

Optimisation de la production de la biomasse micro-algale par la méthode des plans d'expérience (cas de *Dunaliella salina* Teodoresco)

Fatiha KOUDACHE^{1*}, Bachir DOUKANI¹ et Abdelmadjid AITYALA²

¹ Université Djilali Liabés, Laboratoire d'Eco Développement des Espaces, BP 89, Sidi Bel Abbés, Algérie

² Université de Bouira, Laboratoire d'Informatique, Mathématique et Physique pour l'Agriculture et Forêts, Bouira, Algérie

* Correspondance, courriel : koudache@hotmail.com

Résumé

L'objectif de ce travail est de d'optimiser les conditions de production de la biomasse de *Dunaliella salina*, en utilisant la méthode des plans d'expériences. Cette méthode statistique, est basée sur l'analyse de la variance (ANOVA), elle permet de quantifier le poids des paramètres qui interviennent dans la croissance de *Dunaliella salina* et qui sont : la température, l'intensité lumineuse, la salinité et la concentration en nitrate. La souche de *Dunaliella salina* a été récoltée dans les salines d'Arzew, située dans le Nord Ouest algérien et cultivée dans une photo bioréacteur qui nous permet de contrôler les conditions de croissance de la biomasse de notre algue. Les résultats obtenus montrent que la valeur optimale du poids de chaque paramètre est de 20°C pour la température, 18 000 Lux pour l'intensité lumineuse, 45g/L pour la salinité et 50 g/L pour la concentration en nitrate. La production et la biomasse de notre algue est une opération dynamique, il serait intéressant de mener une autre étude, en contrôlant le temps réel de ce phénomène.

Mots-clés : *Dunaliella salina*, optimisation, production de la biomasse, paramètres.

Abstract

Optimization of microalgae biomass production by the method of experimental designs (Case of *Dunaliella salina* Teodoresco)

The objective of this work is to optimize the production conditions of *Dunaliella salina* biomass, using the experimental design method. This statistical method is based on analysis of variance (ANOVA), it allows to quantify the weight of the parameters involved in the growth of *Dunaliella salina* and which are : temperature, light intensity, salinity and concentration in nitrate. The *Dunaliella salina* strain was harvested in the Arzew saltworks, located in north western Algeria and grown in a photo bioreactor that allows us to control the growth conditions of the biomass of our algae. The results obtained show that the optimum value of the weight of each parameter is 20 ° C for the temperature, 18,000 Lux for the luminous intensity, 45g / L for the salinity and 50 g / L for the nitrate concentration. The production and biomass of our seaweed is a dynamic operation, it would be interesting to conduct another study, controlling the real time of this phenomenon.

Keywords : *Dunaliella salina*, optimization, biomass production, parameters.

1. Introduction

Les algues sont des organismes chlorophylliens qui se développent dans l'eau ou dans des milieux très humides. Bien que surtout abondantes dans les eaux des mers, des lacs, des mares, des eaux courantes et des eaux thermales, on en trouve également sur les roches humides et sur la terre. Exceptionnellement, elles peuvent être endophytes de tissus animaux ou végétaux [1]. Les microalgues et les cyanobactéries, dont la taille varie du micron aux centaines de microns, sont des organismes qui utilisent la lumière comme source d'énergie pour fixer le dioxyde de carbone (CO_2). Elles constituent un gisement fabuleux, qui peut être valorisé selon 3 voies [2], toutefois seules quelques dizaines d'espèces sont aujourd'hui exploitées. La chlorophycée *Dunaliella salina* est une espèce unique de microalgues extrémophile. Elle accumule les caroténoïdes (plus de 8 % du poids sec), sous différentes conditions de stress, telles qu'une salinité et une intensité lumineuse élevées ainsi qu'une faible température de culture [3]. Ces caroténoïdes, principalement des β -carotènes, sont produits lorsque ces algues sont stressées. Les chloroplastes commencent alors à devenir oranges. Lorsque le chloroplaste se réduit, ses membranes rétrécissent et les caroténoïdes se forment [4, 5]. C'est un important pigment dans le processus de la photosynthèse car il procure la protection de la photo-oxydation, et fonctionne comme un média dans le processus général [6]. Le Béta-carotène est également une source importante de nutrition car il peut être converti en vitamine A [7]. En plus ; il a également des effets physiologique puisqu'il peut fonctionner comme capteur de radicaux pyroxyles, stimulant de la réponse immunitaire et activateur de communication à jonction lacunaire [7, 8]. Des études récentes ont montré que la *Dunaliella salina* est saine et peut constituer un complément alimentaire potentiel [9].

De nos jours, la bêta-carotène est utilisée de manière extensive comme un colorant, un additif alimentaire, un antioxydant, un agent anti cancer et maladie cardiaque, et dans les industries cosmétiques [10]. En effet bien qu'une large portion de la bêta-carotène disponible sur le marché est synthétisée chimiquement, il existe un intérêt considérable pour sa production à partir d'organismes vivants car elle est dix fois plus active [11, 12]. Dernièrement [13] ont démontré que la *Dunaliella salina* inhibe la production des espèces réactives de l'oxygène ou ERO (en anglais ROS) de l'interleukine 6 et de l'oxyde nitrique via la suppression des voies JAK (protéines Janus Kinases) / STAT (transducteurs de signaux et activateurs de transcription) et améliore l'expression de cytokine SOCS3. Considérant les différentes propriétés et applications citées ci-dessus, la meilleure méthode qui permet une production commerciale de la bêta-carotène naturelle est la culture massive de la *Dunaliella salina*. Actuellement, les recherches sur cette microalgue ont réalisé des progrès significatifs en termes de sélection des espèces d'algues, de média, de cultures et de processus général pour sa production [14 - 16]. Pour la partie technologie Shifa Helena et al ont décrit la culture de la microalgue *Dunaliella salina* en utilisant la lumière des LED (Light Emitting Diodes) dans différents média [17]. Yue-Hui Zhu et Jian-Guo Jiang ont pour leur part analysé la technique de culture continue de la *Dunaliella salina* dans des photo-bioréacteurs pour la production de la bêta-carotène [18]. En parallèle, des travaux ont été effectués en vue d'optimiser cette production. Parmi eux on peut citer Zhe Wu et al qui ont les effets de la lumière, la température et les nutriments sur la culture de la *Dunaliella salina* [19]. Notre travail s'inscrit dans le cadre d'optimisation de la production de cette microalgue, qui dépend de quatre paramètres principaux : la température, l'intensité lumineuse, la salinité et la concentration des nitrates. Notre objectif est de déterminer les valeurs des paramètres qui permettent d'obtenir une production optimale.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel biologique

La souche de *Dunaliella salina* utilisée dans notre travail provient de la saline d'Arzew dont les coordonnées sont : $35^{\circ}33'26,30''\text{N}$ et $0^{\circ}49'17,850''\text{O}$ (élévation 78 m, altitude 78 m) (*Figures 1 et 2*)



Figure 1 : Localisation des salines d'Arzew (Google earth, 2016)



Figure 2 : Récolte de la *Dunaliella salina*

2-2. Méthodes

Nous avons cultivé la *Dunaliella Salina*, durant vingt jours dans un milieu de Johnson modifié et aéré, dans des photo-bioréacteurs (**Figure 3**) plat d'une surface de 1 m² et d'une épaisseur de 40 mm, donc d'un volume de 40 litres. Les concentrations de départ sont les même pour chaque expérience ayant fait une pré-culture de *Dunaliella salina* dans un réacteur cylindrique, la lumière est assurée par des leds type Day light de dernière génération, dans un hangar climatisé, tous les paramètres sont contrôlés par des sondes à l'aide d'un logiciel dédié, en se contentant du CO₂ atmosphérique. La mesure de la biomasse se fait tous les deux jours au laboratoire en utilisant un système de filtration sur membrane en fibre de verre. Pour pouvoir utiliser les plans d'expérience, nous avons attribué à chaque paramètre deux niveaux. Ainsi pour la température nous avons pris T₁ = 20°C et T₂ = 32°C, pour l'intensité lumineuse L₁ = 18000 lux et L₂ = 45000 lux, pour la salinité S₁ = 45 g/L et S₂ = 250 g/L et enfin pour la concentration en nitrate C₁ = 50 mg/L et C₂ = 250 mg/L. Nous avons réalisé ainsi 16 expériences qui constituent le total des combinaisons possibles des quatre paramètres sus cités. Nous appliquons alors à ces résultats la méthode des plans d'expériences.



Figure 3 : *Photobioreacteur en production*

La méthode des plans d'expériences, par essence une méthode d'optimisation multi objectifs [20, 21]. Elle permet au concepteur de déterminer simultanément les effets individuels et interactifs de plusieurs facteurs qui impactent les résultats des phénomènes [22, 23]. Elle permet également d'avoir une quantification du poids des interactions des facteurs qui influent sur l'output ; cette aptitude est capitale dans la mesure où elle permet de modifier n'importe quel standard design en un robuste [24]. En d'autres termes, la méthode des plans d'expérience aide à faire ressortir les éléments qui affectent le résultat. Ceci permet aux concepteurs d'ajuster ces paramètres afin d'en déterminer la combinaison qui permet d'obtenir les résultats optimum. Pour appliquer les plans d'expériences il est nécessaire de bien définir le problème et sélectionner les variables qu'on appelle facteurs ou paramètres. Un espace de design, ou région d'intérêt, doit être délimité. De même un intervalle de variation est fixé pour chaque facteur. A l'intérieur de chaque intervalle on affecte deux ou trois valeurs au facteur que l'on désigne par niveau (level) le nombre des niveaux est généralement le même pour tous les facteurs. La fonction objectif et l'ensemble des expérimentations (ou simulations) sont appelés la « variable réponse » (response variable). Dans ce cas particulier on se propose de déterminer les effets des facteurs sur la production de la biomasse de la *Dunaliella salina* dans les bioréacteurs afin d'en optimiser le rendement. Ces facteurs sont : la température que l'on désignera par (A), l'intensité lumineuse que l'on désignera par (B), la salinité que l'on désignera par (C) et la concentration de nitrate que l'on désignera par (D). On a assumé que les expérimentations à deux niveaux pour chaque facteur est raisonnable. En effet le processus traité peut être considéré comme linéaire par rapport aux variables. Ces niveaux ont été choisis comme ci-dessous :

Facteur A:	(-) Niveau = 20 °C	et (+) Niveau = 32 °C
Facteur B:	(-) Niveau = 18000 lux	et (+) Niveau = 45000lux.
Facteur C:	(-) Niveau = 45 g/L	et (+) Niveau = 250g/L
Facteur D:	(-) Niveau = 50 mg/L	et (+) Niveau = 250 mg/L.

De ce fait, 16 expérimentations ont été réalisées, ce qui correspond au total des combinaisons possibles avec les quatre paramètres considérés. Ensuite l'analyse par les plans d'expérience a été appliquée aux résultats expérimentaux obtenus.

3. Résultats et discussion

Les différentes expérimentations qui correspondent à toutes les combinaisons possibles des quatre facteurs, chacun affecté de deux niveaux, sont présentés dans le **Tableau 1**. Leur nombre est égal à 4². Pour chaque configuration, la biomasse produite tous les deux jours relevée, et ce pour une période de vingt jours (**Figures 4 et 5**). Ces graphes sont descriptifs et difficilement exploitables. D'où la nécessité de les présenter sous forme de tableaux (**Tableau 1**).

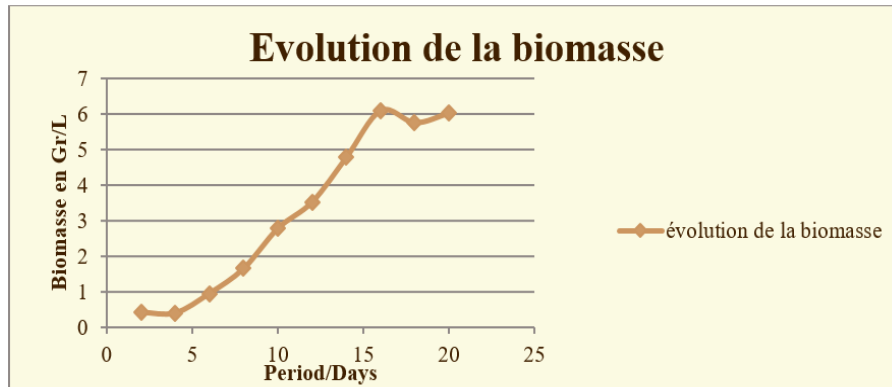


Figure 4 : Évolution de la biomasse test n°1

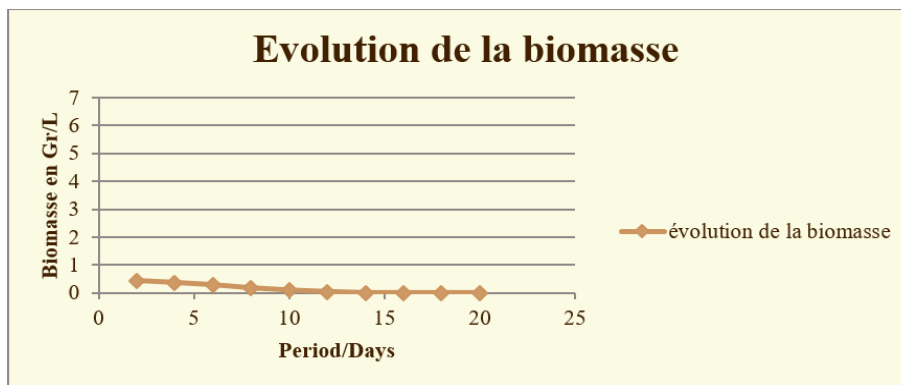


Figure 5 : Évolution de la biomasse test n°16

Tableau 1 : Combinaisons de tous les paramètres avec leurs deux niveaux

Exp N°	Paramètres				Unité			
	Temp	Inten,L	Salin	Conc,Nit	°C	Lux	g/L	mg/L
1	T1	I1	S1	C1	20	18000	45	50
2	T1	I1	S1	C2	20	18000	45	250
3	T1	I1	S2	C1	20	18000	250	50
4	T1	I1	S2	C2	20	18000	250	250
5	T1	I2	S1	C1	20	45000	45	50
6	T1	I2	S1	C2	20	45000	45	250
7	T1	I2	S2	C1	20	45000	250	50
8	T1	I2	S2	C2	20	45000	250	250
9	T2	I1	S1	C1	32	18000	45	50
10	T2	I1	S1	C2	32	18000	45	250
11	T2	I1	S2	C1	32	18000	250	50
12	T2	I1	S2	C2	32	18000	250	250
13	T2	I2	S1	C1	32	45000	45	50
14	T2	I2	S1	C2	32	45000	45	250
15	T2	I2	S2	C1	32	45000	250	50
16	T2	I2	S2	C2	32	45000	250	250

Nous avons alors appliqué les plans d'expérience pour les résultats obtenus le sixième et seizième jour. Les résultats de cette analyse sont présents dans le **Tableau 3**. Comme on peut le constater, le meilleur rendement est obtenu avec les niveaux bas des quatre paramètres et inversement le plus faible rendement est obtenu avec les niveaux élevés des paramètres.

Tableau 2 : Résultats obtenus avec toutes les combinaisons

Temps/jour	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Biomasse en gr/L For T1 I1 S1 C1	0.42	0.4	0.95	1.65	2.78	3.52	4.78	6.09	5.75	6.02
Biomasse en gr/L For T1 I1 S1 C2	0.42	0.38	0.55	0.78	1.13	1.42	2.03	2.32	1.98	2.27
Biomasse en gr/L For T1 I1 S1 C2	0.42	0.38	0.55	0.78	1.13	1.42	2.03	2.32	1.98	2.27
Biomasse en gr/L For T1 I1 S2 C1	0.42	0.41	0.48	0.51	0.58	0.67	0.69	0.72	0.7	0.69
Biomasse en gr/L For T1 I1 S2 C2	0.42	0.4	0.42	0.45	0.49	0.53	0.58	0.61	0.68	0.67
Biomasse en g/L For T1 I2 S1 C1	0.39	0.4	0.75	1.25	1.65	1.95	2.28	2.63	3.12	3.15
Biomasse en g/L For T1 I2 S1 C2	0.39	0.42	0.56	0.79	0.99	1.41	1.78	2.01	1.96	2.01
Biomasse en g/L For T1 I2 S2 C1	0.39	0.38	0.41	0.48	0.62	0.58	0.54	0.49	0.42	0.35
Biomasse en g/L For T1 I2 S2 C1	0.39	0.39	0.38	0.36	0.34	0.28	0.26	0.24	0.23	0.19
Biomasse en g/L For T2 I1 S1 C1	0.41	0.65	0.92	1.21	1.78	2.5	3.13	3.67	3.82	3.99
Biomasse en g/L For T2 I1 S1 C2	0.41	0.43	0.51	0.65	1.01	1.18	1.42	1.68	1.73	1.78
Biomasse en g/L For T2 I1 S2 C1	0.41	0.41	0.43	0.46	0.49	0.53	0.57	0.59	0.61	0.58
Biomasse en g/L For T2 I1 S2 C2	0.41	0.41	0.42	0.39	0.36	0.32	0.28	0.28	0.27	0.28
Biomasse en g/L For T2 I2 S1 C1	0.43	0.41	0.4	0,8	0.38	0.36	0.36	0.37	0.36	0.36
Biomasse en g/L For T2 I2 S1 C2	0.43	0.4	0.36	0.34	0.32	0.28	0.28	0.24	0.26	0.25
Biomasse en g/L For T2 I2 S2 C1	0.43	0.4	0.4	0.38	0.36	0.31	0.28	0.25	0.25	0.26
Biomasse en g/L For T2 I2 S2 C2	0.43	0.36	0.28	0.17	0.09	0.04	0	0	0	0

Les résultats obtenus après analyse par la méthode des plans d'expérience sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Effets des paramètres et de leurs interactions

Factor	Coefficient		
	Estimate	Low	High
Intercept	-0.65	-0.78	-0.52
A-Température	-0.24	-0.37	-0.11
B-Intensité.lumi	-0.26	-0.39	-0.14
C-Salinité	-0.38	-0.51	-0.26
D-Nitrat.Constrat	-0.18	-0.31	-0.056
E-Temps Séjour	0.25	0.13	0.38
AB	-0.14	-0.27	-0.013
AC	0.027	-0.100	0.15
AD	-0.060	-0.19	0.066
AE	-0.25	-0.38	-0.13
BC	0.016	-0.11	0.14
BD	-0.023	-0.15	0.10
BE	-0.26	-0.39	-0.13
CD	-0.048	-0.17	0.078
CE	-0.37	-0.50	-0.25
DE	-0.17	-0.30	-0.048

Il en ressort que la salinité est le facteur le plus influent, son coefficient étant le plus élevé (.38). Il est suivi par l'intensité de la lumière (.26), la température (0.24), et en dernier la concentration en nitrates. Il est à noter que le signe (-) indique que le maximum est atteint avec le niveau bas des paramètres et vice-versa. En ce qui concerne les interactions ; les poids de leurs influences par ordre décroissant est le suivant : Salinité-temps de séjour (0.37), Intensité lumineuse-temps de séjour (0.26), temps de séjour-température (0.25), concentration nitrate-temps de séjour (0.17), température- intensité lumineuse (0.14). Les autres interactions ont un rôle plutôt négligeable. Il est intéressant de noter que les interactions qui ont un poids significatif le sont par rapport au temps de séjour. Ces résultats sont confirmés par les *Figures 6-a et 6-b*. En effet elles indiquent clairement que les meilleurs rendements projetés correspondent aux combinaisons suivantes : niveau bas pour la salinité, niveau élevé pour le temps de séjour et niveau moyen pour la température, l'intensité lumineuse et la concentration en nitrates. Le deuxième meilleur résultat correspond aux valeurs suivantes : niveau bas pour la température, niveau élevé pour le temps de séjour et niveau moyen pour la salinité, l'intensité lumineuse et la concentration en nitrates (*Figure 6-2*). Ces représentations constituent le plus important outil pour déterminer les meilleures conditions qui permettent d'obtenir les rendements les plus élevés. En examinant la *Figure 6-a* on constate que le rendement dépassent la valeur de 1.2 g/ L avec le plus faible niveau de salinité et les valeurs moyennes (entre les plus faibles et les plus élevées valeurs) de la température, l'intensité lumineuse et la concentration des nitrates. Cependant, dans le cas où maintenir la température à un niveau bas ne constitue pas une contrainte majeure (hangar bien isolé) ; on peut atteindre presque le même rendement avec une basse température et un niveau moyen de la salinité (*Figure 6-b*). Ceci nous permet de voir comment cette méthode nous permet d'adapter nos paramètres aux contraintes existantes en vue d'atteindre les résultats désirés. Et tout l'intérêt de la méthode des plans d'expérience réside dans cette aptitude.

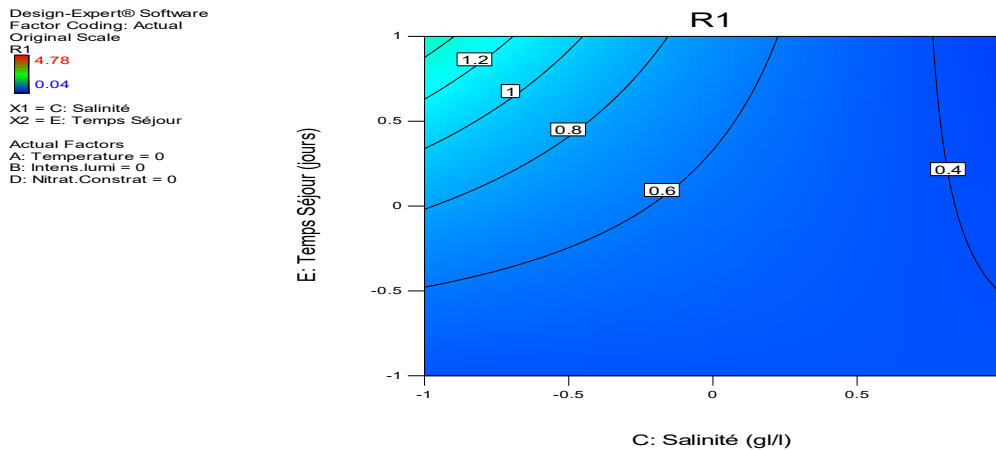


Figure.6-a : Couverture des Rendements projetés

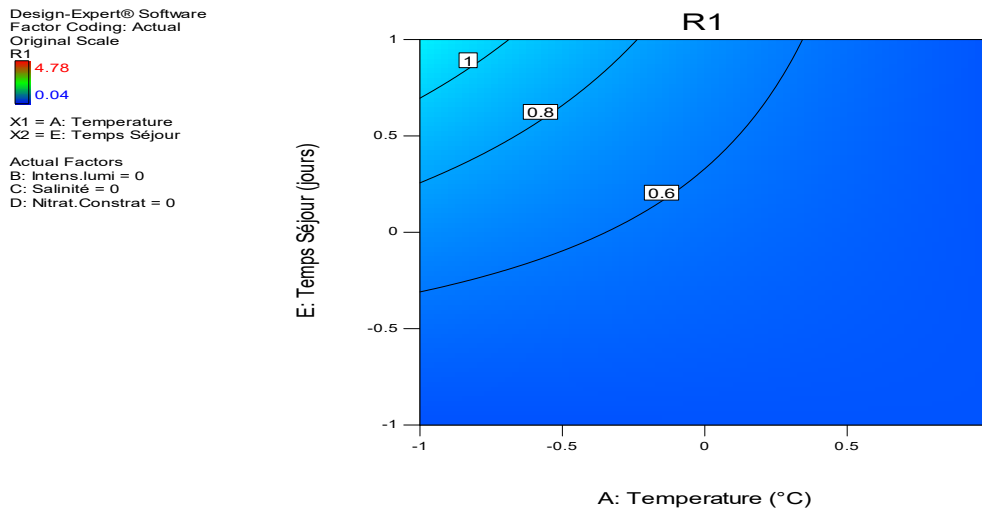


Figure.6-b : Couverture des Rendements projetés

4. Conclusion

L'arbre de production des microalgues est chargée de fruits : les microalgues peuvent en effet être valorisées dans des domaines différents tels que l'agriculture, la nutrition et la phytopharmacie humaine et animale, la cosmétique, la production d'énergie, et la dépollution (ou bioremediation) [25 - 27]. L'analyse par la méthode des plans d'expérience nous a permis de déterminer les conditions de production optimales de la *Dunaliella salina*. Elles sont les suivantes : 20 ° C pour la température, 18 000 lux pour l'intensité lumineuse, 45 g / L pour la salinité et 50 mg / L pour la concentration en nitrate. La culture des microalgues avec les conditions optimisées ont confirmé que les réponses maximales ont été atteintes pour les valeurs minimales des quatre facteurs mentionnés ci-dessus. Le maximum a été enregistré à la fin du 16ème jour pour une production de 6,02 g / L. Cela nous permet également de déterminer les facteurs agissant directement sur la réponse (production de biomasse), leurs interactions et leurs actions sur la productivité de cette algue. Nous avons pu déterminer l'importance de chaque facteur ainsi que leurs interactions afin d'optimiser l'output. Cependant, La production de biomasse est une opération dynamique ; aussi dans le but de compléter cette étude il conviendrait de procéder à une étude dynamique en utilisant le contrôle de ce phénomène en temps réel.

Références

- [1] - A. ILTIS, J. R. DURAND and C. LEVEQUE, IRD Ed., Vol. 1, (1980) 873
- [2] - G. KERLERO DE ROSBO. O. BERNARD, ENRA, consulting INRIA, ADEME, Paris, (2015)122 p. + Annexe 49 p.
- [3] - A. PRIETO, P. CANAVAT, J. GARCIA-GONZALEZ. *J Biotechnol.*, 151 (2) (2011) 180 - 5
- [4] - M. M. DORINDE, M. M. KLEINEGRIS, A. MARJON, M. JANSSEN, W. A. BRANDENBURG, R. H. WIJFFELS. *Jour. Appl. Phycol. February*, 16(2010) 645 - 648
- [5] - Z. LI, X. MA, A. LI, C. ZHANG, *Bioresour Technol.*, 117 (2012) 257 - 63
- [6] - A. J. CURRRISS, C. I. CAZZANELLI, E. T. WURTZEL, B. J. POGSON, Carotenoids.United States of America : Elsevier, (2011) 1 - 36
- [7] - M. BOROWTZKA, *Journal Appl Phycol.*, 7 (1) (1995) 3 - 15
- [8] - Z. W YE, J. G. JIANG, G. H. WU, *Biotechnology Adv.*, 26 (4) (2008) 352 - 60
- [9] - M. K. LAM, K. T. LEE, *Elsevier*, (2014) 261 - 86
- [10] - A. PRIETO, J. PEDRO CAVANATE, M. GARCIA-GONZALAZ, *J Biotechnology*, 151 (2) (2011) 180 - 5
- [11] - M. GARCIA-GONZALEZ, M. MORENO, J. C. MANZANO, F. J. FLORENCIO and M. G. GUERRERO, 115(1) (2005) 81 - 90
- [12] - D. M KLEINGRIS, M. JANSSEN, W. A. BRANDENBOURG and R. H. WIJFFELS, *Enzyme Microb Technol.*, 48 (3) (2011) 253 - 9
- [13] - L. HUI-WEN, L. CHENG-WEI, Y. ENG-JYE, C. CHING-CHUNG, C. SHIH-YIN, J. K. TSENG, Tien-JyeChangYuan-YenChang, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 25, Issue 4, (October 2017) 908 - 918
- [14] - P. P LAMERS, M. JANSSEN, R. C. DE VOS, R. J. BINO and R. H. WIJFFELS, *Trends Biotechnology*, 26 (11) (2008) 631 - 8
- [15] - C. L. MOU, X. H. HAO, X. LIU, X. W. CHEN and D. F. CHEN, *Adv. Mar. Sci.*, 28 (4) (2010) 554 - 62
- [16] - R. SATHASIVAM and N. JUNNTAWONG, *Int. J. Current Sci.*, 5 (2013) 67 - 73
- [17] - S. HELENA, M. ZAINURI and J. SUPRIJANTO, *Aquatic Procedia*, Vol. 7, (August 2016) 226 - 230
- [18] - Z. YUE-HU and J. JIAN-GUO, Vol. 227, Issue 3 (July 2008) 953 - 959
- [19] - Z. WU, P. DUANGMANEE, P. ZHAO, N. JUNTAWONG and C. MA, *Jundishapur Jour. Microbiol.* Published online, (2016)
- [20] - P. GOOS and B. JONES, “*Optimal Design of Experiments: A Case Study Approach*, John Wileyand Sons, (2011)
- [21] - Y. VANDER HEYDEN, *LCCG Europe* Sep 01, Volume 19, Issue 9 (2006) 469 - 475
- [22] - H. HENRI and H. ACHTEN, *International journal of architectural computing*, Vol. 07, Issue 04 (2009) 505 - 534
- [23] - K. KRISHNAIAH and P. SHAHABUDEEN, by PHI Learning Private Limited, New Delhi publisher. ISBN-978-81-203-4527-0, (2012)
- [24] - A. HALL, *Design Issues*. Volume 27 Issue 2 Massachusetts Institute of Technology, (2011) 17 - 26
- [25] - I. PRIYADARSHANI ET B. BATH, *A review, J. Algal Biomass Utln*, 3 (4) (2012) 89 - 10
- [26] - G. BOUGARAN et B. SAINT - JEAN, *biofutur*, Paris, 360 (2014) 28 - 13
- [27] - Y. LERAT, J. F. SASSI et G. ATTIA, Trimatec, Marseille, (2014)