

Composition en acides aminés libres et combinés et en vitamines de la microalgue *Micractinium pusillum* Fres. issue d'un lagunage naturel

Free and combined amino acids and vitamin composition of *Micractinium pusillum* Fres. isolated from a wastewater stabilization pond

L. BOUARAB^{*1}, G. BOURBIGOT², M. SIMON², Y. DE ROECK-HOLTZHAUER², M. LOUDIKI¹

Reçu le 26 novembre 2003, accepté le 18 décembre 2004**.

SUMMARY

The biotechnological exploitation of microalgae requires more investigations in order to improve our knowledge of their biochemistry and to look for new potentially interesting species. Microalgae are used in various areas. Among them, wastewater treatment in wastewater stabilization ponds and high-rate ponds is widely prevalent. Beside their purifying ability, their abundance in these ecosystems makes them interesting as a potential source of valuable products.

Micractinium pusillum Fres, a green alga (Chlorophyceae) that grows in these ecosystems, was isolated from the experimental wastewater stabilization pond of Ouarzazate city (south of Morocco), where it becomes important during the hot period. In the present work, we investigated the dissolved free and combined amino acids and the vitamins produced by this microalgal strain cultured on a mineral medium. The biomass production of *M. pusillum* was conducted in 2 l cotton-stoppered flasks under continuous light ($60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by neon tubes and at a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$. The culture medium was sterilized by autoclaving before inoculation. Free and combined amino acids were respectively analysed by HPLC separation of fluorescent o-phthalaldehyde (OPA) derivatives. Prior to derivatization, the cells were broken and the cell content was digested with HCl. The analysis of vitamins was also realised by HPLC, with UV - visible detection methods, after extraction by appropriate solvents.

1. Laboratoire d'algologie, département de biologie, faculté des sciences semlalia, université cadi ayyad, Av. My Abdallah BP 2390, Marrakech, Maroc. Tel : (212) 044 43 46 49, Fax 212 044 43 74 12.

2. CAEC université de Nantes, rue du Moulin de la Rouselière, CP 4301, 44805 Saint Herblain cedex, France.

* Correspondance : bouarab@ucam.ac.ma

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 août 2006.

The results reveal a high content of combined amino acids of approximately 59% (dry matter). Free amino acids constitute 3.4% (dry matter). Seventeen amino acids have been identified in this microalga (table 1): aspartic acid, glutamic acid, arginine, methionine, phenylalanine, alanine and lysine were the principal components. The analysis of spectra indicated the presence of six categories of amino acids (AA) (table 2): aliphatic AA, hydroxy AA, sulphur-containing AA, basic AA, aromatic AA and the diacid AA. Aliphatic AA (glycine, valine, leucine, and isoleucine) largely dominated the total AA pool, with more than 27% of total AA. Diacids AA (aspartic and glutamic acids), at approximately 25%, came in the second rank. Dibasics AA (15%) were relatively more abundant than aromatics AA (11%) and sulfur-containing AA (8%). It should be noted, however, that among the sulphur-containing AA, only methionine was detected by the method used in this work. Hydroxy AA are much less represented with only 4% of the total AA.

Four vitamins were detected in *M. pusillum* (table 3): vitamins D3, B2, B3, and B12. The content of vitamin D ($6\,970\ \mu\text{g g}^{-1}$) was highest, followed by vitamin B3 ($2\,820\ \mu\text{g g}^{-1}$) and vitamin B12 ($1\,860\ \mu\text{g g}^{-1}$). Vitamin B2 constituted $406\ \mu\text{g g}^{-1}$. According to the reported values of vitamin contents in several other microalgal species, as well as some conventional foods (table 5), it appears that *M. pusillum* species contains relatively important amounts.

Keywords: free amino acids, combined amino acids, vitamin, microalga, *Micractinium pusillum* Fres.

RÉSUMÉ

Dans ce travail est présentée la composition biochimique en acides aminés (AA) libres et combinés et en vitamines de *Micractinium pusillum* isolée à partir du lagunage naturel expérimental de Ouazazate où cette microalgue prolifère pendant la période chaude. *M. pusillum* est produite en culture en vrac, sur milieu synthétique, dans des conditions de lumière et de température fixes. Cette étude révèle la richesse de *M. pusillum* en acides aminés combinés qui constituent environ 59 % de sa matière sèche. Les acides aminés libres forment 3,4 % de cette matière. Dix-sept acides aminés et quatre vitamines (D3, B2, B3, et B12) ont été déterminés chez cette microalgue.

Mots clés : acides aminés libres, acides aminés combinés, vitamines, microalgue, *Micractinium pusillum* Fres.

1 - INTRODUCTION

Les microalgues ont été utilisées comme aliment pour l'homme depuis longtemps par les indigènes des régions littorales du lac Tchad et du Mexique à l'époque des Aztèques (AARONSON *et al.* 1980, COUTÉ, 1992). Les microalgues, estimées à quelque 50 000 espèces (EMDADI, 1992), comme les bactéries et les levures, font partie des micro-organismes prometteurs dans le domaine de la biotechnologie (DE LA NOÛE et DE PAUW, 1988). La recherche dans ce domaine s'est rapidement développée ces dernières décennies dans plusieurs pays : Australie, Allemagne, États-Unis d'Amérique, Japon, Israël, France, Chine (BOROWITZKA, 1988, GUDIN, 1992, LEE, 1997, RICHMOND, 1988, SOEDER HEGEWALD, 1988).

À côté de leur richesse en produits à haute valeur ajoutée (chromoprotéines, caroténoïdes, astaxanthine, vitamines, antioxydants (tocophérols ou vitamines E, vitamines A et C, SOD ou superoxydismutase), produits pharmaceutiques (antibiotiques, antiviraux, antitumoraux)), les microalgues sont intéressantes par leur rendement de conversion de l'énergie solaire nettement supérieur à celui des cultures terrestres traditionnelles (BOROWITZKA, 1988, DE ROECK-HOLTZAUER *et al.*, 1991, RIVALLAND *et al.*, 1990, YAMAGUCHI, 1997, ZHANG et LEE, 1997). Plusieurs genres de microalgues (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nitzschia*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Euglena*, etc.) sont étudiées pour leur exploitation commerciale (BOROWITZKA, *et al.*, 1984, KITANO *et al.*, 1997, 1998, LEE, 1997, OGBONNA *et al.*, 1998).

Sous des conditions favorables, les microalgues peuvent produire, pour la même surface, 20 à 35 fois plus de protéines que le soja et 50 fois plus que le riz, le blé ou le maïs (CIFERRI, 1983, SOEDER et HEGEWALD, 1988, SWITZER, 1982). Pour ce qui est des vitamines, les travaux de DE ROECK- HOLTZAUER *et al.*, (1991) montrent que certaines microalgues (exemple *Tetraselmis suecica*) sont plus riches en vitamines que plusieurs produits alimentaires conventionnels. Ainsi, l'intérêt porté aux microalgues est d'autant plus justifié que le commerce potentiel des substances produites est énorme. En effet, le coût des vitamines produites en 1981 pour la consommation humaine aux États-Unis d'Amérique s'élevait à quelque 1,1 milliard de dollars US (BOROWITZKA, 1988).

L'exploitation et l'utilisation des microalgues exigent donc des recherches, soit pour découvrir de nouvelles espèces potentiellement intéressantes, soit pour parfaire les connaissances de leur biochimie. Cette étude, relative à la caractérisation en acides aminés et en vitamines de la microalgue *Micractinium pusillum* Fresenius, contribue à répondre à ces objectifs en rendant compte de la richesse, en produits exploitables sur le plan biotechnologique, de la biomasse des microalgues se développant dans le lagunage naturel. Les études sur la composition des microalgues en vitamines sont très rares et l'espèce *Micractinium pusillum* a été très peu étudiée sur le plan biochimique, voire sur le plan écophysiological (BOUARAB *et al.*, 2002).

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

La microalgue *Micractinium pusillum* a été isolée de la station expérimentale de lagunage naturel de Ouarzazate où elle se développe en abondance dans les bassins facultatifs et de maturation entre avril et septembre. La biomasse nécessaire aux différents dosages est obtenue par mise en culture en vrac de la microalgue sur milieu minéral (DAUTA, 1982) dans des flacons de 2 litres fermé par du coton et sous des conditions de température (24 ± 2 °C) et de lumière (intensité lumineuse de $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) constantes. La lumière est dispensée en continu par des tubes fluorescents.

La biomasse est concentrée en pâte, sans aucune perte, par centrifugation pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse Sigma 6-10 à 9 000 tr/min ($1\ 313 \times g$). Les différents dosages sont effectués en phase de croissance

exponentielle. Le dosage des acides aminés est réalisé sur des échantillons conservés par congélation, alors que celui des vitamines est réalisé sur des échantillons frais. Tous les dosages sont effectués avec deux replicats.

2.1 Acides aminés libres et combinés

Les acides aminés libres sont mis en solution par simple choc gel - dégel de 0,5 g de matière fraîche dans 1 ml d'eau distillée ultra-pure tiédie. Les acides aminés combinés sont mis en solution par hydrolyse acide en présence de 10 ml d'HCl (6 N) à l'étuve à 110 °C pendant 24 heures. L'acide est évaporé et l'échantillon est recueilli dans 10 ml d'éthanol à 70 % et filtré sur filtre 0,2 µm avant d'être analysé par HPLC.

L'extrait filtré contenant les acides aminés est collecté pour dérivation après dosage. La méthode décrite par LINDROTH et MOPPER (1979), et légèrement modifiée est utilisée pour la dérivation avec le réactif ortho-phthaldialdéhyde (OPA). Ce dernier est préparé par mélange de 1 ml d'une solution tampon de sodium tétraborate (0,5 M) à pH 9,5, 100 mg d'OPA, 9 ml de méthanol et 100 µl de 2-mercaptoéthanol. L'OPA réagit, en 2 à 5 min, avec les acides aminés pour former des dérivés thioisindoïdes, hautement fluorescents, détectables avec une excitation maximum à 340 nm et une émission maximum à 455 nm. Les dérivés, ainsi formés, sont à peu près stables pendant environ 2 heures et demie. La méthode ne permet pas de séparer l'histidine de la glutamine, ni la glycine de la thréonine et ne détecte pas non plus la proline et la cystéine.

L'élution est réalisée à l'aide de solution d'acétate de sodium (50 mM) à pH 7 et du méthanol (HPLC) (74/26). Les deux solutions sont filtrées séparément sous vide sur filtre 0,2 µm (Millipore) avant utilisation. L'identification est réalisée par comparaison à des étalons standards.

Les analyses sont effectuées avec le détecteur en fluorescence. L'appareil consiste en un chromatographe Merck composé d'une pompe Waters Model 655 A-12, d'un contrôleur de gradient basse pression L-5000 LC (Hitachi), d'un injecteur rhéodyne avec boucle d'injection de 20 µl, d'un spectrophotomètre à détection en fluorescence F- 1050, et d'un intégrateur Merck Model D- 2000. Les acides aminés sont séparés sous les conditions suivantes : colonne Superspher 100 RP- 18, Lichrocart 250-3, température 20 °C, débit : 0,3 ml/min. Vingt µl sont injectés dans la colonne HPLC.

2.2 Vitamines

Les vitamines sont extraites et séparées par la méthode développée par DE ROECK-HOLTZHAUER *et al.* (1991). Les vitamines liposolubles (A1, D3, E, K1) nécessitent une saponification à l'aide de NaOH ou KOH, à l'exception de la vitamine K extraite seulement par solvant. Les vitamines hydrosolubles (B1, B2, B3 ou PP, B6, B12, C) sont extraites en milieu acide à part la vitamine B12 extraite par solvant. La séparation et le dosage sont effectués par HPLC en UV-Visible, à l'aide d'une colonne Purospher RP 18, Lichrocart 125-4 en phase inverse pour les vitamines liposolubles et d'une colonne NH2, Lichrocart 125-4 en phase normale pour les vitamines hydrosolubles à l'exception de la vitamine B12 qui est séparée par une colonne Purospher RP 18, Lichrocart 125-4. L'identification est faite par référence à des étalons standards.

La chromatographie liquide haute performance est réalisée avec un système comprenant une pompe L-6200 A, un détecteur Merck Model L-4500 UV/visible, un intégrateur Merck-Hitachi Model D-6500, assisté d'un logiciel Software dad system manager.

3 - RÉSULTATS

Les acides aminés combinés, dosés chez cette espèce forment 59 % de la matière sèche de la microalgue ($590 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$), alors que les acides aminés libres forment seulement 3,4 %. Ces derniers constituent 5,8 % des acides aminés totaux.

Dix-sept acides aminés ont été déterminés dont les principaux sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la méthionine, la phénylalanine et la lysine (tableau 1). L'étude des spectres met en évidence la présence de six catégories d'acides aminés (AA) : les AA aliphatiques, hydroxylés, soufrés, basiques, aromatiques et les diacides aminés (tableau 2).

Tableau 1 Composition en acides aminés libres et combinés ($n = 2$) par rapport à la matière sèche et en pourcentage par rapport aux totaux chez *M. pusillum*.

Table 1 Free (10^{-4} g g^{-1} dry matter) and combined (10^{-3} g g^{-1} dry matter) amino acids ($n = 2$) composition of *M. pusillum* (% of total AA).

	AA libres ($10^{-4} \text{ g g}^{-1} \text{ MS}$)	AA libres (%)	AA combinés ($10^{-3} \text{ g g}^{-1} \text{ MS}$)	AA combinés (%)
Asp	29,4 ^a (28,0-30,8) ^b	8,6	63,8 ^a (69,5-58,1) ^b	10,8
Glu	48,6 (48,1-49,1)	14,3	59,8 (59,7-59,8)	10,1
Ser	14,1 (13,5-14,7)	4,1	23,7 (24,3-23,1)	4,0
His-Gln	2,1 (2,2-2,0)	0,6	10,5 (10,7-10,3)	1,8
Gly-Thr	47,4 (46,8-48,0)	14,0	82,2 (81,6-82,7)	13,9
Arg	27,1 (26,0-28,2)	8,0	33,4 (33,8-32,9)	5,7
Ala	63,8 (62,1-65,5)	18,6	77,4 (78,5-76,3)	13,1
Tyr	6,2 (6,0-6,4)	1,8	19,4 (20,8-18,0)	3,3
Met	43,5 (39,5-47,4)	12,8	46,3 (44,6-47,9)	7,8
Trp	2,8 (2,7-2,9)	0,8	2,3 (2,8-1,8)	0,004
Val	12,4 (12,6-12,2)	3,6	30,4 (31,1-29,7)	5,1
Phe	14,7 (16,4-13,0)	4,3	40,1 (39,2-40,9)	6,8
Ile	5,6 (5,8-5,4)	1,6	28,1 (28,8-27,4)	4,8
Leu	8,2 (7,9-8,5)	2,4	25,9 (24,8-27,0)	4,3
Orn	0,7 (1,0-0,45)	0,2	-	-
Lys	12,4 (10,7-14,1)	3,7	47,0 (50,3-43,7)	7,9

^a : moyenne ; ^b : répétitions.

Acide Aspartique (Asp), Acide Glutamique (Glu), Sérine (Ser), Histidine (His), Glutamine (Gln), Glycine (Gly), Thréonine (Thr), Arginine (Arg), Alanine (Ala), Tyrosine (Tyr), Méthionine (Met), Tryptophane (Trp), Valine (Val), Phénylalanine (Phe), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Ornithine (Orn), Lysine (Lys).

Tableau 2 Regroupement des acides aminés combinés par catégories (% par rapport aux acides aminés combinés totaux).**Table 2** Categories of combined amino acids (% of total).

Acides aminés aliphatiques	27,4
Acides aminés hydroxylés	4,0
Acides aminés diacides	25,0
Acides aminés dibasiques	15,4
Acides aminés soufrés	7,8
Acides aminés aromatiques	10,5

Les AA aliphatiques (glycine, valine, leucine, et isoleucine) dominent largement le pool des acides aminés totaux, avec plus de 27 % du contenu en AA. Les diacides aminés (acides aspartique et glutamique) viennent au deuxième rang avec environ 25 %. Les acides dibasiques (15,4 %) sont relativement plus abondants que les acides aminés aromatiques (10,5 %) et les acides aminés soufrés (7,8 %). Il faut cependant noter que seule la méthionine est détectée parmi les AA soufrés par la méthode utilisée. Les acides aminés hydroxylés sont les plus faiblement représentés avec seulement 4 % des acides aminés totaux.

Les vitamines détectées chez *M. pusillum* sont au nombre de quatre (tableau 3). La teneur de la vitamine D ($6970 \mu\text{g g}^{-1}$) est de loin la plus élevée suivie de celle de la vitamine B3 ($2820 \mu\text{g g}^{-1}$) et de la vitamine B12 ($1860 \mu\text{g g}^{-1}$). La teneur en vitamine B2 est de $406 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tableau 3 Teneurs en vitamines (n = 2) détectées chez *Micractinium pusillum*.**Table 3** Vitamin content (n = 2) in *M. pusillum*.

	D	B2	B3	B12
Teneur ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	6970 ^a	406	2820	1860
	(6977-6963) ^b	(402-410)	(2810-2830)	(1856-1864)

^a : moyenne ; ^b : répétitions

4 - DISCUSSION ET CONCLUSION

Les teneurs en acides aminés combinés dosées chez *M. pusillum* (590 mg g^{-1} MS) sont plus élevées que celles enregistrées chez différentes souches de *Chlorella* (315 à 355 mg g^{-1} de MS) (AL-HINTY et SALMAN, 1989), mais elles sont du même ordre de grandeur que celles dosées chez certaines Chlorophycées d'eaux douces : *Chlamydomonas*, *Scenedesmus quadricauda* et *Selenastrum* (RENAUD et al., 1994).

Dix-sept acides aminés, parmi les vingt essentiels, ont été déterminés chez *M. pusillum* ; les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique,

l'alanine, la méthionine, la lysine, la phénylalanine et l'arginine. Les mêmes acides aminés, à quelques variations près, sont dominants chez d'autres espèces phytoplanctoniques (tableaux 4a et b). PARSONS *et al.* (1961) indiquent que l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glycine, l'alanine, la lysine et l'arginine sont retrouvés relativement en grande quantité chez le phytoplancton. Parmi ces acides aminés, l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'alanine sont fortement présents dans la microalgue (34 % en AA totaux). Cette forte concentration de ces trois acides aminés est rencontrée aussi chez *Dunaliella tertiolecta* (35 % d'AA totaux) (BOROWITZKA et BOROWITZKA, 1988).

Les acides aminés sont classés en six catégories d'acides aminés : les AA aliphatiques, hydroxylés, soufrés, basiques, aromatiques et les diacides aminés. La lecture des tableaux 2 et 4 montre que les acides aminés soufrés sont peu abondants. Cette déficience en acides aminés soufrés est relevée aussi chez *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Spirulina* (BECKER et VENKATARAMAN, 1984, ENDO *et al.*, 1974, MOKADY *et al.*, 1978). Selon BOROWITZKA (1988), les protéines des microalgues sont généralement déficientes en acides aminés soufrés.

Tableau 4a et b Composition en acides aminés combinés chez *M. pusillum* comparée à celle de quelques autres espèces d'algues phytoplanctoniques (% par rapport aux AA totaux). D'après (1) EPIFANIO (1979), (2) BOROWITZKA et BOROWITZKA (1988)(a) et BEN-AMOTZ & AVRON (1980)(b).

Table 4a and b Combined amino acids composition of *M. pusillum* compared to other phytoplanktonic species (% of total AA).

4a

	<i>T. suecica</i> (1)	<i>D. tertiolecta</i> (2)a	<i>D. bardawil</i> (2)b
A. Aspartique	10	10,4	10,4
A. Glutamique	13,5	12	12,7
Sérine	4,3	3,1	4,6
Histidine	2,2	1,6	1,8
Glycine	7,4	15,6	5,5
Thréonine	3,6	1,5	5,4
Arginine	6,4	4,3	7,3
Alanine	8,7	13	7,3
Tyrosine	3,2	Trace	3,7
Méthionine	2	Trace	2,3
Tryptophane	0,5	Trace	0,7
Valine	7,4	8,5	5,8
Phénylalanine	5,9	Trace	5,8
Isoleucine	4,8	5,2	4,2
Leucine	9,7	11,3	11
Ornithine	-	-	-
Lysine	6,6	6,7	7
Cystine	0,4	-	-
Proline	3,7	-	-
Cystéine	-	Trace	1,2

Tetraselmis suecica (1) ; *Dunaliella tertiolecta* (2)a ; *Dunaliella bardawil* (2)b

4b

	<i>M. pusillum</i> (1)	<i>C. chui</i> (1)	<i>I. galbana</i> (1)	<i>P. suecica</i> (1)	<i>T. pseudomona</i>
Asp	10,8	9,5	10,3	10,0	10,3
Glu	10,1	12,9	12,7	13,5	11,2
Ser	4,0	4,4	4,6	4,3	5,0
His-Gln	1,8	2,3 (His)	2,1(His)	2,2 (His)	2,4 (His)
Gly-Thr	13,9	6,5 (Gly) 3,8 (Thr)	6,5 (Gly) 3,8 (Thr)	7,4 (Gly) 3,6 (Thr)	7,0 (Gly) 4,2 (Thr)
Arg	5,7	6,6	7,5	6,4	6,6
Ala	13,1	8,1	8,6	8,7	6,8
Tyr	3,3	3,3	3,1	3,2	3,6
Met	7,8	2,3	2,3	2,0	2,3
Trp	0,004	0,3	0,3	0,5	0,4
Val	5,1	6,4	7,3	7,1	6,7
Phe	6,8	6,4	5,5	5,9	6,0
Ile	4,8	4,7	5,4	4,8	5,6
Leu	4,3	9,5	9,8	9,7	9,6
Orn	-	-	-	-	-
Lys	7,9	6,4	5,9	6,6	6,3
Cys*	-	0,7	0,8	0,4	1,0
Pro*	-	5,9	5,4	3,7	4,9

Carteria chui (1) ; *Isochrysis galbana* (1) ; *Platymonas suecica* (1) ; *Thalassiosira pseudomona* (1) ; * cystéine (Cys), proline (Pro).

En ce qui concerne les acides aminés libres, *M. pusillum* est plus riche (33,9 mg g⁻¹ MS), comparativement à huit espèces microalgales : *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira* sp, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Dunaliella* sp et *Nannochloris* sp, que DERRIEN *et al.* (1998) ont étudiées et dont les teneurs oscillent entre 89 et 470 µg g⁻¹ de MS. Il faut, cependant, dire que DERRIEN *et al.* (1998) n'ont précisé ni les conditions de culture ni l'état physiologique des cellules algales. La teneur en AA libres trouvée chez *M. pusillum* peut s'expliquer par la richesse en azote du milieu de culture utilisé.

Les acides aminés libres dosés chez *M. pusillum*, forment 5,8 % des AA totaux ; la teneur des AA combinés est certes supérieure à celle des AA libres, mais les proportions relatives de chacun d'eux par rapport au total sont sensiblement semblables, à l'exception de la phénylalanine et la lysine qui sont moins représentées. Selon AL-AMOUDI et FLYNN (1989) et SYRETT (1962), l'alanine et l'acide glutamique sont les premiers AA à apparaître suite à l'assimilation de NH₄⁺ après une déficience en azote.

Si une certaine constance dans la composition des acides aminés combinés est relevée chez les microalgues (DERRIEN 1996, MOUGET *et al.*, 1995), il faut noter, comme le soulignent plusieurs auteurs (BOROWITZKA, 1988, DE ROECK-HOLAZHAUER *et al.*, 1993, JÉZÉQUEL *et al.*, 1988, MARSOT *et al.*, 1991), que la concentration et la nature des acides aminés libres et combinés dépendent des espèces, de l'état physiologique, de l'âge de la culture, et des conditions de culture, particulièrement la teneur en azote. L'équilibre entre

l'accumulation et le métabolisme des acides aminés durant la synthèse des protéines et des différents constituants cellulaires affecte aussi la teneur des acides aminés libres (JÉZÉQUEL *et al.*, 1988).

En ce qui concerne les vitamines seules quatre sont identifiées et dosées chez *M. pusillum*, la vitamine D, parmi les vitamines liposolubles, et les vitamines B2, B3 et B12, parmi les vitamines hydrosolubles. Les autres vitamines n'ont pas été détectées. La comparaison des teneurs en vitamines de *M. pusillum* à celles de certaines microalgues et certains produits alimentaires montre que cette microalgue est plus riche en vitamines (tableau 5). SOEDER (1980) rapporte lui aussi que les teneurs en vitamines des microalgues sont plus élevées que celles des fruits et des végétaux. Ces fortes teneurs en vitamines chez certaines espèces de microalgues sont mentionnées également par DE ROECK-HOLTZHAUER *et al.* (1991) : 4280 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS pour la vitamine A1 et 6323 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS pour la vitamine E sont citées chez *Tetraselmis suecica*. Selon ces mêmes auteurs, le contenu en vitamine PP chez *Isochrysis galbana* est de 2 690 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS. POULIOT *et al.* (1986) ont indiqué, sans donner de valeur, que *Spirulina* est très riche en vitamine B12. Ce rappel montre que la composition vitaminique des microalgues est variable d'une espèce à l'autre. Il faut, toutefois, rappeler que chez certaines microalgues, les vitamines synthétisées sont parfois excrétées dans le milieu extérieur (BOROWITZKA, 1988).

Sur le plan de l'exploitation industrielle des vitamines comme la vitamine B12, qui a pour seule source la biosynthèse microbienne par les propionibactéries (ARNAUD et GUIRAUD, 1993, HIMMI, 1998), cette microalgue pourrait présenter un grand intérêt. En effet, celle-ci a montré des teneurs intéressantes comparativement aux teneurs trouvées chez *Butyribacterium methylophilicum* (4 mg g^{-1} de MS) (HATANAKA *et al.*, 1988).

La composition biochimique des microalgues est variable suivant les facteurs du milieu tels que la température, la lumière, la photopériode, le CO_2 , le pH, l'oxygène dissous, les sels minéraux, l'azote, le phosphore, le carbone organique, les oligo-éléments, la salinité et le stress nutritif (CALLEGARI, 1989, JÉZÉQUEL *et al.*, 1988, MARIN *et al.*, 1998, OGBONNA *et al.*, 1998). L'optimisation de la synthèse de ces produits est possible par le biais de méthodes génétiques, quoique cette voie soit encore à ses débuts, et essentiellement par forçage physiologique qui est actuellement le principal moyen utilisé (EMDADI 1992, ZHANG et LEE, 1997).

La caractérisation biochimique de *M. pusillum* a été étudiée sur milieu synthétique et en conditions de lumière et de température contrôlées. Dans un but de comparaison, il serait intéressant dans un travail ultérieur de procéder à sa culture et à l'étude de sa composition sur eau usée. Ceci permettra d'appréhender les perspectives de valorisation sur le plan biotechnologique de la biomasse algale produite dans les eaux usées.

Tableau 5 Composition en quelques vitamines hydrosolubles et liposolubles de la microalgue *M. pusillum*, comparée à d'autres espèces algales et certaines denrées alimentaires conventionnelles (teneurs en $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche).

Table 5 Vitamin content of *M. pusillum* compared to others micro-algal species and some conventional foods ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter).

Vit.	espèce	Teneur	Aliment (5)	Teneur	
D	<i>Pavlova lutheri</i> (1)	39	Huile de foie de morue	2,12	
	<i>Tetraselmis suecica</i> (1)	14	Huître	0,25-1,87	
	<i>Skletonema costatum</i> (1)	11	Œufs	0,025	
	<i>Isochrysis galbana</i> (1)	5	Abat	0,002-0,02	
	<i>M. pusillum</i> (*)	6 970	Lait	0,0001-0,0025	
B2	<i>Pavlova lutheri</i> (1)	6	Levure boulangère	25-30	
	<i>Tetraselmis suecica</i> (1)	42			
	<i>Skletonema costatum</i> (1)	37			
	<i>Isochrysis galbana</i> (1)	14			
	<i>Chaetoceros calcitrans</i> (1)	12			
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (2)	36,6			
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (3)	336			
	<i>M. pusillum</i> (*)	406			
B3 (PP)	<i>Pavlova lutheri</i> (1)	955	Levure boulangère	282	
	<i>Tetraselmis suecica</i> (1)	1 410	foie de veau	170	
	<i>Skletonema costatum</i> (1)	511	Saumon	75	
	<i>Isochrysis galbana</i> (1)	2 690	Noisette	53	
	<i>Chaetoceros calcitrans</i> (1)	25			
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (2)	120			
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (3)	1 200			
	<i>Spirulina platensis</i> (3)	118			
		<i>M. pusillum</i> (*)	2 820		
	B12	<i>Pavlova lutheri</i> (1)	1 162	Foie de bœuf	0,2-0,6
		<i>Tetraselmis suecica</i> (1)	9	Lait	0,01-0,04
<i>Skletonema costatum</i> (1)		117			
<i>Isochrysis galbana</i> (1)		89			
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (1)		8			
<i>Scenedesmus obliquus</i> (2)		0,44			
<i>Spirulina platensis</i> (4)		1,6			
	<i>M. pusillum</i> (*)	1 820			

(1) DE ROECK-HOLTZAUER *et al.*, 1991, (2) SOEDER et HEGEWALD, 1988, (3) BOROWITZKA, 1988, (4) RICHMOND, 1988, (5) LÉBOULANGER, 1977, * présente étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AARONSON S., BERNER T., DUBINSKY Z. 1980. Microalgae as source of chemicals and natural products. Dans *Algae Biomass Production and Use*. Shelef G. & Soeder C. J. (éds), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 852 p.
- AL-AMOUDI A. O., FLYNN K. J., 1989. Effect of nitrate-N incorporation on the composition of the intracellular amino acid pool of N-deprived *Tetraselmis marina*. *Br. Phycol. J.*, 24, 53-61.
- AL HINTY J. S., SALMAN E. E. 1989. Growth and w3- fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77, 337-351.
- ARNAUD A., GUIRAUD J. P., 1993. Le métabolisme microbien. Dans *Biotechnologie*. SCRIBAN R. [éd.], Technique et Documentation - Lavoisier, Londres, New York, Paris, 904 p.
- BECKER E. W., VENKATARAMAN L. K., 1984. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4, 105-125.
- BEN-AMOTZ A., AVRON M., 1980. Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. Dans *Algae Biomass Production and Use*. Shelef G. & Soeder C. J. (éds). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 852 p.
- BOROWITZKA L. J., BOROWITZKA M. A., MOULTON T. P., 1984. Production and utilization of microalgae. *Hydrobiologia*, 116, 115-120.
- BOROWITZKA M. A. 1988. Vitamins and fine chemicals from microalgae. Dans *Microalgal Biotechnology*, BOROWITZKA M. A. et BOROWITZKA L. J. (éds). Cambridge University Press, Cambridge: 153-196.
- BOROWITZKA M. A., BOROWITZKA L. J., 1988. *Dunaliella*. Dans *Microalgal Biotechnology*, BOROWITZKA M. A. et BOROWITZKA L. J. (éds). Cambridge University Press, Cambridge: 27-58.
- BOUARAB L., LOUDIKI M., DAUTA A., 2002. Croissance en autotrophie et en mixotrophie de la microalgue *Micractinium pusillum* Fres. Isolée d'un lagunage naturel : influence de la lumière et de la température. *Rev. Sci. Eau* 15, 73-86.
- CALLEGARI J. P., 1989. Feu vert pour les microalgues. *Biofutur*, 76, 25-38.
- CIFERRI O., 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Reviews*, 47, 551-578.
- COUTÉ A., 1992. Le monde secret des microalgues. *Séminaire sur la Cosmétotechnie des produits marins*, Nantes (France), 9-13 Mars.
- DAUTA A., 1982. Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. 1. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Annls. Limnol.*, 18, 217-262.
- DE LA NOÛE J., DE PAUW N., 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.*, 6, 725-770.
- DE ROECK-HOLTZAUER Y., CLAIRE C., BRESLIN F., AMICEL L., DERRIEN A., 1993. Vitamin, free amino acid and fatty acid composition of some marine planktonic microalgae used in aquaculture. *Botanica Marina*, 36, 321-325.
- DE ROECK-HOLTZAUER Y., QUERRE I., CLAIRE C., 1991. Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. *J. Appl. Phycol.*, 3, 259-264.
- DERRIEN A., 1996. Étude par chromatographie liquide de la composition en acides aminés libres des principales microalgues fourragères utilisées en aquaculture en vue de leur valorisation cosmétique. Thèse de doctorat, Univ. de Nantes, faculté de pharmacie. 127 p.
- DERRIEN A., COIFFARD L. J. M., COIFFARD C., DE ROECK-HOLTZAUER Y., 1998. Free amino acid analysis of five microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 10, 131-134.
- EMDADI M. D., 1992. Acides gras polyinsaturés et microalgues. Vème colloque international valorisation des produits marins. Nantes (France) 1-2-3 déc.
- ENDO H., NAKAJIMA K., CHINO R., SHIROTA M., 1974. Growth characteristics and cellular components of *Chlorella*

- regularis*, heterotrophic fast growing strain. *Agr. Biol. Chem.*, 38, 9-18.
- EPIFANIO C. E., 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* and the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 18, 1-12.
- GUDIN C., 1992. Biotechnologie et microalgues cyanobactéries au MRE. Vème colloque international valorisation des produits marins. Nantes (France) 1-2-3 déc.
- HATANAKA H., WANG E., TANIGUCHI M., IJIMA S., KOBAYASHI T., 1988. Production of vitamin B12 by a fermenter with a hollow-fiber module. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 470-473.
- HIMMI H., 1998. Études des voies fermentaires du glycérol chez *Enterobacter agglomerans*, *Clostridium butrycum*, *Propionibacterium acidopropionici* et *Propionibacterium shermanii* en anaérobiose. Doctorat d'état Es-science, Univ. Cadi Ayyad, Fac. des Sci. Semlalia, Marrakech, 137 p.
- JÉZÉQUEL V. M., POULET S. A., HARRIS R. P., MOAL J., SAMAIN J. F., 1988. Interspecific and intraspecific composition and variation of free amino acids in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 44, 303-313.
- KITANO M., MATSUKAWA R., KARUBE I., 1997. Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic conditions. *J. Appl. Phycol.*, 9, 559-563.
- KITANO M., MATSUKAWA R., KARUBE I., 1998. Enhanced eicosapentaenoic acid production by *Navicula saprophila*. *J. Appl. Phycol.*, 10, 101-105.
- LEBOULANGER J., 1977. *Les vitamines. Biochimie, mode d'action thérapeutique*. Hoffman-La-Roche, Neuilly-sur-Seine, 193 p.
- LEE Y. K., 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.*, 9, 403-411.
- LINDROTH P., MOPPER K., 1979. High performance liquid chromatography determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivation with ophthalaldehyde. *Anal. Chem.*, 51, 1667-1674.
- MARIN N., MORALES F., LODEIROS C., TAMIGNEAUX E., 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J. Appl. Phycol.*, 10, 405-411.
- MARSOT P., CEMBELLA A. D., MOUHRI K., 1991. Croissance de la biomasse azotée du *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) en cultures discontinues dialysante et non dialysante. *Can. J. Microbiol.*, 38, 945-952.
- MOKADY S., YANNAI S., EINAV P., BERK Z., 1978. Nutritional evaluation of the protein of several algae species for broilers. *Arch. Hydrbiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 11, 89-97.
- MOUGET J. L., LEGENDRE L., DE LA NOÛE J., 1995. Long-term acclimation of *Scenedesmus bicellularis* to high-frequency intermittent lighting (100Hz). II. Photosynthetic pigments, carboxylating enzymes and biochemical composition. *J. Plankton Res.*, 17, 875-890.
- OGBONNA J. C., TOMIYAMA S., TANAKA H., 1998. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* for efficient production of α -tocopherol. *J. Appl. Phycol.*, 10, 67-74.
- PARSONS T. R., STEPHENS K., STRICKLAND J. D. H., 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 18, 1001-1016.
- POULIOT Y., BUELNA G., DE LA NOÛE J., 1986. Caractérisation de différentes microalgues pour la valorisation d'effluents polluants. Proceedings of the Renewable Energy Conference, Winnipeg, Manitoba, Canada, 23-26 juin.
- RENAUD S. M., PARRY D. L., THINH L. V., 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I : gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *J. Appl. Phycol.*, 6, 337-345.
- RICHMOND A., 1988. *Spirulina*. Dans *Microalgal Biotechnology*, BORO-WITZKA M. A. & Borowitzka L. J. (éds), Cambridge University Press, Cambridge: 85-121.
- RIVALLAND P., GALDEMAR B., DE ROECK-HOLTZHAUER Y., 1990. Evaluation de

- l'efficacité antiradicalaire des différentes SOD par screening sur fibroblastes humains. XIII^e journées européennes de cosmétologie, IV^e colloque sur la valorisation des produits de la mer. 14-16 nov., Nantes.
- SOEDER C. J., 1980. The scope of microalgae for food and feed. Dans *Algae Biomass Production and Use*, SHELEF G. & SOEDER C. J. (éds), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 852 p.
- SOEDER C. J., HEGEWALD E., 1988. *Scenedesmus*. Dans *Microalgal Biotechnology*, BOROWITZKA M. A. et BOROWITZKA L. J. (éds), Cambridge University Press, Cambridge, 477 p.
- SWITZER L., 1982. *Spirulina, the whole food revolution*, Proteus Corporation, Bantam Books, Toronto : 129-134.
- SYRETT P. J., 1962. Nitrogen assimilation. Dans *Physiology and Biochemistry of Algae*, Lewin J. (éd.), Academic Press, New York: 171-188.
- YAMAGUCHI K., 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol.*, 8, 487-502.
- ZHANG D. H., LEE Y. K., 1997. Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of green alga, *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, 9, 459-463.