R-PE a ensuite été réalisée, selon ces équations, pour chacun de ces temps. Les résultats de l'analyse canonique sont reportés dans le Tableau XXII, seules les trois valeurs prédites les plus élevées sont présentées, c'est à dire à 120, 180 et 240 minutes. Les conditions optimales prédites sont identiques pour les trois durées étudiées, soit une puissance de **300 W**, une température de **20 °C** et un débit fixé à **145 L.h**<sup>-1</sup>. Ces conditions semblent cohérentes puisqu'elles ont également permis, lors de la réalisation du plan d'expériences, d'atteindre le rendement d'extraction le plus élevé (essai n°2 : 4,06 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, Tableau XX, Figure 52).

Tableau XXII : conditions optimales pour les trois variables (puissance (P), température (T), débit (Q)) et les valeurs prédites pour le  $R_{R-PE}$  à 120, 180 et 240 minutes

	Conditions optimales			R² ajusté du modèle	Valeur
	<b>P</b> (W)	<b>T</b> (°C)	<b>Q</b> (L.h <sup>-1</sup> )	(%)	(mg.g <sup>-1</sup> Alg.S)
R R-PE à 120 minutes	300	20	145	85,46	4,21
R <sub>R-PE</sub> à 180 minutes	300	20	145	92,07	4,32
R R-PE à 240 minutes	300	20	145	90,44	4,21

La valeur prédite la plus élevée a été trouvée à 4,32 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S après 180 minutes, suivie par 4,21 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S dès 120 minutes et après 240 minutes. Les conditions pour l'optimisation de l'extraction de la R-PE sont donc : valeur minimale pour la température (**20** °**C**), et valeurs centrales pour la puissance (**300 W**) et le débit (**145 L.h**<sup>-1</sup>).

Afin d'obtenir les fractions hydrosolubles les plus riches en R-PE et de déterminer à partir de quel moment le rendement d'extraction de la R-PE commence à diminuer, il a été décidé de tester expérimentalement ces conditions sur **210 minutes** (l'optimum étant susceptible de se situer autour de 180 minutes). Les cinétiques seront affinées par des prélèvements toutes les 30 minutes à partir de 90 minutes. En effet, la durée de sonication est considérée comme un paramètre important, d'où l'intérêt de réaliser un suivi cinétique plus précis afin de pouvoir déterminer une durée optimale de traitement (Shirsath *et al.*, 2012). De plus, comme il l'a été suggéré dans le chapitre précédent, une exposition trop longue aux ultrasons peut parfois engendrer une dégradation de composés sensibles, tels que la R-PE (Shirsath *et al.*, 2012).

L'extraction de la R-PE de macroalgues par UAEH et UAE n'a jamais été décrite dans la littérature, cependant des travaux ont déjà porté sur l'optimisation de son extraction par hydrolyse enzymatique (EAE). Sur *Gracilaria verrucosa*, il a ainsi été montré que l'augmentation de température avait une influence positive contrairement à l'augmentation de la durée d'hydrolyse (Mensi *et al.*, 2012). Les auteurs de cette étude préconisent une hydrolyse courte à température relativement élevée (6 h, 48 °C, xylanase et cellulase) pour obtenir un rendement maximal d'extraction de la R-PE de 6,25 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S. Les différents résultats présentés ici et dans le chapitre IV montrent cependant un effet négatif de la température sur la R-PE. L'étude de Mensi *et al.* corrobore cependant l'idée d'une hydrolyse courte, il ne faudrait donc pas poursuivre l'UAEH au-delà de 210 minutes.

Il a également été montré au laboratoire que les plans centraux composites sont un outil efficace pour optimiser l'EAE (xylanase) de la R-PE de *Palmaria palmata*. En effet, un rendement de 12,36 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S a été atteint dans les conditions de température et de durée optimisées (24 °C et 320 minutes) (Dumay *et al.*, 2013). Cette température optimale est inférieure à celle préconisée par les fournisseurs, tout comme la température de 20 °C trouvée ici. En revanche, la durée d'hydrolyse est plus longue (320 minutes) que celle déterminée pour l'UAEH (210 minutes).

Contrairement à l'optimisation de la liquéfaction, la puissance n'est pas ressortie ici comme un facteur influençant significativement l'extraction de la R-PE. Cependant, des études portant sur l'extraction de pigments sont parvenues à des conclusions différentes. C'est le cas, par exemple, pour l'UAE de pigments du Bougainvilliers (Maran *et al.*, 2015) et l'UAEH de pigments du céleri (Zhang *et al.*, 2011) pour lesquels l'augmentation de la puissance influence positivement leur extraction (60 à 95 W pour le premier et 45 à 80 W pour le second). Cependant, au-delà d'une certaine valeur, la puissance a un effet négatif,

probablement dû à des bulles de cavitation devenues nombreuses et qui altéreraient la propagation de l'énergie dans le milieu (Maran *et al.*, 2015). Des observations similaires ont été faites pour l'extraction par UAE du  $\beta$ -carotène de la microalgue *Spirulina platensis*, avec une augmentation de son extraction en augmentant la puissance de 50 à 130 W. Au-delà (130 à 145 W), le rendement d'extraction diminue ce qui pourrait, selon les auteurs, être dû à la coalescence de bulles de cavitation qui imploseraient alors moins fortement (Dey et Rathod, 2013).

### III.4. Résumé des conditions optimales

Les deux optimisations distinctes ont permis de déterminer les conditions optimales pour la température, la puissance, le débit et la durée (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : résumé des conditions optimales pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-PE (puissance (P), température (T), débit (Q) et durée (D))

	Conditions optimales			
	<b>P</b> (W)	<b>T</b> (°C)	<b>Q</b> (L.h⁻¹)	<b>D</b> (min)
Liquéfaction	400	40	65	360
Extraction de la R-PE	300	20	145	210

# IV. Validation de la prédiction de la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* par l'UAEH en conditions optimisées

L'optimisation du procédé d'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* a été effectuée selon les conditions préalablement décrites, c'est à dire : **400 W**, à **40 °C** pour un débit de **65 L.h**<sup>-1</sup> pendant **360 minutes**. Des prélèvements réguliers ont été effectués afin de suivre l'évolution de la liquéfaction. Trois expérimentations indépendantes ont été réalisées.

<u>Remarque</u> : comme indiqué dans les chapitres précédents, le suivi du pH au cours du temps révèle sa relative stabilité, avec une augmentation moyenne de 0,43 unité pH. L'énergie délivrée au mélange (W.h) et l'énergie apportée par kilogramme de mélange réactionnel (W.h.kg<sup>-1</sup>) sont les mêmes que celles mentionnées dans les chapitres III et IV.

#### IV.1. Liquéfaction de l'algue

Après 360 minutes d'UAEH, dans les conditions optimales, le pourcentage d'algue liquéfiée est de 87,58 ± 1,40 %, soit 1,8 fois plus de composés en solution par rapport à T0. Le modèle prédisait une valeur de 86,95 %, les résultats obtenus expérimentalement sont donc conformes. Cette valeur est supérieure à toutes celles obtenues lors de la réalisation du plan d'expériences (maximum 82,93 % pour l'essai n°7 avec 300 W, 40 °C, 145 L.h<sup>-1</sup>; Tableau XX). Il y a donc bien eu une optimisation de la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*.

La moyenne des cinétiques de liquéfaction de *Grateloupia turuturu*, pour les trois expérimentations effectuées est présentée dans la Figure 53.



Figure 53 : cinétique de liquéfaction de *Grateloupia turuturu* dans les conditions optimales de liquéfaction définies par le plan d'expériences (400 W, 40 °C, 65 L.h<sup>-1</sup>). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3

Le gain de liquéfaction augmente régulièrement au cours du temps, avec cependant une augmentation plus rapide lors des 30 premières minutes (+  $10,42 \pm 1,23 \%$ ) et un ralentissement au bout de 5 heures (+  $1,27 \pm 0,25 \%$  la dernière heure). Néanmoins, même après 6 heures de traitement, la liquéfaction bien que ralentie semble se poursuivre, confirmant que la durée de 360 minutes prédite par le modèle est bien nécessaire. Au final, le gain de liquéfaction est de +  $38,26 \pm 1,75 \%$ .

Une comparaison peut être faite avec les résultats de liquéfaction obtenus dans le Chapitre III sur les algues de 2013. Avec des conditions proches (400 W, 40 °C, 50 L.h<sup>-1</sup>), le gain de liquéfaction était de +  $38,87 \pm 6,26$  % dès 4 heures et de +  $40,9 \pm 6,23$  % après 6 heures, pour un pourcentage final d'algue liquéfiée de  $90,71 \pm 0,13$  %. Comme le débit est apparu non influent, ces différences sont vraisemblablement dues à la période de collecte de la biomasse (2013 / 2014).

<u>Remarque</u> : pour rappel, la R-PE n'a pas été dosée dans les surnageants obtenus dans ces conditions, puisque d'après les résultats du plan d'expériences (Tableau XX) et du chapitre IV elle est dégradée à 40 °C.

Avec ce procédé d'UAEH optimisé pour la liquéfaction de l'algue, ce sont 3,3 fois plus de composés hydrosolubles qui sont extraits par comparaison à une extraction conventionnelle à l'eau du réseau, sur algues lyophilisées et cryobroyées (Chapitre IV, Figure 45a, p.153).

# IV.2. Analyses des fractions : surnageants et culots

# IV.2.1. Distribution du carbone et de l'azote de l'algue

Les rendements d'extraction ont été déterminés pour la fraction soluble (surnageant) et pour la fraction insoluble (culot), à T0 et T360, mais de façon différente aux Chapitres III et IV. En effet, compte tenu de la composition biochimique du cocktail enzymatique indiquée dans le Tableau XIX, les rendements d'extraction des surnageants ont été corrigés. Ainsi, les valeurs indiquées ci-dessous (Figure 54) reflètent plus précisément la répartition de l'azote et du carbone de l'algue dans chaque fraction, au début (T0) et à la fin (360 min) de l'application du procédé d'UAEH optimisé.



Figure 54 : répartition de l'azote (a) et du carbone (b) de *Grateloupia turuturu* entre la fraction soluble (surnageant, S) et insoluble (culot, C) à T0 et T360 minutes dans les conditions optimales de liquéfaction. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les étoiles \*\*\* indiquent une différence significative par rapport au T0 (p < 0,001)

Au démarrage de l'UAEH (T0), si l'azote et le carbone de l'algue sont principalement retrouvés dans le culot (respectivement 58,18  $\pm$  4,03 % et 68,27  $\pm$  4,76 %), une partie est déjà néanmoins passée en solution après les 30 minutes de préparation du mélange réactionnel. Ceci est confirmé par le pourcentage d'algue liquéfiée constaté initialement (49,31  $\pm$  2,23 %).

Après six heures de traitement, la tendance inverse est constatée puisque l'azote et le carbone se retrouvent essentiellement dans la fraction soluble. Pour l'azote, ce sont près de

71 % (Figure 54a) qui sont passés en solution, soit une augmentation d'un facteur 1,9 par rapport au T0. Pour le carbone (Figure 54b), l'effet de l'UAEH est encore plus marqué puisque près de 77 % du carbone sont retrouvés dans le surnageant, soit 2,7 fois plus de composés carbonés en solution par rapport à T0. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de la liquéfaction de l'algue, puisque entre T0 et T360 le pourcentage d'algue liquéfiée est multiplié par un facteur 1,8 (49,31 ± 2,23 % à T0 et 87,58 ± 1,40 % à T360).

Dans ces conditions optimisées, l'UAEH permet donc d'augmenter fortement la solubilisation des composés carbonés et azotés de *Grateloupia turuturu*.

### IV.2.2. Analyses des sucres

# IV.2.2.1. Sucres hydrosolubles

La détermination de la teneur en sucres des fractions solubles a été effectuée à T0 et après 360 minutes, l'apport par les enzymes ayant été soustrait (Tableau XIX) .

Après les étapes de préparation du mélange réactionnel (30 minutes), le rendement d'extraction des sucres hydrosolubles est de  $80,12 \pm 7,41 \text{ mg.g}^{-1}$  Alg.S. II atteint  $330,00 \pm 13,11 \text{ mg.g}^{-1}$  Alg.S après six heures d'UAEH, soit une augmentation d'un facteur 4,1 par rapport au T0. En comparaison, pour les algues collectées en 2013, six heures de procédé permettaient d'atteindre une valeur un peu plus élevée (439 ± 16 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) (Chapitre III, Figure 42a, p.140), ceci pouvant s'expliquer par un pourcentage de liquéfaction légèrement supérieur (pour des paramètres expérimentaux proches).

### IV.2.2.2. Oses libres

L'analyse de la composition en oses libres a été réalisée sur les fractions hydrosolubles à T0 et après 360 minutes. Comme pour les sucres hydrosolubles, les valeurs ont été exprimées en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S afin de prendre en compte la composition osidique du cocktail enzymatique (Tableau XIX). Les valeurs présentées dans le Tableau XXIV sont donc des valeurs corrigées, la composition en oses de *Grateloupia turuturu* y est également rappelée.
Tableau XXIV : composition osidique (en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) des fractions solubles obtenues à T0 et T360 dans les conditions optimisées pour la liquéfaction par UAEH de *Grateloupia turuturu*. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3

		Oses totaux			
	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	(mg.g <sup>-1</sup> Alg.S)
Alguo	2,87 ± 2,77	Nd	149,42 ± 26,93	20,64 ± 4,45	<b>172 02</b> + 20 90
Algue	(1,7 %)*		(86,4 %)*	(11,9 %)*	<b>172,93</b> ± 30,89
	0,27 ± 0,46	$0,25 \pm 0,43$	66,43 ± 12,19	6,48 ± 11,22	<b>73 43</b> ± 04 07
UAEH IU	(0,3 %)*	(0,3 %)*	(93,1 %)*	(6,4 %)*	7 <b>3,43</b> ± 24,27
	4,62 ± 0,58	$1,08 \pm 1,24$	211,74 ± 27,44	54,59 ± 21,20	<b>272 02</b> ± 40 00
UAEH 1300	(1,8 %)*	(0,4 %)*	(78,3 %)*	(19,6 %)*	212,03 ± 48,88

\* Pourcentage relatif de chaque ose par rapport à l'ensemble des oses détectés (oses totaux)

Nd : non détecté

Il convient de préciser que la méthanolyse de *Grateloupia turuturu* n'a permis d'extraire que 173 mg d'oses par gramme d'algue sèche, or, après 360 minutes d'UAEH ce sont près de 272 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S qui sont quantifiés dans la fraction soluble (teneurs déterminées après méthanolyse des surnageants). Il semble donc que la méthanolyse de la poudre d'algue ne permette pas d'extraire tous les sucres, la présence de particules en suspension dans le méthanolysat confirmant cela.

Il est également intéressant de comparer les résultats obtenus par CPG avec ceux obtenus par le dosage colorimétrique de Dubois sur les surnageants (IV.2.2.1. ). Il s'avère que ces résultats sont assez proches. En effet, à T0 le rendement d'extraction des oses hydrosolubles est de  $73,43 \pm 24,27$  mg.g<sup>-1</sup> Alg.S et celui des sucres hydrosolubles de  $80,12 \pm 7,41$  mg.g<sup>-1</sup> Alg.S. Après 360 minutes, la teneur en oses et en sucres hydrosolubles est respectivement de  $272,03 \pm 48,88$  mg.g<sup>-1</sup> Alg.S et de 330 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S. L'analyse par CPG confirme que l'UAEH permet de solubiliser les sucres de *Grateloupia turuturu*, puisque l'extraction des oses est multipliée par 3,7.

Cette analyse plus poussée de la composition en sucres des fractions solubles (Tableau XXIV) permet de constater que quatre oses sont présents dans les surnageants : le xylose, le mannose, le galactose et le glucose. Le xylose et le mannose ne sont retrouvés qu'à l'état de trace, à T0 et T360 le xylose représente 0,3 et 1,8 % des oses présents, le mannose représente quant à lui 0,3 et 0,4 %. Le glucose est retrouvé en plus grande proportion puisqu'il représente 6,4 % des oses à T0 et 19,6 % après 360 minutes ; cette augmentation pourrait venir de la dégradation de l'amidon floridéen et de la cellulose de

l'algue (Fidelis *et al.*, 2014). Néanmoins, que ce soit à T0 ou à T360, l'ose majoritaire est toujours le galactose, il représente 93,1 % des oses des surnageants à T0 et 78,3 % après 360 minutes. Ces résultats sont cohérents puisque le galactose est l'ose majoritaire chez *Grateloupia turuturu* (86,4 %), suivi par le glucose (11,9 %) et le xylose (1,7 %).

Il semble donc que le procédé d'UAEH ne soit pas sélectif à l'égard de l'extraction des sucres de Grateloupia turuturu. En effet, même après 360 minutes de procédé, les proportions de galactose et de glucose restent relativement proches de celles de l'alque de départ. Dans la littérature, plusieurs études s'intéressent à l'action des ultrasons et/ou de l'hydrolyse enzymatique sur les profils des sucres retrouvés dans les extraits, avec cependant des conclusions variables pouvant être dues aux différences de paramètres expérimentaux. Ainsi, pour certains auteurs, même un traitement prolongé aux ultrasons (15 h dans un système avec recirculation) ne semble pas entraîner de modification de la composition en monosaccharides constitutifs d'un polysaccharide bactérien (Petit et al., 2007). Pour d'autres, la sonication modifie la composition finale en sucres : diminution du glucose et du mannose après deux heures de traitement du champignon Pleurotus tuberregium (Zhang et al., 2004), diminution du glucose et augmentation du mannose et du galactose après sonication de la microalgue Scenedesmus obliquus (Jeon et al., 2013). En 2014, une étude portant sur l'extraction des polysaccharides sulfatés de la macroalque rouge Gracilaria birdiae, a montré que les extraits présentaient une composition osidique différente selon les conditions d'extraction (méthode conventionnelle, UAE, UAEH (protéase) ; en présence ou non de NaOH à 0,1 M), mais d'après les auteurs ces différences étaient difficiles à expliquer (Fidelis et al., 2014).

Les enzymes interviennent également dans la modification de la composition en sucres des extraits, particulièrement lorsqu'il s'agit de polysaccharidases. C'est par exemple ce que montre une récente étude sur l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides de l'algue rouge *Pterocladia capillacea.* En fonction de l'enzyme utilisée, les extraits présentent une composition osidique différente, ainsi une  $\beta$  glucanase (37 °C, pH 5,4, 45 min) permet une augmentation notable de la teneur en glucose et en mannose grâce à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques (Fleita *et al.*, 2015).

Ici, le couplage enzymes-ultrasons a permis d'augmenter de façon significative l'extraction des sucres mais sans entraîner de différence apparente par rapport au profil des oses de l'algue de départ.

#### IV.2.2.3. Détermination des masses molaires moyennes

La détermination des masses molaires (Mw) par HPSEC a été réalisée sur les fractions solubles à T0 et après 360 minutes. Une seule analyse a été effectuée pour chaque répétition d'expérimentation (n=3).

La superposition des six chromatogrammes obtenus en sortie du détecteur réfractométrique (Figure 55) met en avant un seul pic pour les fractions solubles à T0 et à T360, ce qui signifie que les polysaccharides présents dans chacune de ces fractions sont d'une taille relativement homogène.



Figure 55 : superposition des chromatogrammes obtenus en sortie du détecteur réfractométrique (RI), pour les fractions solubles à T0 et T360 minutes, dans les conditions optimisées d'UAEH pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* 

La Figure 55 montre l'augmentation des temps de rétention après 6 heures d'UAEH, ce qui signifie une diminution de taille des polysaccharides dans les surnageants. L'analyse du cocktail enzymatique a, quant à elle, montré que les pics des enzymes et des polysaccharides à T0 et T360 ne se superposaient pas. Les masses molaires (Mw) et indices de polydispersité (Ip) correspondant aux chromatogrammes de la Figure 55 sont présentés dans le Tableau XXV.

Tableau XXV : masses molaires moyennes (Mw) et indices de polydispersité (Ip) pour les fractions solubles obtenues à T0 et T360, dans les conditions optimisées d'UAEH pour la liquéfaction. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3

	<b>Mw</b> (g.mol <sup>-1</sup> )	lp
UAEH T0	1 120 000 ± 41 016	$1,71 \pm 0,03$
UAEH T360	432 000 ± 89 383	2,37 ± 0,40

Les fractions solubles contiennent initialement (T0) des polysaccharides de masses molaires élevées (1,12.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>). La paroi des algues rouges est majoritairement composée de polysaccharides de types agars et carraghénanes. Pour ces derniers, les masses molaires sont variables, allant de 2,60.10<sup>5</sup> à 3,20.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> pour les kappa carraghénanes, de 2,00.10<sup>5</sup> à 8,00.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> pour les lambda et pour les iota carraghénanes elles peuvent avoisiner 1,40.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>. Les agars ont quant à eux des masses molaires plus faibles, avec en moyenne 1,20.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> (Kornprobst, 2005). La masse molaire moyenne de 1,12.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup> trouvée ici est donc plus proche des lambda et iota carraghénanes. Il est vrai que les polysaccharides constitutifs de *Grateloupia turuturu* ne sont pas encore très bien décrits, mais des études ont rapporté que cette algue serait composée de polysaccharides hybrides entre agar et carraghénanes (Chapitre I, III.5., p.41). D'après une récente étude, *Grateloupia turuturu* serait à classer chez les carraghénophytes plutôt que chez les agarophytes (Rodrigues *et al.*, 2015a).

La présence de polysaccharides de hautes masses molaires dès le T0, peut s'expliquer par les 30 minutes de préparation préalables au démarrage de l'UAEH. De plus, les algues n'ont pas été rincées, ce qui signifie que l'exsudat polysaccharidique déjà évoqué dans le Chapitre III (II.1., p.124), peut se retrouver dans cette fraction soluble (Miller, 2005).

Après six heures d'UAEH, la masse molaire des polysaccharides est 2,5 fois plus petite (4,32.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>) que celle à T0 (Tableau XVI), une dépolymérisation des polysaccharides extraits lors de l'UAEH a donc eu lieu. Ce résultat confirme l'explication suggérée dans le Chapitre III (III.1.) pour justifier la diminution de viscosité des fractions solubles obtenues par UAE et UAEH : il y a bien rupture de liaisons au sein des polysaccharides. De plus, les indices de polydispersité (Ip) à T0 et T360 sont relativement proches, il semble donc que les masses molaires soient peu dispersées. Les ultrasons permettraient cette dépolymérisation

grâce aux contraintes mécaniques auxquelles ils soumettent les polysaccharides (implosion des bulles de cavitation) et aussi par la formation d'entités radicalaires qui induiraient leur dégradation (Pétrier *et al.*, 2008).

Cette dépolymérisation par les ultrasons a déjà été décrite pour un polysaccharide bactérien (Mw >  $10^6$  g.mol<sup>-1</sup>), avec un réacteur permettant la circulation en continu du milieu à traiter ; une réduction d'un facteur 7,5 de sa masse molaire moyenne avait été observée (Petit *et al.*, 2007; Petit, 2005). Par ailleurs, une autre étude comparant la taille des polysaccharides d'un champignon, extraits par une méthode conventionnelle et par UAE, a montré que les masses molaires les plus élevées (Mw >  $1.10^6$  g.mol<sup>-1</sup>) sont obtenues avec les ultrasons. Ces derniers permettent aussi d'extraire en plus grande quantité des polysaccharides de petite taille ( $4.10^4$  g.mol<sup>-1</sup>). Il semblerait donc que les ultrasons favorisent l'extraction des polysaccharides de hautes masses molaires mais qu'ensuite ceux-ci seraient dépolymérisés (Zhang *et al.*, 2004).

Une comparaison récente de la taille des polysaccharides extraits d'un mollusque, par EAE et UAEH (papaïne, 40 min, 300 W), a montré que ceux obtenus par UAEH présentaient des masses molaires plus faibles (3,50.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> à 4,70.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>) que ceux obtenus par EAE (5,00.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> à 6,20.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>) (Liao *et al.*, 2015). Cette étude a également montré que les polysaccharides de plus petite taille présentent l'activité antioxydante la plus élevée. Cette augmentation de l'activité antioxydante avec la diminution des masses molaires a déjà été décrite pour les polysaccharides de l'algue rouge *Pyropia yezoensis* (Zhou *et al.*, 2012).

Il est vrai que l'utilisation de polysaccharidases peut faciliter l'extraction des protéines algales, telles que la R-PE, en induisant l'hydrolyse des polysaccharides pariétaux. Cependant, l'efficacité de ces enzymes dépend non seulement du phylum et du genre mais aussi de l'espèce, compte tenu de la diversité des compositions pariétales des macroalgues. Cette spécificité d'action peut poser des difficultés au niveau de la transposition industrielle, car elle nécessite des enzymes spécifiques à la composition pariétale de chaque espèce et des conditions d'hydrolyses adaptées en conséquence (Fleurence, 1999b). Contrairement à cette dépolymérisation par hydrolyse enzymatique, la dépolymérisation par ultrasons présente l'avantage d'être une technique qui ne nécessite pas une connaissance approfondie de la structure du polysaccharide (Petit *et al.*, 2007).

#### IV.2.3. Les acides aminés

#### IV.2.3.1. Distribution des acides aminés de l'algue

La détermination de la distribution des acides aminés de l'algue entre surnageant et culot a été réalisée à partir des rendements d'extractions (RS<sub>aa</sub> et RC<sub>aa</sub>) calculés comme indiqué dans le Chapitre II (V.6.3., p.108). Les résultats présentés ici sont issus des analyses effectuées au laboratoire Bioraf<sup>he</sup>.

Les résultats de la Figure 56 reflètent la répartition des acides aminés de l'algue dans chaque fraction, au début (T0) et à la fin de l'application du procédé (T360), dans les conditions d'UAEH optimisées pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*.



Figure 56 : répartition (%) des acides aminés de l'algue entre culot et surnageant, à T0 et T360 minutes dans les conditions optimisées pour la liquéfaction. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3. Les étoiles \*\*\* indiquent une différence significative par rapport au T0 (p < 0,001). Analyses faites par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

Six heures de traitement par UAEH ont permis de solubiliser 57,11  $\pm$  1,85 % des acides aminés de l'algue, soit une augmentation d'un facteur 1,7 par rapport à T0 (32,85  $\pm$  2,76 %), ce qui est en accord avec l'augmentation de la liquéfaction de l'algue.

La comparaison de ces résultats avec ceux de la Figure 54a suggère que la répartition entre culot et surnageant de l'azote et des acides aminés, suit une même évolution entre T0 et T360 minutes. En effet, après six heures l'UAEH a multiplié par 1,9 la solubilisation de l'azote de l'algue, soit une augmentation similaire à celle des acides aminés (x 1,7). Un rapprochement peut également être fait avec le Chapitre III, dans lequel l'efficacité de l'UAEH pour l'extraction des acides aminés avait déjà été démontrée (Chapitre III, III.2.2. p.143). Ainsi, dans des conditions proches (400 W, 40 °C, 50 L.h<sup>-1</sup>), 54,02  $\pm$  0,19 % des acides aminés de l'algue étaient passés en solution, les 57,11  $\pm$  1,85 % obtenus lors de cette optimisation de la liquéfaction sont donc cohérents.

Récemment, une optimisation de l'extraction par sonication de la taurine (dérivé d'un acide aminé) a été conduite chez la macroalgue rouge *Pyropia yezoensis* (Wang *et al.*, 2015a). Dans les conditions optimales de cette étude, les ultrasons ont permis d'augmenter son rendement d'extraction tout en réduisant la durée et la température par rapport à l'extraction conventionnelle. Parmi les conditions testées dans cette étude, la puissance maximale (300 W) et la température centrale (40 °C) ont été retenues. De plus, la taurine ne présentait pas de modification structurale, il est donc possible que l'UAEH permette également l'extraction des acides aminés tout en préservant leur structure.

# IV.2.3.2. Profils en acides aminés

Afin de mieux caractériser sur le plan qualitatif les fractions solubles et insolubles, les profils en acides aminés de chacune de ces fractions ont été réalisés. La Figure 57a correspond aux culots et surnageants à T0 et la Figure 57b après 360 minutes. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des acides aminés détectés (AA détectés).



Figure 57 : profils en acides aminés de *Grateloupia turuturu* et des fractions (culot C et surnageant S) à T0 (a) et à T360 minutes (b), dans les conditions optimisées pour la liquéfaction. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif de chaque AA par rapport aux AA détectés. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3 (sauf pour *Grateloupia turuturu*, n=1). Analyses effectuées par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

Initialement, les profils en acides aminés des culots et surnageants présentent globalement les mêmes tendances, ceux-ci sont également similaires au profil des acides aminés de *Grateloupia turuturu* (Figure 57a). Les deux acides aminés majoritaires sont, comme pour l'algue, l'acide aspartique et l'acide glutamique, suivis par la leucine. Il semblerait cependant que certains acides aminés soient plus représentés dans une des deux fractions. Ainsi, la leucine (Leu) représente  $9,9 \pm 0,6$  % des acides aminés des culots et seulement  $6,8 \pm 0,1$  % des acides aminés des surnageants ; pour la phénylalanine (Phe) le même constat peut être fait ( $6,0 \pm 0,4$  % pour les culots et  $3,6 \pm 0,1$  % pour les surnageants). *A contrario*, l'acide glutamique est présent en plus grande proportion dans les surnageants avec  $16,8 \pm 0,9$  % contre  $11,5 \pm 1,1$  % dans les culots. Pour les autres acides aminés, les profils des culots et surnageants sont similaires, et sont proches du profil en acides aminés de l'algue. Ces acides aminés doivent donc se répartir sans distinction entre les deux phases.

Après 360 minutes (Figure 57b), les tendances observées initialement pour la leucine (Leu) et la phénylalanine (Phe) sont de nouveau constatées et même renforcées puisque les différences entre culots et surnageants sont plus marquées. En effet, la leucine est présente dans les culots à hauteur de  $10,6 \pm 0,2$  % et de  $5,8 \pm 0,2$  % dans les surnageants. Pour la phénylalanine, le pourcentage est de  $6,4 \pm 0,1$  % dans les fractions insolubles et de  $3,1 \pm 0,1$  % dans les fractions solubles. Les observations faites à T0 pour l'acide glutamique sont elles aussi vérifiées après 360 minutes ( $10,2 \pm 0,2$  % pour le culot et  $14,3 \pm 0,5$  % pour le surnageant). Pour les autres acides aminés, il n'y a pas de modification après 360 minutes par rapport au T0. En effet, que ce soit pour les culots ou les surnageants les profils en acides aminés sont proches, sauf pour la glycine, l'alanine et la proline qui semblent en proportions un peu plus importantes dans les surnageants après six heures d'UAEH ; cette tendance est bien marquée pour l'acide aspartique.

Ces résultats suggèrent que l'UAEH n'est pas un procédé sélectif vis-à-vis de l'extraction de certains acides aminés, il permet donc d'obtenir des extraits qui représentent plutôt fidèlement la composition en acides aminés de *Grateloupia turuturu*. Cette observation a déjà été faite pour l'extraction par UAE des acides aminés du marc de raisin (Carrera *et al.*, 2015).

Sur un plan qualitatif, il est également intéressant de déterminer les valeurs du ratio des acides aminés essentiels (AAE) sur l'ensemble des acides aminés détectés (AA<sub>détectés</sub>) (AAE/AA<sub>détectés</sub>). Le Tableau XXVI présente les ratios obtenus pour les culots et surnageants à T0 et après 360 minutes.

Tableau XXVI : ratios AAE/AA détectés (%) pour les culots et surnageants obtenus à T0 et T360 minutes dans les conditions optimisées pour la liquéfaction. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les lettres différentes indiquent une différence significative avec p < 0,05. Analyses effectuées par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

	UAEH T0 min Surnageants Culots		UAEH T360 min		
			Surnageants	Culots	
AAE/AA <sub>détectés</sub> (%)	38,45 ± 1,06 ª	45,82 ± 1,01 <sup>b</sup>	37,12 ± 0,38 ª	47,62 ± 0,10 °	

Les ratios AAE/AA<sub>détectés</sub> sont toujours plus élevés pour les culots, ce qui est en accord avec les observations faites précédemment. En effet, les proportions de leucine et de phénylalanine (AAE) sont plus importantes dans les culots tandis que l'acide glutamique (non essentiel) est présent en plus grande proportion dans les surnageants. Aucune différence significative n'est constatée entre T0 et T360 pour les surnageants, ce qui va dans le sens d'une non sélectivité du procédé. En revanche, pour les culots, une petite différence est observée au cours du procédé, en effet, après 360 minutes ces derniers contiennent des AAE en plus grande proportion (47,62 ± 0,10 %) par rapport à T0 (45,82 ± 1,01 %).

IV.2.4. <u>Synthèse : composition biochimique de la fraction soluble finale (360</u> <u>minutes)</u>

Les résultats de l'optimisation de la liquéfaction ont montré que le taux de matière solubilisée (87,58 ± 1,40 %) coïncide avec la prédiction du modèle (86,95 %). Les analyses biochimiques ont confirmé que cette liquéfaction est bien associée à un passage en solution de l'ensemble des composés de l'algue, sans spécificité vis-à-vis de certains oses ou acides aminés. Enfin, cette liquéfaction serait associée à une dépolymérisation des polysaccharides de l'algue.

Il est donc intéressant de dresser maintenant la composition biochimique partielle des fractions solubles obtenues après six heures d'UAEH dans les conditions optimales de liquéfaction (Tableau XXVII).

Tableau XXVII : composition biochimique partielle des fractions solubles après 360 minutes d'UAEH dans les conditions optimisées pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3

	<b>Fraction soluble</b> à 360 minutes
Matière sèche (% MF)	2,93 ± 0,07
Matière sèche estimée * (% MF)	$3,11 \pm 0,10$
Cendres (% MS estimée)	28,35 ± 0,24
Sucres hydrosolubles (% MS estimée)	42,73 ± 1,03
Résidus glycosidiques (% MS estimée) (oses libres)	36,56 ± 4,72
Carbone (% MS estimée)	29,78 ± 0,03
Azote (% MS estimée)	3,07 ± 0,10
Acides aminés (% MS estimée)	9,34 ± 0,42

\* par lyophilisation

Les fractions solubles obtenues à la fin du procédé contiennent 3,11  $\pm$  0,10 % de matière sèche (MS <sub>estimée</sub>). Elles se composent principalement de sucres (de 37 à 43 % MS <sub>estimée</sub>) et de 28 % de cendres ou matières minérales. Les acides aminés représentent quant à eux un peu moins de 10 % MS <sub>estimée</sub>, tandis que l'azote est retrouvé à hauteur de 3,07  $\pm$  0,10 % MS <sub>estimée</sub>. En appliquant le facteur N-Prot de 3,47 déterminé dans le Chapitre III pour l'algue collectée en 2014 (Laboratoire Bioraf<sup>he</sup>) (Chapitre III, II.3. , p.131), le pourcentage de protéines totales dans la fraction soluble est de 10,65  $\pm$  0,35 % MS <sub>estimée</sub>, ce qui est cohérent avec les 9,34  $\pm$  0,42 % d'acides aminés détectés. En revanche, en appliquant le facteur plus précis de 5,16, le pourcentage de protéines totales passe à 15,84  $\pm$  0,52 MS <sub>estimée</sub>, soit plus de 6 % par rapport aux acides aminés détectés.

La somme de la matière minérale, des sucres et des protéines totales (N x 5,16) représente entre 81 et 87 % de la fraction soluble (MS  $_{estimée}$ ), mais la teneur en lipides n'a pas été déterminée. Il serait intéressant de la connaître pour compléter cette composition biochimique.

<u>Remarque</u> : la matière sèche déterminée à l'étuve est inférieure (2,93 ± 0,07 %) à la matière sèche estimée par lyophilisation (3,11 ± 0,10 %), puisque la lyophilisation ne permet pas d'éliminer la totalité de l'eau contenue dans les échantillons (MS <sub>estimée</sub>).

# V. Validation de la prédiction de l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu* par UAEH en conditions optimisées

L'optimisation du procédé d'UAEH pour l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu* a été effectuée selon les conditions préalablement décrites, c'est à dire : **300 W**, à **20 °C** pour un débit de **145 L.h**<sup>-1</sup> et sur **210 minutes**. Des prélèvements réguliers ont été effectués afin de suivre l'évolution de l'extraction de la R-PE et la liquéfaction de l'algue. Trois expérimentations indépendantes ont été réalisées.

<u>Remarque</u> : comme indiqué dans les chapitres précédents, le suivi du pH au cours du temps révèle sa relative stabilité avec une augmentation moyenne de 0,30 unité pH après 210 minutes (3,5 heures) d'UAEH. L'énergie délivrée au mélange (W.h) et l'énergie apportée par kilogramme de mélange réactionnel (W.h.kg<sup>-1</sup>) sont inférieures aux valeurs des chapitres précédents puisque la puissance est plus faible et la durée d'extraction plus courte, mais le poids initial de mélange réactionnel reste inchangé (environ 3,3 kg). En prenant en compte le rendement énergétique de l'ordre de 85 % du SONITUBE<sup>®</sup>, la puissance délivrée au mélange varie de 187 à 204 W. L'énergie apportée au mélange réactionnel après 3,5 heures est donc comprise entre 655 W.h et 714 W.h, soit une énergie apportée par kg de mélange comprise entre 198 et 216 W.h.kg<sup>-1</sup>. En considérant les prélèvements effectués au cours des essais (environ 13 % du poids initial), le réacteur contient au final environ 2,9 kg de mélange réactionnel, soit une énergie apportée par kilogramme légèrement plus importante, comprise entre 226 et 246 W.h.kg<sup>-1</sup>.

# V.1. Liquéfaction de l'algue

Après 210 minutes d'UAEH, dans les conditions optimales pour l'extraction de la R-PE, le pourcentage d'algue liquéfiée est de 65,34  $\pm$  1,46 %, soit 1,4 fois plus de composés extraits par rapport à T0. Les 62,53 % d'algue liquéfiée obtenus, après 180 minutes, dans les mêmes conditions lors de l'essai n°2 du plan d'expériences confortent ce résultat. À titre de comparaison, après 180 minutes dans les conditions optimisées pour la liquéfaction de l'algue (400 W, 40 °C, 65 L.h<sup>-1</sup>), le pourcentage de matière liquéfiée était déjà de 78,60  $\pm$  1,54 %, ce qui s'explique par une température plus élevée et par une énergie délivrée au mélange réactionnel, après 180 minutes, également plus importante (900 W.h à 1020 W.h).

La Figure 58 illustre l'évolution moyenne de la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* au cours du temps, pour les trois expérimentations réalisées.



Figure 58 : cinétique de liquéfaction de *Grateloupia turuturu* dans les conditions optimales d'extraction de la R-PE définies par le plan d'expériences (300 W, 20 °C, 145 L.h<sup>-1</sup>). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3

Le gain de liquéfaction augmente régulièrement au cours du temps, avec cependant un léger ralentissement à partir de 90 minutes. Néanmoins, après 210 minutes l'augmentation de la liquéfaction par rapport à la valeur initiale est de 19,84  $\pm$  1,14 %, elle était de 29,29  $\pm$  2,75 % dès 180 minutes dans les conditions optimales de liquéfaction (Figure 53, p.185).

La comparaison des deux optimisations réalisées (liquéfaction/R-PE), en ce qui concerne le gain de liquéfaction, montre bien l'influence positive de l'augmentation de la durée, de la température et de la puissance des ultrasons, pour la solubilisation des composés de *Grateloupia turuturu*.

Avec ce procédé d'UAEH optimisé pour l'extraction de la R-PE de l'algue, ce sont 2,5 fois plus de composés hydrosolubles qui sont extraits, par comparaison à une extraction conventionnelle à l'eau du réseau, sur algue lyophilisée et cryobroyée (Chapitre IV, Figure 45a, p.153).

#### V.2. Analyses des fractions : surnageants et culots

#### V.2.1. Rendements d'extraction de la R-PE

La cinétique des rendements d'extraction de la R-PE ( $R_{R-PE}$ ) dans les conditions optimales (300 W, 20 °C, 145 L.h<sup>-1</sup>) est représentée dans la Figure 59.



Figure 59 : rendement d'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu* dans les conditions optimales d'extraction de la R-PE définies par le plan d'expériences (300 W, 20 °C, 145 L.h<sup>-1</sup>). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les différences significatives (p < 0,05) sont indiquées par des lettres différentes.

La cinétique d'extraction de la R-PE présente la même allure que dans l'essai n°2 du plan d'expérience (Figure 52, p.181), avec une augmentation marquée pendant les 45 premières minutes (+ 1,49 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) suivie d'un ralentissement aboutissant à l'apparition d'un plateau. Pour la microalgue *Spirulina platensis*, une allure similaire avait été observée lors de l'extraction, par sonication, du  $\beta$ -carotène ; le rendement d'extraction augmentait de façon importante les deux premières minutes puis atteignait un plateau (Dey et Rathod, 2013).

Dans les conditions optimisées d'UAEH, le modèle prédisait après 120, 180 et 240 minutes, des rendements d'extraction de la R-PE respectivement de 4,21 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, de 4,32 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S et de 4,21 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S (Tableau XXII). Les résultats expérimentaux sont

donc conformes aux prédictions puisque le  $R_{R-PE}$  est de 4,11 ± 0,12 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S à 120 minutes, de 4,28 ± 0,09 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S à 180 minutes et de 4,24 ± 0,05 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S à 210 minutes.

La réalisation d'une cinétique plus fine permet de constater que le  $R_{R-PE}$  atteint après 150 minutes d'UAEH (4,24 ± 0,11 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) est similaire à celui obtenu après 210 minutes (4,24 ± 0,05 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S), et que le  $R_{R-PE}$  le plus élevé est observé pour le temps intermédiaire de 180 minutes (4,28 ± 0,09 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Néanmoins, de 90 à 210 minutes (inclus), les  $R_{R-PE}$  ne présentent pas de différence significative En revanche, l'augmentation du  $R_{R-PE}$  entre 45 minutes (3,55 ± 0,22 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) et 90 minutes (3,98 ± 0,15 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) est quant à elle significative. D'après ces observations, il apparaît que **la R-PE est relativement stable aux ultrasons**, puisque le  $R_{R-PE}$  augmente dans un premier temps puis semble se maintenir à un niveau constant sur les deux dernières heures (de 90 à 210 minutes) ; ceci va à l'encontre de l'hypothèse n°2 formulée dans le Chapitre IV (« la R-PE extraite dans la fraction soluble serait plus sensible aux ultrasons que la R-PE présente dans l'algue. D'où une dénaturation au cours du temps si la sonication est prolongée »).

Sur la base de ces constatations, en se plaçant dans la situation où la R-PE serait la seule molécule ciblée, il serait envisageable d'effectuer l'UAEH pendant 90 minutes seulement ; cette réduction de la durée d'extraction aurait des avantages pratiques (gain de temps) et économigues (diminution du coût énergétique, par exemple). Cependant, dans cette étude, la R-PE n'est pas l'unique molécule d'intérêt puisque c'est l'extraction de l'ensemble des composés de Grateloupia turuturu qui est recherchée. Or, comme il l'a été décrit précédemment, les fractions solubles sont significativement plus riches en composés de l'algue après 210 minutes qu'après 90 minutes (+ 6,38 % de matière solubilisée), avec respectivement 65,33  $\pm$  1,46 % et 58,96  $\pm$  1,72 % de matière solubilisée. Par ailleurs, le R<sub>R-PE</sub> étant stable ici au-delà de 90 minutes, il serait possible de poursuivre l'UAEH pour augmenter l'extraction des autres molécules de Grateloupia turuturu. Il serait aussi envisageable d'extraire séquentiellement les composés d'intérêt, par exemple en soutirant une partie du mélange réactionnel dès 90 minutes pour obtenir une fraction riche en R-PE, et ensuite poursuivre le procédé pour extraire les autres molécules.

#### V.2.1.1. Comparaison avec les résultats du chapitre précédent

Des rapprochements peuvent être faits entre les cinétiques d'extraction de la R-PE obtenues ici et celles du Chapitre IV.

Dans le Chapitre IV (Figure 50, p.162), pour l'UAEH (400 W, 22 °C, 50 L.h<sup>-1</sup>), un R<sub>R-PE</sub> de 3,6 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S a été obtenu après la première heure, il diminuait ensuite de façon régulière après deux heures de traitement. L'optimisation du procédé a donc bien permis d'augmenter le rendement d'extraction de la R-PE (4,2 mg.g<sup>-1</sup> au lieu de 3,6 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S), ce qui pourrait être attribué à la diminution de température de 2 °C. En effet la température est le seul paramètre étudié influençant l'extraction de la R-PE (négativement).

#### V.2.1.2. Comparaison avec la méthode d'extraction conventionnelle

Avec ce procédé d'UAEH optimisé pour l'extraction de la R-PE, après 180 minutes, le  $R_{R-PE}$  (4,28 ± 0,09 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) est 2,6 fois plus élevé par rapport à l'extraction conventionnelle à l'eau du réseau (pH 5,5) et il est 2,3 fois plus élevé que l'extraction au tampon phosphate. Avant optimisation (Chapitre IV), l'UAEH avait seulement multiplié par 1,4 le  $R_{R-PE}$  par rapport à la méthode conventionnelle à l'eau du réseau pH 5,5, et avait permis d'atteindre un  $R_{R-PE}$  similaire (x 1,1) à l'extraction au tampon phosphate. Ce cinquième chapitre a bien conduit à **une optimisation du procédé d'UAEH pour améliorer l'extraction de la R-PE,** il a également permis de renforcer l'intérêt de l'UAEH par rapport à l'extraction conventionnelle sur algues lyophilisées et cryobroyées.

Par ailleurs, avec la méthode conventionnelle, il avait été constaté qu'à partir des algues de 2013 les rendements d'extraction étaient plus élevés qu'avec les algues de 2014, ceci aussi bien au tampon phosphate (1,7 fois plus de R-PE extraite en 2013) qu'à l'eau du réseau (1,6 fois plus de R-PE extraite en 2013) (Chapitre IV, Figure 45b, p.153). *A contrario*, avec l'UAEH, bien que les conditions opératoires diffèrent légèrement (principalement la puissance, mais facteur non influent) entre les chapitres IV et V, la différence de rendement entre les algues de 2013 (3,62 ± 0,32 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, à 22 °C, Chapitre IV) et les algues de 2014 (4,11 ± 0,12 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, Chapitre V) est très faible après 120 minutes, et la tendance semblerait s'inverser avec 1,1 fois plus de R-PE extraite en 2014 qu'en 2013.

Ces éléments laissent à penser que les algues collectées en 2014 sont susceptibles de contenir autant de R-PE que celles de 2013, contrairement à ce que montrait l'extraction conventionnelle (Chapitre IV, Figure 45b, p.153). Il est possible que l'extraction conventionnelle soit moins efficace sur les algues de 2014 en raison d'une structure pariétale différente, et/ou d'interactions de la R-PE avec d'autres composés de l'algue tels que les polysaccharides pariétaux. Par exemple, pour la macroalgue rouge *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, les rendements d'extraction des polysaccharides sulfatés variaient selon le stade de développement de l'algue, et selon le type de polysaccharides constitutifs de sa

paroi (kappa/iota carraghénanes). En revanche, aucune variation de la teneur en R-PE n'avait été constatée (Kravchenko *et al.*, 2013). Depuis plusieurs années, les polysaccharides pariétaux anioniques (ex : carraghénanes) et neutres (ex : cellulose) sont reconnus comme étant les principaux responsables de la faible solubilité des protéines algales, telles que la R-PE, lors d'extractions solide-liquide conventionnelles (Barbarino et Lourenço, 2005; Fleurence, 1999b). Il peut donc être envisagé que la méthode d'extraction conventionnelle de la R-PE pourrait être influencée par la nature des polysaccharides de *Grateloupia turuturu*. Or, d'après les résultats obtenus ici, le procédé d'UAEH permet la dépolymérisation des polysaccharides de *Grateloupia turuturu* de façon non spécifique (Chapitre V, IV.2.2.3.), ce qui pourrait expliquer l'efficacité de ce procédé pour l'extraction de la R-PE, aussi bien sur les algues collectées en 2013 qu'en 2014.

# V.2.2. Distribution du carbone et de l'azote de l'algue

La répartition du carbone et de l'azote de l'algue dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE est présentée dans la Figure 60. Il s'agit, comme pour l'optimisation de la liquéfaction, des rendements d'extraction corrigés.



Figure 60 : répartition de l'azote (a) et du carbone (b) de *Grateloupia turuturu* entre la fraction soluble (surnageant, S) et insoluble (culot, C) à T0 et T210 minutes dans les conditions optimales d'extraction de la R-PE. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les étoiles indiquent une différence significative par rapport au T0 : \*\* avec p < 0,01 et \*\*\* avec p < 0,001

Au début de l'UAEH (T0), si l'azote et le carbone de *Grateloupia turuturu* sont principalement retrouvés dans le culot (respectivement  $64,25 \pm 5,17$  % et  $74,28 \pm 5,52$  %), une partie est déjà passée en solution après les 30 minutes de préparation du mélange réactionnel. Ceci est cohérent avec le pourcentage d'algue liquéfiée constaté initialement ( $45,50 \pm 1,74$  %).

Après 210 minutes de traitement par UAEH, la tendance inverse est observée pour l'azote puisque près de 56 % sont passés en solution, soit une augmentation d'un facteur 1,7 par rapport au T0 (Figure 60a). Quant au carbone, il se répartit équitablement entre surnageant et culot, avec près de 49 % du carbone de l'algue passés en solution, soit une augmentation d'un facteur 2,1 par rapport au T0 (Figure 60b).

Par rapport à l'UAEH optimisée pour la liquéfaction de l'algue, l'extraction de l'azote et du carbone de l'algue est moins marquée, ce qui est cohérent avec l'écart de liquéfaction constaté entre les deux optimisations : après 360 et 210 minutes, le pourcentage de matière liquéfiée est respectivement multiplié par 1,8 pour l'optimisation de la liquéfaction et par 1,4 pour l'optimisation de la R-PE, par rapport aux T0.

# V.2.3. Analyses des sucres

# V.2.3.1. Sucres hydrosolubles

La détermination de la teneur en sucres des fractions hydrosolubles a été effectuée à T0 et après 210 minutes, l'apport par les enzymes (Tableau XIX) ayant été soustrait.

Après les étapes de préparation du mélange réactionnel (30 minutes), la teneur en sucres hydrosolubles est de 44,31  $\pm$  8,65 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, elle était 1,8 fois plus élevée pour l'optimisation de la liquéfaction (80,11  $\pm$  7,41mg.g<sup>-1</sup> Alg.S). Ceci peut être due à la différence de température initiale dans le réacteur, qui était de l'ordre de 25 °C pour la liquéfaction et de 17 °C pour l'extraction de la R-PE.

Les fractions solubles contiennent 141,86  $\pm$  20,86 mg.g<sup>-1</sup>Alg.S de sucres hydrosolubles après 210 minutes d'UAEH, soit une augmentation d'un facteur 3,2 par rapport au T0. Dans les conditions optimisées pour la liquéfaction de l'algue, ce facteur était de 4,1 après 360 minutes (330,00  $\pm$  13,10 mg.g<sup>-1</sup>Alg.S à T360). Ainsi, les conditions opératoires plus douces pour l'extraction de la R-PE, permettent tout de même la solubilisation des sucres de *Grateloupia turuturu*, mais l'augmentation de la puissance, de la durée et de la température (conditions optimales de la liquéfaction) semble améliorer leur extraction, comme l'ont démontré différentes études sur d'autres biomasses (Liao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

Comme mentionné dans l'hypothèse n°3 du Chapitre IV (IV.1.2.), la stabilité du  $R_{R-PE}$  observée entre 90 et 210 minutes pourrait être due à la co-extraction de composés protecteurs, ces composés pouvant être des sucres. En effet, des études ont déjà décrit des

relations entre extraction de la R-PE et extraction des sucres des algues par hydrolyse enzymatique. Par exemple, pour extraire la R-PE de *Gracilaria verrucosa*, abaisser la température de 48 à 30 °C tout en prolongeant l'hydrolyse pendant 12 heures, permettait de diminuer la co-extraction des sucres (- 40 %), en maintenant le rendement d'extraction de la R-PE (6,25 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) (Mensi *et al.*, 2012). Ici, l'optimisation de l'UAEH pour l'extraction de la R-PE a également permis de diminuer la température mais aussi la durée du procédé, ce qui présente un intérêt du point de vue économique et pratique. Une autre étude, sur *Palmaria palmata*, a elle aussi constaté que les conditions optimales pour l'extraction de la R-PE allaient à l'encontre de la libération des sucres réducteurs (Dumay *et al.*, 2013). Contrairement à ces deux études, l'objectif de ce travail n'est pas de diminuer l'extraction des sucres puisque l'extraction de l'ensemble des composés de l'algue est recherchée. Inévitablement, dans ce contexte d'optimisation spécifique, l'augmentation de l'extraction de la R-PE est accompagnée d'une diminution de l'extraction des sucres de l'algue, en raison de conditions opératoires différentes.

# V.2.3.2. Oses libres

L'analyse de la composition en oses libres a été réalisée sur les fractions hydrosolubles initiales et après 210 minutes de traitement. Comme pour les sucres hydrosolubles, les valeurs ont été ramenées en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, afin de prendre en compte la composition osidique du cocktail enzymatique (Tableau XIX). Les valeurs indiquées dans le Tableau XXVIII sont des valeurs corrigées, la composition en oses de *Grateloupia turuturu* y est également rappelée.

Tableau XXVIII : composition osidique (en mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) des fractions solubles obtenues à T0 et T210 minutes dans les conditions optimisées pour l'extraction par UAEH de la R-PE de *Grateloupia turuturu*. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3

	Os	Oses totaux			
	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	(mg.g <sup>-1</sup> Alg.S)
Algue	2,87 ± 2,77 (1,7 %)*	Nd	149,42 ± 26,93 (86,4 %)*	20,64 ± 4,45 (11,9 %)*	<b>172,93</b> ± 30,89
UAEH T0	Nd	Nd	44,76 ± 5,48 (100 %)*	Nd	<b>44,76</b> ± 5,48
UAEH T210	2,43 ± 0,66 (2,1 %)*	Nd	108,00 ± 4,69 (93,2 %)*	5,57 ± 3,24 (4,7 %)*	<b>116,01</b> ± 7,80

\* Pourcentage relatif de chaque ose par rapport à l'ensemble des oses détectés (oses totaux) Nd : non détecté

Après 210 minutes d'UAEH ce sont près de 116 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S d'oses qui sont quantifiés dans la fraction soluble, soit une teneur inférieure à celle trouvée après méthanolyse de la poudre d'algue (172,93  $\pm$  30,89 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S).

Les teneurs en oses des fractions solubles, à T0 et 210 minutes, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par le dosage colorimétrique de Dubois sur les surnageants. En effet, initialement le rendement d'extraction des oses hydrosolubles est de  $44,76 \pm 5,48 \text{ mg.g}^{-1} \text{Alg.S}$  et celui des sucres hydrosolubles est de  $44,31 \pm 8,65 \text{ mg.g}^{-1} \text{Alg.S}$ . Après 210 minutes, la teneur en oses et en sucres hydrosolubles est respectivement de  $116,01 \pm 7,80 \text{ mg.g}^{-1} \text{Alg.S}$  et de  $141,86 \pm 20,86 \text{ mg.g}^{-1} \text{Alg.S}$ . Par rapport au T0, le rendement d'extraction des oses est 2,6 fois plus élevé après 210 minutes d'UAEH, il était 3,7 fois plus élevé dans les conditions optimisées pour la liquéfaction après 360 minutes, ces différences ont déjà été relevées pour les sucres hydrosolubles. Ces résultats confirment que le procédé d'UAEH, même dans des conditions plus douces de température et de puissance, permet la solubilisation des sucres de *Grateloupia turuturu*.

L'analyse des profils osidiques des fractions solubles (Tableau XXVIII) montre la non détection du mannose, ose présent en faible quantité lors de l'optimisation de la liquéfaction. Bien que trois oses soient détectés dans l'algue (le xylose, le glucose et le galactose), seul le galactose est initialement présent dans les surnageants (44,76 ± 5,48 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S), représentant ainsi la totalité des oses. Après 210 minutes d'UAEH, les surnageants contiennent du galactose (108,00 ± 4,69 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S) mais aussi du xylose (2,43 ± 0,66

mg.g<sup>-1</sup>Alg.S) et du glucose (5,57  $\pm$  3,24 mg.g<sup>-1</sup>Alg.S). Néanmoins, le galactose reste de loin l'ose majoritaire, soit 93,2 % des oses, suivi par le glucose (4,7 %) et le xylose (2,1 %).

Comme constaté pour l'optimisation de la liquéfaction, le procédé d'UAEH n'est pas sélectif à l'égard de l'extraction des sucres de l'algue. En effet, même après 210 minutes de procédé, les proportions de galactose et de glucose restent relativement proches de celles de l'algue de départ. De plus, il semble qu'une température, une puissance et une durée plus importantes (conditions optimales de liquéfaction) n'aient que peu d'effets sur les profils osidiques des fractions solubles, puisque seul le glucose est présent en plus grande proportion (19,6 %) aux dépens du galactose (Tableau XXIV).

# V.2.3.3. Détermination des masses molaires moyennes

La détermination des masses molaires (Mw) par HPSEC a été effectuée sur les fractions solubles initiales et après 210 minutes d'UAEH. Une seule analyse a été réalisée pour chaque répétition d'expérimentation (n=3).

La superposition des six chromatogrammes obtenus en sortie du détecteur réfractométrique (Figure 61) met en avant un seul pic pour les fractions solubles initiales (T0) et pour celles après 210 minutes d'UAEH (T210), ce qui signifie que les polysaccharides présents dans chacune de ces fractions sont d'une taille relativement homogène.



Figure 61 : superposition des chromatogrammes obtenus en sortie du détecteur réfractométrique (RI), pour les fractions solubles à T0 et T210 minutes, dans les conditions optimisées d'UAEH pour l'extraction de la R-PE

L'augmentation des temps de rétention observée après 210 minutes d'UAEH correspond à une diminution de taille des polysaccharides dans les fractions solubles, il y a donc eu une dépolymérisation. Les masses molaires moyennes (Mw) et les indices de polydispersité (Ip) correspondant aux chromatogrammes de la Figure 61 sont indiqués dans le Tableau XXIX.

Tableau	XXIX: masse	es molaires	moyennes	(Mw)	et indices	de poly	dispersité	(lp) pour	' les	fractions
solubles	obtenues à <sup>·</sup>	T0 et T210	minutes, da	ans les	conditions	s optimis	ées d'UAE	EH pour l	'extra	action de
la R-PE.	Les valeurs	corresponde	ent aux moy	rennes	± écarts ty	/pes, n=3	3			

	<b>Mw</b> (g.mol <sup>-1</sup> )	lp
UAEH T0	1 080 000 ± 51 215	$1,79 \pm 0,01$
UAEH T210	493 000 ± 23 866	$1,87 \pm 0,03$

Dès le début des extractions (T0), des polysaccharides de hautes masses molaires sont extraits (1,08.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>). Le même constat avait été fait pour l'optimisation de la liquéfaction (1,12.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>) (Tableau XXV, p.192). Après 210 minutes d'UAEH, la masse molaire des polysaccharides est 2,2 fois plus petite (4,93.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>) par rapport au T0 (Tableau XXIX), ce qui confirme la dépolymérisation des polysaccharides extraits par l'UAEH. De plus, les Ip des fractions à T0 et T210 minutes sont similaires, indiquant la présence de polysaccharides de taille homogène.

Par ailleurs, les fractions solubles finales obtenues lors de l'optimisation de la liquéfaction et pour l'optimisation de l'extraction de la R-PE, présentent des polysaccharides de masses molaires similaires (4,32.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> et 4,93.10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup> respectivement), bien que les durées, les puissances et les températures appliquées soient différentes.

Des éléments de réflexion peuvent être proposés pour expliquer ces observations. Ainsi, la dépolymérisation des polysaccharides de *Grateloupia turuturu* pourrait avoir lieu au début de l'UAEH, et ensuite les ultrasons n'auraient plus d'effet sur la taille des polysaccharides. Ce phénomène a déjà été observé dans une étude, lors d'un suivi cinétique de la dépolymérisation par ultrasons d'un polysaccharide bactérien (Mw >  $1.10^6$  g.mol<sup>-1</sup>) (Petit *et al.*, 2007; Petit, 2005). Dans cette étude, la masse molaire moyenne du polysaccharide était divisée par un facteur 3,5 dans les quinze premières minutes, puis elle continuait ensuite à diminuer mais plus légèrement. La durée optimale retenue pour la dépolymérisation était alors d'environ deux heures.

Pour le procédé d'UAEH utilisé ici, outre l'effet de la durée qui vient d'être évoqué, d'autres variables diffèrent entre les deux optimisations : la puissance et la température, qui peuvent elles aussi affecter potentiellement la taille des polysaccharides.

D'après la littérature, les réactions mettant en jeu des ultrasons sont le plus souvent améliorées par l'abaissement de la température (Pétrier *et al.*, 2008), ceci est notamment vérifié pour les réactions de dépolymérisation (Lorimer *et al.*, 1995). Ici, la comparaison est difficile car l'abaissement de la température (de 40 à 20 °C) s'accompagne également de la diminution de la puissance des ultrasons (de 400 à 300 W). L'effet de la température et de la puissance ultrasonore (Bain, 25 kHz) sur la dégradation d'un polymère en solution (dextrane) a déjà été étudié (Lorimer *et al.*, 1995). D'après cette étude, pour une température donnée, le degré de dépolymérisation augmentait avec la puissance (de 20 à 60 W), tandis que pour une puissance donnée, l'augmentation de la température (30 à 70 °C) diminuait le degré de dépolymérisation. Il y aurait donc un effet inverse de la température et de la puissance. Selon cette étude, dans leurs conditions, il faudrait à la fois augmenter la puissance et diminuer la température pour maximiser la dépolymérisation. Ici, dans le cas de l'optimisation de l'UAEH pour la R-PE, il est possible que la diminution de la température (de 40 à 20 °C) et de la puissance (de 400 à 300 W) se compensent, aboutissant à des masses molaires similaires à celles obtenues après six heures dans les conditions optimales pour la liquéfaction. Néanmoins, les ultrasons ne sont pas les seuls à entrer en jeu dans ce travail, puisque les polysaccharidases interviennent également dans la dépolymérisation des polysaccharides de l'algue, même si leur activité est diminuée par la température utilisée ici.

En revanche, une autre étude a, quant à elle, montré que la dépolymérisation par sonication d'un polysaccharide bactérien n'est pas modifiée par l'abaissement de la température de 60 à 30 °C. Ceci s'expliquerait par la différence de viscosité du milieu réactionnel entre 30 et 60 °C, le polysaccharide étudié étant plus visqueux à 30 °C qu'à 60 °C, l'augmentation de viscosité pourrait contrebalancer l'éventuel effet positif d'une diminution de la température (Petit *et al.*, 2007; Petit, 2005). Or, l'augmentation de viscosité d'un milieu affecte le phénomène de cavitation, ce qui nécessite d'augmenter la puissance ultrasonore (Pétrier *et al.*, 2008). Dans les conditions optimales d'UAEH pour la liquéfaction (40 °C), la présence probable de carraghénanes gélifiants entre 30 et 45 °C (Venegas-Sanchez *et al.*, 2013) pourrait provoquer une augmentation de la viscosité du milieu et ainsi compenser l'effet d'une puissance plus élevée.

Enfin, concernant la taille des polysaccharides et l'extraction de la R-PE, comme cela a été mentionné dans le chapitre IV, des études ont montré que les polysaccharides voyaient leur activité antioxydante augmenter avec la diminution de leur masse molaire. Il semble donc que l'hypothèse n°3, formulée dans le Chapitre IV (IV.1.2.), soit en accord avec ces résultats puisque l'extraction de polysaccharides de petite taille pourrait, du fait de leur éventuelle activité antioxydante, contribuer à stabiliser la R-PE en solution (Figure 59).

En résumé, le couplage simultané des ultrasons et des enzymes dépolymérise les polysaccharides de *Grateloupia turuturu*, à la fois dans les conditions optimisées pour la liquéfaction et dans celles pour l'extraction de la R-PE, cette dépolymérisation serait non spécifique.

#### V.2.4. Les acides aminés

#### V.2.4.1. Distribution des acides aminés de l'algue

La détermination de la distribution des acides aminés de l'algue, entre surnageant et culot, a été réalisée à partir des rendements d'extractions (RS<sub>aa</sub> et RC<sub>aa</sub>) calculés comme

indiqué dans le Chapitre II (V.6.3, p.108). Les résultats présentés ici sont issus des analyses effectuées au laboratoire Bioraf<sup>he</sup>.

La Figure 62 présente la répartition des acides aminés dans chaque fraction, au début (T0) et à la fin de l'application du procédé (T210), dans les conditions d'UAEH optimisées pour l'extraction de la R-PE.



Figure 62 : répartition (%) des acides aminés de l'algue entre culot et surnageant à T0 et T210 minutes dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les étoiles indiquent une différence significative par rapport au T0 : \*\* pour p < 0,01 et \* pour p < 0,05. Analyses effectuées par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

Après 210 minutes, l'UAEH a solubilisé 43,72  $\pm$  6,35 % des acides aminés de l'algue, soit une augmentation d'un facteur 1,5 par rapport au T0 (29,73  $\pm$  1,09 %), ce qui est en accord avec l'augmentation de la liquéfaction de l'algue. La comparaison de ces résultats avec ceux de la solubilisation de l'azote (Figure 60a) montre que leur évolution est relativement proche, puisque après 210 minutes d'UAEH la solubilisation de l'azote a été multipliée par 1,7.

Dans les conditions optimisées pour la liquéfaction, la fraction soluble contient 1,7 fois plus d'acides aminés à T360 (57,11  $\pm$  1,85 %) qu'à T0 (32,85  $\pm$  2,76 %) (Figure 56, p.194). Il semble cohérent que les conditions optimales pour la liquéfaction permettent de solubiliser plus d'acides aminés (x 1,7) que celles pour l'extraction de la R-PE (x 1,5). De plus, la

température de 40 °C est plus proche de la température optimale des polysaccharidases, ces enzymes vont favoriser la dégradation des polysaccharides matriciels et de ce fait améliorer le passage en solution des protéines et acides aminés.

# V.2.4.2. Profils en acides aminés

Afin de mieux caractériser qualitativement les fractions solubles et insolubles, les profils en acides aminés de chacune de ces fractions ont été réalisés. La Figure 63a correspond aux culots et surnageants à T0 et la Figure 63b après 210 minutes d'UAEH. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des AA<sub>détectés</sub>.





Figure 63 : profil en acides aminés de *Grateloupia turuturu* et des fractions (culot C et surnageant S) à T0 (a) et à T210 minutes (b), dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif de chaque AA par rapport aux AA détectés. Les valeurs correspondent aux moyennes ± écarts types, n=3 (sauf pour *Grateloupia turuturu*, n=1). Analyses effectuées par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

Initialement, les profils en acides aminés des culots et surnageants présentent globalement les mêmes tendances, ceux-ci sont également similaires au profil des acides aminés de l'algue (Figure 63a). Les deux acides aminés majoritaires dans les culots et surnageants sont, là encore, l'acide aspartique (Asp) et l'acide glutamique (Glu). L'acide glutamique est cependant retrouvé en plus grande proportion dans le surnageant (17,57  $\pm$  1,09 %) que dans le culot (13,46  $\pm$  0,82 %). La leucine (Leu) est le troisième acide aminé le plus représenté dans l'algue, et s'avère être en plus grande proportion dans les culots (9,21  $\pm$  0,25 %) que dans les surnageants (6,41  $\pm$  0,27 %). Il en est de même pour la phénylalanine (Phe), avec respectivement 5,55  $\pm$  0,14 % dans les culots et 3,25  $\pm$  0,14 % dans les surnageants. La sérine (Ser) est, comme l'acide glutamique, retrouvée en plus grande proportion dans les surnageants (6,58  $\pm$  0,06 %). Pour les autres acides aminés, les profils des culots et des surnageants sont similaires et sont proches du profil en acides aminés de Grateloupia turuturu. Ces acides aminés semblent donc se répartir sans distinction entre les deux fractions.

Après 210 minutes d'UAEH (Figure 63b), les tendances observées sont globalement les mêmes qu'à T0, ce qui signifie que le procédé ne favorise pas la solubilisation sélective des acides aminés. Ainsi, la leucine et la phénylalanine sont encore majoritairement retrouvées dans les culots (9,64 ± 0,10 % et 5,98 ± 0,07 % respectivement) tandis que l'acide glutamique et la sérine sont toujours présents en plus grandes proportions dans les surnageants (respectivement 16,35 ± 0,42 % et 8,43 ± 0,47 %). Ces résultats suggèrent que le procédé d'UAEH appliqué ici ne change pas la répartition des acides aminés entre culot et surnageant.

Ces observations, ainsi que la non sélectivité de l'UAEH pour la solubilisation de certains acides aminés, avaient déjà été mentionnées pour l'optimisation de la liquéfaction (Figure 57, p.196). Ces deux optimisations, malgré des paramètres différents (puissance, température, débit et durée) aboutissent à des profils en acides aminés relativement similaires. Cependant, sur un plan quantitatif, les acides aminés de *Grateloupia turuturu* sont davantage solubilisés dans les conditions optimisées pour la liquéfaction avec 57,11 ± 1,85 % d'acides aminés en solution, que dans les conditions optimisées pour la R-PE avec 43,72 ± 6,35 %.

Sur un plan qualitatif, il est intéressant de déterminer les valeurs prises par le ratio des acides aminés essentiels (AAE) sur l'ensemble des acides aminés détectés (AA<sub>détectés</sub>) (AAE/AA<sub>détectés</sub>). Le Tableau XXX présente les ratios obtenus pour les culots et surnageants à T0 et après 210 minutes.

Tableau XXX : ratios AAE/AA détectés (%) pour les culots et surnageants obtenus à T0 et T210 minutes dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3. Les lettres différentes indiquent une différence significative avec p < 0,05. Analyses effectuées par le laboratoire Bioraf<sup>he</sup>

	UAEH	T0 min	UAEH T210 min		
	Surnageants	Culots	Surnageants	Culots	
AAE/AA <sub>détectés</sub> (%)	36,66 ± 0,57 ª	43,30 ± 0,68 <sup>b</sup>	36,78 ± 0,74 ª	44,35 ± 0,47 <sup>b</sup>	

Comme observé précédemment pour l'optimisation de la liquéfaction (Tableau XXVI, p.198), les culots ont un ratio AAE/AA<sub>détectés</sub> significativement plus élevé par rapport aux surnageants, que ce soit à T0 ou après 210 minutes d'UAEH (Tableau XXX). En revanche, contrairement à l'optimisation de la liquéfaction, il n'y a pas ici de différence significative entre les ratios des culots obtenus à T0 et après 210 minutes, cette observation vaut également pour les surnageants.

# V.2.5. <u>Synthèse : composition biochimique de la fraction soluble finale (210</u> <u>minutes)</u>

Les résultats de l'optimisation de l'extraction de la R-PE ont montré que les rendements d'extraction obtenus à 120, 180 et 240 minutes coïncidaient avec les prédictions du modèle. Les analyses biochimiques ont démontré que l'extraction de la R-PE était bien associée à la solubilisation de différents composés de l'algue, sans spécificité vis-à-vis de certains oses ou acides aminés. Les conditions optimisées ici permettent de maximiser l'extraction de la R-PE, tout en permettant une dépolymérisation des polysaccharides de l'algue, telle que celle observée lors de l'optimisation de la liquéfaction.

La composition biochimique partielle des fractions solubles obtenues après 210 minutes d'UAEH, dans les conditions optimales d'extraction de la R-PE, est dressée dans le Tableau XXXI.

Tableau XXXI : composition biochimique partielle des fractions solubles après 210 minutes d'UAEH dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  écarts types, n=3

	Fraction soluble T210 minutes
Matière sèche (% MF)	2,48 ± 0,01
Matière sèche estimée * (% MF)	2,65 ± 0,02
Cendres (% MS estimée)	30,54 ± 0,17
Sucres hydrosolubles (% MS estimée)	33,50 ± 2,70
Résidus glycosidiques (% MS estimée) (oses libres)	29,01 ± 0,58
Carbone (% MS estimée)	28,64 ± 0,08
Azote (% MS estimée)	$3,31 \pm 0,01$
Acides aminés (% MS estimée)	9,56 ± 1,24
R-PE (% MS estimée)	0,55 ± 0,01

\* par lyophilisation

Ici, les fractions solubles obtenues après 210 minutes d'UAEH ont une teneur plus faible en matière sèche (2,65  $\pm$  0,02 %) que celles obtenues après 360 minutes d'UAEH dans les conditions optimisées de liquéfaction (3,11  $\pm$  0,10 %). Cela signifie qu'une plus faible proportion des composés de l'algue est passée en solution dans le cas de l'optimisation de l'extraction de la R-PE, ce qui est cohérent avec les taux de liquéfaction obtenus après 210 minutes pour chacune des deux réponses optimisées (87,58  $\pm$  1,40 % et 65,34  $\pm$  1,46 %).

Les fractions solubles se composent principalement de sucres (de 29 à 34 % MS <sub>estimée</sub>) et de 31 % MS <sub>estimée</sub> de cendres ou matières minérales. Les acides aminés représentent un peu moins de 10 % MS <sub>estimée</sub>, tandis que l'azote est retrouvé à hauteur de 3,31 ± 0,01 % MS <sub>estimée</sub>. En appliquant le facteur N-Prot de 3,47 déterminé dans le Chapitre III pour l'algue de 2014 (Laboratoire Bioraf<sup>he</sup>) (Chapitre III, II.3., p.131), le pourcentage de protéines totales dans la fraction soluble est de 11,49 ± 0,03 % MS <sub>estimée</sub>, ce qui est proche des 9,56 ± 1,24 % d'acides aminés dosés. Pour le facteur N-Prot de 5,16, le pourcentage de protéines passe alors à 17,10 ± 0,05 % MS <sub>estimée</sub>, soit plus de 7 % par rapport aux acides aminés. Par rapport aux conditions optimales de liquéfaction (Chapitre V, IV.2.4, p.198), les fractions solubles

semblent ici un peu plus concentrées en matières minérales, azote et acides aminés, mais l'inverse est constaté pour les sucres (sucres hydrosolubles :  $42,73 \pm 1,03 \%$  MS <sub>estimée</sub> et oses libres :  $36,56 \pm 4,72 \%$  MS <sub>estimée</sub>).

La somme de la matière minérale, des sucres et des protéines totales (N x 5,16) représente ainsi 77 à 82 % de la fraction soluble (MS  $_{estimée}$ ), sachant que les lipides ne figurent pas dans cette composition.

Enfin, après 210 minutes d'UAEH, la R-PE constitue 0,55  $\pm$  0,01 % de la matière sèche de la fraction soluble (MS <sub>estimée</sub>). L'extrait conventionnel sec (eau du réseau pH 5,5) présente quant à lui une teneur plus élevée en R-PE (0,66  $\pm$  0,07 % MS <sub>estimée</sub>), ce qui est cohérent puisque, par rapport à l'UAEH, l'extraction conventionnelle co-extrait moins de molécules.

# **VI.** Conclusion

Dans ce chapitre, la connaissance plus approfondie de la composition du cocktail enzymatique a confirmé la teneur importante en sucres des complexes enzymatiques utilisés. Elle a également permis d'augmenter la précision des résultats en prenant en considération les apports liés aux enzymes.

Les résultats obtenus à l'issue des 19 essais du plan central composite ont conduit à la réalisation d'une optimisation pour chaque réponse étudiée : la liquéfaction de l'algue et l'extraction de la R-PE. Ainsi, l'augmentation de la température affecte négativement la RPE tandis que l'augmentation de la température, de la puissance et de la durée favorise la liquéfaction de *Grateloupia turuturu*. Les valeurs prédites par le modèle pour la liquéfaction de l'algue et pour l'extraction de la R-PE ont été vérifiées et confirmées par les expérimentations.

La liquéfaction de *Grateloupia turuturu* par UAEH dans les conditions optimisées, 40 °C, 400 W, 65 L.h<sup>-1</sup> et 360 minutes, a permis d'augmenter le passage en solution des composés de 83 % (meilleur résultat des 19 essais) à 88 %. L'analyse biochimique des fractions a montré que le carbone et l'azote de l'algue sont principalement retrouvés dans la fraction soluble (> 70 %), il en est de même pour les acides aminés (57 %). Par rapport au surnageant initial, l'extraction des sucres est considérablement augmentée (x 3,5 à 4), elle s'accompagne d'une diminution de taille des polysaccharides qui ont alors des masses molaires 2,5 fois plus petites.

L'extraction de la R-PE dans les conditions optimisées d'UAEH, 20 °C, 300 W, 145 L.h<sup>-1</sup> et 210 minutes, a permis d'atteindre un  $R_{R-PE}$  de 4,2 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S après 210 minutes. Dès 90 minutes, le  $R_{R-PE}$  se situe autour de 4 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S, puis il n'évolue plus jusqu'à la fin de l'extraction. Il semble donc que, dans les conditions utilisées ici, la R-PE soit relativement stable aux ultrasons. En revanche, comme attendu, l'extraction des composés hydrosolubles est inférieure à celle obtenue dans les conditions optimisées pour la liquéfaction. Cependant, le carbone (> 48 %) et l'azote (> 55 %) sont bien solubilisés, ainsi que les sucres dont le rendement d'extraction est multiplié par 2,6-3,2 par rapport au T0. Ces conditions optimales pour la R-PE ont également permis une dépolymérisation, aboutissant à des polysaccharides de masses molaires 2,2 fois plus petites.

Quelles que soient les conditions expérimentales, **le procédé d'UAEH semble non sélectif** vis-à-vis de l'extraction des sucres et des acides aminés. En effet, pour la liquéfaction et l'extraction de la R-PE, les profils osidiques et les degrés de dépolymérisation des sucres extraits sont similaires, il en est de même pour les profils en acides aminés.

Enfin, par rapport à l'extraction conventionnelle, **l'optimisation de l'UAEH a permis** de multiplier par 3,3 l'extraction des composés hydrosolubles de *Grateloupia turuturu*. L'optimisation pour l'extraction de la R-PE a quant à elle permis de multiplier par 2,6 le R<sub>R-PE</sub>, tout en maintenant la co-extraction d'autres molécules.

# **Conclusion générale**

&

# Perspectives
L'objectif principal de ce travail de thèse était de sélectionner, parmi trois procédés originaux (EAE, UAE et UAEH), celui permettant de maximiser la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* dans le but d'extraire un maximum de composés. Parmi ceux-ci, la R-phycoérythrine a fait l'objet d'une attention particulière.

Dans le premier chapitre de résultats, la caractérisation de la biomasse a montré que les algues collectées en 2013 et 2014 présentaient des compositions biochimiques relativement proches. À notre connaissance, le profil en acides aminés de Grateloupia turuturu n'avait jamais été établi jusqu'à présent. Grâce à cette étude, la présence des 20 acides aminés protéinogènes a été mise en évidence avec une prédominance des acides aspartique et glutamique. De plus, bien qu'elle ne soit pas encore autorisée en Europe en alimentation humaine, Grateloupia turuturu présente un intérêt nutritionnel avec un ratio AAE/AAddetectés intéressant, de l'ordre de 40 %. Pour la première fois, un facteur de conversion azote-protéines (N-Prot=5,16) spécifique à Grateloupia turuturu a été établi, celui-ci pourrait remplacer, à l'avenir, le facteur 6.25 habituellement employé et qui surestime les protéines totales de l'algue. La comparaison des trois procédés d'extraction étudiés a montré que l'extraction assistée par ultrasons et par hydrolyse enzymatique (UAEH) était la plus performante. En effet, après six heures, ce procédé a permis de solubiliser près de 91 % des composés de l'algue, soit 1,7 fois plus que le témoin. Ce niveau élevé de liquéfaction a également été associé à de meilleurs rendements d'extraction des sucres hydrosolubles, de l'azote et du carbone de Grateloupia turuturu. De plus, d'après ces premiers résultats, l'UAEH pourrait être menée sur seulement quatre heures, d'où un gain de temps et une réduction des coûts. Il semble également y avoir un effet synergique entre les ultrasons et les enzymes, comme cela a déjà été décrit précédemment pour d'autres biomasses végétales. Les deux autres procédés étudiés, l'UAE et l'EAE, ont également permis de solubiliser des composés de l'alque, mais à des niveaux moindres que l'UAEH (71 et 74 % respectivement). Cependant, par rapport à l'EAE, l'UAE présenterait tout de même le double avantage de solubiliser plus de sucres et d'abaisser la viscosité des extraits. À l'issue de ce premier chapitre, l'UAE et l'UAEH ont été sélectionnées. Cette première étude a démontré et confirmé l'intérêt de l'UAEH, procédé innovant couplant simultanément ultrasons et enzymes, pour la liquéfaction de la macroalgue rouge *Grateloupia turuturu*.

L'UAE et l'UAEH ont ensuite fait l'objet d'une étude plus poussée portant sur l'influence de la température et sur l'efficacité de ces deux procédés dans l'extraction d'une molécule cible : la R-phycoérythrine. En accord avec de précédents travaux, les premiers résultats

obtenus via la méthode d'extraction conventionnelle ont confirmé la variabilité de la teneur en R-PE de Grateloupia turuturu entre les printemps 2013 et 2014. La sensibilité de ce pigment à l'augmentation de la température a également été observée, celle-ci avait déjà été décrite dans de précédentes études mais pour des durées d'exposition ne dépassant pas une heure. Ici, il a été démontré que la sensibilité de la R-PE à la température est d'autant plus marquée que l'exposition est prolongée. Ainsi, il semblerait qu'une température de 4 à 25 °C, voire 30 °C (selon la durée de traitement), soit préférable pour des extractions de plusieurs heures. Concernant l'influence de la température sur l'UAE et l'UAEH, quelle que soit la température (22 ou 40 °C), ces deux procédés ont permis d'extraire, en moins d'une heure, deux fois plus de composés hydrosolubles que la méthode d'extraction conventionnelle. À ces températures, l'UAEH est ressortie comme étant le procédé le plus performant pour la liquéfaction de Grateloupia turuturu, avec un taux de matière liquéfiée plus élevé à 40 °C (près de 91 %) qu'à 22 °C (près de 84 %). C'est aussi à 40 °C que les fractions solubles obtenues sont les plus riches en sucres hydrosolubles et composés carbonés. Concernant l'extraction de la R-phycoérythrine, il a été démontré que les deux procédés doivent être appliqués à 22 °C sur une durée inférieure à deux heures pour préserver le pigment. À cette température, les rendements d'extraction de la R-PE se sont avérés similaires entre l'UAEH et l'UAE, l'UAEH étant toutefois le procédé le plus performant pour la liquéfaction de l'algue. De plus, l'UAEH à 22 °C a permis d'extraire, en une à deux heures, 1,4 fois plus de R-PE que l'extraction conventionnelle à l'eau du réseau. Forts de ces résultats, l'UAEH a donc été sélectionnée, avec un procédé court à 22 °C pour l'extraction de la R-PE, et un procédé plus long à une température supérieure (40 °C) pour la liquéfaction de Grateloupia turuturu.

L'étude de l'influence de différents paramètres sur l'UAEH a fait l'objet du dernier chapitre de cette thèse, avec pour objectif de déterminer les meilleures conditions pour la liquéfaction de *Grateloupia turuturu* et l'extraction de la R-PE. La réalisation d'un plan d'expériences a confirmé les résultats du précédent chapitre, c'est à dire que l'augmentation de la température a un impact positif sur la liquéfaction tandis qu'elle affecte négativement le rendement d'extraction de la R-PE. Il a également été observé que l'augmentation de la puissance est favorable à la liquéfaction tandis que ce facteur n'a pas d'influence sur l'extraction de la R-PE. Le débit s'est quant à lui montré non influent pour les deux réponses étudiées. Deux optimisations distinctes de ce procédé ont donc été entreprises. Dans les conditions optimisées pour la liquéfaction (40 °C, 400 W, 65 L.h<sup>-1</sup>, 360 min), l'UAEH a permis de solubiliser 88 % des composés de l'algue. La caractérisation des fractions solubles et insolubles obtenues a montré que plus de 70 % du carbone et de l'azote de l'algue ont été solubilisés. Dans les conditions optimisées pour l'extraction de la R-PE (20 °C, 300 W,

145 L.h<sup>-1</sup>, 210 min), un rendement d'extraction de 4,2 mg.g<sup>-1</sup> Alg.S a été atteint grâce au couplage. Cette étude a également permis de démontrer que la R-PE n'est pas ou peu sensible aux ultrasons dans les conditions de sonication appliquées ici. De plus, comme attendu, l'extraction des composés hydrosolubles de l'alque s'est avérée nettement inférieure à celle obtenue dans les conditions optimisées pour la liquéfaction (65 % vs 88 %). Néanmoins, le rendement d'extraction des sucres a tout de même été multiplié par un facteur 3 par rapport au surnageant initial. La comparaison des résultats obtenus, avec l'UAEH optimisée et avec la méthode conventionnelle d'extraction, a permis de confirmer les performances de ce procédé. Ainsi, par rapport à la méthode conventionnelle, l'optimisation de l'UAEH pour la liquéfaction a multiplié par 3,3 l'extraction des composés de Grateloupia turuturu. La deuxième optimisation de l'UAEH, consacrée à la R-PE, a permis de multiplier par 2,6 le rendement d'extraction du pigment, tout en maintenant à un moindre niveau la co-extraction d'autres molécules. Enfin, les analyses biochimiques plus approfondies des fractions solubles obtenues après optimisation de l'UAEH ont montré que, pour les deux réponses optimisées, ce procédé semble non sélectif vis-à-vis de l'extraction des sucres et des acides aminés. En effet, pour la liquéfaction de l'algue et l'extraction de la R-PE, les profils osidiques et les degrés de dépolymérisation des sucres extraits sont proches, il en est de même pour les profils en acides aminés.

De nombreuses perspectives sont ouvertes suite à ce travail de thèse. Elles concernent bien sûr le procédé de couplage ultrasons-enzymes, mais aussi la caractérisation et la recherche de potentielles activités biologiques des fractions solubles générées.

Tout d'abord, concernant le couplage et les conditions d'extraction, les perspectives sont considérables. Ainsi, dans un premier temps, il serait intéressant de favoriser l'extraction de la R-PE (20 °C, 300 W, 145 L.h<sup>-1</sup>) pour soutirer un premier extrait riche en pigment. Ensuite, le mélange réactionnel restant serait placé dans les conditions optimales de la liquéfaction (40 °C, 400 W, 65 L.h<sup>-1</sup>) jusqu'à la fin du procédé, afin d'obtenir un second extrait enrichi en différents composés. Ce procédé en deux temps pourrait permettre de valoriser à la fois la R-PE, mais aussi d'autres composés nécessitant une liquéfaction plus poussée. L'influence du ratio eau/algue serait également intéressante à évaluer car des études ont montré qu'il jouait sur l'efficacité de la sonication (Kurd et Samavati, 2015; Liao *et al.*, 2015). Il ne faut cependant pas oublier que ce ratio impacte également la capacité à pomper le mélange réactionnel pour assurer une bonne circulation dans le système. L'influence de

la fréquence ultrasonore (Subhedar et Gogate, 2013), l'effet du ratio enzyme/substrat (Liao *et al.*, 2015) ainsi que l'effet du pH (Chen *et al.*, 2012) sur le procédé.

Par ailleurs, l'utilisation d'enzymes nécessite ensuite leur inactivation, celle-ci se fait essentiellement par dénaturation thermique entre 90 et 100 °C. Dans ce travail de thèse elles n'ont pas été inactivées en raison de la présence de la R-PE qui aurait été dégradée à de telles températures. D'autres solutions, telles que l'ultrafiltration, pourraient être envisagées pour éliminer les enzymes. En effet, une étude a déjà montré qu'il était possible de pré-purifier la R-PE extraite de *Grateloupia turuturu* de façon conventionnelle, en utilisant une membrane d'ultrafiltration avec un seuil de coupure de 30 kDa (Denis *et al.*, 2009c). Ainsi, les enzymes étant de tailles inférieures à celle de la R-PE, l'utilisation de membranes avec des seuils de coupure adaptés pourrait éventuellement permettre de séparer la R-PE des enzymes. Une autre alternative possible serait l'inactivation des enzymes *via* le pH (Sine, 2010), tout en prenant en considération la gamme de pH dans laquelle la R-PE est stable.

Une caractérisation biochimique plus poussée des fractions générées au cours du temps serait à envisager. En effet, en dehors de la R-PE, les analyses biochimiques n'ont malheureusement pas pu être réalisées sur l'ensemble des cinétiques effectuées, cela aurait permis de voir l'évolution de la composition des fractions obtenues. Ainsi, dans les conditions optimisées pour la R-PE, il serait intéressant d'effectuer l'ensemble des analyses à partir de 90 minutes pour évaluer si les compositions biochimiques des fractions diffèrent de celles décrites après 210 minutes. Dans le cas où peu de différences seraient constatées entre 90 et 210 minutes, il y aurait tout intérêt sur un plan pratique et économigue, à conduire l'UAEH sur seulement 90 minutes. Concernant les masses molaires des polysaccharides, un suivi de la dépolymérisation au cours du temps serait intéressant, car il permettrait de savoir si la taille des polyssacharides atteint un plateau. Ce suivi pourrait peut-être permettre d'expliquer pourquoi les polysaccharides présentaient des masses molaires proches après 360 minutes d'UAEH pour l'optimisation de la liquéfaction et après 210 minutes d'UAEH pour l'extraction de la R-PE. Enfin, la R-phycoérythrine s'est montrée relativement stable aux ultrasons, mais cette stabilité n'a été évaluée que sur la base des spectres d'absorbance. Il faudrait donc approfondir les analyses, en vérifiant par exemple que la R-PE possède toujours ses propriétés de fluorescence et en s'assurant, par des techniques d'électrophorèse et de chromatographie, de l'intégrité de la molécule (Munier, 2013). Il serait intéressant dans un deuxième temps d'envisager une purification partielle de la R-PE des fractions solubles générées (Denis et al., 2009c; Galland-Irmouli et al., 2000; Munier et al., 2015), puis de réaliser une caractérisation fine de ce pigment, notamment de ses sous-unités, afin d'approfondir les connaissances fondamentales sur cette molécule. Cette thématique a déjà fait l'objet d'études préliminaires, qui pourraient être poursuivies grâce à l'expertise du laboratoire MMS, entre autre, et à des collaborations avec d'autres laboratoires (LUBEM, LIENSs) (Dumay *et al.*, 2014a).

La recherche d'activités biologiques (antioxydantes, antibactériennes et antivirales par exemple) pourrait mettre en évidence de nouvelles molécules à valeur ajoutée, ce qui contribuerait à rentabiliser le procédé. En effet, comme mentionné dans l'état de l'art (Chapitre I, Tableau V, p.45), le genre Grateloupia possède plusieurs molécules bioactives. Or, le procédé d'UAEH permet de solubiliser près de 91 % des composés de Grateloupia turuturu, les fractions générées contiennent donc probablement des composés bioactifs. De plus, l'UAEH a déjà permis de potentialiser différentes activités biologiques, notamment les activités antioxydantes en diminuant la taille des polysaccharides (Chaouch et al., 2015; Liao et al., 2015). L'évaluation de l'activité antioxydante des fractions solubles permettrait de savoir si des composés, tels que les polysaccharides, peuvent jouer un rôle dans la stabilité de la R-PE, comme cela a été supposé. Il serait également intéressant de rechercher la présence d'autres molécules, telles que les mycosporine-like amino acids (MAAs), qui ont déjà été identifiées dans le genre Grateloupia et chez Grateloupia turuturu (Figueroa et al., 2007; Munier, 2013). L'utilisation d'ultrasons a précédemment été mentionnée pour l'extraction de MAAs de microalques et de macroalques (Carreto et al., 2004; Yuan et al., 2009). Ces MAAs peuvent être valorisées en tant que filtre UV naturel pour la cosmétologie (Bedoux et al., 2014; Schmid et al., 2004). Cependant, les conditions optimales d'hydrolyse mais aussi de sonication peuvent varier d'un composé bioactif à l'autre (Kadam et al., 2015b). Ainsi, les paramètres de l'UAEH devront être adaptés en fonction de la nature et de la stabilité des molécules recherchées (Delgado-Povedano et Luque de Castro, 2015; Subhedar et Gogate, 2013).

Enfin, sur un plan économique, il faut également se demander dans quelle mesure le procédé d'UAEH peut être rentable en fonction de la valeur ajoutée des molécules extraites. En effet, le coût engendré par l'ajout d'enzymes peut, dans certains cas, ne pas être compensé par l'augmentation du rendement d'extraction du composé ciblé (Deenu *et al.*, 2013), dans ce cas les ultrasons seuls seront à privilégier. Or, le coût lié aux ultrasons, dans un procédé faisant intervenir cette technologie, est principalement impacté par la durée de traitement (Shirsath *et al.*, 2012). Les analyses complémentaires proposées précédemment prennent donc tout leur sens, puisque leurs résultats pourraient peut-être permettre de raccourcir la durée d'extraction.

# Bibliographie

- ADEME. 2014. Évaluation du gisement potentiel de ressources algales pour l'énergie et la chimie en France à l'horizon 2030. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. Disponible sur : http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/potentiel-algalen-france-synthese-2014\_maj2015\_pdf.pdf. Consulté le 16 août 2015.
- AlgaeBase. 2016. Disponible sur : http://www.algaebase.org/. Consulté le 10 février 2016.
- Arasaki, T. & Mino, N. 1973. The Alkali Soluble Proteins in Marine Algae. *Eiyo To Shokuryo*, 26(2): 129-133.
- Araújo, R., Violante, J., Pereira, R., Abreu, H., Arenas, F. & Sousa-Pinto, I. 2011. Distribution and population dynamics of the introduced seaweed *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) along the Portuguese coast. *Phycologia*, 50(4): 392-402.
- Athukorala, Y., Jung, W.-K., Park, P.-J., Lee, Y.-J., Kim, S.-K., Vasanthan, T., No, H.-K. & Jeon, Y.-J. 2008. Evaluation of biomolecular interactions of sulfated polysaccharide isolated from *Grateloupia filicina* on blood coagulation factors. *Journal of Microbiology and Biotechnology*., 18(3): 503-511.

#### В

- Baeza, P. & Matsuhiro, B. 1977. Polysaccharides from Chilean Seaweeds IV. A Sulphated Galactan from *Grateloupia lanceola*. *Botanica Marina*, 20(6): 355-358.
- Baghel, R.S., Reddy, C.R.K. & Jha, B. 2014. Characterization of agarophytic seaweeds from the biorefinery context. *Bioresource Technology*, 159: 280-285.
- Baghel, R.S., Trivedi, N., Gupta, V., Neori, A., Reddy, C.R.K., Lali, A. & Jha, B. 2015. Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. *Green Chemistry*, 17: 2436-2443.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A. & Mohtashamy, M. 2011. Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11–12): 1237-1243.
- **Balcom, N.** 2009. *Grateloupia turuturu*: a red seaweed invading Long Island Sound. Disponible sur : http://seagrant.uconn.edu/publications/ais/gratelou.pdf. Consulté le 4 mars 2013.
- Baldan, B., Andolfo, P., Navazio, L., Tolomio, C. & Mariani, P. 2001. Cellulose in algal cell wall: an « in situ » localization. *European Journal of Histochemistry*, 45(1): 51-56.
- **Barbarino, E. & Lourenço, S.** 2005. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(5): 447-460.
- **Barillé-Boyer, A.-L., Gruet, Y., Barillé, L. & Harin, N.** 2004. Temporal changes in community structure of tide pools following the « Erika » oil spill. *Aquatic Living Resources*, 17(03): 323–328.
- Barton, S., Bullock, C. & Weir, D. 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(3): 190-194.
- Bashari, M., Eibaid, A., Wang, J., Tian, Y., Xu, X. & Jin, Z. 2013. Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1): 155-161.

- Bedoux, G., Hardouin, K., Burlot, A.S. & Bourgougnon, N. 2014. Chapter Twelve Bioactive Components from Seaweeds: Cosmetic Applications and Future Development. *In* Nathalie Bourgougnon, éd. *Advances in Botanical Research*, Sea Plants.p.345-378. Academic Press.
- Beer, S. & Eshel, A. 1985. Determining Phycoerythrin and Phycocyanin Concentration in Aqueous Crude Extracts of Red Algae. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, 36: 785-792.
- Benavides, J. & Rito-Palomares, M. 2006. Simplified two-stage method to B-phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B*, 844(1): 39-44.
- Benazzi, T., Calgaroto, S., Astolfi, V., Dalla Rosa, C., Oliveira, J.V. & Mazutti, M.A. 2013. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(4– 5): 247-250.
- Benoist, D., Tourbier, Y. & Germain-Tourbier, S. 1994. *Plans d'expériences : construction et analyse*. 700 p. Tec et Doc Lavoisier.
- Blanco-Pascual, N., Gomez-Guillen, M.C. & Montero, M.P. 2014. Integral *Mastocarpus stellatus* use for antioxidant edible film development. *Food Hydrocolloids*, 40: 128-137.

#### С

- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P. & Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1–2): 60-78.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M. & Barroso, C.G. 2015. Ultrasound-assisted extraction of amino acids from grapes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 499-505.
- **Carreto, J.I., Carignan, M.O. & Montoya, N.G.** 2004. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology*, 146(2): 237-252.
- **Castro-Puyana, M., Herrero, M., Mendiola, J.A. & Ibáñez, E.** 2013. 16 Subcritical water extraction of bioactive components from algae. *In* H. Domínguez, éd. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.534-560. Woodhead Publishing.
- **CAZy.** 2015. CAZy Carbohydrate-Active enZYmes Database. Disponible sur: http://www.cazy.org/Welcome-to-the-Carbohydrate-Active.html. Consulté le 22 juin 2015.
- **Cecere, E., Moro, I., Wolf, M.A., Petrocelli, A., Verlaque, M. & Sfriso, A.** 2011. The introduced seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta, Halymeniales) in two Mediterranean transitional water systems. *Botanica Marina*, 54(1): 23-33.
- **CEVA.** 2014. Synthèse Règlementation des algues en France. Disponible sur: http://www.ceva.fr/fre/Media/Files/Ceva-Synthese-Regle-2014. Consulté le 13 août 2015.
- **Chaouch, M.A., Hafsa, J., Rihouey, C., Le Cerf, D. & Majdoub, H.** 2015. Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant and antiglycated activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79: 779-786.
- **Chaplin, M.F.** 1986. Monosaccharides. *In* M.F. Chaplin & J.F. Kennedy, éd. *Carbohydrate analysis: a practical approach*, p.1-36. Oxford, IRL Press.

**Chattopadhyay, K., Mateu, C.G., Mandal, P., Pujol, C.A., Damonte, E.B. & Ray, B.** 2007. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry*, 68(10): 1428-1435.

- **Chemat, F., Zill-e-Huma & Khan, M.K.** 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4): 813-835.
- Chen, R., Li, S., Liu, C., Yang, S. & Li, X. 2012. Ultrasound complex enzymes assisted extraction and biochemical activities of polysaccharides from *Epimedium* leaves. *Process Biochemistry*, 47(12): 2040-2050.
- **Chen, Y.-C. & Chiang, Y.-M.** 1994. Development of Protoplasts from *Grateloupia sparsa* and *G. filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Botanica Marina*, 37(4)
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., Liu, Y.-S. & Wu, J.-Y. 2012. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide–protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction. *Process Biochemistry*, 47(5): 892-895.
- Chopin, N., Sinquin, C., Ratiskol, J., Zykwinska, A., Weiss, P., Cérantola, S., Le Bideau, J. & Colliec-Jouault, S. 2015. A Direct Sulfation Process of a Marine Polysaccharide in Ionic Liquid. *BioMed Research International*, 2015: e508656.
- Cian, R.E., Martínez-Augustin, O. & Drago, S.R. 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49(1): 364-372.
- Cian, R.E., Salgado, P.R., Drago, S.R., Gonzalez, R.J. & Mauri, A.N. 2014. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed Porphyra columbina biopolymers. *Food Chemistry*, 146: 6-14.
- **Clogenson, P.** 2015. Olmix, une success story bretonne qui carbure aux algues. Disponible sur: http://www.challenges.fr/entreprise/sante/20150915.CHA9398/olmix-la-success-story-quicarbure-aux-algues.html. Consulté le 25 septembre 2015.
- **Combes, D. & Monsan, P.** 2009. Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur. Chimie verte*, (BIO590): 18.
- **Conde, E., Balboa, E.M., Parada, M. & Falqué, E.** 2013. 4 Algal proteins, peptides and amino acids. *In* H. Domínguez, éd. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.135-180. Woodhead Publishing.
- Costa, L.S., Fidelis, G.P., Cordeiro, S.L., Oliveira, R.M., Sabry, D.A., Câmara, R.B.G., Nobre, L.T.D.B., Costa, M.S.S.P., Almeida-Lima, J., Farias, E.H.C., Leite, E.L. & Rocha, H.A.O. 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1): 21-28.
- **Craigie, J.S.** 1990. Cell walls. *In Biology of the Red Algae*, p.221-257. New York, Cole Kathleen M. and Sheath Robert G.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M. & Cintas, P. 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5): 898-902.
- **CRMC, C.R.M.C.** 2015. Guide to marine invaders in the Gulf of Maine. *Grateloupia turuturu*. Disponible sur: http://www.crmc.ri.gov/invasives/invasives\_refcards/G\_turuturu.pdf. Consulté le 19 août 2015.

#### D

- D'Agnolo, E., Murano, E., Rizzo, R. & Paoletti, S. 1993. A biliprotein from the red alga *Gracilaria longa*: thermal stability of R-Phycoerythrin. *Italian Journal of Biochemistry*, 42: 316A-318A.
- D'Agnolo, E., Rizzo, R., Paoletti, S. & Murano, E. 1994. R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa. Phytochemistry*, 35(3): 693-696.

- D'Archino, R., Nelson, W.A. & Zuccarello, G.C. 2007. Invasive marine red alga introduced to New Zealand waters: First record of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 41(1): 35-42.
- Dawczynski, C., Schubert, R. & Jahreis, G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103(3): 891-899.
- **De Cherisey, H.** 2010. Panorama et potentiel de développement des bioraffineries. Disponible sur: http://www.ademe.fr/panorama-potentiel-developpement-bioraffineries. Consulté le 1 mai 2015.
- **Deenu, A., Naruenartwongsakul, S. & Kim, S.M.** 2013. Optimization and Economic Evaluation of Ultrasound Extraction of Lutein from *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(6): 1151-1162.
- **Delgado-Povedano, M.M. & Luque de Castro, M.D.** 2015. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, 889:1-21.
- **Denis, C.** 2009. Caractérisation biochimique de l'algue Grateloupia turuturu, évaluation de ses potentialités de valorisation via un procédé de digestion enzymatique et la purification partielle d'un pigment d'intérêt (*R-Phycoérythrine*). Université de Nantes, 153 p.
- **Denis, C., Ledorze, C., Jaouen, P. & Fleurence, J.** 2009a. Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Grateloupia turuturu. Botanica Marina*, 52(3): 278-281.
- Denis, C., Le Jeune, H., Gaudin, P. & Fleurence, J. 2009b. An evaluation of methods for quantifying the enzymatic degradation of red seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Applied Phycology*, 21(1): 153-159.
- **Denis, C., Massé, A., Fleurence, J. & Jaouen, P.** 2009c. Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: Process definition and up-scaling. *Separation and Purification Technology*, 69(1): 37-42.
- **Denis, C., Morançais, M., Gaudin, P. & Fleurence, J.** 2009d. Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from *Grateloupia turuturu*. *Botanica Marina*, 52: 262-267.
- Denis, C., Morançais, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., Barnathan, G., Jaouen, P. & Fleurence, J. 2010. Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry*, 119(3): 913-917.
- **Dey, S. & Rathod, V.K.** 2013. Ultrasound assisted extraction of β-carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1): 271-276.
- **Diniz, G.S., Barbarino, E., Oiano-Neto, Pacheco & Lourenço.** 2011. Gross Chemical Profile and Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Five Tropical Seaweeds. *American Journal of Plant Sciences*, 02(03): 287-296.
- **Domínguez-González, R., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A. & Bermejo-Barrera, P.** 2005. Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Talanta*, 66(4): 937-942.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3): 350–356.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N. & Ravishankar, G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9): 389-406.

- **Dumas, J.B.A.** 1831. Procédés de l'analyse organique. *Annales de Chimie et de Physique*, 2(47): 198-213.
- Dumay, J., Allery, M., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Carbonneau, M.E. & Bergé, J.P. 2009. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9): 1599-1606.
- **Dumay, J., Clément, N., Morançais, M. & Fleurence, J.** 2013. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. *Bioresource Technology*, 131: 21-27.
- **Dumay, J., Fleury, Y. & Bordenave, S.** 2014a. Potentialités de valorisation de la R-Phycoérythrine issue de la macroalgue proliférante *Grateloupia turuturu* : Optimisation de l'extraction par voie enzymatique et recherche de nouvelles applications. Présentation et restitution du projet GRAPHYQUE - SMIDAP, Saint Jean de Mont.
- Dumay, J., Morançais, M., Munier, M., Le Guillard, C. & Fleurence, J. 2014b. Chapter Eleven -Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. *In* Nathalie Bourgougnon, éd. *Advances in Botanical Research*, Sea Plants.p.321-343. Academic Press.

#### Ε

- **EASIN.** 2015. European Alien Species Information Network European Commission. Disponible sur: http://easin.jrc.ec.europa.eu/. Consulté le 19 août 2015.
- Easson, M.W., Condon, B., Dien, B.S., Iten, L., Slopek, R., Yoshioka-Tarver, M., Lambert, A.
  & Smith, J. 2011. The application of ultrasound in the enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(5-6): 1322-1331.
- **ExplorEnz.** 2015. ExplorEnz \_ The Enzyme Database. Disponible sur: http://www.enzymedatabase.org/index.php. Consulté le 22 juin 2015.

#### F

- Faïd, F., Romdhane, M., Gourdon, C., Wilhelm, A.M. & Delmas, H. 1998. A comparative study of local sensors of power ultrasound effects: electrochemical, thermoelectrical and chemical probes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(2): 63-68.
- **FAO.** 2015. FAO Fisheries & Aquaculture Modules de requêtes en ligne. Disponible sur: http://www.fao.org/fishery/topic/16140/fr. Consulté le 16 août 2015.
- FAO/WHO/UNU. 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. World Health Organization (WHO). Disponible sur: http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO\_TRS\_935/en/. Consulté le 5 juin 2014.
- Fidelis, G.P., Gomes Camara, R.B., Queiroz, M.F., Santos Pereira Costa, M.S., Santos, P.C., Oliveira Rocha, H.A. & Costa, L.S. 2014. Proteolysis, NaOH and Ultrasound-Enhanced Extraction of Anticoagulant and Antioxidant Sulfated Polysaccharides from the Edible Seaweed, *Gracilaria birdiae*. *Molecules*, 19(11): 18511-18526.
- Figueroa, F.L., Korbee, N., Abdala, R., Jerez, C.G., López-de la Torre, M., Güenaga, L., Larrubia, M.A. & Gómez-Pinchetti, J.L. 2012. Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids) versus C-compounds (polysaccharides) in *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). *Marine Pollution Bulletin*, 64(2): 310-318.

- Figueroa, F.L., Korbee, N., de Clerck, O., Bárbara, I. & Ar Gall, E. 2007. Characterization of *Grateloupia lanceola* (Halymeniales, Rhodophyta), an obscure foliose *Grateloupia* from the Iberian Peninsula, based on morphology, comparative sequence analysis and mycosporine-like amino acid composition. *European Journal of Phycology*, 42(3): 231-242.
- Fleita, D., El-Sayed, M. & Rifaat, D. 2015. Evaluation of the antioxidant activity of enzymaticallyhydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2): 1236-1244.
- Fleurence, J. 1999a. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1): 25-28.
- Fleurence, J. 1999b. The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility? *Journal of Applied Phycology*, 11(3): 313-314.
- **Fleurence, J.** 2003. R-Phycoerythrin from red macroalgae : Strategies for extraction and potential application in Biotechnological area. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1(1): 63-68.
- Fleurence, J. 2004. Seaweed proteins. *In*: Yada R.Y., éd. Proteins in Food Processing.p 197-213. Woodhead Publishing Limited
- Fleurence, J., Antoine, E. & Lucon, M. 2002. Method for Extracting and Improving Digestibility of *Palmaria Palmata* Proteins (WO2002007528 A1)
- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S. & Leray, C. 1994. Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology*, 6(5-6): 527-532.
- Fleurence, J., Massiani, L., Guyader, O. & Mabeau, S. 1995. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. *Journal of Applied Phycology*, 7(4): 393-397.
- Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., García-Bueno, N. & Jaouen, P. 2012. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science & Technology*, 27(1): 57-61.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1): 497-509.
- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M. & Caroppo, C. 2013. The Red Seaweed *Gracilaria gracilis* as a Multi Products Source. *Marine Drugs*, 11(10): 3754-3776.
- Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N. & Kuroda, M. 1984. The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia*, 116-117(1): 513-516.

#### G

- Galland-Irmouli, A.-V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.-P., Villaume, C. & Guéant, J.-L. 1999. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(6): 353-359.
- Galland-Irmouli, A.V., Pons, L., Luçon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Guéant, J.L. & Fleurence, J. 2000. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 739(1): 117-123.
- **García-Bueno, N.** 2015. Valorisation de la macroalgue proliférante Grateloupia turuturu dans l'élevage de l'ormeau européen Haliotis tuberculata. Université de Nantes, 264 p.

- García-Bueno, N., Decottignies, P., Turpin, V., Dumay, J., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., Kervarec, N., Pouchus, Y.-F., Marín-Atucha, A.A. & Fleurence, J. 2014. Seasonal antibacterial activity of two red seaweeds, *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu*, on European abalone pathogen *Vibrio harveyi*. Aquatic Living Resources, 27(02): 83–89.
- **Garon-Lardière, S.** 2004. *Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge* Asparagopsis armata (*Bonnemaisoniales*). Université de Bretagne Occidentale, Brest, 226 p.
- **Gavio, B. & Fredericq, S.** 2002. *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*. *European Journal of Phycology*, 37(3): 349-359.
- **GIP Bretagne Environnement.** 2010. *Les espèces marines invasives en Bretagne*. 44 p. Observatoire de la biodiversité et du patrimoine naturel en Bretagne.
- **Glazer, A.N.** 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal* of *Biological Chemistry*, 264(1): 1-4.
- **Glazer, A.N.** 1994. Phycobiliproteins a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6(2): 105-112.
- **Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A. & Rupérez, P.** 2014. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(1): 29-40.
- **Gómez-Pinchetti, J.L. & García-Reina, G.** 1993. Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds. *Marine Biology*, 116(4): 553-558.
- Gondrexon, N., Renaudin, V., Pétrier, C., Boldo, P., Bernis, A. & Gonthier, Y. 1999. Degradation of pentachlorophenol aqueous solutions using a continuous flow ultrasonic reactor: experimental performance and modelling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(4): 125-131.
- **Goupy, J.** 1996. La méthode des plans d'expériences. Optimisation du choix des essais et de *l'interprétation des résultats.* 303 p. Paris, Dunod.
- **Goupy, J.** 2013. Les plans d'expériences. Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats. 401 p. Paris, Dunod l'Usine nouvelle.
- **Greensea.** 2015. Greensea Actives from Algae Pigments. Disponible sur: http://www.greensea.fr/pigments. Consulté le 21 août 2015.

#### н

- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R. & Muffler, K. 2012. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47(12): 1691-1698.
- Hammed, A.M., Jaswir, I., Amid, A., Alam, Z., Asiyanbi-H, T.T. & Ramli, N. 2013. Enzymatic Hydrolysis of Plants and Algae for Extraction of Bioactive Compounds. *Food Reviews International*, 29(4): 352-370.
- Harada, H., Noro, T. & Kamei, Y. 1997. Selective Antitumor Activity in Vitro from Marine Algae from Japan Coasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20(5): 541-546.
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A.-S., Nyvall-Collén, P. & Bourgougnon, N. 2014. Chapter Ten - Enzymatic Recovery of Metabolites from Seaweeds: Potential Applications. *In* N. Bourgougnon, éd. *Advances in Botanical Research*, Sea Plants.p.279-320. Academic Press.
- Hardouin, K., Burlot, A.-S., Umami, A., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Widowati, I., Bedoux, G. & Bourgougnon, N. 2013. Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. J Appl Phycol, 26(2): 1029-1042.

- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. 2003. A Check-list and Atlas of the Seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society.
- Harlin, M.M. & Villalard-Bohnsack, M. 2001. Seasonal dynamics and recruitment strategies of the invasive seaweed *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Narragansett Bay and Rhode Island Sound, Rhode Island, USA. *Phycologia*, 40(5): 468-474.
- Harnedy, P.A. & FitzGerald, R.J. 2011. Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids from Macroalgae. *Journal of Phycology*, 47(2): 218–232.
- Harnedy, P.A. & FitzGerald, R.J. 2013. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria* palmata. LWT Food Science and Technology, 51(1): 375-382.
- Hehemann, J.-H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M. & Michel, G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290): 908-912.
- Hellio, C., Simon-Colin, C., Clare, A.S. & Deslandes, E. 2004. Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, *Grateloupia turuturu*, inhibit settlement of *Balanus amphitrite* cyprid larvae. *Biofouling*, 20(3): 139-145.
- Hong, I.K., Jeon, H. & Lee, S.B. 2014. Comparison of red, brown and green seaweeds on enzymatic saccharification process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(5): 2687-2691.
- Huovinen, P., Gómez, I., Figueroa, F.L., Ulloa, N., Morales, V. & Lovengreen, C. 2004. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. *Botanica Marina*, 47(1)
- Huovinen, P., Matos, J., Pinto, I.S. & Figueroa, F.L. 2006. The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. Aquatic Botany, 84(4): 308-316.

L

**INRA.** 2014. Dosage du Carbone et de l'Azote Total Méthode Dumas. Disponible sur: https://www1.clermont.inra.fr/urep/docPDF/dosage\_CNS.pdf. Consulté le 6 juillet 2015.

### J

- Janiak, D.S. & Whitlatch, R.B. 2012. Epifaunal and algal assemblages associated with the native *Chondrus crispus* (Stackhouse) and the non-native *Grateloupia turuturu* (Yamada) in eastern Long Island Sound. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 413: 38-44.
- Jennings, C. & Wray, B. 2013. The Feasibility of the eradication of Grateloupia turuturu in Wales - Milford Haven survey. Marine Biodiversity Ecologist, Marine and Freshwater Ecology Group, NRW. Disponible sur: http://portal.oceannet.org/search/full/catalogue/nrw.gov.uk\_MEDIN\_2.3\_4f4c4942-4343-5764-6473-313135363336.xml. Consulté le 18 août 2015.
- Jeon, B.-H., Choi, J.-A., Kim, H.-C., Hwang, J.-H., Abou-Shanab, R.A., Dempsey, B.A., Regan, J.M. & Kim, J.R. 2013. Ultrasonic disintegration of microalgal biomass and consequent improvement of bioaccessibility/bioavailability in microbial fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1): 1-9.
- de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.B. & de Morais, R.M.S.C. 2015. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 13(5): 2967-3028.

- Jiang, T., Zhang, J. & Liang, D. 1999. Structure and function of chromophores in Rphycoerythrin at 1.9 Å resolution. *Proteins*, 34(2): 224-231.
- Jiang, Z., Chen, Y., Yao, F., Chen, W., Zhong, S., Zheng, F. & Shi, G. 2013. Antioxidant, Antibacterial and Antischistosomal Activities of Extracts from *Grateloupia livida* (Harv). Yamada. *PLoS ONE*, 8(11): e80413.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. & Ewart, H.S. 2011. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar Drugs*, 9(2): 196-223.
- John, D.M. 2004. A Taxonomic and Geographical Catalogue of the Seaweeds of the Western Coast of Africa and Adjacent Islands. 156 p. J. Cramer.
- **Jones, D.B.** 1931. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. 24 p. U.S. Dept. of Agriculture.
- Joubert, Y. & Fleurence, J. 2008. Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 20(1): 55-61.
- Jung, K.A., Lim, S.-R., Kim, Y. & Park, J.M. 2013. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*, 135: 182-190.

#### Κ

- Kadam, S.U., Tiwari, B.K. & O'Donnell, C.P. 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20): 4667-4675.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K. & O'Donnell, C.P. 2015a. Effect of ultrasound pre-treatment on the drying kinetics of brown seaweed Ascophyllum nodosum. Ultrasonics Sonochemistry, 23: 302-307.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Smyth, T.J. & O'Donnell, C.P. 2015b. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23: 308-316.
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F. & Clamp, J.R. 1975. Characterization by gasliquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*, 151(3): 491-495.
- Karray, R., Hamza, M. & Sayadi, S. 2015. Evaluation of ultrasonic, acid, thermo-alkaline and enzymatic pre-treatments on anaerobic digestion of *Ulva rigida* for biogas production. *Bioresource Technology*, 187: 205-213.
- Kechaou, E.S., Bergé, J.-P., Jaouen, P. & Amar, R.B. 2015. Optimization of Common Cuttlefish (Sepia officinalis) Protein Hydrolysate Using Pepsin by Response Surface Methodology. Journal of Aquatic Food Product Technology, 24(3): 270-282.
- **Kendel, M.** 2012. Lipides de l'algue rouge comestible Grateloupia turuturu et recherche de composés originaux, et à potentialités de valorisation en santé et nutrition. Université de Nantes, 162 p.
- Kendel, M., Barnathan, G., Fleurence, J., Rabesaotra, V. & Wielgosz-Collin, G. 2013a. Nonmethylene Interrupted and Hydroxy Fatty Acids in Polar Lipids of the Alga *Grateloupia turuturu* Over the Four Seasons. *Lipids*, 48(5): 535-545.
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G. & Wielgosz-Collin,
  G. 2013b. Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga Grateloupia turuturu. Journal of Applied Phycology, 25(2): 425-432.

- Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, D.M., Critchley, A.T., Craigie, J.S., Norrie, J. & Prithiviraj, B. 2009. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4): 386-399.
- Kim, C., Kim, Y.S., Choi, H.G. & Nam, K.W. 2014. New records of three endophytic green algae from *Grateloupia* spp. (Rhodophyta) in Korea. *Algae*, 29(2): 127-136.
- **Kim, K.Y., Nam, K.A., Kurihara, H. & Kim, S.M.** 2008. Potent α-glucosidase inhibitors purified from the red alga Grateloupia elliptica. *Phytochemistry*, 69(16): 2820-2825.
- Kim, S.M., Jung, Y.-J., Kwon, O.-N., Cha, K.H., Um, B.-H., Chung, D. & Pan, C.-H. 2012. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga Phaeodactylum tricornutum. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166(7): 1843-1855.
- Kılınç, B., Cirik, S., Turan, G., Tekogul, H. & Koru, E. 2013. Seaweeds for Food and Industrial Applications. *In* I. Muzzalupo, éd. *Food Industry*, p.735-748. InTech.
- 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. *Journal of Chromatography A*, 1217(51): 7956-7965.
- Kloareg, B. & Quatrano, R.S. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*,
- Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S., Song, H. & Xia, C. 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 51(9): 2006-2013.
- Kornprobst, J.-M. 2005. Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. 1830 p. Tec & Doc
- Korzen, L., Pulidindi, I.N., Israel, A., Abelson, A. & Gedanken, A. 2015. Single step production of bioethanol from the seaweed *Ulva rigida* using sonication. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5(21): 16223-16229.
- Kozhenkova, S.I. 2009. Retrospective analysis of the marine flora of Vostok Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 35(4): 263-278.
- **Kraan, S.** 2012. Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook. *In* C.-F. Chang, éd. *Carbohydrates Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.* p.489-532. InTech.
- Kraan, S. 2013. 6 Pigments and minor compounds in algae. In H. Domínguez, éd. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.205-251. Woodhead Publishing.
- Kravchenko, A.O., Belous, O.S., Glazunov, V.P. & Ermak, I.M. 2013. Comprehensive study of phycobiliproteins and sulfated polysaccharides from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Chemistry of Natural Compounds.*, 49(2): 201-205.
- Kulshreshtha, G., Burlot, A.-S., Marty, C., Critchley, A., Hafting, J., Bedoux, G., Bourgougnon, N. & Prithiviraj, B. 2015. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and Its Effect on *Herpes simplex* Virus (HSV-1). *Marine Drugs*, 13(1): 558-580.
- Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C.R.K. & Jha, B. 2013. 3 Algal lipids, fatty acids and sterols. In
  H. Domínguez, éd. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.87-134. Woodhead Publishing.

- Kumar, S., Gupta, R., Kumar, G., Sahoo, D. & Kuhad, R.C. 2013. Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. *Bioresource Technology*, 135: 150-156.
- **Kurd, F. & Samavati, V.** 2015. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74: 498-506.
- Kwiatkowska, B., Bennett, J., Akunna, J., Walker, G.M. & Bremner, D.H. 2011. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, 29(6): 768-780.

#### L

- Lafontaine, Mussio & Rusig. 2011. Production and regeneration of protoplasts from *Grateloupia turuturu* Yamada (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 23: 17-24.
- Lahaye, M. 1991. Marine algae as sources of fibres: Determination of soluble and insoluble dietary fibre contents in some 'sea vegetables'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4): 587-594.
- **Lahaye, M. & Vigouroux, J.** 1992. Liquefaction of dulse (*Palmaria palmata* (L.) Kuntze) by a commercial enzyme preparation and a purified endo ,β-1,4-D-xylanase. *Journal of Applied Phycology*, 4(4): 329-337.
- Lawrenz, E., Fedewa, E.J. & Richardson, T.L. 2011. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology*, 23(5): 865-871.
- Leaes, E.X., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A.P., Dal Prá, V., Bassaco, M.M., Terra, L.M. & Mazutti, M.A. 2013a. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of αamylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(1): 21-25.
- Leaes, E.X., Zimmermann, E., Souza, M., Ramon, A.P., Mezadri, E.T., Dal Prá, V., Terra, L.M. & Mazutti, M.A. 2013b. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of cassava waste to obtain fermentable sugars. *Biosystems Engineering*, 115(1): 1-6.
- Le Bras, Q., Lesueur, M., Lucas, S. & Gouin, S. 2015a. Étude du marché français des algues alimentaires. Panorama de la distribution en magasins. Programme IDEALG Phase 2. Disponible sur: http://halieutique.agrocampus-ouest.fr/pdf/4662.pdf. Consulté le 16 août 2015.
- Le Bras, Q., Ritter, L., Fasquel, D., Lesueur, M., Lucas, S. & Gouin, S. 2015b. Étude du marché français des algues alimentaires. Catalogue et analyse des produits existants. *Programme IDEALG Phase 2.* Disponible sur: http://halieutique.agrocampus-ouest.fr/pdf/4661.pdf. Consulté le 16 août 2015.
- Lee, O.-H., Yoon, K.-Y., Kim, K.-J., You, S. & Lee, B.-Y. 2011. Seaweed Extracts as a Potential Tool for the Attenuation of Oxidative Damage in Obesity-Related Pathologies1. *Journal of Phycology*, 47(3): 548–556.
- Lee, S.-H., Kang, M.-C., Moon, S.-H., Jeon, B.-T. & Jeon, Y.-J. 2013. Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. *Algae*, 28(4): 371-378.
- Levêque, J.M., Duclaux, L., Fontvieille, D., Gondrexon, N., Vibert, R. & Perrier, A. 2014. Low frequency ultrasonic device Sonitube: A possible gate to pilot and industrial scale applications. Paper presented at 3<sup>rd</sup> International Conference on Fundamental and Applied Sciences (ICFAS 2014): Innovative Research in Applied Sciences for a Sustainable Future, 24 octobre 2014. Disponible sur: http://scitation.aip.org/content/aip/proceeding/aipcp/10.1063/1.4898474. Consulté le 25 août 2015.

- Liao, N., Zhong, J., Ye, X., Lu, S., Wang, W., Zhang, R., Xu, J., Chen, S. & Liu, D. 2015. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Corbicula fluminea*: Characterization and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2, Part 2): 1113-1121.
- Liu, L.-N., Chen, X.-L., Zhang, X.-Y., Zhang, Y.-Z. & Zhou, B.-C. 2005. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata. Journal of Biotechnology*, 116(1): 91-100.
- Liu, L.-N., Su, H.-N., Yan, S.-G., Shao, S.-M., Xie, B.-B., Chen, X.-L., Zhang, X.-Y., Zhou, B.-C. & Zhang, Y.-Z. 2009. Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: Investigations of active conformational and functional variation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*, 1787(7): 939-946.
- Liu, Y., Gong, G., Zhang, J., Jia, S., Li, F., Wang, Y. & Wu, S. 2014. Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. *Carbohydr Polym*, 110: 278-284.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. 366 p. New York, Cambridge University Press.
- Lorimer, J.P., Mason, T.J., Cuthbert, T.C. & Brookfield, E.A. 1995. Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1): S55-S59.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, L.O. da S. & Marquez, U.M.L. 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 50(3): 233–241.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Marquez, U.M.L. & Aidar, E. 1998. Distribution of Intracellular Nitrogen in Marine Microalgae: Basis for the Calculation of Specific Nitrogen-to-Protein Conversion Factors. *Journal of Phycology*, 34(5): 798-811.
- Lozano, I., Wacyk, J.M., Carrasco, J. & Martín, M.A.C.-S. 2015. Red macroalgae *Pyropia columbina* and *Gracilaria chilensis*: sustainable feed additive in the *Salmo salar* diet and the evaluation of potential antiviral activity against infectious salmon anemia virus. *Journal of Applied Phycology*, 1-9.
- Ludwig, M., Enzenhofer, E., Schneider, S., Rauch, M., Bodenteich, A., Neumann, K., Prieschl-Grassauer, E., Grassauer, A., Lion, T. & Mueller, C.A. 2013. Efficacy of a Carrageenan nasal spray in patients with common cold: a randomized controlled trial. *Respiratory Research*, 14(1): 124.
- Lunelli, F.C., Sfalcin, P., Souza, M., Zimmermann, E., Dal Prá, V., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Kuhn, R.C. & Mazutti, M.A. 2014. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars. *Biosystems Engineering*, 124: 24-28.

#### Μ

- Mabeau, S. & Fleurence, J. 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4(4): 103-107.
- Mæhre, H.K., Malde, M.K., Eilertsen, K.-E. & Elvevoll, E.O. 2014. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15): 3281-3290.
- Manikandan, S., Ganesapand, S., Singh, M., Sangeetha, N. & Kumaraguru, A.K. 2011. Antimicrobial Activity of Seaweeds Against Multi Drug Resistant Strains. *International Journal of Pharmacology*, 7(4): 522-526.

- Maran, J.P., Priya, B. & Nivetha, C.V. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from *Bougainvillea glabra* flowers. *Industrial Crops and Products*, 63: 182-189.
- Marfaing, H. & Lerat, Y. 2007. Les algues ont-elles une place en nutrition? *Phytothérapie*, 5(1): 2-5.
- Marrion, O., Fleurence, J., Schwertz, A., Guéant, J.-L., Mamelouk, L., Ksouri, J. & Villaume,
  C. 2005. Evaluation of protein in vitro digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria verrucosa*. J Appl Phycol, 17(2): 99-102.
- Marrion, O., Schwertz, A., Fleurence, J., Guéant, J.L. & Villaume, C. 2003. Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. *Food / Nahrung*, 47(5): 339–344.
- Marston, M. & Villalard-Bohnsack, M. 2002. Genetic Variability and Potential Sources of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an Invasive Species in Rhode Island Waters (USA). *Journal of Phycology*, 38(4): 649-658.
- Martin, M., Portetelle, D., Michel, G. & Vandenbol, M. 2014. Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(7): 2917-2935.
- Mason, T.J. 1992. Industrial sonochemistry: potential and practicality. *Ultrasonics*, 30(3): 192-196.
- Mason, T.J., Chemat, F. & Vinatoru, M. 2011. The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2): 237-247.
- Mason, T.J. & Lorimer, J.P. 2002a. Introduction to Applied Ultrasonics. In Applied Sonochemistry, p.1-24. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mason, T.J. & Lorimer, J.P. 2002b. Ultrasonic Equipment and Chemical Reactor Design. In Applied Sonochemistry, p.267-293. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mathieson, Dawes, Pederson, Gladych & Carlton. 2008. The Asian red seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta) invades the Gulf of Maine. *Biological Invasions*, 10(7): 985-988
- McHugh, D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. Rome, Food and Agriculture Organization of the united states. Disponible sur: http://www.fao.org/3/a-y4765e/index.html. Consulté le 8 août 2015.
- Meireles, M.A.A. 2013. 17 Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive components from algae. In
  H. Domínguez, éd. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.561-584. Woodhead Publishing.
- Mensi, F., Ksouri, J., Seale, E., Romdhane, M. & Fleurence, J. 2012. A statistical approach for optimization of R-phycoerythrin extraction from the red algae *Gracilaria verrucosa* by enzymatic hydrolysis using central composite design and desirability function. *Journal of Applied Phycology*, 24(4): 915-926.
- Michalak, I. & Chojnacka, K. 2014. Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 14(6): 581-591.
- Michalak, I. & Chojnacka, K. 2015. Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2): 160-176.
- Miller, I.J. 2005. The structure of polysaccharides from selected New Zealand species of *Grateloupia. Bot. Marina*, 48(2): 157-166.
- **Minard, F.** 2005. Procédé de photo-stabilisation de phycobiliprotéines dans un extrait aqueux, compositions contenant des phycobiliprotéines stabilisées et utilisation de phycobiliprotéines stabilisées (WO2005065697 A1)

- Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. 2015. Territoires « zéro déchet zéro gaspillage ». Disponible sur: http://www.developpementdurable.gouv.fr/Territoires-zero-dechets-zero. Consulté le 20 août 2015.
- Montreuil, J., Bouquelet, S. & Debray, H. 1986. Glycoproteins. In Carbohydrate analysis: a practical approach, p.228. Oxford, IRL Press.
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P. & Kalil, S.J. 2011. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1): 45-49.
- **Morais, S.** 2013. 18 Ultrasonic- and microwave-assisted extraction and modification of algal components. *In* H. Domínguez, éd. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.585-605. Woodhead Publishing.
- Moscon, J.M., Priamo, W.L., Bilibio, D., Silva, J.R.F., Souza, M., Lunelli, F., Foletto, E.L., Kuhn, R.C., Cancelier, A. & Mazutti, M.A. 2014. Comparison of conventional and alternative technologies for the enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4): 149-154.
- Mouranche, A. & Costes, C. 1985. *Hydrolases et dépolymérases enzymes d'intérêt industriel*. Paris, Gauthier-Villars.
- Mulvaney, W.J., Winberg, P.C. & Adams, L. 2013. Comparison of macroalgal (*Ulva* and *Grateloupia* spp.) and formulated terrestrial feed on the growth and condition of juvenile abalone. *J. Appl. Phycol.*, 25(3): 815-824.
- **Munier, M.** 2013. Étude du polymorphisme pigmentaire de l'algue rouge Grateloupia turuturu au travers de la purification et de la caractérisation de la *R*-Phycoérythrine en vue d'une valorisation industrielle. Université de Nantes, 229 p.
- Munier, M., Dumay, J., Morançais, M., Jaouen, P. & Fleurence, J. 2013. Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): The Influence of Storage Method on the Extraction of the Seaweed Pigment R-Phycoerythrin. *Journal of Chemistry*, 2013: 1-8.
- Munier, M., Jubeau, S., Wijaya, A., Morançais, M., Dumay, J., Marchal, L., Jaouen, P. & Fleurence, J. 2014. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 150: 400-407.
- Munier, M., Morançais, M., Dumay, J., Jaouen, P. & Fleurence, J. 2015. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Chromatography B*, 992: 23-29.

Ν

- Narukawa, T., Hioki, A. & Chiba, K. 2012. Aqueous Extraction of Water-soluble Inorganic Arsenic in Marine Algae for Speciation Analysis. *Analytical Sciences*, 28(8): 773-779.
- Navarro, A., Bañon, S., Olmos, E. & Sánchez-Blanco, M.J. 2007. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science*, 172(3): 473-480.
- Nelson, W.A. 2013. New Zealand seaweeds: an illustrated guide. 312 p. Wellington, NZ, Te Papa Press.
- Niu, J., Xu, M., Wang, G., Zhang, K. & Peng, G. 2013. Comprehensive Extraction of Agar and R-Phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* (Bangiales, Rhodophyta). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42(1): 21-28.

**Norziah, M.H. & Ching, C.Y.** 2000. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry*, 68(1): 69-76.

## 0

- **O'Donnell, C.P., Tiwari, B.K., Bourke, P. & Cullen, P.J.** 2010. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7): 358-367.
- Ogawa, H., Mizuno, H., Saito, T., Yamada, Y., Oohusa, T. & Iso, N. 1991. Effects of pH on the Conformation of Phycoerythrin from Nori *Porphyra* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(5): 899-903.
- Orta-Ramirez, A., Merrill, J. e. & Smith, D. m. 2000. pH Affects the Thermal Inactivation Parameters of R-Phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*. *Journal of Food Science*, 65(6): 1046–1050.
- Özbek, B. & Ülgen, K.Ö. 2000. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry*, 35(9): 1037-1043.

#### Ρ

- Peinado, I., Girón, J., Koutsidis, G. & Ames, J.M. 2014. Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Research International*, 66: 36-44.
- Peña-Farfal, C., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P., Pinochet-Cancino, H. & Gregori-Henríquez, I. de. 2005. Speeding up enzymatic hydrolysis procedures for the multi-element determination in edible seaweed. *Analytica Chimica Acta*, 548(1–2): 183-191.
- Pérez, R. 1997. Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. 272 p. Plouzané : IFREMER, Quae.
- Petit, A.-C. 2005. Modifications d'un exopolysaccharide biosynthétisé par une bactérie issue des écosystèmes hydrothermaux profonds. Université de Rennes 1, 196 p.
- Petit, A.-C., Noiret, N., Guezennec, J., Gondrexon, N. & Colliec-Jouault, S. 2007. Ultrasonic depolymerization of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Ultrason Sonochem*, 14(2): 107-112.
- Pétrier, C., Gondrexon, N. & Boldo, P. 2008. Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur. Sciences fondamentales*, AFP4(AF6310): 15.
- **Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Bourvellec, C.L., Renard, C.M.G.C. & Chemat, F.** 2012. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1): 73-81.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S. & Chemat, F. 2013. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2): 593-606.
- **Plouguerné, E.** 2006. Étude écologique et chimique de deux algues introduites sur les côtes bretonnes, Grateloupia turuturu Yamada et Sargassum muticum (Yendo) Fensholt : nouvelles ressources biologiques de composés à activité antifouling. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 251 p.
- Plouguerné, E., Hellio, C., Deslandes, E., Véron, B. & Stiger-Pouvreau, V. 2008. Antimicrofouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*: Botanica Marina. *Botanica Marina*, 51: 202-208.

- Plouguerné, E., Kikuchi, H., Oshima, Y., Deslandes, E. & Stiger-Pouvreau, V. 2006. Isolation of Cholest-5-en-3-ol formate from the red alga *Grateloupia turuturu* Yamada and its chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(9): 714-717.
- Prajapati, V.D., Maheriya, P.M., Jani, G.K. & Solanki, H.K. 2014. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 105: 97-112.
- Programme Breizh'alg. 2012. Etude de marché et d'opprotunité économique relative au secteur de l'algue alimentaire en France, en Europe et à l'international. BDI - Bretagne Développement Innovation. Disponible sur: http://www.bdi.fr/sites/default/files/ressource/etude\_de\_marche\_document\_de\_synthese\_ vff.pdf. Consulté le 16 août 2015.

## Q

Quemener, B., Lahaye, M. & Metro, F. 1995. Assessment of methanolysis for the determination of composite sugars of gelling carrageenans and agarose by HPLC. *Carbohydrate Research*, 266(1): 53-64.

#### R

- Rehman, M.S.U., Kim, I., Chisti, Y. & Han, J.-I. 2013. Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Energy, Education, Science and Technology*, 30(2): 1391-1410.
- **de Reviers, B.** 2015. Qu'est-ce-qu'une algue? Disponible sur: https://sites.google.com/site/francephycologie/accueil. Consulté le 8 août 2015.
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T. & Meyer, A.S. 2015. Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies. *Marine Drugs*, 13(6): 3340-3359.
- Rocha de Souza, M.C., Marques, C.T., Guerra Dore, C.M., Ferreira da Silva, F.R., Oliveira Rocha, H.A. & Leite, E.L. 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 19(2): 153-160.
- Rodrigues, D., Freitas, A.C., Pereira, L., Rocha-Santos, T.A.P., Vasconcelos, M.W., Roriz, M., Rodriguez-Alcala, L.M., Gomes, A.M.P. & Duarte, A.C. 2015a. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry*, 183: 197-207.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Silva, A., Amorim, M., Pereira, L., Rocha-Santos, T.A.P., Gomes, A.M.P., Duarte, A.C. & Freitas, A.C. 2015b. Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of portugal. *J. Agric. Food Chem.*, 63(12): 3177-3188.
- **Romarís-Hortas, V., Bermejo-Barrera, P. & Moreda-Piñeiro, A.** 2013. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for iodinated amino acid extraction from edible seaweed before reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasmamass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1309: 33-40.
- Roselló-Soto, E., Galanakis, C.M., Brnčić, M., Orlien, V., Trujillo, F.J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B.K. & Barba, F.J. 2015. Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science & Technology*,
- Rossano, R., Ungaro, N., D'Ambrosio, A., Liuzzi, G.. & Riccio, P. 2003. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae </i>Corallina elongata</i> Ellis & Solander. *Journal of Biotechnology*, 101(3): 289-293.

- Samarakoon, K. & Jeon, Y.-J. 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae A review. Food Research International, 48(2): 948-960.
- Sánchez-Camargo, A. del P., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M. & Ibáñez, E. 2016. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, 192: 67-74.
- Saunders, G.W. & Withall, R.D. 2006. Collections of the invasive species *Grateloupia turuturu* (Halymeniales, Rhodophyta) from Tasmania, Australia. *Phycologia*, 45(6): 711-714.
- Schmid, D., Schürch, C. & Zülli, F. 2004. UV-A sunscreen from red algae for protection against premature skin aging. *Personal Care*, 29-31.
- Schmid, M., Guihéneuf, F. & Stengel, D.B. 2014. Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. *Journal of Applied Phycology*, 26(1): 451-463.
- Sekar, S. & Chandramohan, M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2): 113-136.
- Sen, A.K., Das, A.K., Banerji, N., Siddhanta, A.K., Mody, K.H., Ramavat, B.K., Chauhan, V.D., Vedasiromoni, J.R. & Ganguly, D.K. 1994. A new sulfated polysaccharide with potent blood anti-coagulant activity from the red seaweed Grateloupia indica. International Journal of Biological Macromolecules, 16(5): 279-280.
- Sen, A.K., Das, A.K., Sarkar, K.K., Siddhanta, A.K., Takano, R., Kamei, K. & Hara, S. 2002. An Agaroid-Carrageenan Hybrid Type Backbone Structure for the Antithrombotic Sulfated Polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). *Botanica Marina*, 45(4)
- Senthilkumar, N., Suresh, V., Thangam, R., Kurinjimalar, C., Kavitha, G., Murugan, P., Kannan, S. & Rengasamy, R. 2013. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55: 150-160.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H. & Gogate, P.R. 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53: 10-23.
- Simon, C., Ar Gall, E. & Deslandes, E. 2001. Expansion of the red alga *Grateloupia doryphora* along the coasts of Brittany (France). *Hydrobiologia*, 443(1-3): 23-29.
- Simon-Colin, C. 2001. Applications de la résonance magnétique nucléaire à l'étude des solutés organiques majeurs potentiellement impliqués dans l'ajustement osmotique chez l'algue rouge invasive Grateloupia doryphora (Montagne) Howe. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 141 p.
- Simon-Colin, C., Kervarec, N., Pichon, R., Bessières, M.-A. & Deslandes, E. 2002. Characterization of N-methyl-L-methionine sulfoxide and isethionic acid from the red alga *Grateloupia doryphora. Phycological Research*, 50(2): 125-128.
- Sine, J.-P. 2010. Enzymologie et applications. Paris, Ellipses.
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S. & Moustaid-Moussa, N. 2012. Chapter 13 Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid. In S.-K. Kim, éd. Advances in Food and Nutrition Research, Marine Medicinal Foods Implications and Applications - Animals and Microbes.p.211-222. Academic Press.

- Sonani, R.R., Madamwar, R.P.R. and D. & Rastogi, R.P. 2015. Antioxidant Potential of Phycobiliproteins: Role in Anti-Aging Research. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 4(2): 172.
- Sonani, R.R., Singh, N.K., Kumar, J., Thakar, D. & Madamwar, D. 2014. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochemistry*, 49(10): 1757-1766.
- Sørensen, H.R., Pedersen, S. & Meyer, A.S. 2007. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 908-918.
- Sørensen, H.R., Pedersen, S., Viksø-Nielsen, A. & Meyer, A.S. 2005. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5–6): 773-784.
- Souza, M., Mezadri, E.T., Zimmerman, E., Leaes, E.X., Bassaco, M.M., Dal Prá, V., Foletto, E., Cancellier, A., Terra, L.M., Jahn, S.L. & Mazutti, M.A. 2013. Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1): 89-94.
- **Stassi, F.** 2015. Nutrition animale : Olmix croit aux algues pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. Disponible sur: http://www.usinenouvelle.com/article/nutrition-animaleolmix-croit-aux-algues-pour-lutter-contre-la-resistance-aux-antibiotiques.N350146. Consulté le 25 septembre 2015.
- Stiger-Pouvreau, V. & Pagny, J. 2008. La grateloupe (*Grateloupia turuturu*) Flore marine -Faune et flore marines - espèces invasives - Biodiversité Bretagne. Disponible sur: http://www.observatoire-biodiversite-bretagne.fr/especes-invasives/Faune-et-floremarines/Flore-marine/La-grateloupe-Grateloupia-turuturu. Consulté le 10 février 2013.
- Stiger-Pouvreau, V. & Thouzeau, G. 2015. Marine Species Introduced on the French Channel-Atlantic Coasts: A Review of Main Biological Invasions and Impacts. Open Journal of Ecology, 5(5): 227-257.
- Subhedar, P.R.G.P.B. & Gogate, P.R. 2013. Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose Using Ultrasound for Efficient Bioethanol Production: A Review. *Industrial & amp; Engineering Chemistry Research*, 52(34): 11816-11828.
- Sudhakar, M.P., Jagatheesan, A., Perumal, K. & Arunkumar, K. 2015. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. *Algal Research*, 8: 115-120.
- Sudhakar, M.P., Saraswathi, M. & Nair, B.. 2014. Extraction, purification and application study of R-phycoerythrin from *Gracilaria corticata* (J.Agardh) J.Agardh var. corticata. *Indian Journal of Natural products and resources*, 5(4): 371-374.
- Sulaiman, A.Z.B., Ajit, A., Yunus, R.B.M. & Chisti, Y. 2010. Effects of ultrasound on enzymatic hydrolysis of soluble cellulose. *Journal of Biotechnology*, 150, Supplement: 135.
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., Zhao, M., Fu, X. & Wang, L. 2009. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64(2): 146-154.
- Swanson, D., Block, R. & Mousa, S.A. 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition*, 3(1): 1-7.
- Szabó, O.E. & Csiszár, E. 2013. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 98(2): 1483-1489.

- Tan, I.S. & Lee, K.T. 2014. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study. *Energy*, 78: 53-62.
- Tao, Y., Zhang, Z. & Sun, D.-W. 2014. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4): 1461-1469.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L. & Mason, T.J. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2): 137-142.

#### U

- **Usov, A.I.** 2011. Chapter 4 Polysaccharides of the red algae. *In* D. Horton, éd. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, p.115-217. Academic Press.
- **Usov, A.I. & Zelinsky, N.D.** 2013. 2 Chemical structures of algal polysaccharides. *In* H. Domínguez, éd. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.23-86. Woodhead Publishing.

#### V

- Vanegas, C., Hernon, A. & Bartlett, J. 2014. Influence of Chemical, Mechanical, and Thermal Pretreatment on the Release of Macromolecules from Two Irish Seaweed Species. *Separation Science and Technology*, 49(1): 30-38.
- Van Patten, P. 2006. Beware the Red Menace: *Grateloupia turuturu* invades Long Island Sound. *Wrack Line Magazine*, 6(2): 7-10.
- **van de Velde, F., Antipova, A.S., Rollema, H.S., Burova, T.V., Grinberg, N.V., Pereira, L., Gilsenan, P.M., Tromp, R.H., Rudolph, B. & Grinberg, V.Y.** 2005. The structure of κ/ιhybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. *Carbohydrate Research*, 340(6): 1113-1129.
- Venegas-Sanchez, J.A., Motohiro, T. & Takaomi, K. 2013. Ultrasound effect used as external stimulus for viscosity change of aqueous carrageenans. Ultrasonics Sonochemistry, 20(4): 1081-1091.
- Verlaque, M., Brannock, P.M., Komatsu, T., Villalard-Bohnsack, M. & Marston, M. 2005. The genus *Grateloupia* C. Agardh (Halymeniaceae, Rhodophyta) in the Thau Lagoon (France, Mediterranean): a case study of marine plurispecific introductions. 44(5): 477-496.
- Viard, F. 2014. Les macro-algues marines non-indigènes : qu'avons-nous appris par l'étude de leur diversité génétique ? Colloque annuel de la Société Phycologique de France, Paris
- Villalard-Bohnsack, M. & Harlin, M.M. 2001. *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Rhode Island waters (USA): geographical expansion, morphological variations and associated algae. *Phycologia*, 40(4): 372-380.
- Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D. & Mason, T.J. 1997. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2): 135-139.
- Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.C.G. & Chemat, F. 2010. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6): 1066-1074.

- Wang, F., Guo, X.-Y., Zhang, D.-N., Wu, Y., Wu, T. & Chen, Z.-G. 2015a. Ultrasound-assisted extraction and purification of taurine from the red algae *Porphyra yezoensis*. Ultrasonics Sonochemistry, 24: 36-42.
- Wang, G., Chunmei, J., Wang, S., Wei, X. & Zhao, F. 2012a. Early development of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(2): 264-268.
- Wang, G., Zhou, B. & Zeng, C. 1998. Isolation, properties and spatial site analysis of gamma subunits of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin. *Science in China, C, Life Sciences*, 41(1): 9-17.
- Wang, H.-M.D., Chen, C.-C., Huynh, P. & Chang, J.-S. 2015b. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184: 355-362.
- Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C. & Mo, Y. 2011. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(2): 534-540.
- Wang, L., Wang, S., Fu, X. & Sun, L. 2015c. Characteristics of an R-Phycoerythrin with Two y Subunits Prepared from Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PLoS ONE*, 10(3): 15.
- Wang, L. & Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6): 300-312.
- Wang, P., Zhao, X., Lv, Y., Li, M., Liu, X., Li, G. & Yu, G. 2012b. Structural and compositional characteristics of hybrid carrageenans from red algae *Chondracanthus chamissoi*. *Carbohydrate Polymers*, 89(3): 914-919.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Hreggvidsson, G.O., Jónsson, J.Ó., Thorkelsson, G. & Ólafsdóttir, G. 2010. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. LWT - Food Science and Technology, 43(9): 1387-1393.
- Wijesinghe, W.A.J.P. & Jeon, Y.-J. 2012. Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83(1): 6-12.
- Wijesinghe, W.A.J.P. & Jeon, Y.J. 2013. 15 Enzymatic extraction of bioactives from algae. *In* H. Domínguez, éd. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.p.517-533. Woodhead Publishing.
- **Wong, K.H. & Cheung, P.C.K.** 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: Part I proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 71(4): 475-482.
- Woods, L., Riccobono, M., Mehan, N., Hestekin, J. & Beitle, R. 2011. Synergistic Effect of Abrasive and Sonication for Release of Carbohydrate and Protein from Algae. *Separation Science and Technology*, 46(4): 601-604.
- Wu, H., Zhu, J., Diao, W. & Wang, C. 2014. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*). Carbohydrate Polymers, 113: 314-324.
- **Wu, S.-J.** 2012. Degradation of  $\kappa$ -carrageenan by hydrolysis with commercial α-amylase. *Carbohydrate Polymers*, 89(2): 394-396.

Xu, J. & Gao, K. 2008. Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. *Journal of Applied Phycology*, 20(5): 681-686.

#### Υ

- Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T. & Lambert, A. 2009. Acceleration of the Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover and Sugar Cane Bagasse Celluloses by Low Intensity Uniform Ultrasound. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(1): 25-31.
- Yamada, Y. 1941. Notes on Some Japanese Algae IX. Scientific papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, 2(2): 195-215.
- Yang, B., Yu, G., Zhao, X., Ren, W., Jiao, G., Fang, L., Wang, Y., Du, G., Tiller, C., Girouard, G., Barrow, C.J., Ewart, H.S. & Zhang, J. 2011. Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis*. *Food Chemistry*, 124(1): 50-57.
- Yang, J.-L., Liu, L.-L., Wang, B.-G. & Shi, Y.-P. 2010. Secondary metabolites from *Grateloupia turuturu* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4): 850-852.
- Yuan, Y.V., Westcott, N.D., Hu, C. & Kitts, D.D. 2009. Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chemistry*, 112(2): 321-328.

#### Ζ

- Zhang, M., Zhang, L., Cheung, P.C.K. & Ooi, V.E.C. 2004. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, 56(2): 123-128.
- Zhang, Q., Zhou, M.-M., Chen, P.-L., Cao, Y.-Y. & Tan, X.-L. 2011. Optimization of Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis for the Extraction of Luteolin and Apigenin from Celery. *Journal of Food Science*, 76(5): C680–C685.
- Zhao, G., Chen, X., Wang, L., Zhou, S., Feng, H., Chen, W.N. & Lau, R. 2013. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 128: 337-344.
- **Zhou, C. & Ma, H.** 2006. Ultrasonic degradation of polysaccharide from a red algae (*Porphyra yezoensis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(6): 2223-2228.
- **Zhou, C., Wang, Y., Ma, H. & He, R.** 2008. Effect of Ultrasonic Degradation on In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Food Science and Technology International*, 14(6): 479-486.
- Zhou, C., Yu, X., Zhang, Y., He, R. & Ma, H. 2012. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Udea. *Carbohydrate Polymers*, 87(3): 2046-2051.

## Glossaire

## \_\_\_A

**Anti-biofouling** (p.44) : revêtement, peinture, traitement de surface ou dispositif utilisé sur un navire pour contrôler ou empêcher le dépôt d'organismes indésirables (bactéries, champignons, microalgues), ou anti-biosalissures

## \_**B**

**Benthique** (p.15) : ensemble des êtres, fixes ou mobiles, pouvant vivre et se développer sur les substrats durs ou meubles des fonds des mers et des nappes d'eau douce

## \_\_\_C

**Chloroplaste** (p.23) : organite cellulaire spécifique aux végétaux, il est impliqué dans la photosynthèse

Crampon (p.36) : organe de fixation présent chez certaines macroalgues

## \_\_\_\_E

Épiphyte (p.46) : organisme animal ou végétal fixé, vivant sur une algue ou sur une plante

Espèces cryptiques (p.36) : espèces non distinguables d'un point de vue morphologique

**Eucaryotes** (p.7) : regroupent tous les organismes, unicellulaires ou pluricellulaires, dont les cellules se caractérisent par la présence d'un noyau et de mithochondries

## \_\_\_\_F

Fucoïdanes (p.69) : polysaccharides sulfatés des macroalgues brunes

## \_\_\_\_I

**Isoflavones** (p.49) : molécules présentes chez toutes les plantes, elles constituent une sous-famille des flavonoïdes qui est très étudiée pour leurs propriétés pseudo-œstogéniques (phytohormones)

## \_\_\_M

**MAAs** (p.44) : mycosporine like amino acids, petites molécules (Mw < 400 g.mol<sup>-1</sup>) présentes chez divers organismes, elles ont un rôle de protection contre les UV et un rôle d'antioxydant

## \_\_\_P

**Pigments accessoires** (p.24) : pigments qui ne sont pas capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique

## Phlorotannins (p.69) : composés phénoliques des macroalgues brunes

**Phycocolloïdes** (p.10) : macromolécules hydrosolubles extraites des algues, en solution aqueuse elles modifient les propriétés rhéologiques du produit dans lequel elles sont ajoutées (épaississant, gélifiant, stabilisant, *etc.*)

**Protoplaste** (p.56) : cellule végétale ou bactérienne dont la paroi a disparu, le protoplaste est alors limité par sa seule membrane plasmique. Ils sont obtenus principalement par digestion enzymatique

## \_\_\_\_R

**ROS** (p.33) : les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) sont des espèces radicalaires telles que des radicaux peroxydes (ROO<sup>•</sup>), anion superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ) et le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>)

## \_\_\_S

**Saccharification** (p.62) : transformation de polysaccharides tels que la cellulose ou l'amidon en sucres plus simples comme le glucose

Stipe (p.36) : partie du thalle située entre le crampon et la lame

**Symbiose** (p.58) : association spécifique entre deux organismes ne pouvant vivre l'un sans l'autre, chacun d'eux tirant un bénéfice de cette association

## \_\_\_\_Т

**Thalle** (p.15) : tissu végétal composé de cellules non différenciées, dépourvu d'appareil vasculaire où l'on ne reconnaît ni feuilles, ni tiges, ni racines. Il constitue l'appareil végétatif des thallophytes

**Thylakoïdes** (p.23) : système de membranes présent dans les chloroplastes et au niveau duquel sont présents les pigments impliqués dans la photosynthèse (directement ou indirectement)

## Annexes
# Annexe 1

# Soft liquefaction of the red seaweed Grateloupia turuturu Yamada by

ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process

# Journal of Applied Phycology

Le Guillard, C., Bergé, J.-P., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J.-Y., Baron, R., Fleurence, J., Dumay, J., 2016. Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. *Journal of Applied Phycology* doi: 10.1007/s10811-015-0788-x



# Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process

Cécile Le Guillard<sup>1,2</sup> · Jean-Pascal Bergé<sup>3</sup> · Claire Donnay-Moreno<sup>1</sup> · Sandrine Bruzac<sup>1</sup> · Jean-Yves Ragon<sup>1</sup> · Régis Baron<sup>1</sup> · Joël Fleurence<sup>2</sup> · Justine Dumay<sup>2</sup>

Received: 26 June 2015 / Revised and accepted: 23 December 2015 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis is a recent process, increasingly employed for plant biomass liquefaction and the recovery of soluble biomolecules. However, to our knowledge, it has never been used on seaweeds, particularly wet ones. The aim of this study was to compare the efficiency of three processes on the liquefaction of the red seaweed Grateloupia turuturu Yamada: enzyme-assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and their combination, ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH). These comparisons will allow the identification as to which process achieves the highest extraction yield of water-soluble compounds. For this purpose, experiments were conducted at 40 °C for 6 h using an enzymatic cocktail of four industrial carbohydrases and an original ultrasonic flowthrough reactor. After 6 h, similar profiles were observed between EAE and UAE with the recovery of 71-74 % of the initial material into the soluble phase. However, when these processes were combined, up to 91 % solubilized material was observed in the same time, with a synergistic effect after 2 h. From a biochemical point of view, UAEH improved the extraction of nitrogen and carbon compounds and, more precisely, carbohydrates and amino acids. This study demonstrates that ultrasound improved the enzymatic hydrolysis, probably by an increase in the mass transfer and a disruption of the thallus due to the implosion of the cavitation bubbles

Justine Dumay justine.dumay@univ-nantes.fr

<sup>3</sup> IDMer, 2 rue Batelière, 56100 Lorient, France

Published online: 07 January 2016

generated. UAEH is clearly an efficient procedure for the liquefaction of wet seaweeds, enabling the recovery of valuable components.

**Keywords** Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis · Enzymatic hydrolysis · Ultrasound · Liquefaction · Algae · *Grateloupia turuturu* 

#### Introduction

Although several seaweeds have been industrially processed for many decades for applications in agriculture, animal feed, food, cosmetics, and pharmaceuticals, many remain unexploited. This is the case for the proliferative red seaweed Grateloupia turuturu (Yamada), which was introduced on the Brittany coast in the 1970s and is now abundant on the French Atlantic coast (Munier et al. 2013; Stiger-Pouvreau and Thouzeau 2015). Red seaweeds are interesting due to their richness in a wide range of biomolecules and their worldwide distribution. Indeed, as recently demonstrated, they appear to be a promising feedstock for biorefinery (Baghel et al. 2014, 2015). This concept of biorefinery involves the development of eco-friendly processes for sequential recovery of molecules (Baghel et al. 2014). Furthermore, novel techniques have demonstrated their interest for the extraction of seaweed biomolecules. Indeed, these novel extraction technologies allow reduction in the use of organic solvents and the treatment time. They are also able to preserve the activity of target compounds and to obtain higher extraction yields with a lower cost in comparison to traditional extraction methods. Nevertheless, the main challenge in the development of novel extraction methods is their transfer to an industrial scale (Kadam et al. 2013, 2015a; Michalak and Chojnacka 2014). Currently, enzyme-assisted extraction (EAE) and ultrasound-assisted

🖄 Springer

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> IFREMER centre de Nantes BP 21105, BIORAFHE, 44311 Nantes cedex 03, France

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> LUNAM Université de Nantes, MMS, Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes cedex 03, France

extraction (UAE) are among the five novel techniques most mentioned in the literature (Kadam et al. 2013, 2015a; Michalak and Chojnacka 2014). Both processes are described as feasible and efficient alternatives to traditional extraction methods (Kadam et al. 2013) and could be transposed on a large scale (Kadam et al. 2015a). This study deals with the extraction's improvement of compounds from *G. turuturu*, among the three processes investigated here [EAE, UAE, and their combination (UAEH)].

EAE has shown its efficiency in seaweed liquefaction by increasing the digestibility of proteins and enabling the extraction of added-value components such as proteins, bioactive peptides, water-soluble pigments (R-phycoerythrin), and antioxidant compounds (Dumay et al. 2013; Fleurence et al. 1995; Wang et al. 2010; Wijesinghe and Jeon 2012). On vegetable biomass, carbohydrases are generally used, alone or in a cock-tail (Cerveró et al. 2010; Mensi et al. 2012; Sørensen et al. 2005, 2007). In fact, in spite of their different optima for pH and temperature, the use of such enzymes in combination may lead to a higher level of hydrolysis than a single enzyme, indicating a synergistic effect (Denis et al. 2009a, b; Sørensen et al. 2005, 2007).

In the last decade, UAE has been extensively studied in bioprocessing by using ultrasonic baths (Lunelli et al. 2014; Souza et al. 2013) or ultrasonic probes (Kadam et al. 2015c). However, although the use of ultrasound (US) for extracting natural products from different vegetable biomass has been validated (Mason et al. 2011; Vinatoru et al. 1997), very few studies have been conducted on seaweeds. UAE has been successfully used to improve the determination of major and trace elements in seaweed (Domínguez-González et al. 2005), to enhance the extraction of sensitive compounds from brown seaweeds (Kadam et al. 2015c), and to improve the drying process of *Ascophyllum nodosum* (Kadam et al. 2015b).

The simultaneous combination of enzymatic hydrolysis and sonication is known as ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH). This process is relatively new and has been mainly developed to convert plant biomass or waste into valuable sugars by enhancing the extraction and the hydrolysis of polysaccharides (Leaes et al. 2013; Liu et al. 2014; Lunelli et al. 2014; Wu et al. 2014). According to Lunelli et al. (2014), ultrasound irradiation is a promising technology for enzymatic hydrolysis in order to obtain sugars. They even say, as Leaes et al. (2013), that ultrasound acts as a tool for process intensification. However, the mechanism of this positive interaction is not yet well understood (Delgado-Povedano and de Castro 2015) and several parameters will be involved, such as the type of ultrasonic device, the frequency and power of the ultrasound, the sonication time, the enzyme, the enzyme-tosubstrate ratio, etc. (Delgado-Povedano and de Castro 2015; Subhedar and Gogate 2013). Nevertheless, according to several articles, it could be due to the cavitation phenomenon inducing an increase in the mass transfer, enhancing the substrate accessibility to the enzyme (Fig. 1) (Kwiatkowska et al. 2011; Lunelli et al. 2014; Mason et al. 2011). In seaweed, a study has demonstrated that the use of ultrasound energy could improve the enzymatic hydrolysis for extracting metallic elements by a 12-fold reduction of the process (Peña-Farfal et al. 2005). A recent study proposed the use of ultrasound to produce bioethanol from *Ulva rigida*, using an ultrasound-assisted saccharification and fermentation process (Korzen et al. 2015).

The aim of the present work was to study the efficiency of a UAEH system on the liquefaction of the wet red seaweed *Grateloupia turuturu* in order to intensify the extraction of seaweed biomolecules. For this purpose, an enzymatic cock-tail composed of four industrial carbohydrases developed for terrestrial biomass and an original ultrasonic flow-through reactor were used. To the best of our knowledge, this is the first time such an original approach has been proposed.

#### Materials and methods

The seaweed, Grateloupia turuturu, was harvested on 24 May 2013, in the intertidal zone of Batz-sur-Mer on the Atlantic coast, France. Epiphytes were removed by hand and algae were partially dewatered with a spin dryer, then vacuumpacked (Boulanger INV 40, France) and immediately frozen. The algae were stored at -20 °C in darkness. Four industrial carbohydrases were selected and combined according to their similar pH and temperature optima and their complementarity (Table 1). Regarding our target, all of those enzymes do not work at temperatures higher than 40 °C. The resulting enzymatic cocktail was thus composed of four enzymes: Sumizyme TG and Sumizyme MC produced by Shin Nihon Chemical (Japan) and kindly provided by Takabio (France), Multifect<sup>®</sup> CX 15L kindly provided by DuPont (United States), and Ultraflo<sup>®</sup> XL kindly provided by Novozymes (Denmark).

#### **Extraction methods**

A portion of the frozen seaweed was partially defrosted and cut into small pieces (about 5–7 mm<sup>2</sup>) using a cutting mill (Microcut Stephan MC 15, Germany). These were subsequently frozen again and stored at -20 °C. All experiments were performed at  $40\pm1$  °C in a jacketed glass reactor vessel (5 L) containing around 3 kg of reaction mixture, composed of 20 % wet and cut seaweed homogenized in tap water (corresponding to minimal water quantity to obtain an effective circulation of the reaction mixture with the pump, in our conditions) with the pH adjusted to 5.5 by addition of 6 M HCl. Homogenization was conducted continuously, at 100 rpm (Stuart Overhead Stirrer SS20; Bibby Scientific Ltd., UK) using a peristaltic pump (Leroy-Somer, France) at a flow rate



Fig. 1 Schematic representation of the ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH) process applied to a seaweed thallus. Formation of cavitation bubbles (a). Shearing forces created by bubble implosions near the seaweed surface (b). Seaweed compounds released towards the liquid phase and improved of enzyme access into the seaweed (c)

of 50 L h<sup>-1</sup>. An external circulation system (Hitema ESE 010, Italy; Memmert, Germany) was used to control and adjust the temperature in the reactor for the 6 h of the process (Fig. 2a). The temperature inside the reactor and at the outlet of the ultrasonic apparatus was measured and pH was monitored inside the reactor.

Regular sampling ( $\pm 30 \text{ mL}$ ; at the beginning of the experiment and after every 30 min during the first hour, followed by one every hour) was carried out throughout the experiment. Samples were immediately centrifuged (15,500×*g*, 30 min, 20 °C), providing supernatant and pellet fractions that were weighed and then freeze-dried.

#### Enzyme-assisted extraction (EAE)

Enzymatic hydrolysis was initiated by the addition of the enzymatic cocktail and monitored for 360 min. After preliminary tests (data not shown), 1 % w/w of each enzyme related to the weight of wet seaweed was added, corresponding to a concentration of 0.2 % w/w of each enzyme in the reaction mixture. Hydrolysis was carried out at  $40 \pm 1$  °C, while the ultrasonic reactor was turned off.

#### Ultrasound-assisted extraction (UAE)

The reaction mixture was sonicated for 6 h using an ultrasonic flow-through reactor (Sonitube<sup>®</sup> 35 kHz, 200 to 400 W), manufactured and kindly provided by Synetude (France) (Fig. 2b). The Sonitube<sup>®</sup> was set to 400 W, and the power indicated by the generator varied between 350 and 400 W. So, taking into account the energy efficiency of the device (in order of 85 %) (Synetude, personal communication), the power really delivered during the experiments in the reaction mixture varied between 300 and 340 W. No enzyme was added during these experiments.

 Table 1
 Enzymatic cocktail

 composition: activities, pH, and
 temperature ranges—minimum

 (Min), maximum (Max), and
 optimal (Opt) values are given

	Activities		pH		Temperature (°C)			
	Primary	Secondary	Min	Max	Opt	Min	Max	Opt
Sumizyme TG	β-1,3-glucanase		3.5	8	4	40	50	50
	Botrytis glucanase							
Sumizyme MC	Polygalacturonase	Protease	5	6	5	40	45	45
		Amylase						
Multifect <sup>®</sup> CX 15L	Cellulase	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	4	6	5	35	65	55
	β glucosidase							
Ultraflo <sup>®</sup> XL	$\beta$ glucanase (endo-1,3(4–))	Xylanase	$Nd^{a}$	Nd	6	40	65	Nd
		$\alpha$ amylase						

<sup>a</sup> Non-defined values

Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)

The UAEH process is a combination of the EAE and UAE extraction methods; the US was applied at the same power than for the UAE and the enzymes were added at the same concentration than for the EAE. The experiments were carried out at  $40 \pm 1$  °C for 6 h.

#### Analyses

To identify the biochemical composition of *G. turuturu*, a portion of the frozen seaweed was freeze-dried and ground in liquid nitrogen before being stored at -20 °C.

*Dry weight.* The dry weight of samples was determined gravimetrically, on 10 g (wet seaweed), after 24 h at 105 °C. Results are expressed as a percentage of wet seaweed.

Ash content. Total ash content was determined by incineration of 1 g of seaweed powder in an oven at 550 °C overnight. The ash content is expressed as a percentage of dry seaweed.

Determination of the seaweed liquefaction. For all experiments, the liquefaction of material was calculated over time. The proportion of soluble material was obtained by calculating the ratio between the weight of freeze-dried supernatant  $(m_1)$  and the sum of freeze-dried



Fig. 2 Schematic diagram of the extraction system (a). Schematic illustration of the SONITUBE<sup>®</sup>, an ultrasonic flow-through reactor (Synetude, France) (b)

supernatant  $(m_1)$  and pellet  $(m_2)$ , expressed in percentage, according to the equation:

$$\frac{m_1}{(m_1+m_2)} \times 100$$

Thus, for each time, the gain in liquefaction was calculated as the proportion of soluble material without the proportion of soluble material at the beginning of the process.

Sodium chloride content (NaCl). The total sodium chloride content was based on the determination of chloride anions by argentometry using an automatic chloride analyzer (Chloride analyzer Model 926; Sherwood Scientific Ltd., UK). Prior to analyses, samples of seaweed powder (2 g) were diluted in 150 mL of MilliQ water and ground using an Ultra Turrax (Ultra Turrax<sup>®</sup> IKA T18 B, IKA, Germany). The solution was brought to a boil for 10 min, homogenized, and filtered on glass wool. The volume was adjusted with ultrapure water to obtain a final volume of 200 mL. Measurements were made using the chloride analyzer after calibration with a NaCl standard solution at 200 mg L<sup>-1</sup> Cl. Results are expressed as a percentage.

Soluble carbohydrate content. The water-soluble carbohydrates were analyzed using a phenol-sulfuric acid method (Chaplin 1986). Glucose was used as a standard (range from 15 to 150 mg  $L^{-1}$ ). Absorbance was measured at 490 nm.

*Elemental composition: carbon and nitrogen.* The elemental C and N composition was determined on dehydrated samples (algal powder and freeze-dried supernatants), weighed (1.5-5 mg), and placed in small tin capsules that were carbonized by flash combustion at 1800 °C. The C and N contents were oxidized and converted into a gaseous form at 950 °C in a combustion column and at 750 °C in a reduction column. The gases formed were transferred by carrier gas (helium) and analyzed by gas chromatography (FLASH 2000 NC Organic Elemental Analyzer—Thermo Scientific, USA). Results were integrated using the Eager Xperience for Flash software.

*Lipid content*. Total lipid content of *G. turuturu* was determined gravimetrically according to the Folch method (Folch et al. 1957).

*Total amino acid (AA) content.* The total amino acid content was determined on selected freeze-dried supernatants, according to EC no. 152/2009 (EC no. 152/2009 2009).

*Microscopic observations*. Microscopic observations of samples were made before centrifugation in order to estimate and compare the thalli degradation over time. A light microscope with a digital camera (Evos XL Core Cell Imaging System, USA) was used, without staining. Two magnifications were performed on the samples:  $\times 100$  and  $\times 1000$ .

Statistical analysis. All the extraction processes were made in triplicate (n=3). Means and standard deviation are given for

each experiment. Analyses were performed using the software Sigmastat 3.1. Multiple comparison tests were carried out using the Holm-Sidak test following the ANOVA procedure (p < 0.05).

#### **Results and discussion**

#### Biochemical composition of the seaweed G. turuturu

The biochemical composition of G. turuturu is presented in Table 2. The dry weight (dw) content observed here (14.2 %) was higher than previous observations of 6.5 % (Munier et al. 2013) and 9.5 % (Denis et al. 2010). This was also the case regarding the mineral content, 30.7 % dw compared to 15.6 % dw (Munier et al. 2013) and 18.5 % dw (Denis et al. 2010). These higher values could be explained by the absence of a rinsing step (with tap or distilled water) here, allowing superficial material, particularly salt, to be conserved. This hypothesis is confirmed by the high content of NaCl found here, representing half of the total mineral content. We decided to not rinse the seaweeds in order to avoid the loss of seaweed compounds (in particular polysaccharides and proteins) (Marrion et al. 2003; Miller 2005) and to save time and money. However, the only washing step does not explain the higher amount of minerals found in our work. Indeed, for the same location, year, and month of collection, a study demonstrated a mineral content of 35.3 % for a dry weight of 9.7 % (Munier 2013). According to authors, this higher mineral content could be due to the effect of environmental parameters (particularly the sunshine duration) on the biochemical composition of G. turuturu.

Lipid content was similar to that previously found (3.7 % dw) (Kendel et al. 2013). Regarding the amino acid content (18.4 % dw), as the extraction and analysis procedures greatly differ from the only previously published work on this seaweed (Arasaki and Mino 1973), a comparison is inappropriate.

Table 2	$G_{\cdot}$	turuturu	biochemical	composition

	Grateloupia turuturu
Dry weight (% ww)	$14.17 \pm 0.10$
Ash (% dw)	$30.69 \pm 0.75$
Total NaCl (% dw)	$16.77\pm\!0.90$
Total N (% dw)	$3.62\pm0.07$
Total C (% dw)	$29.11 \pm 0.53$
Total amino acids (% dw) <sup>a</sup>	18.44
Total lipids (% dw)	$3.25 \pm 0.6$

Values are means  $\pm$  standard deviation, n = 3

dw dried weight, ww wet weight

 $^{\rm a}$  Tryptophan, hydroxyproline, and hydroxylysine were not detected,  $n\!=\!1$ 

Based on the methodology proposed by Lourenço et al. (2002), the nitrogen-to-protein conversion factor was calculated by the ratio of amino acid residues to total nitrogen. As indicated by these authors, due to the strong species variability, a specific conversion factor needs to be calculated in order to estimate the protein content precisely. The conversion factor for *G. turuturu* was estimated for the first time and found to be 5.09.

#### Comparison of EAE, UAE, and UAEH liquefaction

As expected, the soluble content increased with time (Fig. 3). However, without any treatment, the liquefaction level of the seaweed after 6 h was found to be very low  $(8 \pm 1 \%$  increase). Differences were observed regarding the kinetics of liquefaction according to the process used. A noticeable effect of EAE was observed as, despite a lag phase of 1 h, a regular increase in soluble material occurred throughout the experiment. This was previously observed when carbohydrases were used to degrade the thallus of G. turuturu leading to an increase in reducing sugars in the soluble phase (Denis et al. 2009a, b). Such higher liquefaction was also noticed when UAE was applied, but without any lag phase. However, after 6 h (Fig. 4), percentages of solubilized material obtained for EAE  $(71 \pm 1 \%)$  and UAE  $(74 \pm 1 \%)$  were very close, despite a significant difference. When both processes were applied simultaneously (UAEH), the level of liquefaction increased rapidly during the first 3 h, moderately one more hour, and then followed by a stationary phase until the end of the experiment (40  $\pm$  1 % increase) (Fig. 3). At the end, up to 91  $\pm$  0.1 % of the initial dry matter was recovered in the soluble phase (Fig. 4). These results indicate that all the processes used were more effective for seaweed liquefaction than autolysis (p < 0.05).



Fig. 3 Evolution of the gain in seaweed liquefaction for each process [control, enzyme-assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)] during 360 min at 40 °C. Values are means  $\pm$  standard deviation, n=3



Fig. 4 Percentage of solubilized material at 360 min for the control, enzyme-assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH), at 40 °C. Values are means  $\pm$  standard deviation, n=3. Significant differences (p < 0.05) are indicated by different *letters* 

The positive effect of US on the increased soluble fraction is well known and recognized as a valuable solution for recovering plant molecules (Mason et al. 2011; Vinatoru et al. 1997). However, such an effect has only recently been confirmed in seaweeds (Kadam et al. 2015c). Concerning the simultaneous application of enzyme(s) and ultrasound, association benefits have been demonstrated for the extraction of plant compounds (Leaes et al. 2013; Liu et al. 2014; Yachmenev et al. 2009). In the last few years, despite some studies carried out on the understanding of this positive association, the mechanisms involved have not been elucidated yet. Thus, on a model substrate, some studies have demonstrated that the enzymatic activity of carbohydrases was increased in the presence of ultrasound (Barton et al. 1996; Souza et al. 2013; Sulaiman et al. 2010). One of the most likely mechanisms would be an increased efficiency of mixing and diffusion of reaction components (enzyme(s), substrate(s), and product(s) of the reaction) (Barton et al. 1996). According to Bashari et al. (2013), the increased activity could be also due to the improvement of enzyme stability, which would be induced by some structural transformations (secondary structure) of their active site. Conversely, a reduction of a commercial cellulase activity has also been shown after sonication of the enzyme. However, when the cellulase was simultaneously used in the presence of its substrate and ultrasound, its activity was higher with US than without it. The authors concluded that, with a simultaneous sonication, the increased interactions and transfers between enzymes and substrate have overcome the undesirable effect of ultrasound on this cellulase (Szabó and Csiszár 2013). In some cases, a synergistic effect between enzymes and US was mentioned (Easson et al. 2011; Wu et al. 2014). Such synergy can be observed here, particularly at 2 h when the sum of liquefaction gain for UAE and EAE (24 %) was lower than that for UAEH (31 %). As

D Springer

previously mentioned, UAEH can also reduce the processing time (Liu et al. 2014) as the maximum liquefaction level here was obtained after 4 h.

To conclude, it seems clear that each case is individual, depending on the type of enzyme, the parameters of hydrolysis, and the parameters of sonication (Özbek and Ülgen 2000; Szabó and Csiszár 2013).

# Biochemical analyses of EAE, UAE, and UAEH soluble fractions

Carbohydrate, C, and N extraction yields. In order to identify and quantify the dry matter content, some biochemical



**Fig. 5** Biochemical composition of soluble fractions at 360 min for the control, enzyme-assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH) at 40 °C. Carbohydrates (**a**), carbon (**b**), and nitrogen (**c**). Values are means  $\pm$  standard deviation, n=3 except for UAEH carbohydrates (n=2). Significant differences (p<0.05) are indicated by different *letters. dw* dried weight

analyses were carried out on the resulting soluble fractions. To ensure the accuracy of our values, enzymatic cocktail carbohydrates were estimated at 427.43 mg of carbohydrate per gram of enzymatic cocktail. This is in accordance with data provided by the suppliers as follows: Sumizyme TG contains 50 % dextrins, Sumizyme MC is composed by 79 % maltodextrins, and Ultraflo<sup>®</sup> XL by 30 % glycerol and 20 % sorbitol. No data were communicated for Multifect<sup>®</sup> CX 15L. In order to avoid an overestimation, these amounts were compared to dried seaweed, giving an overall value of 127.41 mg of carbohydrate per gram of dried seaweed. This was removed from the biochemical composition of soluble fractions for the EAE and UAEH processes. The biochemical compositions of the resulting fractions obtained after 6 h of treatment are presented in Fig. 5.

Compared to the control, carbohydrate extraction was not improved by enzyme addition (EAE), with  $133 \pm 5$  and 150 $\pm 10 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively (Fig. 5a). This could be due to the low temperature used (40 °C), below the optimum for these carbohydrases (Table 1). This temperature was chosen in order to preserve heat-sensitive molecules found in red seaweed, such as the R-phycoerythrin (R-PE) which is a red-purple pigment stable up to 40 °C (Munier et al. 2014). When ultrasound was used (UAE and UAEH), the recovery of carbohydrates into the soluble phases was significantly increased (296  $\pm 37$  and  $439 \pm 16$  mg g<sup>-1</sup>, respectively), in comparison to the control. Thus, as previously noticed, US may have improved the enzyme activity leading to higher levels of polysaccharide extraction (Leaes et al. 2013; Liu et al. 2014; Lunelli et al. 2014; Yachmenev et al. 2009). Indeed, ultrasound allows polysaccharide degradation, inducing a reduction of viscosity and a decrease of the polysaccharide molecular weights (Petit et al. 2007; Pétrier et al. 2008; Zhou et al. 2008). Moreover, ultrasonic depolymerization could facilitate the access of carbohydrases to their substrate, which would further increase cell wall polysaccharide degradation. This could explain why the highest level of carbohydrates found was observed in the soluble fractions obtained by the combined process (UAEH).

Whatever the process used, the extraction of carbon and nitrogen was enhanced compared to the control (Fig. 5b, c). For both C and N, UAEH was the most efficient leading to an extraction yield of  $92\pm0.3$  % of the initial carbon and 74  $\pm1.2$  % of the initial nitrogen. Despite some discrepancies, no statistical differences (p < 0.05) were observed between the C and N contents of soluble fractions recovered after 6 h for EAE and UAE treatments. This is in accordance with the similarity of their dry matter content (Fig. 4). Although a direct link can be established between nitrogen and proteins, this is more complex for carbon, which is found in both proteins and carbohydrates. For nitrogen, it can be assumed that the polysaccharide degradation by UAEH increases the release of nitrogenous compounds and thus proteins.

*Amino acids (AA) analysis.* As is commonly known, AA content is the best measurement of proteins in plant tissue (Khanizadeh et al. 1995); thus, the composition of the UAEH fraction obtained after 6 h was established (Fig. 6).

For all samples (raw material, control, and UAEH), about 17 amino acids were detected including 8 essential ones (EAA). As expected, aspartic acid (Asp) and glutamic acid (Glu) were the most abundant as they occur at high levels in seaweeds, particularly red seaweeds (Diniz et al. 2011; Galland-Irmouli et al. 1999; Wong and Cheung 2000). In contrast, histidine (His), cysteine (Cys), and methionine (Met) were found in low proportions. Regarding the ratio of EAA/ total amino acids, some discrepancies were observed. In the raw material, this ratio was 38 %, close to that found in the seaweed of the same class, *Palmaria palmata*, and confirming their nutritional value (Galland-Irmouli et al. 1999). For both control and UAEH samples, this ratio decreased to 34 %

Fig. 6 Amino acid (AA) profiles expressed as a percentage of the total AA detected for seaweed (G. turuturu) and soluble fractions at 40 °C after 360 min [control and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)]. Classification into two categories: essential amino acids (EAA) and non-essential amino acids (NEAA). Tryptophan, hydroxyproline, and hydroxylysine were not detected. \*Essential amino acid for children. Values are means  $\pm$  standard deviation, n=2



Fig. 7 Microscopic observations during the processes. Magnification ×100 (a). Magnification 1000 (b). a, b Seaweed before processing; enzyme-assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH) at 180 min (-1) and 360 min (-2). Arrows indicate examples of holes in the thallus



indicating a modification in the overall amino acid composition of extracted proteins. In fact, extracts (control and UAEH) were enriched in cysteine (Cys), aspartic acid (Asp), alanine (Ala), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), and serine (Ser) while they contained less histidine (His), leucine (Leu), phenylalanine (Phe), arginine (Arg), and tyrosine (Tyr) compared to the raw material. Moreover, some differences were observed between the control and the UAEH. For example, compared to the control, UAEH enhanced the proportion of isoleucine (Ile), threonine (Thr), valine (Val), aspartic acid (Asp), and glutamic acid (Glu), while leucine (Leu), lysine (Lys), phenylalanine (Phe), arginine (Arg), and tyrosine (Tyr) were less abundant. As previously depicted, more nitrogenous compounds were extracted with the UAEH compared to the control (Fig. 5c). It can be assumed that some proteins could be solubilized thanks to the UAEH, and these proteins would have some differences concerning their amino acids profiles.

Hence, the differences between amino acids profiles could be explained. Indeed, processes investigated here, especially UAEH, could enhance the total protein extraction, resulting in a de facto modification of the amino acid relative composition. To our knowledge, there are only few studies mentioning ultrasound for the extraction of amino acids. Thus, recently, the interest of ultrasound (UAE) was demonstrated in comparison to conventional methods to extract amino acids from grapes (Carrera et al. 2015) and taurine (free amino acid) from Porphyra vezoensis (Wang et al. 2015). Carrera et al. (2015) found that the level of individual amino acids in the extracts was always higher using ultrasound rather than their conventional method (maceration), with higher recoveries for most amino acids. Moreover, the simultaneous use of ultrasound and enzyme has demonstrated its effectiveness, on seaweeds, for the extraction of iodinated amino acids (Romarís-Hortas et al. 2013).

Table 3Quantitative analysisand extraction yields forG. turuturu, control, andultrasound-assisted enzymatichydrolysis (UAEH) after 360 minat 40 °C

			N content (% dw)	C content (% dw)	Total AA content <sup>a</sup> (% dw)
	G. turuturu (dried powder)		$3.62\pm0.07$	$29.11\pm0.53$	18.44
	Solubilized material (%)	Carbohydrate content (mg $g^{-1}$ dw)	N extraction yield (%)	C extraction yield (%)	Total AA extraction yield (%)
Control	$54.60 \pm 1.09$	$132.90\pm5.15$	$41.05\pm0.69$	$41.58\pm0.69$	$25.79 \pm 0.57$
UAEH	$90.71\pm0.13$	$439.43 \pm 16.39$	$73.95 \pm 1.16$	$92.27\pm0.34$	$54.06\pm0.19$

Values are means ± standard deviation

dw dried weight

<sup>a</sup> Tryptophan, hydroxyproline, and hydroxylysine were not detected

#### **Microscopic observations**

In order to visualize the effect of the different processes, some microscopic observations were made (Fig. 7). After 3 and 6 h, for all treatments (EAE, UAE, and UAEH), cell wall disruption was noticed, confirmed by the observation of cellular debris. Such an effect of EAE has been previously observed, representing the enzymatic degradation of the thallus over time (Denis et al. 2009a). UAE seemed to be even more disruptive as more holes were observed, confirming previous studies on plants (Easson et al. 2011; Toma et al. 2001).

However, of the three procedures used here, the most disruptive one was the combination of US and enzymes. Sonication led to the creation of cavitation bubbles, which may have imploded leading to the deterioration of the seaweed surface, the breakdown of the parietal cell wall, and the improved penetration of enzymes into the substrate (Mason et al. 2011; Toma et al. 2001).

#### Conclusions

Three procedures for liquefying the red seaweed *Grateloupia turuturu*, in order to maximize the solubility of the components in 6 h, were compared. Among these, the combination of non-specific carbohydrases and ultrasound was found to be the most efficient in terms of: liquefaction level (×1.7 compared to the control), extraction of carbohydrates (×3.3), nitrogen (×1.8), carbon (×2.2), and amino acids (×2.1) (Table 3). Moreover, the kinetics of liquefaction revealed that a synergistic effect occurred after 2 h of treatment. Further biochemical analysis could be interesting such as the polysaccharide molecular weight determination before and after UAEH and the identification of simple sugars in soluble fractions generated.

Although such an approach has been successfully conducted on different substrates in recent years, this is, to the best of our knowledge, the first time that it has been carried out on seaweed, furthermore on a fresh one. It could be interesting to test this UAEH process on other red seaweeds in order to evaluate its transfer feasibility to other species. The original ultrasonic system used here can easily be scaled up but, before an industrial application, further work must be done, notably to study the temperature effect, the nature of the enzyme, the ultrasonic power, and the time of processing.

Acknowledgments This research was supported by the Région Pays de La Loire and the MSH Ange Guépin, France (COSELMAR project). We thank DuPont, Novozymes, and Takabio for kindly providing the enzymes; Synetude for providing the Sonitube; Ewa Lukomska for elemental analyses; and Carol Robins for her expertise in scientific English.

#### References

- Arasaki T, Mino N (1973) The alkali soluble proteins in marine algae. Eiyo Shokuryo 26:129–133
- Baghel RS, Reddy CRK, Jha B (2014) Characterization of agarophytic seaweeds from the biorefinery context. Bioresour Technol 159:280–285
- Baghel RS, Trivedi N, Gupta V, Neori A, Reddy CRK, Iali A, Jha B (2015) Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. Green Chem 17:2436–2443
- Barton S, Bullock C, Weir D (1996) The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. Enzyme Microb Technol 18:190–194
- Bashari M, Eibaid A, Wang J, Tian Y, Xu X, Jin Z (2013) Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. Ultrason Sonochem 20:155–161
- Carrera C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG (2015) Ultrasoundassisted extraction of amino acids from grapes. Ultrason Sonochem 22:499–505
- Cerveró JM, Skovgaard PA, Felby C, Sørensen HR, Jørgensen H (2010) Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol. Enzyme Microb Technol 46:177–184
- Chaplin MF (1986) Monosaccharides. In: Chaplin MF, Kennedy JF (eds) Carbohydrate analysis: a practical approach, First edn. IRL Press, Oxford, pp 1–36
- Delgado-Povedano MM, de Castro MD L (2015) A review on enzyme and ultrasound: a controversial but fruitful relationship. Anal Chim Acta 889:1–21
- Denis C, Le Jeune H, Gaudin P, Fleurence J (2009a) An evaluation of methods for quantifying the enzymatic degradation of red seaweed *Grateloupia turuturu*. J Appl Phycol 21:153–159
- Denis C, Morançais M, Gaudin P, Fleurence J (2009b) Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from *Grateloupia turuturu*. Bot Mar 52:262–267
- Denis C, Morançais M, Li M, Deniaud E, Gaudin P, Wielgosz-Collin G, Barnathan G, Jaouen P, Fleurence J (2010) Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). Food Chem 119:913–917
- Diniz GS, Barbarino E, Oiano-Neto, Pacheco S, Lourenço SO (2011) Gross chemical profile and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for five tropical seaweeds. Am J Plant Sci 02:287–296.
- Domínguez-González R, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera P (2005) Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. Talanta 66:937–942
- Dumay J, Clément N, Morançais M, Fleurence J (2013) Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance Rphycoerythrin extraction. Bioresour Technol 131:21–27
- Easson MW, Condon B, Dien BS, Iten L, Slopek R, Yoshioka-Tarver M, Lambert A, Smith J (2011) The application of ultrasound in the enzymatic hydrolysis of switchgrass. Appl Biochem Biotechnol 165:1322–1331
- EC no. 152/2009 (2009) In: Official Journal of the European Union. http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri= OJ:L:2009:054:0001:0130:EN:PDF. Accessed 26 January 2015
- Fleurence J, Massiani L, Guyader O, Mabeau S (1995) Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. J Appl Phycol 7:393–397
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226:497–509
- Galland-Irmouli A-V, Fleurence J, Lamghari R, Luçon M, Rouxel C, Barbaroux O, Bronowicki JP, Villaume C, Guéant JL (1999)

Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). J Nutr Biochem 10:353–359

- Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2013) Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. J Agric Food Chem 61:4667–4675
- Kadam SU, Álvarez C, Tiwari BK, O'Donnell CP (2015a) Extraction of biomolecules from seaweeds. In: Troy BKTJ (ed) Seaweed sustainability. Academic, San Diego, pp 243–269
- Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2015b) Effect of ultrasound pretreatment on the drying kinetics of brown seaweed Ascophyllum nodosum. Ultrason Sonochem 23:302–307
- Kadam SU, Tiwari BK, Smyth TJ, O'Donnell CP (2015c) Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed Ascophyllum nodosum using response surface methodology. Ultrason Sonochem 23:308–316
- Kendel M, Couzinet-Mossion A, Viau M, Fleurance J, Barnathan G, Wielgosz-Collin G (2013) Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. J Appl Phycol 25:425–432
- Khanizadeh S, Buszard D, Zarkadas CG (1995) Misuse of the Kjeldahl method for estimating protein content in plant tissue. Hortscience 30:1341–1342
- Korzen L, Pulidindi IN, Israel A, Abelson A, Gedanken A (2015) Single step production of bioethanol from the seaweed Ulva rigida using sonication. RSC Adv 5:16223–16229
- Kwiatkowska B, Bennett J, Akunna J, Walker GM, Bremner DH (2011) Stimulation of bioprocesses by ultrasound. Biotechnol Adv 29:768–780
- Leaes EX, Zimmermann E, Souza M, Ramon AP, Mezadri ET, Dal Pra V, Terra LM, Mazutti MA (2013) Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of cassava waste to obtain fermentable sugars. Biosyst Eng 115:1–6
- Liu Y, Gong G, Zhang J, Jia S, Li F, Wang Y, Wu S (2014) Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. Carbohydr Polym 110:278–284
- Lourenço SO, Barbarino E, De-Paula JC, Pereira LOS, Marquez UML (2002) Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. Phycol Res 50:233–241
- Lunelli FC, Sfalcin P, Souza M, Zimmermann E, Dal Pra V, Foletto EL, Jahn SL, Kuhn RC, Mazitti MA (2014) Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars. Biosyst Eng 124:24–28
- Marrion O, Schwertz A, Fleurence J, Guéant JL, Villaume C (2003) Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. Nahrung 47:339–344
- Mason TJ, Chemat F, Vinatoru M (2011) The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. Curr Org Chem 15:237–247
- Mensi F, Ksouri J, Seale E, Romdhane MS, Fleurence J (2012) A statistical approach for optimization of R-phycoerythrin extraction from the red algae *Gracilaria verrucosa* by enzymatic hydrolysis using central composite design and desirability function. J Appl Phycol 24:915–926
- Michalak I, Chojnacka K (2014) Algal extracts: technology and advances. Eng Life Sci 14:581–591
- Miller IJ (2005) The structure of polysaccharides from selected New Zealand species of *Grateloupia*. Bot Mar 48:157–166
- Munier M (2013) Pigmentary polymorphism study of the red algae *Grateloupia turuturu* through the purification and the characterization of R-phycoerythrin in an industrial valorization context. Dissertation, University of Nantes
- Munier M, Dumay J, Morançais M, Jaouen P, Fleurence J (2013) Variation in the biochemical composition of the edible seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada harvested from two sampling sites on the Brittany Coast (France): the influence of storage method on the extraction of the seaweed pigment R-phycoerythrin. J Chem 2013:1–8

- Munier M, Jubeau S, Wijaya A, Morançais M, Dumay J, Marchal L, Jaouen P, Fleurence J (2014) Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. Food Chem 150: 400–407
- Özbek B, Ülgen KÖ (2000) The stability of enzymes after sonication. Process Biochem 35:1037–1043
- Peña-Farfal C, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera P, Pinochet-Cancino H, Gregon-Henriquez I (2005) Speeding up enzymatic hydrolysis procedures for the multi-element determination in edible seaweed. Anal Chim Acta 548:183–191
- Petit A-C, Noiret N, Guezennec J, Gondrexon N, Colliec-Jouault S (2007) Ultrasonic depolymerization of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. Ultrason Sonochem 14:107–112
- Pétrier C, Gondrexon N, Boldo P (2008) Ultrasons et sonochimie. Tech Ing Sci Fondam AFP4:15
- Romarís-Hortas V, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A (2013) Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for iodinated amino acid extraction from edible seaweed before reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. J Chromatogr A 1309:33–40
- Sørensen HR, Pedersen S, Viksø-Nielsen A, Meyer AS (2005) Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. Enzyme Microb Technol 36:773–784
- Sørensen HR, Pedersen S, Meyer AS (2007) Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. Enzyme Microb Technol 40: 908–918
- Souza M, Mezadri ET, Zimmerman E, Leaes EX, Bassaco MM, Dal Prá V, Foletto E, Cancellier A, Terra LM, Jahn SL, Mazutti MA (2013) Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasoundassisted irradiation. Ultrason Sonochem 20:89–94
- Stiger-Pouvreau V, Thouzeau G (2015) Marine species introduced on the French Channel-Atlantic coasts: a review of main biological invasions and impacts. Open J Ecol 5:227–257
- Subhedar PRGPB, Gogate PR (2013) Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: a review. Ind Amp Eng Chem Res 52:11816–11828
- Sulaiman AZB, Ajit A, Yunus RBM, Chisti Y (2010) Effects of ultrasound on enzymatic hydrolysis of soluble cellulose. J Biotechnol 150, Supplement:135. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.08.354
- Szabó OE, Csiszár E (2013) The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. Carbohydr Polym 98:1483–1489
- Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrason Sonochem 8:137–142
- Vinatoru M, Toma M, Radu O, Filip PI, Lazurca D, Mason TJ (1997) The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. Ultrason Sonochem 4:135–139
- Wang T, Jónsdóttir R, Kristinsson HG, Hreggvidsson GO, Jónsson JÓ, Thorkelsson G, Ólafsdóttir G (2010) Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. LWT -Food Sci Technol 43:1387–1393
- Wang F, Guo X-Y, Zhang D-N, Wu Y, Wu T, Chen Z-G (2015) Ultrasound-assisted extraction and purification of taurine from the red algae *Porphyra yezoensis*. Ultrason Sonochem 24:36–42
- Wijesinghe WAJP, Jeon Y-J (2012) Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. Fitoterapia 83:6–12
- Wong KH, Cheung PCK (2000) Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: part I—proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. Food Chem 71: 475–482

Wu H, Zhu J, Diao W, Wang C (2014) Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*). Carbohydr Polym 113: 314–324

Yachmenev V, Condon B, Klasson T, Lambert A (2009) Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. J Biobased Mater Bioenergy 3:25-31

Zhou C, Wang Y, Ma H, He R (2008) Effect of ultrasonic degradation on in vitro antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra yezoensis (Rhodophyta)*. Food Sci Technol Int 14:479–486

# Annexe 2

# Ultrasound-Assisted extraction of R-phycoerythrin from Grateloupia

turuturu with and without enzyme addition

# Algal Research

Le Guillard, C., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J.-Y., Fleurence, J., Bergé, J.-P., 2015. Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition. *Algal Research* 12 : 522–528. doi: 10.1016/j.algal.2015.11.002

#### Algal Research 12 (2015) 522-528



# Contents lists available at ScienceDirect



#### journal homepage: www.elsevier.com/locate/algal

# Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with and without enzyme addition



Cécile Le Guillard <sup>a,b</sup>, Justine Dumay <sup>b,\*</sup>, Claire Donnay-Moreno <sup>a</sup>, Sandrine Bruzac <sup>a</sup>, Jean-Yves Ragon <sup>a</sup>, Joël Fleurence <sup>b</sup>, Jean-Pascal Bergé <sup>c</sup>

<sup>a</sup> IFREMER centre de Nantes BP 21105, BIORAFHE, 44311 Nantes cedex 03, France

<sup>b</sup> LUNAM Université de Nantes, MMS, Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322, Nantes cedex 03, France

<sup>c</sup> IDMer, 2 rue Batelière, 56100 Lorient, France

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 30 July 2015 Received in revised form 2 October 2015 Accepted 2 November 2015 Available online xxxx

Keywords: Seaweed Grateloupia turuturu R-phycoerythrin Ultrasound-assisted extraction Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis Liquefaction

#### 1. Introduction

The concept of biorefinery continues to make progress with many studies dealing with the development of new technologies for the total recovery of biomass. Among vegetal biomasses, marine substrates like seaweeds are of interest due to their content in a wide range of biomolecules and their worldwide distribution, making them a promising feedstock [1]. Although several species have been used for hundreds of years for various applications, many remain underexploited, notably in European countries. Among these, the red seaweed *Grateloupia turuturu* (Yamada), introduced 45 years ago, is now proliferative and abundant on the French Atlantic coast [2].

Red seaweeds are interesting notably for their richness in proteins, polysaccharides and lipids, and also due to some biomolecules such as the valuable R-phycoerythrin (R-PE), a water-soluble pink-purple pigment [3]. R-PE is the main light-harvesting pigment of Rhodophyta and belongs to the phycobiliprotein family [4,5]. In fact, it is the most abundant phycobiliprotein in *G. turuturu*, representing up to 0.30% dw

E-mail addresses: cecile.leguillard@wanadoo.fr (C. Le Guillard),

justine.dumay@univ-nantes.fr (J. Dumay), Claire.Donnay.Moreno@ifremer.fr

#### http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.002 2211-9264/Published by Elsevier B.V.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to compare two processes for the extraction of R-phycoerythrin (R-PE) from the red seaweed *Grateloupia turuturu*: ultrasound-assisted extraction (UAE) and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH). Process efficiencies were both evaluated by the yield of R-PE extraction and by the level of liquefaction. Experiments were conducted at 40 and 22 °C, for 6 h, using an enzymatic cocktail and an original ultrasonic flow-through reactor. R-PE appeared very sensitive to temperature, thus 22 °C is strongly recommended for its extraction by UAEH or UAE. However, the higher processing temperature (40 °C) clearly increased the extraction of water-soluble compounds (up to 91% of liquefaction).

These two new processes are thus promising alternatives for the extraction of water-soluble components including R-PE, from wet seaweeds, with extraction yields at least similar to conventional solid–liquid extraction.

Published by Elsevier B.V.

[6]. Such a pigment has a number of potential applications, like as a natural colorant, a fluorescent probe (these 2 are already available on the market), an antioxidant, antitumoral and antidiabetic compound [3].

The more conventional R-PE extraction method is based on a solidliquid extraction, in sodium phosphate buffer, from a seaweed powder obtained after freeze-drying and grinding in liquid nitrogen. Such a process is very time-consuming and expensive, making it difficult to upscale, thus extraction alternatives are welcomed. Among these, enzymatic hydrolysis appears promising to extract R-PE [7] as well as other valuable components [1,8]. However, regarding the enzymatic extraction of R-PE, despite promising data on *Palmaria palmata* [7], no successful results have been obtained on *G. turuturu* [9]. According to this study, the use of combined polysaccharidases did not improve R-PE extraction, but was useful for the extraction of oligosaccharides [9].

In the last decade, the use of ultrasound (US) for extracting natural products from different vegetable biomasses has been validated and increasingly applied. This method is usually named ultrasonic/ ultrasound-assisted extraction (UAE), and is already a proven technology for large-scale extraction [10]. However, only very few studies, most of them recent, have been conducted on seaweeds [11–13]. According to Wang et al. [13], the use of US enhanced the extraction efficiency of taurine from the red seaweed *Porphyra yezoensis*, compared to the conventional solid–liquid procedure. They also noticed that the UAE process required a shorter extraction time and lower operating

<sup>\*</sup> Corresponding author.

<sup>(</sup>C. Donnay-Moreno), Sandrine.Bruzac@ifremer.fr (S. Bruzac), Jean.Yves.Ragon@ifremer.fr (J.-Y. Ragon), joel.fleurence@univ-nantes.fr (J. Fleurence), jpberge@idmer.com (J.-P. Bergé).

temperatures, which is interesting regarding the weak stability of R-PE [4]. Ultrasound has already been used to extract phycobilin but from microalgae; Benavides and Rito-Palomares [14] reported that the extraction of B-phycoerythrin was improved by sonication, due to a better disruption of microalgal cells.

In recent years, growing number of studies have focused on the simultaneous combination of enzymes and sonication in plants, which was notably developed to enhance the extraction and hydrolysis of polysaccharides [15–18]. It appears that ultrasound irradiation can act as a tool of hydrolysis intensification, sometimes with synergistic effects between the enzymes and US leading to a lower enzyme consumption [16,17]. The mechanism of this positive interaction, ultrasound-enzymes, is not well understood, although it could be due to an increase in the mass transfer, through the implosion of cavitation bubbles, enhancing the accessibility of the substrate to the enzyme [16,18]. Moreover, the ultrasound might act by the induction of structural transformations which may affect the active site (secondary structure). The ultrasound irradiation might confer more stability to the enzyme and they might modify the affinity between the enzyme and the substrate [19].

This relatively new process is known as ultrasound/ultrasonicassisted enzymatic hydrolysis (UAEH) or ultrasound/ultrasonic-assisted enzymatic extraction (UAEE).

On seaweeds, a study demonstrated the value of UAEH in speeding up enzymatic hydrolysis (12-fold) [20]. Recently, Korzen et al. [21] highlighted the interest of ultrasound to produce bioethanol from the macroalgae *Ulva rigida*, using an ultrasound-assisted saccharification and fermentation process. As seaweed cell walls are mainly composed of polysaccharides, such a process could be very helpful in improving access to valuable compounds such as R-PE.

To the best of our knowledge, no study has been carried out on the extraction of R-PE under sonication (UAE), or with the simultaneous combination of enzymes and ultrasound (UAEH) on seaweed.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Materials

Seaweed, *G. turuturu*, was harvested on 24th May 2013, in the intertidal zone of Batz-sur-Mer on the Atlantic coast, France. Epiphytes were removed by hand and algae were partially dewatered with a spin-dryer, then vacuum-packed (Boulanger INV 40) and immediately frozen. The algae were stored at -20 °C in darkness. Four industrial carbohydrases were used and combined according to their similar pH and temperature optima and their complementarity (Table 1). Regarding our target, all these enzymes do not work at temperatures higher than 40 °C. The enzymatic cocktail was thus composed of Sumizyme TG and Sumizyme MC produced by SHIN NIHON CHEMICAL and kindly provided by Takabio (Beaucouzé, France); Multifect® CX 15 L was kindly provided by DSM; and Ultraflo® XL was kindly provided by Novozymes®.

#### 2.2. R-PE temperature stability

A portion of the seaweed was freeze-dried and ground in liquid nitrogen to give an algal powder, stored at -20 °C in darkness. Following the conventional R-PE extraction method, the resulting powder was suspended in tap water, with a 1/20 ratio (w/v) for 20 min at 4 °C; then the suspension was centrifuged (25,000 g, 20 min, 4 °C). The soluble phase, called the water extract, was maintained in darkness at 4 °C, 25 °C, 30 °C or 40 °C. The R-PE concentrations ([R-PE]) were monitored over 6 h.

#### 2.3. Extraction methods

A portion of the seaweed was cut into small pieces (about 5–7 mm<sup>2</sup>) using a cutting mill (Microcut Stephan MC 15). These were subsequently stored at -20 °C. All the experiments were performed in a jacketed glass reactor vessel (5 L) containing around 3 kg of reaction mixture, composed of 20% wet and cut seaweed homogenized in tap water (corresponding to the minimal water quantity to obtain an effective circulation of the reaction mixture, with the pump, in our conditions) with the pH adjusted to 5.5 by addition of 6 M HCl (Radiometer analytical TitraLab® 854). Homogenization was conducted continuously, at 100 rpm (Stuart® Overhead Stirrer SS20), and the reaction mixture was circulated using a peristaltic pump (Leroy® Somer) at a flow rate of 50 L  $\cdot$  h<sup>-1</sup>. An external circulation system (Hitema® ESE 010 and Memmert) was used to control and adjust the temperature (22 ± 1 °C) or 40 ± 1 °C) in the reactor during the 6 h of the process. To ensure R-PE preservation, the whole system was kept in darkness (Fig. 1a).

Regular sampling (±30 mL) was carried out throughout the experiment. Samples were immediately centrifuged (15,500 g, 30 min, 20 °C, Beckman Coulter Avanti® J-E Centrifuge) providing supernatant and sludge fractions that were weighed and then freeze-dried. The temperature was regulated (22 ± 1 °C or 40 ± 1 °C) and pH was monitored inside the reactor during the whole experiment.

#### 2.3.1. Ultrasound-assisted extraction (UAE)

The reaction mixture was sonicated for 6 h using an ultrasonic flowthrough reactor (SONITUBE® 35 kHz, 200 to 400 W), manufactured and kindly provided by SYNETUDE (Chambéry, France) (Fig. 1b). At the amplitude of 100%, the power delivered during the experiments in the reaction mixture varied between 300 W and 340 W. No enzyme was added during these experiments.

#### 2.3.2. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)

The UAEH process is a combination of enzymatic hydrolysis (EAE) and the UAE extraction method. The UAEH was initiated by the addition of the enzymatic cocktail and the simultaneous application of US. After preliminary tests (data not shown), 1% w/w of each enzyme related to the weight of wet seaweed was added, corresponding to a concentration of 0.2% w/w of each enzyme in the reaction mixture. Experiments were monitored during 360 min.

Table 1

Enzymatic cocktail composition: activities, pH and temperature ranges. Minimum (Min), maximum (Max) and optimal (Opt) values are given.

	Activities		pН	рН			Temperature (°C)		
	Primary	Secondary	Min	Max	Opt	Min	Max	Opt	
Sumizyme TG	β-1,3-glucanase Botrytis glucanase		3.5	8	4	40	50	50	
Sumizyme MC	Polygalacturonase	Protease Amylase	5	6	5	40	45	45	
Multifect® CX 15 L	Cellulase β glucosidase		4	6	5	35	65	55	
Ultraflo® XL	β glucanase (endo-1,3(4-))	Xylanase $lpha$ amylase	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	6	40	65	Nd <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> Non-defined values.

523

#### C. Le Guillard et al. / Algal Research 12 (2015) 522-528



**Fig. 1.** a: Diagram of the extraction system. b: Schematic illustration of the SONITUBE®, an ultrasonic flow-through reactor (SYNETUDE, France).

#### 2.4. Analyses

#### 2.4.1. Determination of seaweed liquefaction

For all experiments, the liquefaction of the material was calculated over time. The proportion of soluble material was obtained by calculating the ratio between the weight of the freeze-dried supernatant  $(m_1)$  and the weight of the freeze-dried supernatant  $(m_1)$  added to the weight of the sludge  $(m_2)$ , expressed in percentage, according to Eq. (1):

Solubilized material = 
$$m_1/(m_2 + m_1) \times 100$$
. (1)

Thus, for each time, the gain in liquefaction was calculated as the proportion of soluble material without the proportion of soluble material at the beginning of the process.

#### 2.4.2. R-phycoerythrin (R-PE)

Absorption spectra were monitored from 200 to 800 nm, using a UV–VIS spectrophotometer (Shimadzu UV–1800). R-PE concentrations were determined spectrometrically, using the Beer and Eshel [22] equation (Eq. (2)), where  $A_{565}$ ,  $A_{592}$ ,  $A_{455}$  and  $A_{492}$  are the absorbances at 565 nm, 592 nm, 455 nm and 492 nm:

$$[\mathbf{R} - \mathbf{PE}] = [(A_{565} - A_{592}) - (A_{455} - A_{492}) \times 0.20] \times 0.12.$$
(2)

R-PE extraction yield was expressed as  $mg \cdot g^{-1}$  seaweed dried weight (dw).

#### 2.4.3. Soluble carbohydrates

The water-soluble carbohydrates were analyzed using a phenolsulfuric acid method. Glucose was used as a standard (range from to 15 to 150 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>). Absorbance was measured at 490 nm (Shimadzu UV-1800, UV-VIS Spectrophotometer) [23]. The extraction yield of soluble carbohydrates was expressed as mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> seaweed dried weight (dw).

#### 2.4.4. Elemental composition: carbon and nitrogen

The elemental C and N composition was determined on dehydrated samples (algal powder and freeze-dried supernatants), weighed (1.5–5 mg) and placed in small tin capsules that were carbonized by flash combustion at 1800 °C. The C and N contents were oxidized and converted into a gaseous form, at 950 °C in a combustion column and at 750 °C in a reduction column. The gases formed were transferred by carrier gas (helium) and analyzed by gas chromatography (FLASH 2000 NC Organic Elemental Analyzer – Thermoscientific). The results were integrated using the Eager Xperience for Flash software. Carbon and nitrogen extraction yields were expressed as a percentage of the initial carbon and nitrogen seaweed content (%).

#### 2.4.5. Statistics

All the extractions were carried out in three independent replicates (n = 3). Means and standard deviations (SD) are given for three independent experiments. Analyses were performed using the software Sigmastat 3.1. Multiple comparison tests were carried out using the Holm–Sidak test following the ANOVA procedure (p < 0.05).

#### 3. Results and discussion

#### 3.1. R-PE temperature stability

The R-PE stability according to temperature is depicted in Fig. 2a as the percentage of preserved R-PE over time.

Whatever the processing temperature, the level of preserved R-PE decreased with time without any plateau, even after 6 h. The shape of the curves was similar with the highest denaturation occurring during the first 30 min followed by a slower one. However, a temperature impact was clearly noticeable. Indeed, after 30 min, at 4  $^{\circ}$ C, 94% of R-PE was preserved but only 61% at 40  $^{\circ}$ C while intermediate values were found at 25  $^{\circ}$ C and 30  $^{\circ}$ C (92% and 86%, respectively). After 2 h, 91, 86, 76 and 35% of preserved R-PE were quantified at 4, 25, 30 and 40  $^{\circ}$ C, respectively, while at the end of the experiments (6 h), the level of preserved R-PE was 86, 79, 63 and 26%. These results clearly illustrate a negative influence of temperature on the preservation of R-PE. An increase of 10  $^{\circ}$ C (30 to 40  $^{\circ}$ C) led to a large reduction in the amount of preserved R-PE after 6 h, from 63 to 26%.

A recent study demonstrated that R-PE was stable for up to 60 min at 40 °C while a consequent denaturation occurred at 60 °C [4]. The lower stability observed here (45% of preserved R-PE after 1 h at 40 °C) could be due to temperature but also to pH as this influences thermal stability [24].

As depicted in Fig. 2b representing the absorption spectra, a noticeable effect of temperature was observed after 360 min for the three main R-PE characteristic peaks (498 nm, 540 nm and 565 nm), with a regular decrease in absorbance according to the temperature increase. However, among these three, the peak at 498 nm demonstrated a greater stability toward temperature than the 540 and 565 nm peaks, corresponding to the chromophores phycourobilins (PUB) and phycoerythrobilins (PEB), respectively [5]. This is in accordance with previous studies dealing with the thermal stability of bilins [4,25].

#### 3.2. Seaweed liquefaction

Whatever the process or the temperature, the rate of liquefaction increased with time (Fig. 3a), which confirms that ultrasound can reduce the hydrolysis processing time [15].

However, some discrepancies were found, as the gain in seaweed liquefaction over time at UAEH 40 °C was much higher than that observed with other treatments. In fact, a comparison of the kinetics for UAE 22 °C, UAE 40 °C and UAEH 22 °C revealed that the gain in liquefaction seemed to be similar over time, with the same regular and slight increase. Nevertheless, when the combined process (UAEH) was applied at 40 °C, the level of liquefaction increased rapidly during



**Fig. 2.** a: Percentage of preserved R-PE over time (360 min) for the temperatures:  $4 \degree C$ ,  $25 \degree C$ ,  $30 \degree C$  and  $40 \degree C$ . Values are means  $\pm$  SD from three independent experiments (n = 3). b: Absorption spectra of R-PE extracts after 360 min at  $4 \degree C$ ,  $25 \degree C$ ,  $30 \degree C$  and  $40 \degree C$ ; the extract at T0 was labeled Control.

the first 3 h, moderately for one more hour, and was then followed by a stationary phase until the end of the experiment (40  $\pm$  1%).

After 6 h of treatment, no statistical differences were observed for UAE processes, as the final soluble contents were found identical (74  $\pm$  4% at 22 °C and 74  $\pm$  0.5% at 40 °C) (Fig. 3b). Thus, in these conditions, seaweed liquefaction by sonication was not influenced by temperature. However, a recent study on grape marc demonstrated that the extraction yields under sonication were correlated to temperature (from 20 to 50 °C) but that too high temperatures could have a negative effect on the ultrasonic cavitation intensity due to the increase in vapor pressure [26].

In contrast, a clear impact of temperature was noticed when enzymes were used associated with sonication (UAEH). For example, while 83.6  $\pm$  1.9% of solubilized material was found at 22 °C, up to 90.7  $\pm$  0.1% of soluble compounds were recovered at 40 °C. This could be explained by the fact that 40 °C is closer to the optimal temperature of the enzymes used, thus leading to a better enzymatic efficiency. Moreover, some studies have demonstrated that the activation energy (temperature) of enzymes can be lowered in the presence of ultrasound, due to their different relationship to pH and temperature parameters [27,28], although some contradictory studies have revealed that the enzymes' optimal temperature does not change, despite ultrasonic stimulation [19.29].

Whatever the temperature, the addition of enzymes had a positive impact on the recovery of soluble materials after 6 h of treatment (p <



Fig. 3. a: Evolution of the gain in seaweed liquefaction for each process (ultrasound-assisted extraction (UAE) and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)) during 360 min at 40 °C and 22 °C. Values are means  $\pm$  SD from three independent experiments (n = 3). b: Percentage of solubilized material at 360 min for ultrasound-assisted extraction (UAE) and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH), at 40 °C and 22 °C. Values are means  $\pm$  SD from three independent experiments (n = 3). Significant differences (p < 0.05) are indicated by different letters.

0.05). Recently, some research has been carried out in order to understand how the combination of enzymes and ultrasonic waves can improve extraction efficiency [15,18,30]. It has been demonstrated that, under sonication, enzymatic activity could increase [28] due to some structural transformations (secondary structure) of the active site, leading to an improved enzyme stability [19]. In contrast, it has also been shown that US can reduce the specific activity of commercial enzymes, notably cellulase; however, the resulting activity remained higher under sonication as the increased mass transfer between enzymes and substrate could overcome this direct adverse effect on the enzymes [31]. Nevertheless, it seems clear that each case is individual, depending on the type of enzyme and the parameters of sonication [31,32].

#### 3.3. Biochemical composition of soluble fractions

#### 3.3.1. *R-phycoerythrin content*

The R-PE extraction yields measured over time are presented in Fig. 4, in which some kinetic differences are observed.

Whatever the treatment, during the first hour, two trends emerged: an increase in R-PE extraction yields at 22 °C and, conversely, a decrease at 40 °C. Such a reduction is consistent with the denaturation previously observed at 40 °C (3.1).

However, after these initial 60 min, different R-PE extraction kinetics were noticed: a regular reduction for UAE 22 °C and 40 °C throughout the processing time, a stagnation during one more hour followed by a decrease for UAEH 22 °C and a relative stability for UAEH 40 °C (1.81  $\pm$  0.01 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw). After 6 h, UAE at 40 °C seemed to be the

525

#### C. Le Guillard et al. / Algal Research 12 (2015) 522-528



Fig.4. Evolution of the R-PE extraction yield for each process (ultrasound-assisted extraction (UAE) and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)) during 360 min at 40 °C and 22 °C. Values are means  $\pm$  SD from three independent experiments (n = 3).

most denaturing treatment but the final amount of preserved R-PE extracted ( $39 \pm 3\%$ ) remained higher than that obtained by classic tap-water extraction ( $26 \pm 0.6\%$ ) (Fig. 2a).

Regarding the extraction efficiency of R-PE from *G. turuturu* of the French Atlantic coast, some comparisons with previous studies can be made. With the conventional extraction method (in sodium phosphate buffer), yields varied between 1.2 and 4.4 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw [2,6]. However, according to Fig. 4, after 2 h of extraction at 22 °C with UAEH or UAE, they reached 3.6  $\pm$  0.3 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> and 3.1  $\pm$  0.1 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw, respectively, which is in the range of the conventional solid–liquid extraction.

Whatever the temperature, the addition of enzymes always led to higher extraction rates (p < 0.05). At the end of the processes (360 min), no significant differences were noticed between UAE 22 °C and UAEH 22 °C while at 40 °C, the R-PE yield with UAEH was higher than with UAE, which could be associated with the positive action of enzymes at 40 °C, as previously mentioned.

Nevertheless, 22 °C is preferable as at this temperature, the thermal denaturation of R-PE is limited. This is in accordance with a previous study on the red seaweed *P. palmata*, which demonstrated that the extraction of R-PE, by enzymatic hydrolysis, was improved by reducing the temperature to 25 °C [7].

Based on these results, some assumptions can be formulated: **1** – R-PE would be more stable toward temperature in our soluble phase than in a tap-water extract due to the presence of other co-extracted compounds, such as polysaccharides or oligosaccharides (see below, Fig. 5a); **2** – the extraction yield of R-PE was the difference between extraction and denaturation over time; **3** – soluble R-PE could be more sensitive to sonication than non-extracted R-PE, leading to its denaturation over time. Indeed, a recent study on the UAE of watersoluble pigments from *Bougainvillea glabra* flowers found that temperature was more influential than cavitation on the extraction of pigments, as they are temperature-sensitive [33]. Thus, temperature could have both positive and negative effects: it increased the solubility of solids (including pigments) from the biomass (Fig. 3b) but, beyond a certain temperature, ultrasonic cavitation could be altered and pigments damaged by thermal denaturation.

In accordance with our assumption 3, it is possible that too long an exposure of pigments to ultrasonic waves, even at 22 °C, induced their structural destruction leading to a lower yield [33]. For example, at 22 °C, the extension of the UAEH treatment from one to six hours led to the denaturation of 31% of extracted R-PE.

It is important to keep in mind that sensitivity toward temperature and ultrasonic waves, depends on the type of molecules and the experimental parameters. As previously mentioned by Roselló-Soto et al. [34],



**Fig. 5.** Biochemical composition of soluble fractions at 360 min for ultrasound-assisted extraction (UAE) and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH) at 40 °C and 22 °C. a: Carbohydrates, b: Carbon and c: Nitrogen. Values are means  $\pm$  SD from three independent experiments (n = 3). Significant differences (p < 0.05) are indicated by different letters.

the UAE technique should be carefully used in the extraction of unstable compounds (like carotenoids and chlorophylls) and the conditions optimized accordingly.

In this study, one or 2 h of ultrasonic treatment of *G. turuturu* with or without enzymes at 22 °C appeared the most efficient to extract R-PE like the classic procedure. Furthermore, with this new process, the steps of freeze-drying and grinding in liquid nitrogen were avoided, saving time and energy. To an economical and trans positional point of view, and according to the ultrasonic reactor used there, such process could be used with volume up to 50 L moreover it could be upscaled to up to 200 or 300 L while with using the same technology and powered by a SONITUBE® 20 kHz. As mentioned in the study of Denis et al. [35], a membrane process dealing with the recovery of around 30 L  $\cdot$  day<sup>-1</sup> with a cost of 1  $\in \cdot L^{-1}$  of pre-purified fraction of 0.245 g of R-PE  $\cdot L^{-1}$ . Here, with a 3 L reaction mixture it's up to 0.306 g of R-PE

526

that could be extracted thus equivalent to 0.102 g of R-PE  $\cdot$  L<sup>-1</sup> without any purification.

#### 3.3.2. Carbohydrate, carbon and nitrogen contents

In order to qualify the dry matter content, some biochemical analyses were carried out on the resulting soluble fractions. To ensure the accuracy of our values, enzymatic cocktail carbohydrates were estimated at 427.43 mg of carbohydrate per g of enzymatic cocktail. This is in accordance with data provided by the suppliers as: Sumizyme TG contains 50% dextrins, Sumizyme MC is composed of 79% maltodextrins and Ultraflo® XL by 30% glycerol and 20% sorbitol. No data were communicated for Multifect® CX 15 L. In order to avoid an overestimation, these amounts were compared to dried seaweed, giving an overall value of 127.41 mg of carbohydrate per g of dried seaweed. This was removed from the biochemical composition of the resulting fractions obtained after 6 h of treatment are presented in Fig. 5.

The comparison of soluble carbohydrates extracted by sonication (UAE) and ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH) demonstrated that the temperature did not affect significantly the extraction of carbohydrates by sonication alone (Fig. 5a). However, at 40 °C, the combined process (UAEH) increased significantly the carbohydrate release (439  $\pm$  16 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw) compared to sonication alone (296  $\pm$  37 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw).

Thus, as previously noticed, the simultaneous combination of ultrasound and enzymes may have improved the process efficiency, leading to higher levels of polysaccharide extraction and hydrolysis (fermentable sugars) [15,16,18,30]. In our conditions, an increase in the temperature for the UAEH process significantly enhanced the extraction of soluble carbohydrates from 210 to 439 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw, which is in accordance with a previous work [17]. A relationship can be made between the extraction of carbohydrates and the results of the R-PE extraction yield (Fig. 4). For example, as mentioned in assumption 1 (3.3.1), it is possible that soluble carbohydrates contribute to R-PE preservation, as it seems that the presence of uncharged glucan could prevent the thermal degradation of R-PE [25]. At least some side effects of the released polysaccharides, such as antioxidant properties, could also contribute to this preservation [17,36].

Regarding carbon and nitrogen, whatever the temperature, they were better extracted by UAEH treatments compared to UAE ones (Fig. 5b and c). However, a positive temperature effect was only noticeable for carbon with UAEH as 83% of the initial carbon was extracted at 22 °C and 92% at 40 °C. For nitrogen, no statistical differences were observed between UAEH at 22 °C and 40 °C (Fig. 5c).

All these results clearly demonstrate an enzymatic effect as the polysaccharidases, with an optimal temperature close to 40  $^{\circ}$ C (Table 1), improved the extraction of carbohydrates and carbon components at 40  $^{\circ}$ C rather than nitrogen components. Differences between carbohydrates and carbon, for UAEH 22  $^{\circ}$ C, could be explained by the presence of carbon in both proteins and carbohydrates.

#### 4. Conclusions

These results highlight some differences between R-PE extraction and seaweed liquefaction. For liquefaction, the UAEH process at 40 °C for 6 h (at least 4 h) appeared to be the best condition with up to 91% of solubilized material. For R-PE, both UAE and UAEH at 22 °C (60–120 min) were suitable, with extraction yields (around 3.6 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup> dw for UAEH) close to conventional solid–liquid extraction. However, UAEH 22 °C also demonstrated a greater extraction of other water-soluble compounds. Thus, further work is needed in order to find the best compromise for R-PE extraction and *G. turuturu* liquefaction.

#### Acknowledgments

This research was supported by the Région Pays de La Loire and the MSH Ange Guépin, France (COSELMAR project). We thank DSM, Novozymes® and Takabio for kindly providing the enzymes, SYNETUDE for providing the SONITUBE® and Carol Robins for her expertise in scientific English. The authors thank Marion Liennard and Andrea Villa López for their active involvement in this study, and Ewa Lukomska for elemental analyses.

#### References

- R.S. Baghel, N. Trivedi, V. Gupta, A. Neori, C.R.K. Reddy, A. Lali, et al., Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals, Green Chem. 17 (2015) 2436–2443, http://dx.doi.org/10.1039/C4GC02532F.
- [2] M. Munier, J. Dumay, M. Morançais, P. Jaouen, J. Fleurence, Variation in the biochemical composition of the edible seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada harvested from two sampling sites on the Brittany Coast (France): the influence of storage method on the extraction of the seaweed pigment R-phycoerythrin, J. Chem. 2013 (2013) 1–8, http://dx.doi.org/10.1155/2013/568548.
  [3] J. Dumay, M. Morançais, M. Munier, C. Le Guillard, J. Fleurence, Chapter eleven —
- [3] J. Dumay, M. Morançais, M. Munier, C. Le Guillard, J. Fleurence, Chapter eleven phycoerythrins: valuable proteinic pigments in red seaweeds, in: N. Bourgougnon (Ed.), Advances in Botanical Research, Sea Plants, Academic Press 2014, pp. 321–343.
- [4] M. Munier, S. Jubeau, A. Wijaya, M. Morançais, J. Dumay, L. Marchal, et al., Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*, Food Chem. 150 (2014) 400–407, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.113.
- [5] A.N. Glazer, Phycobiliproteins a family of valuable, widely used fluorophores, J. Appl. Phycol. 6 (1994) 105–112, http://dx.doi.org/10.1007/BF02186064.
- [6] C. Denis, M. Morançais, M. Li, E. Deniaud, P. Gaudin, G. Wielgosz-Collin, et al., Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France), Food Chem. 119 (2010) 913–917, http://dx.doi.org/10.1016/j. foodchem.2009.07.047.
- [7] J. Dumay, N. Clément, M. Morançais, J. Fleurence, Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction, Bioresour. Technol. 131 (2013) 21–27, http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.146.
- [8] W.A.J.P. Wijesinghe, Y.-J. Jeon, Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review, Fitoterapia 83 (2012) 6–12, http://dx.doi.org/10.1016/j. fitote.2011.10.016.
- [9] C. Denis, M. Morançais, P. Gaudin, J. Fleurence, Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from *Grateloupia turuturu*, Bot. Mar. 52 (2009) 262–267, http://dx.doi.org/10.1515/BOT.2009.035.
- [10] T.J. Mason, F. Chemat, M. Vinatoru, The extraction of natural products using ultrasound or microwaves, Curr. Org. Chem. 15 (2011) 237–247, http://dx.doi.org/10. 2174/138527211793979871.
- [11] S.U. Kadam, B.K. Tiwari, C.P. O'Donnell, Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 4667–4675, http:// dx.doi.org/10.1021/jf400819p.
- [12] S.U. Kadam, B.K. Tiwari, T.J. Smyth, C.P. O'Donnell, Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed Ascophyllum nodosum using response surface methodology, Ultrason. Sonochem. 23 (2015) 308–316, http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007.
- [13] F. Wang, X.-Y. Guo, D.-N. Zhang, Y. Wu, T. Wu, Z.-G. Chen, Ultrasound-assisted extraction and purification of taurine from the red algae *Porphyra yezoensis*, Ultrason. Sonochem. 24 (2015) 36–42, http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014. 12.009.
- [14] J. Benavides, M. Rito-Palomares, Simplified two-stage method to B-phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*, J. Chromatogr. B 844 (2006) 39–44, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.06.029.
- [15] Y. Liu, G. Gong, J. Zhang, S. Jia, F. Li, Y. Wang, et al., Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*, Carbohydr. Polym. 110 (2014) 278–284, http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014. 03.040.
- [16] F.C. Lunelli, P. Sfalcin, M. Souza, E. Zimmermann, V. Dal Prá, E.L. Foletto, et al., Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars, Biosyst. Eng. 124 (2014) 24–28, http://dx.doi.org/10.1016/j. biosystemseng.2014.06.004.
   [17] H. Wu, J. Zhu, W. Diao, C. Wang, Ultrasound-assisted enzymatic extraction and anti-
- [17] H. Wu, J. Zhu, W. Diao, C. Wang, Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*), Carbohydr. Polym. 113 (2014) 314–324, http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.025.
- [18] V. Yachmenev, B. Condon, T. Klasson, A. Lambert, Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagases celluloses by low intensity uniform ultrasound, J. Biobased Mater. Bioenergy 3 (2009) 25–31, http://dx.doi.org/10.1166/ jbmb.2009.1002.
- [19] M. Bashari, A. Eibaid, J. Wang, Y. Tian, X. Xu, Z. Jin, Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase, Ultrason. Sonochem. 20 (2013) 155–161, http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.06.010.
- [20] C. Peña-Farfal, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, P. Bermejo-Barrera, H. Pinochet-Cancino, I. de Gregori-Henríquez, Speeding up enzymatic hydrolysis procedures for the multi-element determination in edible seaweed, Anal. Chim. Acta 548 (2005) 183–191, http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.004.

#### C. Le Guillard et al. / Algal Research 12 (2015) 522-528

- [21] L. Korzen, I.N. Pulidindi, A. Israel, A. Abelson, A. Gedanken, Single step production of bioethanol from the seaweed Ulva rigida using sonication, RSC Adv. 5 (2015) 16223–16229, http://dx.doi.org/10.1039/C4RA14880K.
- [22] S. Beer, A. Eshel, Determining phycoerythrin and phycocyanin concentration in aqueous crude extracts of red algae, Aust. J. Mar. Freshwat. Res. 36 (1985) 785–792. [23] M.F. Chaplin, Monosaccharides, in: M.F. Chaplin, J.F. Kennedy (Eds.), Carbohydrate
- Analysis: A Practical Approach, Oxford, First, IRL Press 1986, pp. 1–36. [24] A. Orta-Ramirez, J.E. Merrill, D.M. Smith, pH affects the thermal inactivation parameters of R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*, J. Food Sci. 65 (2000) 1046–1050, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09415.x.
- [25] E. D'Agnolo, E. Murano, R. Rizzo, S. Paoletti, A biliprotein from the red alga Gracilaria *longa*: thermal stability of R-phycoerythrin, Ital. J. Biochem. 42 (1993) 316A–318A.
- [26] Y. Tao, Z. Zhang, D.-W. Sun, Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: influence of acoustic energy density and temperature, Ultrason. Sonochem. 21 (2014) 1461–1469, http://dx.doi.org/10. [27] E.X. Leaes, D. Lima, L. Miklasevicius, A.P. Ramon, V. Dal Prá, M.M. Bassaco, et al.,
- Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase, Biocatal. Agric. Biotechnol. 2 (2013) 21–25, http://dx.doi.org/ 10.1016/j.bcab.2012.08.003.
- [28] M. Souza, E.T. Mezadri, E. Zimmerman, E.X. Leaes, M.M. Bassaco, V. Dal Prá, et al., Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradia-tion, Ultrason. Sonochem. 20 (2013) 89–94, http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch. 2012.05.012.
- [29] J. Wang, Y. Cao, B. Sun, C. Wang, Y. Mo, Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic, Ultrason. Sonochem. 18 (2011) 534–540, http://dx.doi. org/10.1016/j.ultsonch.2010.09.008.

- [30] E.X. Leaes, E. Zimmermann, M. Souza, A.P. Ramon, E.T. Mezadri, V. Dal Prá, et al., Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of cassava waste to obtain fermentable sugars, Biosyst. Eng. 115 (2013) 1–6, http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng. 2013.02.001.
- [31] O.E. Szabó, E. Csiszár, The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme, Carbohydr. Polym. 98 (2013)
- 1483–1489, http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.017. B. Özbek, K.Ö. Ülgen, The stability of enzymes after sonication, Process Biochem. 35 (2000) 1037–1043, http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00141-2. [32]
- J.P. Maran, B. Priya, C.V. Nivetha, Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from *Bougainvillea glabra* flowers, Ind. Crop. Prod. 63 (2015) 182–189, http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.059. [33]
- For interview and the second secon [34] assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions, Trends Food Sci. Technol. 42 (2015) 134-149, http://dx.doi.org/10. 1016/i.tifs.2015.01.002.
- C. Denis, A. Massé, J. Fleurence, P. Jaouen, Concentration and pre-purification with [35] ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: process definition and up-scaling, Sep. Purif. Technol. 69 (2009) 37–42, http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2009.06.017.
- C. Zhou, X. Yu, Y. Zhang, R. He, H. Ma, Ultrasonic degradation, purification and anal-ysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Udea, Carbohydr. Polym. 87 (2012) 2046–2051, http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol. [36] 2011.10.026

528

# Annexe 3

# Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

# Advances in Botanical Research, Volume 71

Référence :

Dumay, J., Morançais, M., Munier, M., Le Guillard, C., Fleurence, J., 2014. Chapter Eleven -Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. *In* Nathalie Bourgougnon éd. *Advances in Botanical Research,* Sea Plants. p. 321–343. Academic Press.

> > CHAPTER ELEVEN

# Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

# Justine Dumay<sup>1</sup>, Michèle Morançais, Mathilde Munier,

Cécile Le Guillard and Joël Fleurence

LUNAM, Université de Nantes, Nantes, France

 $^1 Corresponding \ author: e-mail \ address: justine.dumay@univ-nantes.fr$ 

# Contents

11.1	Introduction	322
11.2	Red Seaweed: Biochemical Composition and Nutritional Value	323
	11.2.1 Biochemical Composition	323
	11.2.1.1 Protein and Amino Acid Composition	323
	11.2.1.2 Carbohydrate Composition	324
	11.2.1.3 Lipid and Fatty Acid Composition	325
	11.2.2 Nutritional Value	325
11.3	R-Phycoerythrin and Phycobiliproteins: Function, Structure and Utilization	326
	11.3.1 Location and Function of Phycobilisomes	326
	11.3.2 Chromophore Structure	329
	<b>11.3.3</b> Structure of Phycobiliproteins	329
	11.3.3.1 Phycoerythrocyanin	330
	11.3.3.2 Allophycocyanin	331
	11.3.3.3 Phycocyanin	331
	11.3.3.4 Phycoerythrin	332
	<b>11.3.4</b> Utilization of Phycoerythrins	333
	11.3.4.1 Colorant	333
	11.3.4.2 Fluorescent Probe	334
	11.3.4.3 Bioactivity	334
11.4	Phycoerythrin Extraction and Purification Procedures	334
	<b>11.4.1</b> Extraction Processes	334
	11.4.1.1 Classic Processes	334
	11.4.1.2 Enzymatic Processes	335
	<b>11.4.2</b> Purification Processes of Phycoerythrins	336
11.5	Concluding Remarks and Future Prospects	339
Refer	ences	339

Advances in Botanical Research, Volume 71		
ISSN 0065-2296	© 2014 Elsevier Ltd.	
http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00011-1	All rights reserved.	321

### Abstract

Seaweeds are traditionally used as sea vegetables in Asian countries but their consumption by western people is marginal. Species used as sea vegetables are mainly red and brown algae. The biochemical content of marine red algae provides a high nutritional value, similar to that found in traditional vegetable food sources. Nowadays, the use of red seaweeds as sources of proteins, pigments, or minerals appears to be an interesting opportunity for the valorization of a marine resource. Phycobiliproteins, which are the main light-harvesting pigments of photosystem II in Cyanobacteria and Rhodophyta, are the only water-soluble algal pigments. Their specific structure and function confer a wide range of applications. R-phycoerythrin is one of these soluble proteins and is widely used as a fluorescent probe or food colorant depending on its purity. Numerous studies have been conducted to extract and purify phycoerythrins using various methods.

# **11.1 INTRODUCTION**

Marine macroalgae have a long history of use as foods and colorants in Asia but are much less common in Europe and North America. Mainly red and brown seaweeds are harvested and cultivated for use in the food, agricultural or medicine sectors (Dawczynski, Schubert, & Jahreis, 2007). Generally, marine algae are used in human or animal foods for their mineral content or for the functional properties of their polysaccharides. They are rarely promoted for the nutritional value of their proteins. However, some red seaweeds, such as *Porphyra tenera* and *Palmaria palmata*, can have protein contents higher than those recorded in pulses such as soybean (Fleurence, 1999b). Other algae, such as *Ulva*, *Undaria* or *Enteromorpha*, have protein levels comparable to those reported for common vegetables (Amano & Noda, 1990). Conditioned by their marine environment, macroalgae produce unique and interesting active compounds (Fitzgerald, Gallagher, Tasdemir, & Hayes, 2011).

Phycobiliproteins, which are the main light-harvesting pigments of photosystem II in Cyanobacteria and Rhodophyta, are the only water-soluble algal pigments. In most of these species, the phycobiliprotein content is relatively high and can reach around 50% of water-soluble proteins (Gantt & Lipschultz, 1974; Ke, 2001) and up to 60% in a filamentous blue-green cyanobacteria (Tandeau de Marsac, Castets, & Cohen-Bazire, 1980). Moreover, phycobiliproteins can represent up to 20% of dry algal material (Bogorad, 1975). They are constituted of one proteinic part linked by a covalent bond to a prosthetic group: the *chromophore* (also named bilin) (Glazer et al., 1976). These molecules are oligomeric proteins composed of two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , both coming probably from a common ancestor (Glazer, 1989). Contrary to other biliproteins, R-phycoerythrin is the only one to possess an extra  $\gamma$  subunit, increasing the stability of the pigment structure (Glazer & Hixson, 1977; Hilditch, Balding, Jenkins, Smith, & Rogers, 1991). Phycoerythrin (PE), like other phycobiliproteins, is highly water soluble and its proteinic nature has led to much interest and many applications (Sekar & Chandramohan, 2008).

Recently, methods have been improved to recover highly purified PEs using mild technologies as outlined in the final part of this chapter.

# **11.2 RED SEAWEED: BIOCHEMICAL COMPOSITION** AND NUTRITIONAL VALUE

Most of the red seaweeds are consumed as sea vegetables. One example is the species P. tenera or P. yezoensis, well known under the name of nori (Nisizawa, Noda, Kikuchi, & Watanabe, 1987). The world production of this genus was established as 22,060,504 tons expressed in fresh weight (FAO, 2011). The red algae belonging to the genus Gracilaria are also cultivated for food, being used as sea vegetables (ogo-nori), for abalone breeding and mainly for agar production. In France, some red seaweed species are authorized for human consumption (Mabeau & Fleurence, 1993); P. palmata or dulse, Gracilaria gracilis or ogo-nori, and Porphyra umbilicalis or nori.

As described below, the biochemical composition and nutritional value of this resource justify the traditional consumption of red seaweeds in human or animal nutrition.

# 11.2.1 Biochemical Composition

## 11.2.1.1 Protein and Amino Acid Composition

Some red seaweeds are characterized by a high protein content (Table 11.1). For example, Japanese authors reported a protein content of 47% DW for the species P. tenera (Fujiwara-Arasaki, Mino, & Kuroda, 1984), which

(Fujiware-Arasaki et al., 1984; Fleurence, 2004; Denis et al., 2010)							
<b>c</b> .	Porphyra	Palmaria	Grateloupia	Gracilaria			
Species	tenera	paimata	turuturu	gracilis			
Protein content (% DW)	33.0-47.0	8.0–35.0	14.0–27.5	7.0–25.0			

Table 11.1 Seasonal Variation in Protein Content of Some Edible Red Seaweeds

is similar to that of soybean oilcake (50% protein). The red seaweed *P. palmata* (dulse) was described as containing up to 35% protein DW (Morgan, Wright, & Simpson, 1980). However, this amount was obtained from seaweeds cultivated in tanks supplied with nitrogen nutrients. In natural environments, such as on the coasts of Brittany (France), the maximal level of proteins recorded for this species was 25% DW (Galland-Irmouli et al., 1999).

In addition, protein levels in red seaweeds are subject to significant seasonal variation. In *P. palmata*, the protein content ranges from 8% to 35% DW (Table 11.1). A seasonal variation in protein level has also been reported for *Grateloupia turuturu*, an invasive red seaweed on the French coast, consumed as a sea vegetable in Japan (Denis et al., 2010). For this species, the lowest amounts of proteins were observed in summer (14% protein DW) and the highest at the end of winter (27.5% protein DW) (Table 11.1).

The amino acid content of red seaweeds is also subject to variations (Table 11.2). However, a species such as *P. palmata* is characterized by a high level of methionine (up to 4.5 g/100 g protein) in comparison with other red algae (Fleurence, 2004). This feature distinguishes this species both from other seaweeds and from plants such as legumes.

### 11.2.1.2 Carbohydrate Composition

Like the protein level, the carbohydrate content of red algae varies according to the species and the season. Some authors consider the approximate carbohydrate composition of red seaweeds to fall between 30% and 60% DW (Jensen, 1993). For *P. palmata*, it lies between 38% and 74% DW (Morgan et al., 1980). Carbohydrates mainly consist of acidic xylans and cellulose (Deniaud, Quemener, Fleurence, & Lahaye, 2003). The carbohydrate level can also vary according to the cultivation conditions. The cultivation of *G. gracilis*, previously called *Gracilaria verrucosa*, a seaweed producing agar, is a well-known example. In this species, the carbohydrate content is 35.9%

**Table 11.2** Methionine Content of Some Red Seaweeds Compared to Other FoodSources (Egg, Soybean) (Fujiwara-Arasaki et al., 1984; Fleurence, 2004; Fleurence et al.,2012)

Food source	Porphyra tenera	Palmaria palmata	Grateloupia turuturu	Soybean	Ovalbumin
Methionine content	1.1	4.5	2.0	1.4	3.1

g amino acid/100 g protein

Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

DW when the nitrogen input in the cultivation medium is minimal and 14.7% in conditions where the nitrogen input is maximal (Bird, 1984).

#### 11.2.1.3 Lipid and Fatty Acid Composition

Generally, seaweeds are poor in lipids (<3% DW). For red species such as *P. tenera*, a level of 0.8% DW was recorded (Anonymous, 1969). Regarding the species consumed in Europe, such as *Porphyra dioica*, previously called *P. umbilicalis, Chondrus crispus, P. palmata* and *G. gracilis*, the amounts reported are 3.4%, 0.6%, 1.6% and 1.3% DW, respectively (Fleurence, Gutbier, Mabeau, & Leray, 1994). There are few studies on the seasonal variations in lipid content in red seaweeds. Recent research on *G. turuturu* showed an absence of variation in lipid content in relation to the season (2.31–2.78% DW) (Denis et al., 2010). However, small variations in lipid content (3.3–4.1% DW) were reported on *G. turuturu* collected in the same places but in another year (2009) (Kendel et al., 2013). In this last study, no marked variations were observed for glycolipids (42.3–46.8% DW), whereas phospholipids and neutral lipids varied significantly between summer and winter.

Red algae are known to contain large amounts of C20 polyunsaturated fatty acids. A high level of eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5 n-3) was reported for *Porphyra* sp. from Japan and Korea (Dawczynski et al., 2007). Similar data were observed for other red seaweeds collected on the coasts of Brittany. The levels of EPA in *P. umbilicalis*, *P. palmata* and *G. gracilis* were 48%, 46% and 26%, respectively, of the total fatty acid fraction (Fleurence et al., 1994).

## 11.2.2 Nutritional Value

Their high protein content is the main nutritional interest for the use of red seaweeds in human and animal foods (Fleurence et al., 2012). Among the species consumed in Europe, *P. palmata* has a high nutritional value. First, the protein content in spring (25% DW) is similar to that reported for the soybean plant, which is a widely used food protein source. Secondly, essential amino acids constitute almost 46% of the total amino acid fraction (Fleurence, 2004). This proportion is close to that reported for ovalbumin, which is the reference for determining the nutritional value of food protein.

However, the nutritional interest of the seaweed protein fraction is not limited to the protein content and composition. The digestibility of proteins is an important criterion to assess their true nutritional value. Unfortunately, the *in vitro* digestibility of *P. palmata* proteins is limited by the presence of water-soluble xylans, which are antinutritional factors (Galland-Irmouli

Justine Dumay et al.

**Table 11.3** In vitro Digestibility after 6 h of Casein, Gracilaria gracilis and Palmariapalmata Proteins (Marrion et al., 2005)

	Casein	G. gracilis proteins	P. palmata proteins
In vitro digestibility (%)	38.7	30.4	10.3

et al., 1999). However, their digestibility can be significantly improved by carrying out previous fermentation treatments on the thalli (Marrion, Schwertz, Fleurence, Guéant, & Villaume, 2003).

Although enzymatic or fermentation treatment is useful for *P. palmata*, it is not necessary for other species, such as the red seaweed *G. gracilis* which can be readily eaten as vegetable under the name ogo-nori. This species has a protein level similar (25% DW) (Table 11.1) to that reported for *P. palmata*. A comparative study on the digestibility of protein fractions from both these species showed that *G. gracilis* proteins were more digestible than those of *P. palmata*. Effectively, without any previous enzymatic digestion or fermentation, *G. gracilis* protein digestibility was 30% after 6 h of digestion compared to 10% for *P. palmata* proteins in the same conditions (Table 11.3) (Marrion et al., 2005).

# **11.3 R-PHYCOERYTHRIN AND PHYCOBILIPROTEINS: FUNCTION, STRUCTURE AND UTILIZATION**

# 11.3.1 Location and Function of Phycobilisomes

The phycobiliproteins are subnumerary pigments organized *in vivo* in supramolecular structures called *phycobilisomes* (Gantt, 1980).

The main function of this remarkable photon collector is the survival of living organisms at low light intensities. In fact, as yellow and green radiations are quickly vanished according to depth, the phycobilisomes are able to absorb light in spectral zones where chlorophyll a cannot, and to transmit the energy to the photosystem II reactive center (Glazer, 1989; Ke, 2001).

Phycobilisomes are located on the external structure of thylakoid membranes, in the stroma (Figure 11.1). They have a supramolecular structure with a diameter ranging from 30 to 60 nm. They are constituted by an association of phycobiliproteins which allows the transfer of light energy according to the pathway described in Figure 11.2 (Bald, Kruip, & Rögner, 1996; Glazer & Hixson, 1977; Sun, Wang, Gong, & Chen, 2004).

Thus, these structures can transmit the light energy from chromophores absorbing at green wavelengths (such as PEs) to chromophores absorbing at red ones (such as allophycocyanins (APCs)) (Glazer & Hixson, 1977).

326

327





**Figure 11.1** Schematic representation of the thylakoid membrane and phycobilisomes. CF, coupling factor; PS, photosystem. (See the colour plate.)



Figure 11.2 Light energy transfer pathway through phycobilisomes.

Four types of phycobilisome structure have been highlighted (bundleshaped, hemi-discoidal, hemi-ellipsoidal and block-shaped), but only two are predominant:

- The hemi-ellipsoidal type which is found in red algae. Phycobilisome of this type are 40 nm long, 19 nm wide and 28 nm high.
- The globular type, which is more complex, is found in only some Rhodophyta.

The design of the phycobilisome (Figure 11.3) is such that excitation energy is delivered from any one of these many chromophores to a reaction center in the photosynthetic membrane with an efficiency approaching 100% (Glazer, 1984).

As described above, phycobilisomes have two morphologically distinct substructures: the rods and the core. The core is essentially composed of APCs and is linked to polypeptides responsible for the thylakoid connection. The core is composed of three cylinders, each constituted of four disks, which consist of APC trimer. The other major biliproteins are confined to





Figure 11.4 Diagram of phycobiliprotein subunit assemblage.

the rod substructure, shaped like a stick. Each stick is composed of disks made up of hexamers of distinct phycobiliproteins and linked with a polypeptide. A diagram of disk formation is given in Figure 11.4.

The linkage polypeptides represent around 15% (according to the species) of the proteinic part of the phycobilisome (Tandeau de Marsac & Cohen-bazire, 1977). Their main functions are first to fix the phycobilisome to the thylakoid membrane and second to stabilize the phycobilisome structure. Moreover, they ensure phycobiliprotein cohesion in the phycobilisome. In fact, while phycobiliproteins are acidic and hydrophilic, linkage polypeptides are basic and hydrophobic, thus allowing some interactions between these constituents (Ke, 2001). The polypeptides can be divided into four groups according to their molecular weight (Ducret et al., 1998; Glazer, 1984):

329

Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

- Group I or  $L_{CM}$  (70–120 kDa): phycobilisome fixation to thylakoid membranes. They act as final emitters of the collecting antenna and contribute to the light energy transfer to photosystem II.
- Group II or  $L_R$ ,  $L_{RC}$  (25–35 kDa): stabilization of phycobiliprotein in the stick structure and fixation of the rod to the core.
- Group III (12–22 kDa): this group is constituted of phycobiliprotein subunits, an 18.3 kDa polypeptide and the α subunit of APC B.
- Group IV or  $L_C$  (9–12 kDa): assembly and fixation of the core.

Hence, the linkage polypeptides determine the aggregation state of the phycobiliprotein and influence both different subunit positions and chro-mophore conformation (Glazer, 1984).

## 11.3.2 Chromophore Structure

Bilin chromophores are tetrapyrrolic structures, closely related to the mammalian blue pigments biliverdin and bilirubin (Brown, Holroyd, & Vernon, 1984). Unlike chlorophylls, these chromophores are not cyclized. Depending on their origin, phycobilisomes contain between 300 and 800 tetrapyrrol chromophores (Glazer, 1984), which confer spectral properties on the phycobiliproteins. Four types of chromophore are found in Cyanobacteria and Rhodophyta. The first two described were phycocyanobilin (PCB) and phycoerythrobilin (PEB). Thereafter, two other chromophores were identified: phycourobilin (PUB) and phycobiliviolin (PXB). All four structures are represented in Figure 11.5.

Chromophores differ according to their absorption wavelength maxima as depicted in Figure 11.5 (Apt, Collier, & Grossman, 1995). PXB is a minor chromophore only located on the  $\alpha$  subunit of phycoerythrocyanin, so it has been little studied to date.

## 11.3.3 Structure of Phycobiliproteins

All the major biliproteins are oligomers of an  $\alpha\beta$  monomer, where  $\alpha$  and  $\beta$  are dissimilar polypeptide chains of approximately 160–180 amino acid residues (Glazer, 1984). Glazer summarized several studies showing that all the polypeptides that make up the biliproteins are encoded by a family of closely related genes (Glazer, 1984). Originally, they were divided into two categories according to their colour: PEs with a soft pink colour and orange fluorescence and phycocyanins (PCs) with a blue colour and red fluorescence. They were then classified according to the chemical nature of their chromophores and the spectral properties of the native proteins (Bogorad, 1975; Glazer & Hixson, 1975). Hence, prefixes were introduced

Justine Dumay et al.



Figure 11.5 Chemical structures of bilin chromophores.

Phycobiliprotein	Colour	Prefix	Max. Absorption (nm)	Shoulder Absorption (nm)	Max. Fluorescence Emission (nm)
Phycoerythrocyanin	Orange	_	568/570	595	625
Allophycocyanin	Blue	_	618/671	_	675
Phycocyanin	Blue	С	620	_	640
		R	555/617	_	636
Phycoerythrin	Pink	R	565/540	498	575
		В	565/545	499	576
		b	545	565	570
		С	560	_	577

 Table 11.4
 Spectral Properties of Phycobiliproteins According to Bryant (1982)

 Max
 Shoulder
 Max

to distinguish the phycobiliprotein subclasses: C for Cyanobacteria species, R for Rhodophyta and B for Bangiales (Kornprobst, 2011). A third class has been highlighted: the phycoerythrocyanins, which possess similar spectral properties to PE (Bryant, Glazer, & Eiserling, 1976). Table 11.4 summarizes the main differences between the different phycobiliproteins.

## 11.3.3.1 Phycoerythrocyanin

Phycoerythrocyanin was first described in 1976 by Bryant et al. This phycobiliprotein is found in a few Cyanobacteria unable to synthesize PE. Thus,

330


phycoerythrocyanin is an efficient alternative for light absorption at wavelengths close to those absorbed by PE (568 nm instead of 565 nm). It can be found in trimeric ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> or hexameric ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> form. The PXB chromophore, specific to phycoerythrocyanin, is located on the  $\alpha$  subunit while the  $\beta$  subunit possesses two PCB chromophores (Figure 11.6).

### 11.3.3.2 Allophycocyanin

APC is mostly defined by a 110 kDa molecular weight trimer  $(\alpha\beta)_3$ . Both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits possess one PCB chromophore (Figure 11.6). Its maximum absorption wavelength is 650 nm, corresponding approximately to the second maximum of chlorophyll b, leading to its nickname: blue-green and red algae chlorophyll b (Bogorad, 1975). APC is a minor pigment representing only 5% of water-soluble proteins in *Porphyridium cruentum* (Gantt & Lipschultz, 1974). It possesses an intermediary function in the energy transfer mechanism through the chlorophyll a reaction centers. Hence, APC is one of the core constituents near the start of the rod (PEs).

# 11.3.3.3 Phycocyanin

PC is found in Cyanobacteria, Rhodophyta and Cryptophyta. Hence, according to the classification mentioned above, two types have been

described: C-PC and R-PC. C-PC is the most widespread. Like in APC, both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits possess a PCB chromophore but the  $\beta$  subunits have two chromophores (Figure 11.6). The conformation of APC can change according to pH; it is hexameric ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> at pH 5–6 and trimeric ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> at pH 7.

# 11.3.3.4 Phycoerythrin

PE is the main pigment found in Rhodophyta but it can also be recovered from Cyanobacteria (Glazer, 1994). Like other phycobiliproteins, different forms occur according to the algal species: R-PE (for Rhodophyta), B-PE (for Bangiales), b-PE and C-PE (for Cyanobacteria). B-PE and R-PE are the most abundant PEs in red algae. Both are composed of  $(\alpha\beta)_6\gamma$  complexes and have a molecular weight between 240 and 260 kDa (Sun et al., 2009) while C-PE and b-PE are  $(\alpha\beta)$  complexes without any  $\gamma$  subunit (Figure 11.7).

### 11.3.3.4.1 R-Phycoerythrin

R-PE is the major phycobiliprotein in red algae (Glazer, 1984) and can also be found in Cyanobacteria (Bryant, 1982). It is a hexameric  $(\alpha\beta)_6\gamma$  240 kDa molecular weight protein (Galland-Irmouli et al., 2000; Glazer, 1989). The  $\gamma$  subunit is located in the center of the molecule and links the  $(\alpha\beta)_3$  trimers conferring a high stability on the pigment (Wang, Zhou, & Zeng, 1998).



Figure 11.7 Phycoerythrin structures. (See the colour plate.)

332

#### 333

# 11.3.3.4.2 B-Phycoerythrin

B-PE is characteristic of the Bangiales algae (Gantt & Lipschultz, 1974). It is a 245 kDa molecular weight protein and represents 2–6% DW of the algae (Rebolloso Fuentes, Acién Fernández, Sánchez Pérez, & Guil Guerrero, 2000). It also has a hexameric ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> $\gamma$  structure and possesses the same chromophores as R-PE but its absorption spectrum is slightly different as depicted in Table 11.4 (Glazer, 1982; Glazer & Hixson, 1977; Tchernov, Minkova, Georgiev, & Houbavenska, 1993).

# 11.3.3.4.3 b-Phycoerythrin

b-PE is synthesized by the same organisms as B-PE but is composed of an  $(\alpha\beta)_n$  complex (Figure 11.7) with *n* ranging from 1 to 6. It is a smaller molecule than B-PE but shows strong structural similarities. The unique feature of this PE is due to its chromophore composition where only PEB is represented.

### 11.3.3.4.4 C-Phycoerythrin

C-PE is synthesized by Cyanobacteria and isolated as hexameric or trimeric complexes. Unusually, the  $\beta$  subunit is linked to four chromophores (all PEB) while in the other PEs, the  $\beta$  subunit carries only three chromophores.

# 11.3.4 Utilization of Phycoerythrins

Phycobiliproteins have a variety of uses and offer interesting industrial perspectives.

# 11.3.4.1 Colorant

PC from *Arthrospira platensis*, previously called *Spirulina*, is currently commercialized as a blue colorant in the food industry under the name of Lina Blue (Dainippon Ink & Chemicals, Sakura). This pigment can be used in the production of gums, sorbets, ice-cream, candies, soft beverages, wasabi or dairy products (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006). Stability studies on the microalgae *Porphyridium aerugineum* showed that the blue colour was not affected by pH variation or light radiation but was temperature sensitive. However, its stability was significantly increased in dry preparations (Sekar & Chandramohan, 2008).

B-PE and b-PE extracted from *P. cruentum* are used as red colorants in the food industry, especially for jellified desserts and dairy products. R-PE from the seaweed *Porphyra* sp. can also be used as a food colorant (Dufossé et al., 2005). There are many patents regarding the utilization of PEs as

food colorants (Sekar & Chandramohan, 2008), mainly intended for Asiatic countries.

# 11.3.4.2 Fluorescent Probe

PE possesses a high molar extinction coefficient ( $\varepsilon = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for 240 kDa) and a high fluorescence yield, at least 10 times more than those usually observed (Kronick, 1986; Yu, Glazer, Spencer, & West, 1981). Moreover, the background noise occurring in orange wavelength emission is lower than for other spectrum areas. These fluorescent properties are widely used in various applications. R-PE and phycobiliproteins can also be exploited as a moiety in fluorescent energy transfer, fluorescent labels, tags, tracers and markers, which are useful in flow cytometry, fluorescent immunoassays, immunophenotyping and other such fluorescent studies (Glazer, 1994; Isailovic, Sultana, Phillips, & Yeung, 2006; Sekar & Chandramohan, 2008).

# 11.3.4.3 Bioactivity

Lastly, R-PE also possesses some biological activities, such as antitumoral ones in which R-PE subunits have been indicated as an attractive option for improving the selectivity of photodynamic therapy in mouse tumor cells and human liver carcinoma cells (Sekar & Chandramohan, 2008). Other effects reported include antioxidant (Fitzgerald et al., 2011; Pangestuti & Kim, 2011), antidiabetic, antitumoral (Fitzgerald et al., 2011), immunosuppressive and antihypertensive (Cian, Martínez-Augustin, & Drago, 2012). R-PE subunits could constitute a good alternative to increase the selectivity of photochemotherapy in cancer treatments (Bei, Guang-Ce, Chen-Kui, & Zhen-Gang, 2002).

# $\rangle$

# 11.4 PHYCOERYTHRIN EXTRACTION AND PURIFICATION PROCEDURES

# 11.4.1 Extraction Processes

# 11.4.1.1 Classic Processes

PEs can be extracted by soaking seaweeds in water for one or several days (Niu, Wang, & Tseng, 2006; Siegelman & Kycia, 1978; Wang, 2002). This method extracts the proteins by osmotic shock (Fleurence & Guyader, 1995). However, this type of extraction takes a long time and its main disadvantage is the partial degradation of PEs by proteases. Generally, PEs are extracted in diluted phosphate buffer (5–50 mM, pH 7) from fresh algae (D'Agnolo,

Rizzo, Paoletti, & Murano, 1994; Hilditch et al., 1991; Senthilkumar et al., 2013; Sun et al., 2009), frozen algae (Bermejo et al., 2003; Bermejo, Ruiz, & Acien, 2007; Chuner et al., 2012; Liu, Chen, Zhang, Zhang, & Zhou, 2005) or freeze-dried algae (Galland-Irmouli et al., 2000; Kaixian, Franklin, & Borowitzka, 1993; Munier et al., in press; Rossano, Ungano, D'Ambrosio, Liuzzi, & Riccio, 2003).

Currently, most procedures used are based on cell wall breakage. The macroalgae are ground in liquid nitrogen and the resulting powder is homogenized in sodium phosphate buffer (5–50 mM, pH 7) (D'Agnolo et al., 1994; Galland-Irmouli et al., 2000; Hilditch et al., 1991; Munier, Dumay, Morançais, Jaouen, & Fleurence, 2013). Grinding in liquid nitrogen is used to facilitate the destruction of the cell wall, which is the main obstacle to accessing and extracting algal proteins. However, this approach is not totally efficient for cell wall degradation and is also costly on an industrial scale.

Alternative extraction methods for PEs and seaweed proteins were investigated and enzymatic hydrolysis of the cell wall was suggested as another way of accessing algal proteins (Amano & Noda, 1990; Fleurence, 1999a).

### 11.4.1.2 Enzymatic Processes

Nowadays, as described earlier, PE is mainly extracted by grinding the algal sample in liquid nitrogen, then homogenizing it in phosphate buffer before centrifugation (Denis, Massé, Fleurence, & Jaouen, 2009; Sun et al., 2009). The presence of various polysaccharides in large quantities in the cell wall of many rhodophyceae reduces the extraction efficiency of classic extraction methods. In fact, seaweed proteins are not as bioavailable as expected due to their polysaccharide content (xylans, agar, carrageenan or alginates), which limits the accessibility of protein fractions (Horie, Sugase, & Horie, 1995), and also due to the strong covalent bonding between mix-linked xylan and glycoprotein complexes, as reported for P. palmata (Deniaud, Fleurence, & Lahaye, 2003). However, new kinds of extraction techniques have recently appeared, such as enzymolysis and microwave-assisted extraction (Wijesinghe & Jeon, 2012). Preliminary studies have demonstrated the benefits of using enzymes to recover high added-value seaweed compounds (Wijesinghe & Jeon, 2012), R-PE (Joubert & Fleurence, 2008) and seaweed proteins (Fleurence et al., 2012; Lahaye & Vigouroux, 1992). It is well known that enzymatic tissue disruption may be an efficient alternative for releasing many kinds of compounds, usually confined and inaccessible. Response surface methodology is a useful technique for investigating complex processes such as enzymatic hydrolysis. Some papers have reported the optimization of processing conditions, such as pH, temperature and enzyme concentration, for protein or peptide recovery (Diniz & Martin, 1996; Guerard, Sumaya-Martinez, Laroque, Chabeaud, & Dufossé, 2007). A recent paper describes the potential of using enzymes, especially xylanases, for *P. palmata* cell wall disruption with a focus on the extraction yield of R-PE. In this study, the R-PE extraction yield was 62 times greater than without enzyme treatment and 16 times greater than without optimization. Enzymatic optimization enhanced the Purity Index up to 16 times (Dumay, Clément, Morançais, & Fleurence, 2013). In this way, hydrolysis extracts could also be purified according to the techniques described below.

### 11.4.2 Purification Processes of Phycoerythrins

The traditional methods used in the purification of PEs involve ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography, gel filtration and hydrophobic interaction, hydroxyapatite and electrophoresis.

Ammonium sulfate precipitation is usually employed as a preliminary purification step with different saturation percentages (25-85%) depending on the species (Bermejo, Talavera, & Alvarez-Pez, 2001; Hilditch et al., 1991; Kaixian et al., 1993; Liu et al., 2005; Sun et al., 2009). The solubility of proteins varies according to the ionic strength of the solution, and hence according to the salt concentration. Since proteins differ markedly in their solubility at high ionic strength, salting-out is a very useful procedure to facilitate the purification of a given protein. The precipitated protein is then removed by centrifugation and the ammonium sulfate concentration is increased to a value that will precipitate most of the proteins of interest while leaving the maximum amount of protein contaminants still in solution. The precipitated protein of interest is recovered by centrifugation and dissolved in fresh buffer for the next stage of purification. Fractional precipitation with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eliminates the high-molecular-weight fraction. With this technique, the purity index of R-PE has been increased by around 2.7, 3.5 and 4.53 for Polysiphonia urceolata (Liu et al., 2005), Portieria hornemannii (Senthilkumar et al., 2013) and Heterosiphonia japonica (Sun et al., 2009), respectively.

The second step of purification can be performed using chromatographic methods.

The most popular for proteins is ion-exchange chromatography, a process that separates ions and polar molecules based on their net charge. Ion-exchange chromatography retains molecules on the column based on coulombic (ionic) interactions. The elution is carried out either with a pH gradient (Liu et al., 2005) or with a step or linearly increasing gradient of salt concentration (Kaixian et al., 1993; Senthilkumar et al., 2013). Through ammonium sulfate precipitation followed by DEAE column chromatography, Kaixan et al. (1993) and Liu et al. (2005) extracted the R-PE from *Ceramium isogonum* and *P. urceolata* with a purity index of 2.1 and 5.6, respectively. Likewise, with 55% salting-out and Q-Sepharose column chromatography, Senthilkumar et al. (2013) achieved a maximum purity index of 5.2 in *P. hornemannii*.

Protocols with gel filtration chromatography have also been developed to purify proteins. In this case, the separation is based on size. D'Agnolo et al. (1994) purified the R-PE of *Gracilaria longa* using a Superdex 200 column and obtained a purity index of 4.5.

The combination of these two methods has also been carried out with *Corallina officinalis* (Hilditch et al., 1991) and *H. japonica* (Sun et al., 2009).

Affinity chromatography is another powerful and generally applicable means of purifying proteins. This technique takes advantage of the high affinity of many proteins for specific chemical groups.

Hydrophobic interaction chromatography (HIC) is a separation technique that uses the properties of hydrophobicity to separate proteins from one another. Separation is based on the reversible interaction between a protein and the hydrophobic ligand bound to the chromatography matrix.

Hydroxyapatite chromatography is considered to be a 'pseudo-affinity' chromatography or 'mixed-mode' ion exchange. It has proved to be an effective purification mechanism in a variety of processes, providing bio-molecule selectivity complementary to more traditional ion-exchange or hydrophobic interaction techniques.

HIC has been carried out in combination either with ion-exchange chromatography for the purification of the B-PE of *P. cruentum* (Bermejo et al., 2003; Bermejo et al., 2007) and the R-PE of *P. palmata* (Wang, 2002) and *P. urceolata* (Niu et al., 2006) or with hydroxyapatite chromatography for the purification of the R-PE of *P. urceolata* (Niu et al., 2006).

Hydroxyapatite chromatography has been used for the purification of R-PE and R-PC of *P. yezoensis* (Chuner et al., 2012) and in association with gel filtration chromatography for *Corallina elongata* (Rossano et al., 2003).

Preparative electrophoresis may also be used to purify proteins. The separation is based on ionic charge. This method has been described to purify the R-PE from *P. palmata* (Galland-Irmouli et al., 2000).

All these procedures are resumed in Table 11.5.

Table 11.5 Procedures Used for	Phycoerythrin Purification	Extraction Yield	-	
Protocol	Species	(mg/g DW)	Ы	References
$\frac{(\mathrm{NH}_4)_2\mathrm{SO}_4 + \mathrm{GF} + \mathrm{IE} + \mathrm{UF} + \mathrm{GF}}{\mathrm{UF} + \mathrm{GF}}$	Corallina officinalis (R-PE)	0.117	4.7	Hilditch et al. (1991)
$(NH_4)_2SO_4 + IE + UF$	Ceramium isogonum (R-PE) Cracilaria Innaa (R-PE)	0.038	2.1 7	Kaixan et al. (1993) D'Aonolo et al. (1994)
Preparative electrophoresis	Palmaria palmata (R-PE)	0.562	3.2	Galland-Irmouli et al. (2000)
HIC+IE	Palmaria palmata (R-PE)	0.152	3.6	Wang et al. (2002)
Hydroxyapatite + GF	Corallina elongata (R-PE)	0.600	6.67	Rossano et al. (2003)
HIC + IE	Porphyridium cruentum (B-PE)	0.825	4.6	Bermejo et al. (2003), Bermejo, Ruiz,
				and Acien, (2007)
$(NH_4)_2SO_4 + IE$	Polysiphonia urceolata (R-PE)	0.841	5.59	Liu et al. (2005)
HIC + hydroxyapatite	Polysiphonia urceolata (R-PE)	0.425	3.90	Niu et al. (2006)
HIC+IE HICH	Polysiphonia urceolata (R-PE)	0.500	3.26	Niu et al. (2006)
2GF + IE	Heterosiphonia japonica (R-PE)	0.940	4.89	Sun et al. (2009)
$(NH_4)_2SO_4 + hydroxyapatite$	Porphyra yezoensis (R-PE et R-PC)	0.540	3.2	Chuner et al. (2012)
$(NH_4)_2SO_4 + IE$	Portiera hornemannii R-PE	0.810	5.2	Senthilkumar et al. (2013)
HIC, hydrophobic interaction chroma	atography; IE, ion exchange; GF, gel filtration.			

Justine Dumay et al.

Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

# 11.5 CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PROSPECTS

In conclusion, red seaweeds are a promising source of proteins for human and animal nutrition. Their protein digestibility can be improved by the application of food processes such as mild fermentations but this is not necessary for all species; it depends on the presence or absence of large quantities of soluble fibers.

The use of red seaweed proteins, instead of soybean proteins, appears to be especially relevant for the nutrition of fish and mollusks (e.g. abalone) (Fleurence et al., 2012).

PEs have been identified as abundant pigments in marine seaweeds and Cyanobacteria and could provide an efficient target for the valorization of these resources.

Currently, the extraction and purification of PEs are being widely investigated but the methodologies employed still remain expensive and time-consuming, as they require multiple steps. Further studies could be conducted to improve the efficiency of these methods and to investigate less-studied red seaweed species.

Finally, to facilitate the introduction of new applications of PE, such as novel food, additive, colorant or cosmetic applications, new legislation must be established, especially in European countries, where only 21 red seaweed species are considered edible.

### REFERENCES

- Amano, H., & Noda, H. (1990). Proteins of protoplasts from red alga Porphyra yezoensis. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(11), 1859–1864.
- Anonymous. (1969). Annual report of Fishery Institute of Iwate prefecture.
- Apt, K. E., Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1995). Evolution of the Phycobiliproteins. Journal of Molecular Biology, 248(1), 79–96.
- Bald, D., Kruip, J., & Rögner, M. (1996). Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems? *Photosynthesis Research*, 49(2), 103–118.
- Bei, H., Guang-Ce, W., Chen-Kui, Z., & Zhen-Gang, L. (2002). The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 17, 35–42.
- Bermejo, R., Acien, F. G., Ibanez, M. J., Fernandez, J. M., Molina, E., & Alvarez-Pez, J. M. (2003). Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 790, 317–325.
- Bermejo, R., Ruiz, E., & Acien, F. G. (2007). Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: scale-up of the process. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 927–933.

339

- Bermejo, R., Talavera, E. M., & Alvarez-Pez, J. M. (2001). Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterisation of its subunits. *Journal of Chromatography A*, 917, 135–145.
- Bird, K.T. (1984). Seasonal variation in protein: carbohydrate ratios in a subtropical estuarine alga, *Gracilaria verrucosa*, and the determination of Nitrogen limitation status using these ratios. *Botanica Marina*, 27, 111–115.
- Bogorad, L. (1975). Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1), 369–401.
- Brown, S. B., Holroyd, A., & Vernon, D. I. (1984). Biosynthesis of phycobiliproteins. Incorporation of biliverdin into phycocyanin of the red alga *Cyanidium caldarium*. *Journal of Biochemistry*, 219, 905–909.
- Bryant, D., Glazer, A., & Eiserling, F. (1976). Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Archives of Microbiology*, *110*(1), 61–75.
- Bryant, D. A. (1982). Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 128(4), 835–844.
- Chuner, C., Chunxia, L., Shuxian, W., Qing, W., Ziye, G., & Peimin, H. (2012). Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. *Natural Science*, 4(8), 536–543.
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., & Drago, S. R. (2012). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, *49*(1), 364–372.
- D'Agnolo, E., Rizzo, R., Paoletti, S., & Murano, E. (1994). R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. *Phytochemistry*, *35*(3), 693–696.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, *103*, 891–899.
- Deniaud, E., Fleurence, J., & Lahaye, M. (2003). Interaction of the max-linked  $\beta$ -(1,3)/ $\beta$ -(1,4)-D-xylans in the cell walls of *Palmaria plamata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, *39*, 74–82.
- Deniaud, E., Quemener, B., Fleurence, J., & Lahaye, M. (2003). Structural studies of the mixlinked β-(1→3)/β-(1→4)-D-xylans from the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules*, *33*(1−3), 9–18.
- Denis, C., Massé, A., Fleurence, J., & Jaouen, P. (2009). Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu:* process definition and up-scaling. *Separation and Purification Technology*, 69(1), 37–42.
- Denis, C, Morançais, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., et al. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry*, 119(3), 913–917.
- Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science & Technology*, 31(5), 419–426.
- Ducret, A., Müller, S. A., Goldie, K. N., Hefti, A., Sidler, W. A., Zuber, H., et al. (1998). Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Molecular Biology*, 278(2), 369–388.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Malis Arad, S., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., et al. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity of industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16, 389–406.
- Dumay, J., Clément, N., Morançais, M., & Fleurence, J. (2013). Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. *Bioresource Technology*, 131(0), 21–27.

Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

FAO. (2011). Fisheries and aquaculture. Department. Fisheries Statistical Collection.

- Fitzgerald, C., Gallagher, E., Tasdemir, D., & Hayes, M. (2011). Heart health peptides from macroalgae and their potential use in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 6829–6836.
- Fleurence, J. (1999a). The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility? *Journal of Applied Phycology*, 11(3), 313–314.
- Fleurence, J. (1999b). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 25–28.
- Fleurence, J. (2004). Seaweed proteins. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (pp. 197–211). CRC press.
- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S., & Leray, C. (1994). Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology*, *6*, 527–532.
- Fleurence, J., & Guyader, O. (1995). Contribution of electrophoresis of red seaweeds (*Gracilaria* sp.) used as food ingredients. *Sciences des aliments*, 15, 43–48.
- Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., et al. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science & Technology*, 27(1), 57–61.
- Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N., & Kuroda, M. (1984). The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia*, *116–117*(1), 513–516.
- Galland-Irmouli, A.V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., et al. (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *10*(6), 353–359.
- Galland-Irmouli, A.V., Pons, L., Luçon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Guéant, J.-L., et al. (2000). One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 739, 117–123.
- Gantt, E. (1980). Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and Blue-Green algae. In J. F. D.G.H. Bourne, & K.W. Jeon (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 66(pp. 45–80). Academic Press.
- Gantt, E., & Lipschultz, C. A. (1974). Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis. *Biochemistry*, 13(14), 2960–2966.
- Glazer, A. (1994). Phycobiliproteins a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal* of Applied Phycology, 6(2), 105–112.
- Glazer, A. N. (1982). Phycobilisomes: structure and dynamics. *Annual Review of Microbiology*, 36(1), 173–198.
- Glazer, A. N. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Bioenergetics*, 768(1), 29–51.
- Glazer, A. N. (1989). Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. Journal of Biological Chemistry, 264(1), 1–4.
- Glazer, A. N., Apell, G. S., Hixson, C. S., Bryant, D. A., Rimon, S., & Brown, D. M. (1976). Biliproteins of cyanobacteria and Rhodophyta: homologous family of photosynthetic accessory pigments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(2), 428–431.
- Glazer, A. N., & Hixson, C. S. (1975). Characterization of R-phycocyanin. Chromophore content of R-phycocyanin and C-phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry*, 250(14), 5487–5495.
- Glazer, A. N., & Hixson, C. S. (1977). Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry*, 252(1), 32–42.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A., & Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42(11), 1486–1491.

- Hilditch, C. M., Balding, P., Jenkins, R., Smith, A. J., & Rogers, L. J. (1991). R-phycoerythrin from the macroalga *Corallina officinalis* (Rhodophyceae) and application of a derived phycofluor probe for detecting sugar-binding sites on cell membranes. *Journal of Applied Phycology*, 3(4), 345–354.
- Horie, Y., Sugase, K., & Horie, K. (1995). Physiological differences of soluble and insoluble dietary fibre fractions of brown algae and mushrooms in pepsin activity in vitro and protein digestibility. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 4, 251–255.
- Isailovic, D., Sultana, I., Phillips, G. J., & Yeung, E. S. (2006). Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobilin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. *Analytical Biochemistry*, *358*(1), 38–50.
- Jensen, A. (1993). Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia*, 260-261(1), 15-23.
- Joubert, Y., & Fleurence, J. (2008). Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 20, 55–61.
- Kaixian, Q., Franklin, M., & Borowitzka, M.A. (1993). The study for isolation and purification of R-phycoerythrin from a red alga. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 43, 133–139.
- Ke, B. (2001). *Photosynthesis photobiochemistry and photobiophysics* (Vol. 10). Kluwer Academic Publishers.
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G., & Wielgosz-Collin, G. (2013). Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu. Journal of Applied Phycology*, 25(2), 425–432.
- Kornprobst, J. (2011). Encyclopedia of marine natural products. Wiley.
- Kronick, M. N. (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. Journal of Immunological Methods, 92(1), 1–13.
- Lahaye, M., & Vigouroux, J. (1992). Liquefaction of dulse (*Palmaria palmata* (L.) Kuntze) by a commercial enzyme preparation and a purified endo-β-1,4-D-xylanase. *Journal of Applied Phycology*, *4*, 329–337.
- Liu, L.-N., Chen, X.-L., Zhang, X.-Y., Zhang, Y.-Z., & Zhou, B.-C. (2005). One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata. Journal of Biotechnology*, *116*, 91–100.
- Mabeau, S., & Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4(4), 103–107.
- Marrion, O., Fleurence, J., Schwertz, A., Guéant, J.-L., Mamelouk, L., Ksouri, J., et al. (2005). Evaluation of protein digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Applied Phycology*, 17(2), 99–102.
- Marrion, O., Schwertz, A., Fleurence, J., Guéant, J. L., & Villaume, C. (2003). Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. *Food/Nahrung*, 47(5), 339–344.
- Morgan, K. C., Wright, J. L. C., & Simpson, F. J. (1980). Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (Dulse). *Economic Botany*, 34(1), 27–50.
- Munier, M., Dumay, J., Morançais, M., Jaouen, P., & Fleurence, J. (2013). Variation in the biochemical composition of the edible seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada harvested from two sampling sites on the Brittany Coast (France): the influence of storage method on the extraction of the seaweed pigment R-phycoerythrin. *Journal of Chemistry*.
- Munier, M., Jubeau, S., Wijaya, A., Morançais, M., Dumay, J., Marchal, L. et al. (2014). Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-Phycoerythrin of Grateloupia turuturu and B-Phycoerythrin of Porphyridium cruentum. Food Chemistry, 150, 400–407.
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R., & Watanabe, T. (1987). The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia*, 151–152(1), 5–29.

Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds

- Niu, J.-F., Wang, G.-C., & Tseng, C.-K. (2006). Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expression and Purification*, 49, 23–31.
- Pangestuti, R., & Kim, S.-K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, *3*(4), 255–266.
- Rebolloso Fuentes, M. M., Acién Fernández, G. G., Sánchez Pérez, J. A., & Guil Guerrero, J. L. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345–353.
- Rossano, R., Ungano, N., D'Ambrosio, A., Liuzzi, G. M., & Riccio, P. (2003). Extracting and purifying R-phycoreythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *Journal of Biotechnology*, 101, 289–293.
- Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113–136.
- Senthilkumar, N., Suresh, V., Thangam, R., Kurinjimalar, C., Kavitha, G., Murugan, P., et al. (2013). Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55(0), 150–160.
- Siegelman, H.W., & Kycia, J. H. (1978). In J. Hellebust, & J. S. Craigie (Eds.), *Algal biliproteins* (pp. 71–79). Cambridge: Cambridge University Press.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., & Chen, L. (2004). A rod-linker-contained R-phycoerythrin complex from the intact phycobilisome of the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 76(1-3), 1–11.
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., Zhao, M., Fu, X., & Wang, L. (2009). Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 146–154.
- Tandeau de Marsac, N., Castets, A. M., & Cohen-Bazire, G. (1980). Wavelength modulation of phycoerythrin synthesis in *Synechocystis* sp. 6701. *Journal of Bacteriology*, 142(1), 310–314.
- Tandeau de Marsac, N., & Cohen-bazire, G. (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(4), 1635–1639.
- Tchernov, A. A., Minkova, K. M., Georgiev, D. I., & Houbavenska, N. B. (1993). Method for B-phycoerythrin purification from *Porphyridium cruentum*. *Biotechnology Techniques*, 7(12), 853–858.
- Wang, G. (2002). Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria vertucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography. *Chromatographia*, 56, 509–513.
- Wang, G., Zhou, B., & Zeng, C. (1998). Isolation, properties and spatial site analysis of γ subunits of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin. *Science in China Series C: Life Sciences*, 41(1), 9–17.
- Wijesinghe, W. A., & Jeon, Y.-J. (2012). Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. *Fitoterapia*, 83(1), 6–12.
- Yu, M. H., Glazer, A. N., Spencer, K. G., & West, J. A. (1981). Phycoerythrins of the red alga *Callithamnion*: Variation in phycoerythrobilin and phycoroubilin content. *Plant Physiology*, 68(2), 482–488.





# Cécile LE GUILLARD

Application de l'hydrolyse enzymatique assistée par ultrasons à la macroalgue rouge *Grateloupia turuturu* : Étude de la liquéfaction de la biomasse et de l'extraction de la R-phycoérythrine

Application of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis on the red seaweed *Grateloupia turuturu*: Study of the biomass liquefaction and the R-phycoerythrin extraction

#### Résumé

Les macroalgues rouges possèdent un large panel de molécules d'intérêt pour différents domaines d'applications. Cette étude porte sur une espèce non-indigène des côtes françaises, Grateloupia turuturu, en vue d'intensifier sa liquéfaction pour l'extraction de ses composés et en particulier celle d'un pigment d'intérêt, la R-phycoérythrine (R-PE). Trois procédés d'extraction ont été étudiés : l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique (EAE), par ultrasons (UAE) et par ultrasons et hydrolyse enzymatique (UAEH). Pour ce faire, quatre complexes enzymatiques de polysaccharidases industrielles et un générateur d'ultrasons tubulaire ont été utilisés. Dans un premier temps, l'efficacité de ces trois procédés, à 40 °C, a été évaluée par la liquéfaction de l'algue. Cette étude a montré que le couplage (UAEH) permet la liquéfaction la plus importante de l'algue, avec plus de 90 % de matière solubilisée. Il a ensuite été décidé de poursuivre cette étude avec l'UAE et l'UAEH. La comparaison de ces deux procédés, à 22 et 40 °C, a montré que l'UAEH était le procédé le plus efficace pour l'extraction de la R-PE et la liquéfaction de l'algue. Il a également été démontré que l'UAEH à 22 °C était préférable pour la R-PE tandis qu'une température de 40 °C favorisait la liquéfaction de G. turuturu. La relative stabilité de la R-PE aux ultrasons a également été démontrée. Pour finir, l'étude de différents paramètres de l'UAEH (débit, température et puissance) a permis d'optimiser la liquéfaction de G. turuturu et l'extraction de la R-PE. Les résultats de ce travail de thèse démontrent l'intérêt du couplage ultrasons-enzymes dans l'extraction des composés de G. turuturu.

### Mots clés

Macroalgues, *Grateloupia turuturu*, R-phycoérythrine, hydrolyse enzymatique (EAE), extraction par ultrasons (UAE), extraction assistée par ultrasons et hydrolyse enzymatique (UAEH)

### Abstract

Red seaweeds contain a large range of molecules of interest for different applications. This study concerns a non-native species of the French coast, Grateloupia turuturu, with a view to intensify its liquefaction for the extraction of its compounds, more particularly a pigment of interest, the R-phycoerythrin (R-PE). Three extraction methods were studied: enzymatic assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE) and ultrasoundassisted enzymatic hydrolysis (UAEH). Four industrial enzymatic preparations of carbohydrases and an ultrasonic flow-through reactor were used. First, the three processes efficiency, at 40 °C, was estimated by the liquefaction of seaweeds. This study demonstrated that the combination (UAEH) allows to obtain the highest liquefaction rate of seaweed, with more than 90 % of solubilized material. It was then decided to continue this study with the UAE and the UAEH. A comparison between the two processes, at 22 and 40 °C, demonstrated that the UAEH was the most efficient for the R-PE extraction and the liquefaction of seaweed. It was also demonstrated that the UAEH at 22 °C was preferable for the R-PE, whereas for the liquefaction of G. turuturu the best temperature was 40 °C. The relative stability of R-PE towards the ultrasound was also demonstrated. To finish, the study of different UAEH parameters (flow, temperature and power) has allowed to optimize the liquefaction of G. turuturu and the extraction of R-PE. These thesis results demonstrate the interests of this combination ultrasound-enzymes for the extraction of G. turuturu compounds.

**UNIVERSITÉ DE NANTES** 

### Key Words

Seaweeds, *Grateloupia turuturu*, R-phycoerythrin, enzymatic hydrolysis (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (UAEH)