

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Utilisation et valorisation du perméat de lactosérum acide par la microalgue *Scenedesmus obliquus* pour la production d'enzyme de type β -galactosidase

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en ingénierie
en vue de l'obtention du grade de maître en sciences appliquées
(M. Sc. A.)

PAR

© [Jihed Bentahar]

[Avril 2018]

Composition du jury :

Adrian Ilinca, président du jury, UQAR

Jean-Sébastien Deschênes, directeur de recherche, UQAR

Youssef Djibril Soubaneh, examinateur externe, UQAR

Dépôt initial le 13 Décembre 2017

Dépôt final le 19 Avril 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Je dédie ce mémoire à :

Ma mère et mon père

Toute ma famille

Tous mes amis

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Dieu le tout puissant de m'avoir donné courage et santé pour achever ce travail.

Un grand merci à Monsieur Jean-Sébastien Deschênes, d'avoir accepté de diriger ce travail avec compétence et dévouement, et de m'avoir permis de mener à bien cette étude.

J'adresse ma sincère gratitude à Madame Lucie Beaulieu (U. Laval, INAF) et Monsieur Alain Doyen (U. Laval, INAF) pour leur collaboration attentionnée, leur écoute attentive et leurs précieux conseils qui m'ont guidé tout au long de ce projet.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur Jonathan Gagnon, Monsieur Steeven Ouellet, Monsieur Jonathan Coudé, Madame Marie-Eve Anglehart et Madame Mélanie Simard, non seulement pour le savoir qu'ils m'ont transmis, mais aussi pour leur fierté et leur ambition qui m'inspire.

Je tiens à remercier tous ceux qui, dans l'UQAR ou dans l'ISMER par leurs conseils, leur amitié et leurs compétences, m'ont été d'un secours d'un moment à un autre au long de ce projet.

AVANT-PROPOS

Ce projet a été réalisé aux laboratoires du Centre d'Appui à l'Innovation par la Recherche à l'Université du Québec à Rimouski. Il est présenté sous forme d'un mémoire par articles. Le premier chapitre présente une introduction générale concernant le problème de l'utilisation et de la valorisation de l'un des rejets industriels les plus polluants dans l'industrie laitière (perméat de lactosérum) par le biais de la microalgue *Scenedesmus obliquus* afin de produire l'enzyme spécifique de type β -galactosidase. Le deuxième chapitre constitue une revue de littérature pertinente dans le domaine de valorisation du lactosérum et de son perméat notamment par les microalgues afin de produire des composés à haute valeur ajoutée. Le troisième chapitre montre les détails relatifs à la méthodologie du travail, aux matériels utilisés et aux préparations des cultures pour montrer le niveau de précautions prises. Le plan des expériences et les méthodes analytiques utilisées sont ensuite décrits soigneusement et les résultats obtenus ont été discutés dans le quatrième et le cinquième chapitre. Le sixième et dernier chapitre présente une conclusion générale et quelques pistes à considérer pour la poursuite de ce projet.

RÉSUMÉ

L'objectif général du présent travail est la valorisation du perméat de lactosérum acide issu de la production du yogourt grec par le biais de la microalgue *Scenedesmus obliquus* afin de produire l'enzyme spécifique de type β -galactosidase. Les difficultés rencontrées pour exploiter ce coproduit riche en lactose combinées au besoin d'augmenter la production de la biomasse microalgale nous ont amené à penser à la réalisation de cette étude, qui n'a jamais été abordé.

Une des originalités de ce projet consiste à étudier la production d'une enzyme commercialement importante et largement utilisée dans l'industrie alimentaire en utilisant un produit secondaire à charge environnementale élevée, à faible valeur marchande, à forte valeur nutritionnelle et abondant partout dans le monde pour la culture d'une espèce de microalgue connue pour sa capacité à assimiler une grande variété de sources de carbone et à produire différents composés bioactifs.

La première étape consiste à une investigation expérimentale des effets du mode de culture, de source du carbone organique et du ratio C/N, sur la productivité enzymatique. Cette investigation a permis d'identifier les variables les plus pertinentes pour une véritable utilisation du perméat de lactosérum acide. La deuxième étape du projet a permis d'introduire le perméat acide dans le milieu de culture de *Scenedesmus obliquus* après ajustement du pH. Les proportions du perméat et de nitrate contenues dans le milieu de culture basal (BBM) ont été modifiées afin d'optimiser la productivité enzymatique. En se basant sur ces résultats, la cinétique de productivités enzymatique et algale a été suivie sous les meilleures conditions d'utilisation du perméat de lactosérum acide et les cultures ont été inoculées à l'échelle laboratoire en flacons agités puis en photobioréacteur de 5 L pour imiter une mise en œuvre industrielle réaliste pour une éventuelle application commerciale.

Les résultats de cette étude révèlent que le perméat de lactosérum acide constitue un nutriment potentiel et peu coûteux pour la culture de *Scenedesmus obliquus*. Sa présence dans des conditions mixotrophes augmente significativement la biomasse et la productivité enzymatique *volumétrique* (totale), mais semble réduire l'activité enzymatique *spécifique*.

Mots clés : [Perméat de lactosérum acide; *Scenedesmus obliquus*; β -galactosidase; conditions de culture; lactose; biomasse microalgale; activité enzymatique *spécifique*; activité enzymatique *volumétrique*]

ABSTRACT

The main objective of the present work is the valorization of the acid whey permeate (obtained after Greek-style yogurt production) by using the microalgae specie *Scenedesmus obliquus* in order to produce the β -galactosidase enzyme. Difficulties encountered to valueate such a coproduct known for its high lactose content and the need for enhancing microalgal growth and biomass productivity, led us to think about the realization of this study, which has never been investigated.

One of the originalities of this project is to study the production of a commercially important enzyme, widely used in the food industry by using an abundant secondary product with a high environmental impact, low market price and high nutritional value for the culture of a microalgal specie known for its ability to assimilate a wide variety of carbon sources and potential to produce different bioactive compounds.

The first phase of the project was an experimental investigation of the influence of culture mode, organic carbon sources and C/N ratio on enzyme productivity. This investigation identified the most relevant conditions for the practical use of acid whey permeate in microalgae cultures. The second phase of the project consisted in introducing the acid permeate into *Scenedesmus obliquus* culture medium, requiring pH adjustment. The proportions of permeate and nitrogen contained in the basal culture medium (BBM) have been modified in order to optimize the enzyme productivity. Based on these results, the kinetics of enzyme and algal biomass production were followed under a certain optimum condition of acid whey permeate incorporation: laboratory-scale cultures in shake-flasks and in a 5 L photobioreactor were evaluated as a proxy for a realistic industrial implementation for an eventual commercial application.

The results of this study reveal that acid whey permeate presents a potential and inexpensive nutrient for the cultivation of *Scenedesmus obliquus*. Its presence under mixotrophic conditions significantly increases biomass and *volumetric* (total) enzyme productivities, but appears to reduce *specific* enzyme activity.

Keywords : [Acid whey permeate; *Scenedesmus obliquus*; β -galactosidase; culture conditions; lactose; microalgal biomass; *specific* enzymatic activity; *volumetric* enzymatic activity]

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
AVANT-PROPOS	XI
RÉSUMÉ.....	XIII
ABSTRACT	XV
TABLE DES MATIÈRES	XVII
LISTE DES TABLEAUX	XXI
LISTE DES FIGURES.....	XXIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	XXV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 MISE EN CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE.....	1
1.2 OBJECTIFS	5
1.3 CONTRIBUTIONS ORIGINALES	5
1.4 METHODOLOGIE	7
1.5 PLAN DU MEMOIRE	8
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTERATURE	11
2.1 LE LACTOSERUM ET SON PERMEAT: GENERALITES ET APPLICATIONS.....	11
2.1.1 QUANTITES PRODUITES ET CHARGE POLLUANTE.....	12
2.1.2 VALORISATION DU LACTOSERUM ET DE SON PERMEAT	13
2.2 LES MICROALGUES : GENERALITES ET APPLICATIONS.....	18
2.2.1 COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES MICROALGUES	19

2.2.2	CONDITIONS DE CULTURE ET SYSTEMES DE PRODUCTION DES MICROALGUES	
	21	
2.2.3	APPLICATIONS COMMERCIALES DES MICROALGUES.....	26
2.3	LES PRODUITS MICROALGAUX A HAUTE VALEUR AJOUTEE	30
2.3.1	LES ACIDES GRAS ET LEURS DERIVES	30
2.3.2	LES PIGMENTS.....	33
2.3.3	LES VITAMINES	37
2.3.4	LES POLYSACCHARIDES.....	39
2.3.5	LES ENZYMES	41
2.4	LES BETA-GALACTOSIDASES ET LEURS APPLICATIONS POTENTIELLES	45
2.4.1	LES SOURCES DE B-GALACTOSIDASE.....	45
2.4.2	LES APPLICATIONS POTENTIELLES DES B-GALACTOSIDASES	49
	CHAPITRE 3 METHODOLOGIE DU TRAVAIL.....	53
3.1	ETAPES PREPARATOIRES : CULTURE ET MILIEU	53
3.2	PLAN EXPERIMENTAL	55
3.3	METHODES D'ANALYSE	57
3.3.1	MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	57
3.3.2	MESURE DE LA MASSE SECHE	59
3.3.3	ANALYSE STATISTIQUE	59
	CHAPITRE 4 INVERSTIGATION DE LA PRODUCTION DE BETA-	
	GALACTOSIDASE PAR LA MICROALGUE <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i>	
	DANS DES CONDITIONS DE CULTURE DETERMINEES	61
	AVANT-PROPOS	61
4.1	ABSTRACT	62
4.2	INTRODUCTION	63
4.3	MATERIALS AND METHODS	65
4.3.1	CULTURE AND MEDIUM.....	65
4.3.2	EXPERIMENTAL DESIGN.....	65

4.3.3 ANALYTICAL METHODS.....	66
4.4 RESULTS	68
4.4.1 INFLUENCE OF THE CULTURE MODE	68
4.4.2 INFLUENCE OF THE ORGANIC SUBSTRATE	69
4.4.3 INFLUENCE OF CARBON AND NITROGEN CONCENTRATIONS	70
4.4.4 KINETICS OF ENZYME ACTIVITY	71
4.5 DISCUSSION.....	73
4.6 ACKNOWLEDGMENT.....	75
4.7 REFERENCES.....	75
CHAPITRE 5 PERMEAT DE LACTOSERUM ACIDE : UN MILIEU DE CULTURE ALTERNATIF POUR LA MICROALGUE SCENEDESMUS OBLIQUUS ET LA PRODUCTION DE BETA-GALACTOSIDASE	79
AVANT-PROPOS	79
5.1 ABSTRACT.....	80
5.2 INTRODUCTION.....	81
5.3 MATERIALS AND METHODS	84
5.3.1 CULTURE MAINTENANCE AND MEDIUM	84
5.3.2 AWP USE : GROWTH OPTIMIZATION AND ENZYME PRODUCTION	85
5.3.3 COMPOSITIONAL AND ANALYTICAL ANALYSIS.....	86
5.3.4 STATISTICAL ANALYSIS	88
5.4 RESULTS	88
5.4.1 COMPOSITION OF AWP	88
5.4.2 INFLUENCE OF AWP USE	89
5.4.3 INFLUENCE OF THE NITRATE CONCENTRATIONS.....	90
5.4.4 KINETICS OF GROWTH AND B-GALACTOSIDASE PRODUCTION IN THE PRESENCE OF AWP	91
5.5 DISCUSSION.....	93
5.6 ACKNOWLEDGMENT.....	97
5.7 REFERENCES.....	97

CHAPITRE 6 CONCLUSION GÉNÉRALE.....	101
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition générale du perméat de lactosérum doux et acide.....	12
Tableau 2 : Composition chimique générale dans certaines microalgues par pourcentage de poids sec.....	20
Tableau 3 : Comparaison des propriétés de différents systèmes de cultures microalgales ..	25
Tableau 4 : Les acides gras polyinsaturés de microalgues particulièrement intéressants.....	32
Tableau 5 : Contenu des principaux caroténoïdes, lipides ou hydrates de carbone par rapport à divers facteurs de stress a induit leur accumulation dans certaines espèces de microalgues (en % de la masse sèche).....	37
Tableau 6 : Production de polysaccharides par certaines espèces de microalgues.....	40
Tableau 7 : Propriétés des β -galactosidases microbiennes	48
Tableau 8 : Composition chimique du Bold's Basal Medium (BBM).....	54
Tableau 9 : Compositional analysis of the acid whey solution obtained from STELA Dairy Research Center, Institute of Nutrition and Functional Foods, Department of Food Sciences, Laval University, Quebec (Canada). ^a	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Différents procédés de valorisation de lactosérum (Siso, 1996 ; Panesar et Kennedy, 2012 ; Da-Silva et al., 2014)	15
Figure 2 : Exemple de valorisation de la biomasse microbienne : domaines d'application et différents bioproduits (Subhadra et Edwards, 2010)	17
Figure 3 : Vue aérienne d'un étang de type «raceway» (Chisti, 2007)	24
Figure 4 : Photobioréacteur tubulaire avec un réseau tubulaire horizontal et parallèle (Chisti, 2007)	25
Figure 5 : Différents produits énergétiques provenant des microalgues (Da-Silva et al., 2014)	29
Figure 6 : Applications biotechnologiques des β -galactosidases. (f) enzymes actives au froid; (t) enzymes thermophiles (Oliveira et al., 2011)	47
Figure 7 : Photo d'ultrafiltration stérilisante du perméat de lactosérum acide	55
Figure 8 : Enzymatic activities and dry weights of microalgae cultures grown in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions; Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).....	69
Figure 9 : Enzymatic activities and dry weights of microalgae cultures grown in mixotrophic and photoautotrophic conditions; Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).	70

Figure 10 : Enzymatic activities and dry weights of microalgae cultures grown in mixotrophic conditions (initial nutrient concentrations indicated); Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).....	71
Figure 11 : Evolution of cell dry weights and enzymatic activities through time in mixotrophic conditions (initial nutrient concentrations indicated); Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).....	72
Figure 12 : Daily-averaged volumetric enzyme productivity in mixotrophic conditions (initial nutrient concentrations indicated); Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). .	73
Figure 13 : Greek-style yogurt processing including Yogurt concentration by ultrafiltration (Paredes Valencia, 2016).....	85
Figure 14 : Enzymatic activities and dry weights of cultures grown on various proportions of AWP, compared to a control with 20 g.L ⁻¹ pure lactose. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).....	90
Figure 15 : Enzymatic activities and dry weights of cultures grown on a constant proportion of AWP and various concentrations of BBM. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).....	91
Figure 16 : Process kinetics with AWP in shake-flask conditions. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).	92
Figure 17 : Process kinetics with AWP in photobioreactor conditions. Results are expressed as the mean value from two measurements of the same system \pm SD (n = 2).	93

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AGPI	Acides gras polyinsaturés à longue chaîne.
BBM	Bold's Basal Medium.
DBO	Demande biologique en oxygène.
DCO	Demande chimique en oxygène.
GOS	Galacto-oligosaccharides.
GH	Glycosyl hydrolase.
GRAS	Généralement reconnu comme sûr (Generally Recognized As Safe).
kT	Kilo Tonnes.
m	Masse.
ONPG	O-nitrophényl- β -D-galactoside.
PL	Perméat de lactosérum.
SCP	Protéine d'organismes unicellulaires (Single-cell protein).
SDS	Sodium dodecyl sulfate.
SEA	Activité enzymatique spécifique (Specific enzymatic activity).
V	Volume.
VEA	Activité enzymatique volumétrique (Volumetric enzymatic activity).

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 MISE EN CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

Le lactosérum, appelé aussi petit lait, est le liquide vert-jaunâtre issu de la coagulation du lait. Il est composé de 93-94% (V/V) d'eau, 4-6% (m/V) de lactose et 0.5-1% (m/V) de protéines laitières, de vitamines, de lipides et de minéraux (Kosikowski et Wierzbicki, 1973 ; Smithers, 2008). C'est le principal produit secondaire issu de l'industrie laitière. Selon la procédure utilisée pour la précipitation des caséines, deux catégories de lactosérums peuvent être distinguées, les lactosérums acides (pH <5) et les lactosérums doux (pH 6-7). Les lactosérums acides (ex. yaourt grec) ont typiquement des teneurs en cendres plus élevées et des teneurs en protéines plus faibles que les lactosérums doux (ex.: fromage à pâte pressée) (Mawson, 1994).

La production de lactosérum dans le monde est estimée à environ 180 à 190 million de tonnes par an (Baldasso et al., 2011). Au Canada 2 100 000 de tonnes de lactosérum sont produites chaque année, dont 1 200 000 tonnes au Québec (Girard, 2014). Il présente un problème majeur comme étant l'un des rejets industriels les plus polluants à cause de la fermentation organique qui peut avoir lieu. Sa charge organique est très élevée et sa BDO (demande biologique en oxygène) oscille aux environs de 40 000 mg.L⁻¹ alors que la norme de rejet pour une entreprise traitant ses effluents de façon autonome est de 30 mg.L⁻¹ (Poirier, 1996).

La gestion de l'utilisation et du rejet de lactosérum devient de plus en plus stricte en matière de qualité des effluents (Farizoglu et al., 2004). En effet, un déversement direct du lactosérum dans les cours d'eau (rivières, fleuves, etc.) génère une diminution du contenu en oxygène dissous, des problèmes d'eutrophisation et de toxicité modifiant les propriétés

physico-chimiques des écosystèmes aquatiques (Arevalo, 2017). Au Québec, la norme de rejet moyenne exigé par le Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs (2011) ne peut pas dépasser 10 mg DBO₅.L⁻¹. Pour respecter cette norme, les industries agroalimentaires ont besoin d'un prétraitement physico-chimique suivi d'un traitement biologique. Un traitement tertiaire peut également être requis à condition que ces traitements soient conçus de façon très sécuritaire et que l'opération soit constamment optimale (Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs, 2011).

Selon Baldasso et al. (2011), seulement la moitié du lactosérum est valorisé dans le monde ce qui exige de trouver des solutions simples et économiques pour la valorisation de ce coproduit. Les procédés de filtration membranaires ont permis de récupérer la fraction protéique du lactosérum afin de générer un concentré à fort intérêt nutritionnel et commercial. L'inconvénient est toutefois la production d'un nouveau coproduit riche en lactose appelé le perméat de lactosérum (environ 0.8 million de tonnes produites par an au Québec) ayant une charge environnementale élevée (DBO > 25 000 mg.L⁻¹) (Norton et al., 1994) et une faible valeur monétaire (environ 0.5 \$.Kg⁻¹ de poudre).

Le perméat de lactosérum (PL) a actuellement des débouchés commerciaux limités. D'une part, ce coproduit est utilisé directement dans l'alimentation porcine, ou plus rarement séché et vendu sous la forme d'une poudre de lactose. D'autre part, les procédés d'extraction du lactose sont connus, mais demeurent très coûteux, ce qui fait en sorte que cette avenue de valorisation n'est pas à la portée de tous les industriels (Jacques, 1993). Il est à noter qu'aucune stratégie de valorisation ne peut atteindre cet objectif sans valoriser le lactose puisqu'il représente plus de 75% des solides dissous dans le lactosérum (Girard, 2014 ; Smithers, 2008).

Les problèmes nutritionnels et fonctionnels causés par ce disaccharide (lactose) sont bien connus. En carence de production d'une enzyme spécifique appelée lactase (β -galactosidase), le lactose ne peut pas être hydrolysé et il passe directement dans le gros intestin, où il produit une déshydratation, une mauvaise absorption de calcium, des diarrhées, des flatulences, des éructations et des crampes abdominales et, dans des cas graves, des

diarrhées aqueuses, avec des selles fréquentes et parfois explosives (Shukla, 1975). Il a été estimé que plus de 70% de la population adulte dans le monde souffrent soit d'une mauvaise digestion ou d'une intolérance au lactose (de Vrese et al., 2001, Khabarova et al.; 2011, Rosolen et al., 2015). Un autre problème lié au lactose est sa faible solubilité qui conduit souvent à sa cristallisation, à cause de la texture sableuse ou granuleuse qu'il confère à certains produits laitiers tels que la crème glacée et les produits de confiseries à forte teneur en lait (Zarate et Lopez-Leiva, 1990). Un procédé approprié et économiquement faisable pour l'hydrolyse de lactose peut diminuer certaines difficultés technologiques associées à la cristallisation du lactose et ouvrir des nouvelles possibilités pour l'utilisation de lactosérum à travers la production des édulcorants et le développement des nouveaux produits à partir de lactosérum à lactose hydrolysé (Zadow, 1993).

En effet, le lactose peut être hydrolysé en glucose et galactose par le biais d'une enzyme spécifique appelée lactase ou encore β -galactosidase et l'utilisation de cette enzyme en tant que solution de l'intolérance au lactose, de la cristallisation du lactose et comme méthode pour produire des galacto-oligosaccharides (GOS) a été étudié (Daniels, 1985 ; Flaschel et al., 1982, Davies et al., 1994 ; Kim et Rajagopal, 2000 ; Nakkharat et al., 2006 ; Chen et al., 2008).

Les enzymes de type β -galactosidase sont largement distribuées dans la nature et peuvent être trouvées dans les microorganismes (bactéries, champignons, levures), les plantes et organes des animaux (Nagy et al., 2001; Haider et Husain, 2007a), mais les enzymes d'origine microbienne montrent une productivité plus élevée (Rosolen et al., 2015), et donc les enzymes obtenues à partir d'*Aspergillus* et de *Kluyveromyces* sont les principaux enzymes utilisés dans le milieu industriel (Klewicki, 2007). De plus, certaines caractéristiques d'intérêt pour l'industrie, telles un pH optimal acide, la capacité d'opérer à des faibles températures (4°C) et le domaine catalytique de l'enzyme (ex. Glycosyl hydrolase (GH) famille 35) (Chantarangsee et al., 2007) sont très recherchées. Ainsi, ce type d'enzyme a été isolé à partir de nombreux microorganismes, caractérisé de manière approfondie et testé pour application commerciale, mais seulement quelques sources sont actuellement reconnues

comme « généralement sûres » (GRAS) pour l'utilisation dans les aliments et les systèmes alimentaires (Gekas et López-Leiva, 1985 ; Linko et al., 1992 ; Hsu et al., 2005). Comme les propriétés, la spécificité et la structure de la β -galactosidase diffèrent significativement selon la source microbienne de l'enzyme, il était nécessaire de chercher des nouvelles sources de β -galactosidase stable à des hautes et des basses températures et qui peuvent être approuvée comme GRAS pour une éventuelle utilisation dans le secteur de la nutrition humaine. Une source à considérer serait les microalgues, qui ont déjà été exploitées avec succès en industrie alimentaire (Christaki et al., 2011) grâce à leur capacité de produire une large gamme de métabolites à hautes valeurs ajoutées telles que les protéines, les acides gras polyinsaturés, les pigments et les enzymes (Priyadarshani et Rath, 2012), et pour lesquelles la production de β -galactosidase a été démontrée dans plusieurs espèces (Davies et al., 1994 ; Casal et al., 1985).

Une étude récente (Girard et al., 2013; Girard et al., 2014), effectuée dans nos laboratoires à l'UQAR, en utilisant un mélange de D-lactose, D-glucose et D-galactose purs puis un perméat de lactosérum doux dans le milieu de culture de l'espèce de microalgue *Scenedesmus obliquus* a montré une augmentation de la proportion des deux monosaccharides (glucose et galactose) avec une diminution concomitante de la concentration du disaccharide (lactose) au cours du temps démontrant alors une hydrolyse de ce dernier en deux sucres simples nécessaires à la croissance cellulaire. Pour effectuer une telle hydrolyse, *Scenedesmus obliquus* doit synthétiser une enzyme de type β -galactosidase.

Le présent travail propose donc une première étude pratique pour la détection et l'optimisation de la production d'une enzyme de type β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus* dans une optique de valorisation du perméat de lactosérum notamment le perméat acide issu de la fabrication du yogourt grec. Malgré qu'il contient moins de protéines que le lactosérum doux, le lactosérum acide contient des quantités plus importantes de galactose, de phosphate, de calcium, d'ammonium et d'acide lactique.

1.2 OBJECTIFS

Objectif général : Valoriser le perméat de lactosérum acide de yaourt grec par le biais de la microalgue *Scenedesmus obliquus* afin de produire l'enzyme spécifique de type β -galactosidase.

Objectif spécifique #1 : Détecter et quantifier de façon comparative la production de l'enzyme de type β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus*.

Objectif spécifique #2 : Maîtriser la culture des microalgues en présence du perméat de lactosérum acide (perméat de yogourt grec).

Objectif spécifique #3 : Rechercher des conditions optimales pour la production de cet enzyme par la microalgue *Scenedesmus obliquus* à l'échelle laboratoire.

Objectif spécifique #5 : Implémenter l'approche de production en photobioréacteur de 5 L en présence de perméat de lactosérum acide.

Les résultats de cette étude permettront d'engendrer des nouvelles connaissances théoriques, en lien avec la croissance de la microalgue *Scenedesmus obliquus* en utilisant du lactosérum acide, afin de produire des composés à haute valeur ajoutée notamment les galacto-oligosaccharides dans une optique de valorisation de la biomasse microalgale.

1.3 CONTRIBUTIONS ORIGINALES

Ce projet contribue au développement d'une approche innovatrice visant à valoriser un coproduit alimentaire ayant à la fois une faible valeur marchande et une forte charge environnementale par un produit naturel en pleine évolution afin de créer des produits et/ou des additifs alimentaires à valeur ajoutée et à faible empreinte écologique :

- Nouvelle approche de diminution de la pollution des industries laitières : Le lactosérum ainsi que le perméat de lactosérum sont considérés parmi les rejets industriels les plus polluants. Par conséquent, l'utilisation du perméat de lactosérum pour la croissance des

microalgues s'avère prioritaire afin de résoudre les problèmes environnementaux de l'industrie laitière au Québec et ailleurs dans le monde.

● Nouvelle approche de valorisation du perméat de lactosérum acide et doux : Les voies de valorisation du perméat de lactosérum (acide et doux) sont très restreintes. Cependant, sa forte concentration en lactose ouvre des horizons pour une possible valorisation par la production des composés prébiotiques notamment les galacto-oligosaccharides générés suite à l'hydrolyse du lactose par l'enzyme d'origine microalgale de type β -galactosidase.

● Nouvelle approche de valorisation de la biomasse algale : Bien que le perméat doux du fromage ait été utilisé avec succès comme une source de carbone organique pour la culture de l'espèce de microalgue *Scenedesmus obliquus* (Girard, 2014), l'étude de la culture de cette microalgue en utilisant un perméat acide (ex. yaourt grec) dans une optique de production de biocarburants ou des composés biologiquement actifs, tels que les caroténoïdes, les phycobilines, les vitamines et les stérols, n'a jamais été effectuée. Une telle étude permettra de valoriser la microalgue en utilisant un autre produit dont la composition diffère en termes de concentration de lactose, d'acide lactique, de sels minéraux et de métabolites microbiens.

● Opportunité de caractérisation d'une nouvelle β -galactosidase d'origine microalgale : Les propriétés, la spécificité et la structure de la β -galactosidase diffèrent de manière significative selon la source de l'enzyme. En effet, les conditions de la réaction d'hydrolyse du lactose, la présence de certains ions dans le milieu et le statut GRAS représentent les principaux facteurs du choix de la source appropriée de β -galactosidase (Mlichova et Rosenberg, 2006). Dans cette optique, l'identification, la purification et la caractérisation d'une nouvelle forme de cette enzyme à partir de l'espèce de microalgue *Scenedesmus obliquus* s'avère nécessaire. Par conséquent, ces travaux permettront à la fois d'ajouter à la littérature des nouvelles informations sur la nature et les propriétés de la β -galactosidase ciblée (ex. masse moléculaire, longueur de la chaîne des acides aminés, position du site actif, pH et température optimaux et stabilité) et, en cas d'approbation GRAS, de proposer un nouvel ingrédient qui puisse être intégré dans la formulation de divers produits laitiers et dans la régulation des problèmes d'intolérance au lactose.

1.4 METHODOLOGIE

Le projet s'intitule : « Utilisation et valorisation du perméat de lactosérum acide par la microalgue *Scenedesmus obliquus* pour la production de l'enzyme de type β -galactosidase ». Il a été réalisé aux laboratoires du Centre d'Appui à l'Innovation par la Recherche (CAIR) à l'Université du Québec à Rimouski (UQAR) sous la direction de Jean-Sébastien Deschênes, professeur et chercheur au département de mathématiques, d'informatique et de génie à l'UQAR (Campus de Rimouski) et expert dans le domaine de développement et modélisation de bioprocédés à partir de microalgues. Lucie Beaulieu et Alain Doyen, deux professeurs et chercheurs au département des sciences des aliments à l'Université Laval sont également étroitement liés au projet, et agissent en tant que collaborateurs. Leur expertise dans les domaines de valorisation des biomasses aquatiques, de biochimie structurale et de procédés de transformation du lait notamment les technologies de séparation membranaires constitue un atout indispensable pour mener au bien ce projet multidisciplinaire.

Nous proposons d'étudier en premier lieu les différents facteurs qui peuvent influencer la production de la β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus* à l'échelle laboratoire. Pour ce faire, le mode de culture (photoautotrophe, hétérotrophe et mixotrophe), la forme du carbone organique, le temps de culture et les concentrations d'azote et de carbone vont être mis en évidence dans des conditions stériles, en triplicatas (pour la validation statistique) et en utilisant une concentration cellulaire initiale de 1×10^6 cellules.mL⁻¹ (jour 0). La mesure de l'activité enzymatique de type β -galactosidase sera effectuée conformément à la méthode de Miller (1972) initialement développée pour des bactéries comme *E.coli*. En effet, quelques modifications seront réalisées afin de l'adapter au cas de la microalgue *Scenedesmus obliquus* et l'activité enzymatique journalière sera suivie dans les conditions de cultures optimales en se basant sur les résultats de l'étude comparative des différents facteurs. En parallèle, la biomasse microalgale (poids sec) sera étudiée conformément à la méthode de Zhu et Lee (1997).

Par la suite, le perméat de lactosérum sera utilisé après stérilisation et filtration. Dans une première étape, nous procéderons à une culture en flacons agités en utilisant le perméat de lactosérum acide de yaourt grec (pH proche de 4) qui est plus riche en calcium et en phosphore que le perméat de lactosérum doux (pH \approx 6.5). Des ajouts de tampon pH, des produits basiques (ex. : Tris base) vont être effectués afin d'ajuster le pH dans le milieu de culture.

La deuxième étape est la production en photobioréacteur dans une optique de mise au point des conditions générales d'opération (ex. : stratégies pour la régulation du pH et de la production de biomasse) et du choix du mode de conduite (ex. : fed-batch, continu, etc.). En effet, nous disposons d'un incubateur-agitateur de type Multitron II (Infors-ht Suisse) permettant d'effectuer des expériences en flacons agités. De même, un photobioréacteur Applikon de 5L de volume de culture est à notre disposition pour réaliser une production microalgale ayant les mêmes caractéristiques qu'un modèle industriel.

1.5 PLAN DU MEMOIRE

Ce manuscrit est présenté sous la forme d'une mémoire composée de six chapitres dont le détail est donné ci-dessous :

✓ *Chapitre 1 : Introduction générale*

Ce chapitre présente une mise en contexte et problématique, les objectifs du projet de recherche, un résumé des contributions originales, la méthodologie du travail ainsi que le plan du mémoire.

✓ *Chapitre 2 : Revue de littérature*

Ce chapitre se veut une revue des connaissances existantes en lien avec les différents aspects d'utilisation du lactosérum (acide et doux) et de son perméat, de valorisation des microalgues notamment l'espèce *Scenedesmus obliquus* et de production de l'enzyme spécifique de type β -galactosidase par les microorganismes y compris les microalgues comme *Scenedesmus obliquus* ainsi que leurs applications potentielles.

✓ *Chapitre 3 : Méthodologie du travail*

Ce chapitre présente tous les aspects techniques (matériels, méthodes, etc.) mis en œuvre pour la réalisation des expériences à l'échelle pilote et en utilisant un photobioréacteur.

✓ *Chapitre 4 : Investigation de la production de β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus* dans des conditions de culture déterminées*

Ce chapitre est consacré à l'étude et à l'optimisation de la production de l'enzyme à l'échelle pilote sous l'effet de la variation des conditions de culture en utilisant le BBM (milieu de culture modèle pour les algues vertes en mode photoautotrophe) comme la seule source d'azote et le lactose pur, le glucose pur et le galactose pur comme les trois sources différentes de carbone organique.

✓ *Chapitre 5 : Perméat de lactosérum acide : Un milieu de culture alternatif pour la production de β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus**

Ce chapitre propose l'utilisation de véritable lactosérum acide de yaourt grec dans la culture de la microalgue *Scenedesmus obliquus* et l'étude de son effet sur la production de l'enzyme de type β -galactosidase. Nous présentons également les résultats à l'échelle laboratoire (culture en flacons agités) et en photobioréacteur.

✓ *Chapitre 6 : Conclusion générale*

Cette partie permet de résumer les différents travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire. De même, des perspectives de recherche sont proposées dans la continuité des travaux, en particulier au niveau de la purification et la caractérisation de la β -galactosidase.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTERATURE

2.1 LE LACTOSERUM ET SON PERMEAT: GENERALITES ET APPLICATIONS

Le lactosérum est le produit secondaire issu de la coagulation des caséines dans l'industrie laitière. Il présente 85% à 95% du volume total du lait et il contient environ 55% de ses nutriments tels que le lactose (4.5-5% m/V), les protéines (0.6-0,8% m/V), les lipides (0.4-0.5% m/V) et d'autres composants mineurs tels que les sels minéraux, les vitamines du groupe B, l'acide acétique et l'acide lactique (González Siso, 1996). Il existe deux types de lactosérums obtenus à partir de deux procédés de coagulation : le lactosérum doux et le lactosérum acide. Le lactosérum doux, appelé aussi lactosérum de fromagerie, est obtenu suite à la coagulation des caséines du lait, lors de la fabrication des fromages, par une enzyme spécifique issue de l'estomac des veaux appelé la chymosine ou la présure. Le pH de ces lactosérums doux peut varier de 5.2 à 6.7. Le lactosérum acide, ayant un pH qui varie entre 3.8 et 4.6, est produit suite à la coagulation des caséines par l'acidification du lait en utilisant des acides (minéraux ou organiques), ou par fermentation naturelle produit de l'acide lactique (Smither, 2008). La composition des lactosérums (Tableau 1) et ses caractéristiques sensorielles sont variables et dépendent de type de lactosérum (acide ou doux), de l'origine du lait (vache, chèvre, brebis), de l'alimentation de l'animal qui produit le lait, du traitement utilisé, de la période de l'année et du stade de lactation.

Tableau 1 : Composition générale du perméat de lactosérum doux et acide

Composés	Perméat de lactosérum	Perméat de lactosérum
	doux	acide
Eau (%)	93 - 94	94 - 95
Masse sèche (%)	6 - 6.5	5 - 6
Lactose (%)	4.5 - 5	3.8 - 4.3
Acide lactique (%)	traces	Jusqu'à 0.8
Protéines totales (%)	0.8 - 1.0	0.8 - 1.0
Protéines de lactosérum (%)	0.6 - 0.65	0.6 - 0.65
Acide citrique (%)	0.1	0.1
Sels minéraux (%)	0.5 - 0.7	0.5 - 0.7

Source : www.dairyforall.com, page consultée le 27 juin 2017.

Le perméat de lactosérum est obtenu après la récupération des protéines solubles existant dans le lactosérum en poussant du lactosérum cru à travers une membrane d'ultrafiltration (González Siso, 1996). Il contient des concentrations élevées de lactose (de 40 à 60 g.L⁻¹, par analyse HPLC), de sels minéraux et de protéines jusqu'à 3500 mg.L⁻¹, même après le recyclage des protéines de lactosérum par ultrafiltration membranaire.

2.1.1 Quantités produites et charge polluante

Selon la OECD-FAO (2011), la production mondiale de fromage a été estimée à 19670 kilo tonnes (kT) en 2010, ce qui a engendré environ 177 028 kT de lactosérum en tant que sous-produit. Le taux de croissance annuel est estimé à 1,64%, entraînant environ 211500 kT de lactosérum en 2020. En moyenne, 9 L de lactosérum sont obtenus lors de la production

d'un kilogramme de fromage (Kosikowski, 1979 ; Panesar et Kennedy, 2012) et pour chaque 100 kg de lait utilisé pour faire du yogourt grec, seulement 33 kg sont utilisés dans le produit final. Les deux tiers restants constituent le lactosérum acide (Source : www.arlafoodsingredients.com). Au Canada, la production du fromage a augmenté de 366 kT en 2003 à 466 kT en 2016 dont la moitié est produite au Québec (Source : Centre canadien d'information laitière). Les ventes du yaourt grec sont passées de 1.5 à 10 % du marché du yaourt canadien entre 2011 et 2013. D'où une production annuelle de lactosérum qui dépasse le 2.1 millions de tonnes, soit 1.2 million de tonnes au Québec.

En raison de sa faible teneur en constituants du lait (environ 6-7% du résidu sec). Le lactosérum est considéré comme un rejet. Il présente une forte demande biochimique en oxygène (DBO) et une forte demande chimique en oxygène (DCO) (environ 50 g.L⁻¹ et 80 g.L⁻¹ respectivement) (Marwaha et Kennedy, 1988). Le perméat du lactosérum représente aussi un problème environnemental majeur puisqu'il retient la partie majeure du lactose et 70% du solide total de lactosérum. D'après Sienkiewicz et Riedel (1990), le rejet de 100 tonnes de lactosérum correspondrait à une charge organique équivalente à celle rejetée par une ville comptant 55000 habitants. L'élimination du lactosérum constitue un problème majeur pour l'industrie laitière. Au Canada, environ 17% de la quantité produite est déversée directement dans les égouts et 26% sont rejetées sur la terre mettant en danger la structure physique et chimique du sol et entraînant des problèmes graves de pollution d'eau (Belem et lee, 1988.b).

Cependant, sa teneur élevée en sucre (lactose) et en sels tel que l'ammonium rend le lactosérum un candidat important pour la production en mode mixotrophe des microorganismes notamment les microalgues.

2.1.2 Valorisation du lactosérum et de son perméat

Environ 50% de la production mondiale du lactosérum est traitée et transformée en divers produits alimentaires, dont environ 45% sont utilisés directement sous forme liquide, 30% sous forme de poudre, 15% en tant que lactose et ses dérivés, et le reste pour la

fabrication des concentrés des protéines de lactosérum (Marwaha et Kennedy, 1988). En effet, trois options différentes d'utilisation de lactosérum peuvent être envisagées (Figure 1). La première est basée sur l'application des technologies de valorisation dont le but est de récupérer les composés à haute valeur nutritive et fonctionnelle tels que les protéines et le lactose (environ 10g et 50g respectivement dans chaque litre de lactosérum). Le concentré de protéines obtenu après ultrafiltration, méthode économique permettant de préserver la qualité des protéines extraites sans les dénaturer, peut servir comme additif dans l'industrie du pain (concentré de 35% de protéines) ou comme un ingrédient dans la fabrication des aliments pour les nourrissons (concentré de 92% de protéines). Ce dernier, avec un prix dix fois plus élevé que le lactosérum ne semble pas économiquement rentable puisque seulement le 1/6 de volume de lactosérum est utilisé pour la production des protéines (Domingues et al., 1999). Le lactose purifié à partir du perméat de lactosérum par cristallisation est généralement utilisé en tant qu'agent de remplissage, d'enrobage et d'adsorption dans le domaine alimentaire et pharmaceutique. Cependant, la purification du lactose demeure un processus lent et très coûteux. Il consiste à évaporer le perméat à 60 – 62% de matière sèche, séparer les cristaux de lactose ainsi formés par centrifugation puis les raffiner en cas de besoin et les sécher sur un lit fluidisé. De même, le besoin mondiale en lactose nécessite l'utilisation de seulement 5% de la production totale du lactosérum (Coton, 1980), pour développer plusieurs molécules, très utiles dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, à partir du lactose pur tel que le lactulose, le lactitol et l'acide lactobionique (Moulin et Galzy, 1984).

La deuxième option vise l'utilisation de traitements biologiques pour la valorisation du perméat de lactosérum qui retient la quasi-totalité du lactose, des minéraux et des vitamines. En effet, l'hydrolyse du lactose conduit à la génération de deux monosaccharides (glucose et galactose) qui peuvent être utilisés dans l'industrie des produits laitiers, des confiseries, des pâtes et des boissons gazeuses (Gekas et Lopez-Leiva, 1985). Les processus de fermentation contrôlée sont pris en compte dans la production d'acide lactique, d'éthanol, d'acide acétique, d'enzymes, d'acétone, des monosaccharides, de biohydrogène, etc. Par exemple, le lactose du perméat peut subir une hydrolyse enzymatique (enzyme de type β -galactosidase) suivie par une fermentation en mode batch (Kargi et Ozmihi, 2006) ou fed-batch (Ozmihi et

Kargi, 2007a) en utilisant des microorganismes tel que *Saccharomyces cerevisiae* (Bailey et al., 1982) et *K. fragilis* (Mawson, 1994) afin de produire de l'éthanol. La fermentation du perméat de lactosérum par des microorganismes comme *Aspergillus niger* (El-Samragy et al., 1996), *Lactobacillus helveticus* (Roy et al., 1986) et *Kluyveromyces marxianus* (Rapin et al., 1994) ont été utilisés pour la production d'acide citrique, d'acide lactique et de glycérol respectivement. Cependant, d'une part, le lactosérum ainsi que son perméat posent des problèmes économiques au niveau du transport et du stockage vu leur teneur en eau élevée et leur susceptibilité à la détérioration bactérienne et fongique d'où la nécessité d'utilisation des techniques comme l'osmose inverse ou l'évaporation multiple pour la concentration du liquide. D'autre part, plusieurs traitements biologiques ont été étudiés et développés (Kosikowski, 1979 ; Moulin et Galzy, 1984 ; Smithers, 2008 ; Panesar et Kennedy, 2012) et n'ont pas pu dépasser l'étape de développement au laboratoire à cause du coût élevé de production. Par exemple, la production d'éthanol à partir de lactosérum non concentré n'est pas économiquement faisable par ce que les niveaux d'éthanol obtenus atteignent seulement environ 2%, ce qui rend le processus de distillation trop cher (Tin et Mawson, 1993).

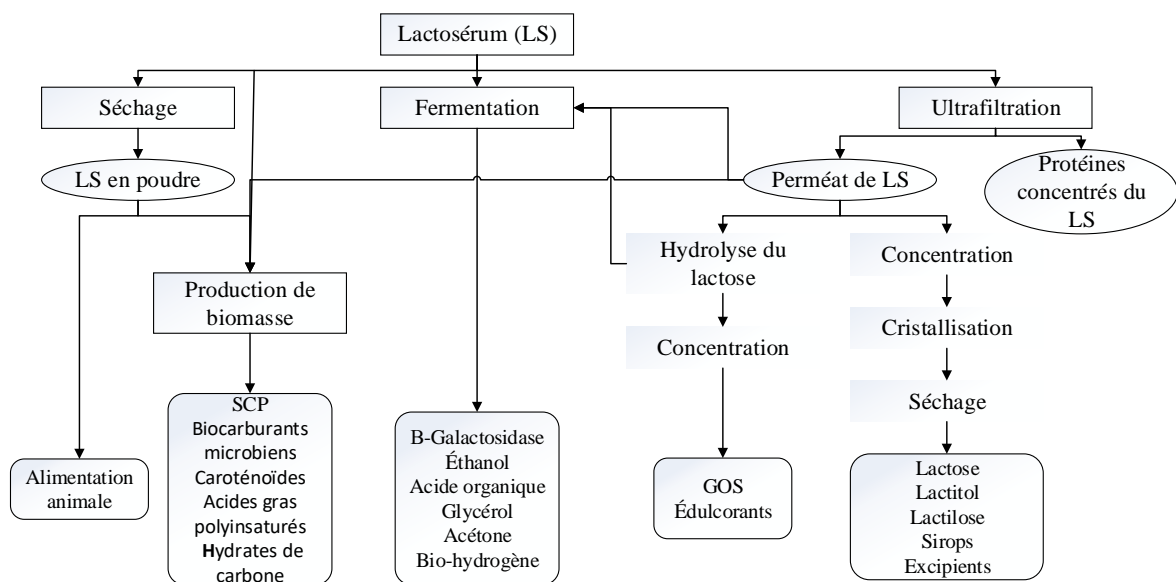


Figure 1 : Différents procédés de valorisation de lactosérum (Siso, 1996 ; Panesar et Kennedy, 2012 ; Da-Silva et al., 2014)

La troisième option est l'utilisation de lactosérum et de son perméat comme un substrat pour la production de biomasse. En effet, ils contiennent du lactose (source de carbone organique), des protéines solubles (source d'azote protéique) et des sels contenant l'azote (source d'azote non protéique) requis pour la croissance de certains microorganismes. Ils contiennent également des vitamines hydrosolubles et constituent donc un excellent milieu basal pour tout type de culture en mode hétérotrophe et mixotrophe. La commercialisation de biomasse microbienne produite à partir du lactosérum a commencé depuis les années 1940 (Siso, 1996) en utilisant plusieurs procédés notamment le procédé Bel et le procédé de Vienne (Moulin et Galzy, 1984). Par exemple, les levures, dans le cas des industries de Bel, sont cultivées en culture continue sur une période de plus d'un an sans arrêt, à un faible pH (environ 3,5) et à une température élevée (38 °C) afin de réduire le risque de contamination (Castillo, 1990). La biomasse produite est principalement utilisée comme additif alimentaire pour les animaux et pour l'alimentation humaine (Mawson, 1994). La production de protéines d'organismes unicellulaires (SCP) est une étape importante dans cette direction. SCP est la protéine extraite de la biomasse microbienne cultivée (bactéries, champignons, microalgues). Il peut être utilisé pour la supplémentation en protéines d'un régime alimentaire de base en remplaçant les coûteuses sources conventionnelles comme la graine de soja et la farine de poisson pour atténuer le problème de la pénurie de protéines (Anupama et Ravindra, 2000). Par exemple, les protéines de *Kluyveromyces fragilis* obtenues par culture avec du lactosérum entier ont donné une SCP avec une forte teneur en protéines brutes et une faible teneur en cendres (Galvez et al., 1990). La biomasse microbienne a également été utilisée pour la production de biocarburants microbiens, car ils présentent des sources alternatives aux combustibles fossiles dont leur quantité diminue et leur utilisation a un impact négatif sur l'environnement. En effet, les biocarburants microbiens appelés aussi biocarburants de troisième génération représentent une source d'énergie renouvelable, ne contiennent pas de soufre et sont hautement biodégradables (González-Delgado et Kafarov 2011). Jusqu'à présent, le principal obstacle à la commercialisation des biocarburants obtenus à partir de microorganismes reste le coût de production élevé impliqué. Par conséquent, il a été crucial d'explorer des approches pour réduire les coûts des processus de production de biocarburants

microbiens, en utilisant des matières premières peu coûteuses tel que le perméat de lactosérum et/ou en produisant des coproduits à haute valeur ajoutée. Cependant, la plupart des études publiées portant sur les biocarburants microbiens décrivent la production d'un seul biocarburant. Cela signifie que les autres produits ou composants microbiens qui restent dans la biomasse microbienne sont sous-évalués et perdus (Da-Silva et al., 2014). Certains microorganismes peuvent produire composés intracellulaires à haute valeur ajoutée tels que les caroténoïdes, les acides gras polyinsaturés, les hydrates de carbone et les protéines. Ces produits peuvent être récupérés et utilisés dans un véritable processus intégré de bioraffinerie dans diverses industries telles que les produits alimentaires, pharmaceutiques, nutraceutiques, cosmétiques et chimiques (Figure 2). Une telle approche profitera des divers produits synthétisés par la biomasse microbienne, maximisant ainsi la valeur dérivée de l'ensemble du processus, car les produits à haute valeur ajoutée peuvent soutenir la production de biocarburants microbiens.

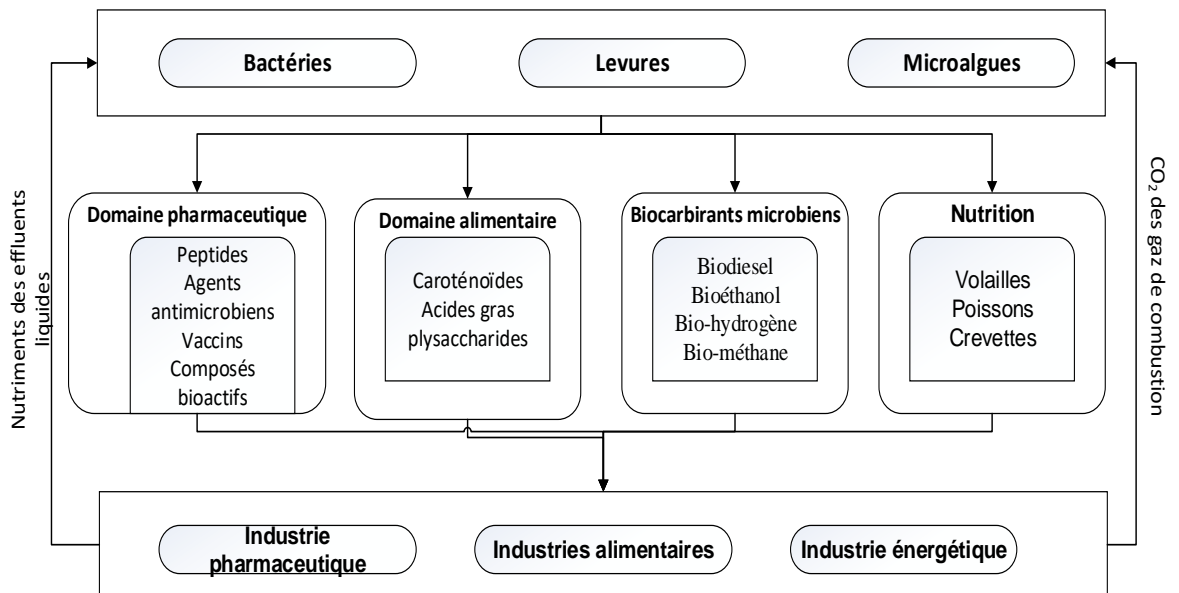


Figure 2 : Exemple de valorisation de la biomasse microbienne : domaines d'application et différents bioproduits (Subhadra et Edwards, 2010)

2.2 LES MICROALGUES : GENERALITES ET APPLICATIONS

Les microalgues appelées aussi «plancton» sont les algues unicellulaires qui existent individuellement, ou en chaîne ou en groupe. Ils représentent l'un des organismes vivants les plus anciens qui forment la base de la chaîne alimentaire dans les mers et les rivières (Song et al, 2008). La première utilisation de microalgues par l'homme remonte à 2000 ans aux Chinois, qui ont utilisé *Nostoc* pour survivre pendant la famine. Cependant, la biotechnologie microalgale n'a vraiment commencé à se développer qu'au milieu du siècle dernier. En effet, au début des années 1950, l'augmentation de la population mondiale et les prédictions d'un approvisionnement insuffisant en protéines ont conduit à la recherche de nouvelles sources de protéines alternatives et non conventionnelles. La biomasse microalgale est apparue à ce moment comme un bon candidat pour réaliser cet objectif (Becker, 2004). Des études systématiques sur les substances biologiquement actives dans les microalgues, notamment les antibiotiques, ont également commencé (Borowitzka, 1995). L'intérêt pour la culture microalgale s'est poursuivi avec des études sur l'utilisation des microalgues comme échangeurs de gaz photosynthétiques pour la navigation spatiale (Borowitzka, 1995). L'utilisation des microalgues pour générer des sources d'énergie renouvelables a suscité un intérêt accru pendant la crise de l'énergie dans les années 1970. Par exemple, des technologies environnementales visant à améliorer la qualité des eaux usées et la fermentation de la biomasse résultante au méthane ont été mises en œuvre aux États-Unis (Cornet, 1998 ; Pulz et Scheibenbogen, 1998 ; Chaumont, 1993). La culture commerciale à grande échelle a commencé au début des années 1960 au Japon avec la culture de *Chlorella* par Nihon Chlorella (Iwamoto, 2004). Il a été suivi au début des années 1970 par la création d'une usine de culture d'*Arthrospira* au Mexique (Muller-Feuga, 1996) et des premiers champs d'aquaculture (Pulz et Scheibenbogen, 1998). En 1980, 46 usines à grande échelle ont été établies en Asie produisant plus de 1000 kg/mois de microalgues (principalement *Chlorella*). En 1986, la production commerciale de *Dunaliella salina*, en tant que source de β -carotène, est devenue la troisième industrie majeure des microalgues après les installations de Western Biotechnology et Betatene (maintenant Cognis Nutrition and Health) en Australie

suivies par d'autres installations en Israël et aux États-Unis. La production à grande échelle de cyanobactéries (algues bleu-vert) a commencé en Inde à peu près à la même période. Plus récemment, plusieurs usines produisant *Haematococcus pluvialis* comme une source d'astaxanthine ont été établies aux États-Unis et en Inde (Spolaore et al., 2006). Ainsi, dans une courte période d'environ 30 ans, l'industrie de la biotechnologie des microalgues a grandi et s'est diversifiée de manière significative. De nos jours, le marché de la biomasse des microalgues produit environ 5000 tonnes de matière sèche par année et génère un chiffre d'affaires d'environ $1,25 \times 10^9$ US \$/an sans inclure les produits transformés à partir des microalgues (Pulz et Gross, 2004).

2.2.1 Composition biochimique des microalgues

Les microalgues sont actuellement utilisées dans plusieurs secteurs notamment la cosmétique, l'alimentation et l'aquaculture (Guil-Guerrero et al., 2004) grâce à leur composition biochimique naturelle (Tableau 2). En effet, la teneur élevée en protéines de plusieurs espèces de microalgues présente l'une des principales raisons de les considérer comme une source non conventionnelle de protéines (Soletto et al., 2005). En outre, comme les cellules microalgales sont capables de synthétiser tous les acides aminés, elles peuvent fournir les acides aminés essentiels aux humains et aux animaux (Guil-Guerrero et al., 2004). Les glucides peuvent être trouvés dans les microalgues sous forme d'amidon, de glucose, de saccharose et d'autres polysaccharides. Leur digestibilité globale est élevée, c'est pourquoi il n'y a pas de limitation à l'utilisation de microalgues entières séchées dans l'alimentation animale et humaine (Becker, 2004). La teneur moyenne en lipides des cellules microalgales varie entre 1% et 70%, et sous certaines conditions elle peut atteindre 90% de poids sec (Metting, 1996). Les lipides de microalgues sont composés de glycérol et de bases estérifiées en acides gras saturés ou insaturés. D'une part, certains acides gras des familles Oméga-3 et Oméga-6 présentent un intérêt particulier. Ils peuvent être utilisés dans l'industrie cosmétique pour la préparation de crème anti-rides grâce à leurs grandes capacités de régénération de la peau. D'autre part, la forte teneur en lipides neutres de la classe des triglycérides de certaines espèces de microalgues pourrait devenir une source de biodiesel intéressante (Chisti, 2007).

Tableau 2 : Composition chimique générale dans certaines microalgues par pourcentage de poids sec

Espèce	Protéines	Hydrates de carbone	Lipides
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

*Il est à noter que les chiffres présentés dans ce tableau sont des estimations, car la proportion de constituants cellulaires individuels dépend en grande partie des paramètres environnementaux.

Source : Becker, 2004.

Les microalgues représentent également une source possible de presque toutes les vitamines essentielles (par exemple, A, B1, B2, B6, B12, C, E, le nicotinate, la biotine, l'acide folique et l'acide pantothénique) (Becker, 2004). En effet, les vitamines améliorent la valeur nutritionnelle des cellules d'algues, mais leur quantité peut être affectée par plusieurs facteurs tels que l'environnement, le traitement de récolte et la méthode de séchage des cellules (Brown, 1999). Les microalgues sont également riches en pigments comme la chlorophylle (0,5% à 1% de poids sec), les caroténoïdes (0,1% à 0,2% de poids sec en moyenne et jusqu'à 14% de poids sec pour le β -carotène de *Dunaliella*) et les phycobiliprotéines. Ces molécules ont une large gamme d'applications commerciales (Spolaore et al., 2006).

Ainsi, cette composition donne des qualités intéressantes aux microalgues, qui peuvent être introduites dans la nutrition humaine et animale. Cependant, avant la commercialisation, l'innocuité des microalgues doit être testée afin de vérifier la présence ou non de composés

toxiques (Reboloso Fuentes, 2000). Dans ce domaine, des recommandations ont été publiées par différentes organisations internationales et règlements nationaux. Ils concernent les acides nucléiques, les toxines et les composants de métaux lourds. Par exemple, le groupe consultatif sur les protéines a recommandé que la consommation quotidienne d'acide nucléique provenant de sources non conventionnelles ne dépasse pas 2,0 g et que les acides nucléiques totaux provenant de toutes les sources n'excédant pas 4,0 g par jour. Compte tenu des personnes menacées d'une hyperuricémie latente, le niveau de sécurité est d'environ 20 g de microalgues par jour ou 0,3 g de microalgues par kg de poids corporel (Becker, 2004).

2.2.2 Conditions de culture et systèmes de production des microalgues

Les caractéristiques de croissance et la composition chimique des microalgues dépendent de manière significative des conditions de culture. Il existe quatre principaux types de conditions de culture pour les microalgues: la culture en mode photoautotrophe, hétérotrophe, mixotrophe et photohétérotrophe (Chojnacka et Marquez-Rocha, 2004). En effet, la culture photoautotrophique se produit lorsque les microalgues utilisent la lumière comme source d'énergie et le carbone inorganique (par exemple, le dioxyde de carbone) comme source de carbone pour former de l'énergie chimique à travers la photosynthèse (Huang et al., 2010). C'est la condition de culture la plus couramment utilisée pour la croissance des microalgues (Chen et al., 2011). Certaines espèces de microalgues peuvent non seulement se développer dans le mode photoautotrophe, mais elles peuvent aussi utiliser une source de carbone organique pour se développer dans l'obscurité, tout comme les bactéries. Le mode de culture utilisant le carbone organique à la fois comme source d'énergie et de carbone s'appelle le mode hétérotrophe (Chojnacka et Marquez-Rocha, 2004). Ce type de culture permet d'éviter des problèmes associés à des conditions de lumière limitées qui empêchent l'obtention d'une densité cellulaire élevée dans les photobioréacteurs à grande échelle pendant la culture photoautotrophique (Huang et al., 2010). La culture mixotrophe est lorsque les microalgues effectuent la photosynthèse et utilisent à la fois des composés organiques et du carbone inorganique (CO₂) comme sources de carbone pour assurer leur croissance. Cela signifie que certaines microalgues peuvent vivre dans des conditions

photoautotrophiques, hétérotrophiques, ou les deux en même temps. De ce fait, les microalgues assimilent les composés organiques et le dioxyde de carbone en tant que sources de carbone et le CO₂ libéré au cours de la respiration peut être piégé plus rapidement et réutilisé dans le mode photoautotrophe (Mata et al., 2010). Finalement, on parle de mode de culture photohétérotrophe lorsque les microalgues nécessitent de la lumière pour assimiler les sucres. La principale différence entre la culture mixotrophique et photohétérotrophique est que ce dernier nécessite de la lumière comme source d'énergie, alors que la culture mixotrophique peut utiliser des composés organiques pour atteindre cet objectif (Chojnacka et Marquez-Rocha, 2004). En général, la production de biomasse microalgale peut être améliorée par des modes de culture spécifiques tels que le mode mixotrophe et hétérotrophe. Il est également démontré que les variations dans certaines conditions de culture notamment la température, la concentration de sels, l'azote et le CO₂ interfèrent directement dans la composition biochimique des microalgues (Satyanarayana et al., 2011). La production à grande échelle de la biomasse microalgale utilise généralement une culture continue pendant la lumière du jour. De ce fait, un milieu de culture frais est alimenté à un taux constant et la même quantité de microalgues est retirée en continu. L'alimentation cesse pendant la nuit, mais la décantation de la biomasse doit être empêchée par une agitation continue (Molina Grima et al., 2001). Dépendamment du niveau de lumière dans lequel la biomasse a été cultivée, de la température de croissance et de la température de nuit, jusqu'à 25% de la biomasse produite pendant la période de lumière du jour peut être perdue pendant la nuit à cause de la respiration.

Différentes approches physiologiques et technologiques ont été proposées et étudiées pour maximiser la productivité dans les systèmes de culture microalgale (Lee, 2001) comme montré dans le tableau 4. Néanmoins, les seules méthodes pratiques pour la production de microalgues à grande échelle sont les étangs de type « raceway » et les photobioréacteurs tubulaires (Chisti, 2007). La production de microalgues en étangs de type « raceway » existe depuis les années 1950 et est la plus répandue. Ce type de système est constitué d'un canal de recirculation en boucle fermée d'environ 0,3 m de profondeur. Le mélange et la circulation sont produits par une roue à aubes. Le flux est guidé autour des virages par des chicanes

placées dans le canal d'écoulement (Figure 3). La perte d'eau peut être significative en raison des pertes importantes dans l'atmosphère d'où la nécessité d'alimenter constamment le système en eau. Les étangs de type «raceway» utilisent le dioxyde de carbone beaucoup moins efficacement que les photobioréacteurs et leur productivité est soumise à des risques élevés de contamination par d'autres microalgues et par des microorganismes qui se nourrissent d'algues (Chisti, 2007). Contrairement aux systèmes ouverts des étangs, les photobioréacteurs autorisent une culture axénique de microalgues pour des durées prolongées. En effet, ils ont été utilisés avec succès pour produire de grandes quantités de biomasses microalgales grâce à une meilleure productivité (Carvalho et al., 2006). Le photobioréacteur tubulaire se compose d'un réseau de tubes transparents rectilignes habituellement fabriqués en plastique ou en verre. Ce réseau tubulaire appelé aussi collecteur solaire est l'endroit où la lumière du soleil est capturée (Figure 4). Cependant, la photosynthèse génère de l'oxygène et une forte concentration d'oxygène dissous en combinaison avec une lumière du soleil intense produit des dommages photo-oxydatifs aux cellules microalgales. Pour éviter ce problème, le niveau d'oxygène dissous maximum tolérable ne doit généralement pas dépasser environ 400% de la valeur de saturation de l'air (Molina Grima et al., 2001). En plus, la zone de dégazage (Figure 4) doit désengager toutes les bulles de gaz formées dans le milieu de culture frais, de sorte que le milieu dégazé retourne au collecteur solaire.

Les produits de microalgues cultivés dans des étangs ouverts ne peuvent être commercialisés que comme des additifs alimentaires à valeur ajoutée et comme des réactifs pour la recherche. La nécessité d'obtenir une productivité plus élevée et de maintenir la monoculture microalgale a conduit au développement de photobioréacteurs tubulaires et plats. Malgré une concentration accrue de la biomasse et un meilleur contrôle des paramètres de culture, les données accumulées au cours des 25 dernières années ont montré que les propriétés lumineuses, la productivité volumétrique et le coût de production dans ces photobioréacteurs fermés ne sont pas meilleurs que ceux réalisés dans les cultures en étangs ouverts (Lee, 2001). Les propriétés de différents systèmes de culture telles que leur efficacité d'utilisation de la lumière, leur capacité à contrôler la température, le stress hydrodynamique

appliqué sur les microalgues, la capacité de maintenir la culture unialgale et/ou axénique et la facilité d'aller de l'échelle pilote à l'échelle industrielle doivent également être pris en considération (Tableau 3). En outre, l'alternative de cultiver des microalgues en mode hétérotrophe dans des bioréacteurs stérilisables a connu un certain succès commercial (Gladue 1991) et la conception future de bioréacteurs stérilisables pour la culture mixotrophique de microalgues qui met en jeu le substrat organique comme la principale source d'énergie et la lumière comme une source d'énergie supplémentaire peut être envisagée (Lee, 2001). Entre-temps, le marché des microalgues pour l'utilisation dans l'alimentation humaine, dans l'alimentation animale et dans l'aquaculture est en croissance rapide, avec une valeur au détail estimée à entre 3 000 et 4 000 millions US \$ (Pulz et Gross, 2004).

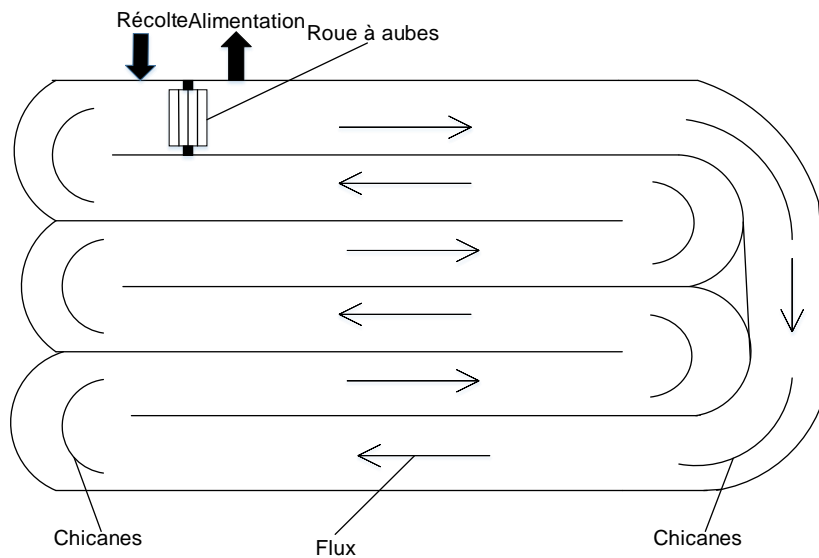


Figure 3 : Vue aérienne d'un étang de type «raceway» (Chisti, 2007)

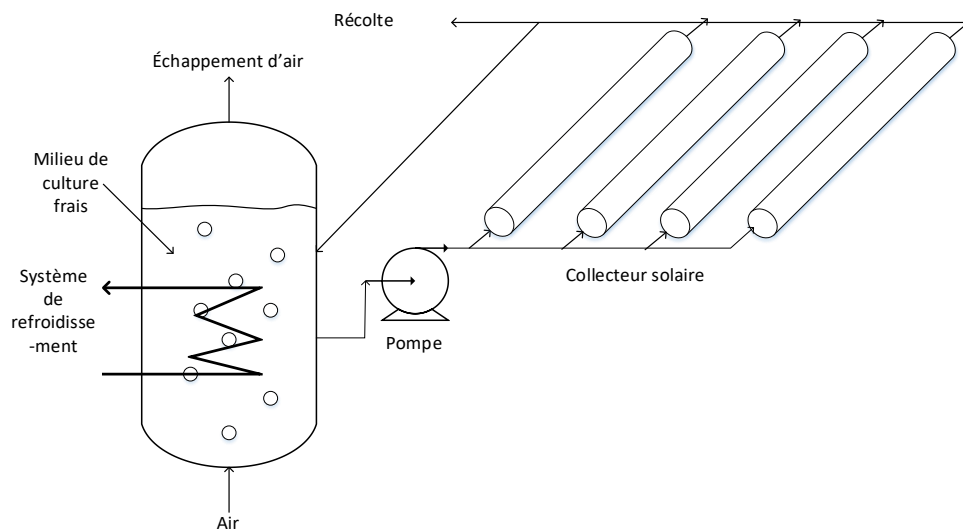


Figure 4 : Photobioréacteur tubulaire avec un réseau tubulaire horizontal et parallèle (Chisti, 2007)

Tableau 3 : Comparaison des propriétés de différents systèmes de cultures microalgales

Système de culture	Mélange	efficacité d'utilisation de lumière	Contrôle de température	Transfert de gaz	Stress hydrodynamique	Contrôle de l'espèce	Stérilisation de culture	Échelle industrielle
Étangs non agités et peu profonds	Très mauvais	Mauvais	Aucun	Mauvais	Très faible	Difficile	Aucun	Très difficile
Réservoir	Mauvais	Très mauvais	Aucun	Mauvais	Très faible	Difficile	Aucun	Très difficile
Étangs circulaires agités	Correct	Correct-Bon	Aucun	Mauvais	Faible	Difficile	Aucun	Très difficile
Étangs de type « raceway »	Correct-Bon	Correct-Bon	Aucun	Mauvais	Faible	Difficile	Aucun	Très difficile
Culture en sacs	variable	Correct-Bon	Bien (à l'intérieur)	Faible-Elevé	Faible	Facile	Facilement réalisable	Difficile
Bioréacteur à réservoir agité	Largement uniforme	Correct-Bon	Excellent	Faible-Elevé	Élevé	Facile	Facilement réalisable	Difficile
Bioréacteur plat	Uniforme	Excellent	Excellent	Élevé	Faible-Elevé	Facile	Réalisable	Difficile

Système de culture	Mélange	efficacité d'utilisation de lumière	Contrôle de température	Transfert de gaz	Stress hydrodynamique	Contrôle de l'espèce	Stérilisation de culture	Échelle industrielle
Bioréacteur tubulaire (type serpentin)	Uniforme	Excellent	Excellent	Faible-Elevé	Faible-Elevé	Facile	Réalisable	Raisonnable
Bioréacteur tubulaire (type Biocoil)	Uniforme	Excellent	Excellent	Faible-Elevé	Faible-Elevé	Facile	Réalisable	Facile

Source : Borowitzka, 1999.

2.2.3 Applications commerciales des microalgues

Les études de recherche sur les microalgues sont nombreuses et variées, mais elles n'ont pas toujours abouti à des applications commerciales (Spolaore et al., 2006). Cependant, la production mondiale annuelle estimée de la biomasse microalgale est d'environ 5000-7500 tonnes générant un chiffre d'affaires annuel d'environ 1,25 milliard US \$ (Satyanarayana et al., 2011). En effet, les microalgues ont trois attributs fondamentaux qui peuvent être transformés en avantages techniques et commerciaux. Ils sont génétiquement très diversifiés avec une large gamme de caractéristiques physiologiques et biochimiques; ils produisent naturellement de nombreux acides gras, sucres, composés bioactifs, etc., et ils sont capables d'intégrer de manière rentable les isotopes stables ^{13}C , ^{15}N et ^2H dans leur biomasse pour la production des divers composés. Ils comprennent un grand groupe d'organismes inexplorés et fournissent ainsi une source pratiquement inexploitée de produits (Priyadarshani et Rath, 2012).

● Utilisation des microalgues pour l'alimentation humaine : Les microalgues sont utilisées pour la nutrition humaine sous différentes formes telles que des comprimés, des capsules et des liquides. Elles peuvent également être incorporés dans des pâtes, des bonbons ou des gommages et des boissons (Liang et al., 2004). En raison de leurs diverses propriétés biochimiques, elles peuvent agir comme additif alimentaire ou comme source de colorants

alimentaires naturels (Borowitzka, 1999). Les applications commerciales sont dominées par quatre espèces: *Arthrospira*, *Chlorella*, *D. salina* et *Aphanizomenon flos-aquae* (Spolaore et al., 2006). De plus, *Scenedesmus* est l'une des microalgues les plus utilisées qui a attiré l'attention des industriels sur le marché alimentaire grâce à sa qualité nutritionnelle très élevée (Chacón-Lee et Gonzalez Marino, 2010) et aucun impact ou anomalie toxique n'a été révélé dans des expériences faites avec des animaux de laboratoire (Becker, 1984). Gross et al. (1978) ont mené une étude nutritionnelle en incorporant la souche *Scenedesmus* dans le régime alimentaire des enfants (5 g par jour) et des adultes (10 g par jour) et une légère augmentation de poids a été découverte. Par la suite, il y a eu une amélioration significative du poids des enfants de quatre ans qui ont été nourris avec des microalgues par rapport à ceux nourris avec un régime alimentaire normal. Dans une autre étude effectuée par Natrah et al. (2007), la souche *Scenedesmus* a montré des propriétés antioxydantes et des composés biochimiques qui pourraient être appliqués dans l'industrie des nutraceutiques.

● Utilisation des microalgues pour l'aquaculture et l'alimentation animale : En plus de leur utilisation dans la nutrition humaine, les microalgues peuvent être incorporées dans l'alimentation d'une grande variété des animaux allant des poissons (aquaculture) aux animaux domestiques et de ferme. En effet, 30% de la production mondiale actuelle des microalgues est consacré pour l'alimentation animale et plus de 50% de la production mondiale actuelle d'*Arthrospira* est utilisée comme complément alimentaire pour les animaux (Spolaore et al., 2006). En 1999, la production de microalgues pour l'aquaculture a atteint 1000 tonnes (62% pour les mollusques, 21% pour les crevettes et 16% pour les poissons) pour une production mondiale d'aquaculture de 43×10^6 tonnes de plantes et d'animaux (Muller-Feuga, 2004). L'importance des microalgues dans ce domaine n'est pas surprenante, car elles représentent la source naturelle d'alimentation. Ainsi, elles ont été utilisées récemment comme additifs alimentaires pour les nutriments de base afin de colorer la chair des salmonidés et d'induire d'autres activités biologiques (Spolaore et al., 2006).

● Utilisation des microalgues en cosmétiques : Les extraits des microalgues sont fréquemment utilisés dans les cosmétiques comme agents épaississants, agents liants ou

antioxydants. Certaines espèces, notamment des genres *Arthrospira* et *Chlorella* sont actuellement utilisées dans le marché des soins de la peau dans les crèmes anti-âge, les produits de soins rafraîchissants ou régénérants et les anti-irritants (Stolz et Obermayer, 2005). Les microalgues sont également représentées dans la protection solaire et les produits capillaires (Priyadarshani et Rath, 2012). Les pigments tels que l'astaxanthine, la phycocyanine et le β -carotène, les acides aminés mycosporine-like et la sporopollénine sont extraits et utilisés dans les cosmétiques comme des composés filtrant le rayonnement UV pour la protection de la peau (Ishaq et al., 2016).

● Utilisation des microalgues comme source de biocarburants : Les microalgues ont longtemps été reconnues par leur capacité de production de biocarburants en raison de leur teneur élevée en huile et de leur production rapide de biomasse. Au cours des dernières années, l'utilisation de microalgues comme matière première pour la production de biodiésel a suscité un intérêt renouvelé pour les chercheurs, les entrepreneurs et le grand public (Priyadarshani et Rath, 2012). Les algues peuvent potentiellement en produire de 1000 à 4000 gallons par acre par an, soit des quantités significativement plus élevées qu'avec le soja et d'autres cultures oléagineuses (Priyadarshani et Rath, 2012). Les extraits des microalgues peuvent être transformés en différentes formes de carburant, telles que le biogaz, le carburant de transport liquide et gazeux, le kérosène, l'éthanol, le carburant d'aviation et le biohydrogène grâce à la mise en œuvre de technologies de traitement telles que la digestion anaérobie, la pyrolyse, la gazéification, le craquage catalytique et la trans-estérification enzymatique ou chimique (Da-Silva et al., 2014) (Figure 5). Par exemple, il a été découvert que la souche *Scenedesmus* est capable de produire de l'hydrogène, et cette découverte a conduit à la recherche d'un moyen d'utilisation de cette microalgue comme vecteur énergétique (Skjanes et al., 2013).

● Utilisation des microalgues dans l'industrie pharmaceutique : Les microalgues représentent une source riche de métabolites primaires et secondaires. Ces métabolites peuvent être des composés potentiellement bioactifs très utiles dans l'industrie pharmaceutique (Rania et Hala, 2008). L'existence de composés bioactifs dans les

microalgues peut être due à la concurrence avec d'autres microorganismes dans les communautés aquatiques naturelles, où une interaction inhibitrice s'est produite entre les producteurs et les concurrents dans un même milieu (Priyadarshani et Rath, 2012). Les microalgues contiennent de nombreux composés bioactifs qui peuvent être exploités à des fins commerciales. En effet, ils produisent des antibiotiques, car leurs extraits ont démontré des activités antibactériennes, antiprotozoaires et antiplasmodiques (Ishaq et al., 2016). De plus, les trois principales classes de pigments photosynthétiques des microalgues (chlorophylle, caroténoïdes et phycobilines) ont démontré une activité biologique ayant une large gamme d'applications biologiques, y compris la prévention des syndromes coronariens aigus et chroniques, la dystrophie musculaire, l'athérosclérose, la cataracte, la polyarthrite rhumatoïde et les troubles neurologiques (Mimouni et al., 2012). Par exemple, la souche *Scenedesmus* produit des polysaccharides qui ont montré des effets médicaux contre le stress oxydatif. D'autres composés trouvés dans *Scenedesmus* possèdent des aptitudes thérapeutiques notamment la vitamine E, la vitamine C, l'astaxanthine et les métabolites avec des activités antibiotiques (Ishaq et al., 2016).

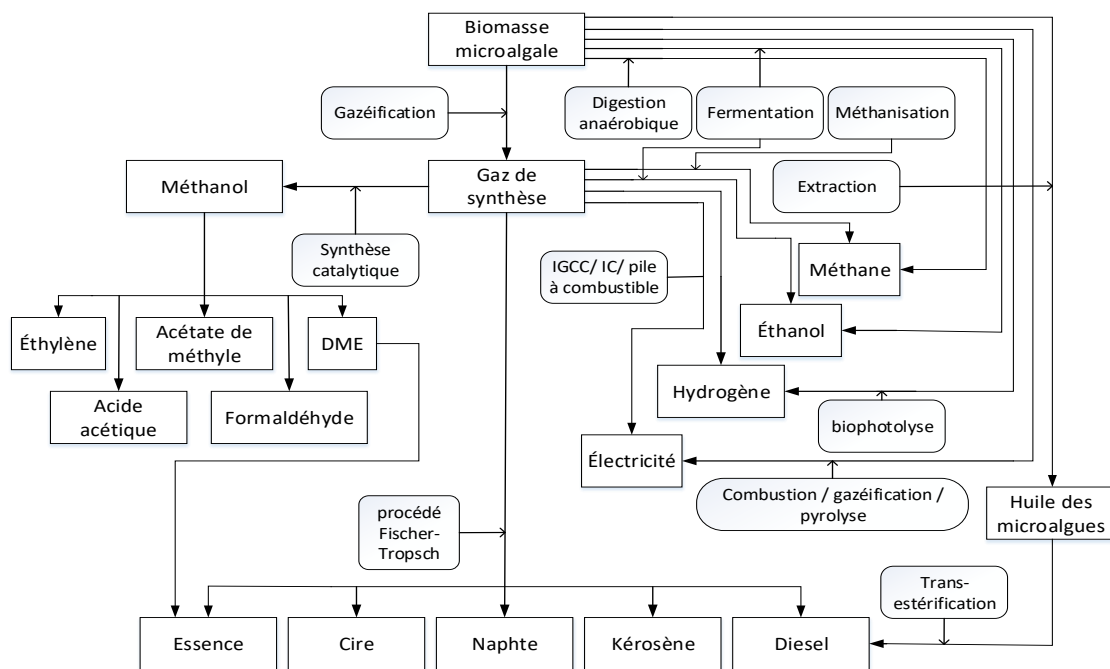


Figure 5 : Différents produits énergétiques provenant des microalgues (Da-Silva et al., 2014)

2.3 LES PRODUITS MICROALGAUX A HAUTE VALEUR AJOUTEE

Les microalgues représentent un groupement diversifié d'organismes qui ne sont pas encore pleinement explorés. Cette diversité évolutive et phylogénétique signifie une grande diversité dans la composition biochimique de ces microorganismes, ce qui les rend extrêmement attrayants pour la bioprospection et l'exploitation potentielle comme des sources commerciales d'une large gamme de biomolécules (Borowitzka, 2013). Les tentatives visant à développer des produits commerciaux à partir de microalgues ne sont pas nouvelles (Borowitzka 2013), la première étant pendant la Seconde Guerre mondiale lorsque Harder et von Witsch (1942) ont proposé la culture en masse de microalgues pour produire des graisses nécessitant une demande urgente à cette époque (Tu et al., 2016). Ensuite, Kathrein (1964) a étudié la production des caroténoïdes par la culture des microalgues et dans les années 1970, plusieurs souches ont été étudiées comme des sources de protéines d'organismes unicellulaires (Borowitzka 2013). Les premières microalgues commercialisées étaient *Chlorella* et *Spirulina* comme «aliments diététiques» à Taiwan et au Mexique (Soong, 1980 ; Durand-Chastel, 1980). Cela a été suivi dans les années 1980 par la commercialisation du β -carotène de *Dunaliella salina* (Ben-Amotz et Avron, 1989), d'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* dans les années 1990 (Lorenz et Cysewski, 2000) et d'acide docosahexaénoïque, l'un des acides gras polyinsaturés oméga-3 qualifiés d'indispensables, de *Cryptothecodinium cohnii* (Kyle, 2005).

2.3.1 Les acides gras et leurs dérivés

Les acides gras peuvent, par exemple, se produire dans les cellules sous forme de glycolipides et de phospholipides formant les membranes cellulaires, ou stockées sous forme de triglycérides (Hu et al., 2008b). Selon l'existence ou non de doubles liaisons, on peut distinguer deux types d'acides gras : saturés ou insaturés. Les microalgues ont, depuis longtemps, été intéressantes en tant que sources d'acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne tels que l'acide γ -linoléinique, l'acide arachidonique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque (Borowitzka, 2013) comme montré

dans le tableau 5. En effet, les microalgues vertes sont capables de produire une quantité moyenne de lipides de 23% (poids cellulaire sec) dans les conditions normales de culture (Skjanes et al., 2013). Dans le cas de carence en nutriments, la teneur en lipides par cellule augmente dans de nombreuses espèces de microalgues vertes, tandis que d'autres réagissent en produisant de l'amidon (Griffiths et Harrison, 2009). Par exemple, la culture de *Parietochloris incisa*, lorsque carencée en azote, conduit à une augmentation, non seulement dans la teneur totale en lipides, mais aussi du contenu en acides aminés (Solovchenko et al., 2008). De plus, la production microalgale de lipides est affectée par le mode de culture où la croissance en mode autotrophe tend à donner une production unitaire (par unité de cellule) de lipides plus élevée face à une production totale et une quantité relative des AGPI plus faibles que celle en mode mixotrophe (Skjanes et al., 2013).

La température a tendance à affecter la composition des acides gras plutôt que la quantité totale de lipides dans la cellule (Hu, 2004). En effet, les températures plus basses ont tendance à favoriser l'instauration des acides gras afin de maintenir la fluidité des membranes (Skjanes et al., 2013). Par contre, un niveau plus élevé d'acides gras saturés a été observé à faible pH dans les souches acido-tolérantes de *Chlamydomonas*, éventuellement comme adaptation pour éviter une fluidité trop élevée de la membrane cellulaire (Tatsuzawa et al., 1996). De plus, la concentration élevée en sel conduit à un ratio plus élevé d'acides gras insaturés probablement lié à l'adaptation aux niveaux élevés de glycérol intracellulaire chez la souche halotolérante de *Dunaliella* (Azachi et al., 2002). Des études provenant d'autres microalgues ont montré que des concentrations élevées en sel peuvent diminuer les proportions d'acides gras insaturés ainsi que la teneur en triglycérides (Ben-Amotz et al., 1985; Chen et al., 2008). L'intensité de la lumière peut également avoir un effet sur la proportion d'acides gras. L'intensité lumineuse élevée peut provoquer la production des acides gras saturés et mono-insaturés, alors qu'une faible intensité lumineuse peut induire la formation des AGPI et l'exposition aux UV peut inhiber leur synthèse (Skjanes et al., 2013). D'une manière générale, les microalgues en phase stationnaire produisent souvent plus de triglycérides et une quantité relativement plus faible des AGPI (Hu et al., 2008b).

Tableau 4 : Les acides gras polyinsaturés de microalgues particulièrement intéressants

AGPI	Structure	Application potentielle	Microorganismes producteur
Acide γ -linoléinique	18 : 3 ω 6, 9, 12	Formules infantiles pour nourrissons à terme. Compléments alimentaires.	<i>Arthrospira</i>
Acide arachidonique,	20 : 4 ω 6, 9, 12, 15	Formules infantiles pour nourrissons à terme et prématurés. Compléments alimentaires.	<i>Porphyridium</i>
Acide eicosapentaénoïque	20 : 5 ω 3, 6, 9, 12, 15	Compléments alimentaires. Aquaculture.	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Nitzschia</i>
Acide docosahexaénoïque	22 : 6 ω 3, 6, 9, 12, 15, 18	Formules infantiles pour nourrissons à terme et prématurés. Compléments alimentaires. Aquaculture.	<i>Cryptocodinium</i> , <i>Schizochytrium</i>

Source : Spolaore et al., 2006.

Plusieurs espèces des microalgues sont capables de produire des quantités élevées de lipides. Cependant, l'étude de la production des AGPI spécifiques par toutes les microalgues qui pourraient devenir des producteurs importants n'a pas été effectuée en détail (Skjanes et al., 2013). Par exemple, la souche *Scenedesmus* peut produire des AGPI à longue chaîne qui

peuvent inhiber la croissance de microorganismes pathogènes, mais ces composés actifs n'ont pas été utilisés comme des agents antibactériens pour inhiber les agents pathogènes alimentaires tels que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Salmonella* (Ishaq et al., 2016). De ce fait, d'autres études, en particulier dans l'application du potentiel des composés antibactériens dans l'industrie alimentaire, doivent être réalisées. Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent expliquer ces effets inhibiteurs. La première étant les produits d'oxydation provenant de la dégradation des acides gras comme les aldéhydes et les alcools. Ensuite, les acides gras qui peuvent avoir une fonction régulatrice directe sur les activités enzymatiques (Ikawa, 2004). La production de substances inhibitrices permet en général aux espèces de dominer dans leur environnement.

Les microalgues comme *Tetraselmis suecica* (Cardozo et al., 2007) et *Pyramidons* (Ponomarenko et al., 2004) sont capables de produire d'autres lipides notamment les stérols y compris le brassicastérol, le sitostérol et le stigmastérol, qui sont des groupes de lipides importants comme nutrition pour les organismes aquacoles et peuvent avoir des applications pharmaceutiques ou comme aliments fonctionnels (Gatenby et al., 2003; Borowitzka, 2013). Certaines algues peuvent produire des lipides acétyléniques qui peuvent avoir des propriétés antitumorales, antibactériennes, antimicrobiennes, antisalissures, antifongiques, phototoxiques, inhibitrices du VIH et immunosuppressives (Dembitsky, 2006). Cependant, ce groupe de lipides n'est pas largement exploré dans les microalgues. De même, les alcadiènes représentent un groupe de lipides produits par exemple par *Botryococcus braunii* et peuvent être utilisées pour la cire dans l'industrie cosmétique (Mendes et al., 2003).

2.3.2 Les pigments

Les pigments sont des composés chimiques colorés qui absorbent ou reflètent certaines longueurs d'onde de la lumière visible. Les pigments participent au système photosynthétique des microalgues en agissant comme absorbeur d'énergie lumineuse. Ils sont principalement regroupés en chlorophylles, caroténoïdes et phycobilines. Les chlorophylles sont présentes dans toutes les plantes et les microalgues photosynthétiques, tandis que les caroténoïdes sont

présents dans la plupart des microalgues, et les phycobilines ne se trouvent que dans les cyanobactéries et les microalgues rouges (Markou et Nerantzis, 2013). Les pigments sont des composés à grande valeur ajoutée qui peuvent être utilisés dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et nutraceutiques et leur teneur dépend des conditions de culture. En effet, plusieurs pigments secondaires s'accumulent en quantités plus élevées dans des conditions de stress, tandis que les chlorophylles en général se dégradent sous stress et, par conséquent, leur teneur dans la biomasse diminue de manière significative (Markou et Nerantzis, 2013).

Les caroténoïdes sont des pigments lipophiles ayant une structure isoprénique qui sont largement utilisés dans les domaines alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Skjanes et al., 2013). Il existe deux types de caroténoïdes : les caroténoïdes primaires notamment l' α -carotène, le β -carotène, la lutéine, la violaxanthine, la zéaxanthine et la néoxanthine qui sont directement impliqués dans la photosynthèse et les caroténoïdes secondaires comprenant l'astaxanthine, la canthaxanthine et l'echinenone dont leur production dépend de plusieurs facteurs environnementaux comme l'exposition à une forte intensité lumineuse, la carence en nutriments, la variation de température, le pH élevé ou faible, la forte salinité et le stress oxydatif (Leya et al., 2009). Dans plusieurs cas, ces facteurs doivent être présents afin d'induire une production optimale de ces métabolites précieux. Par d'exemple, la limitation des éléments nutritifs chez la souche *Dunaliella* est essentielle pour une production élevée de β -carotène et cette production peut être augmentée par une forte salinité et/ou intensité lumineuse (Coesel et al., 2008). De plus, de nombreux caroténoïdes présentent un grand effet antioxydant qui sert à protéger les organismes contre le stress oxydatif. En effet, les dérivés actifs de l'oxygène déclenchent une régulation des gènes codant pour la production de caroténoïdes (Li et al., 2009b). Ces dérivés sont formés, par exemple, dans les radicaux hydroxylés de *Chlorella zofingiensis* pendant les conditions de stress et ils génèrent une augmentation de la production d'astaxanthine (Ip et Chen, 2005). Il a été suggéré que non seulement les molécules d'astaxanthine elles-mêmes, mais aussi leur voie de synthèse peuvent servir comme de mécanismes de protection contre le stress oxydatif chez *Haematococcus* (Hu et al., 2008c).

Plusieurs souches de microalgues sont capables de produire des quantités importantes d'astaxanthine, du β -carotène et de lutéine (Tableau 5). En effet les microalgues tels que *Chlorella* (Del Campo et al., 2004), *Chlorococcum* (Ma et Chen, 2001) et *Scenedesmus* (Qin et al., 2008), sont signalés comme des producteurs potentiels d'astaxanthine, mais la production par la souche *H. pluvialis* dépasse toute autre source connue (Boussiba, 2000). Cette production est induite chez la microalgue *H. pluvialis* par l'inhibition de la division cellulaire, la carence des nutriments notamment l'azote, le phosphore et le soufre, le stress salin, la température élevée et la forte intensité lumineuse (Markou et Nerantzis, 2013). Les espèces de microalgues les plus étudiées pour la production de β -carotène sont *Dunaliella* et en particulier *D. salina*. Cette microalgue produit plus de β -carotène comparativement aux autres microalgues vertes (environ 0,5 à 1% de poids sec) (Del Campo et al., 2007). Le taux de synthèse de β -carotène dépend de certains paramètres environnementaux. En effet, comme dans le cas de l'astaxanthine, l'accumulation de β -carotène dans *Dunaliella* est déclenchée principalement lorsque le taux de division cellulaire est soit ralenti ou arrêté en raison de l'effet des facteurs stressants (Markou et Nerantzis, 2013). La lutéine peut être produite par plusieurs microalgues notamment *Chlorella* (Del Campo et al., 2004), *Muriellopsis* (Del Campo et al., 2000), *Scenedesmus* (Sánchez et al., 2008) et *Chlamydomonas* (Garbayo et al., 2008) et son rôle est d'agir dans le maintien de la structure et du fonctionnement des photosystèmes. Contrairement au cas de l'astaxanthine et de la β -carotène, la teneur en lutéine est assez équivalente dans la majorité des espèces de microalgues et semble ne pas être induite par des conditions de stress (Markou et Nerantzis, 2013).

Les phycobilines sont des pigments photosynthétiques liés à certaines protéines hydrosolubles, connues sous le nom de phycobiliprotéines. Les phycobiliprotéines sont présentées principalement dans les cyanobactéries, mais elles se trouvent également dans certaines microalgues rouges telles que *Porphyridium*, *Rhodella* et *Galdieria* et *Glaucophyta* (Borowitzka, 2013). Les phycobiliprotéines sont divisées en phycocyanobiline (couleur bleue), phycoérythrobiline (couleur rouge), phycourobiline (couleur jaune) et phycobioviline (couleur pourpre) (Markou et Nerantzis, 2013). Ces pigments solubles dans l'eau peuvent être utilisés comme colorants dans les industries alimentaires et cosmétiques, comme

marqueurs fluorescents utilisés en cytométrie en flux et en immunologie, comme antioxydants en cosmétique, comme composants consacrés aux aliments fonctionnels et comme photosensibilisateurs en thérapie photodynamique pour le traitement des cancers (Borowitzka, 2013). Il semble que la synthèse de phycobiliprotéines diminue en conditions de stress. En effet, la carence en phosphore, en azote et en soufre entraîne une diminution significative du taux de phycobiliprotéines dans la microalgue *Spirulina*, tandis qu'une augmentation de la concentration de NaCl jusqu'à 0,6 M entraîne une augmentation de la teneur totale en phycobiliprotéines de 25 à 45% de poids sec (Tableau 5), mais une augmentation supplémentaire de NaCl jusqu'à 0,9 M affecte négativement leur synthèse (Hifney et al., 2013). De même, la présence de plusieurs métaux lourds dans le milieu de culture d'*Anabaena* conduit à une réduction de la phycobiliprotéine (Hemlata et Fatma, 2009).

Tableau 5 : Contenu des principaux caroténoïdes, lipides ou hydrates de carbone par rapport à divers facteurs de stress a induit leur accumulation dans certaines espèces de microalgues (en % de la masse sèche)

Espèce de microalgues	Caroténoïdes			Phycobilines
	<i>Astaxanthine</i>	β -carotène	<i>Lutéine</i>	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	4%, carence des nutriments. 10%, intensité lumineuse élevée et culture mixotrophe non aérée.	-	-	-
<i>Dunaliella salina</i>	-	12%. 3,1%, forte intensité lumineuse. 2,7%, carence en azote.	-	-
<i>Chlorella protothecoides</i>	-	-	4,6%, haute température (35°C).	-
<i>Spirulina</i>	-	-	-	17,5 à 20%, salinité (NaCl 0,6 M).

*Source : Markou et Nerantzis, 2013.

2.3.3 Les vitamines

Plusieurs espèces, telles que *Dunaliella tertiolecta* (Abalde et al., 1991), *Nannochloropsis oculata* (Durmaz, 2007), *Spirulina platensis* (Mendiola et al., 2008), *Tetraselmis suecica* (Carballo-Cárdenas et al., 2003) et *Euglena gracilis* (Ogbonna et al., 1998) produisent des vitamines notamment les vitamines E et C. Les facteurs qui influencent la production des vitamines ne sont pas largement explorés (Markou et Nerantzis, 2013).

Cependant, les études de Durmaz (2007) sur la microalgue marine *N. oculata* ont montré que la diminution de la concentration en nutriments d'azote augmente la production d' α -tocophérol (vitamine E) et que le type de la source d'azote affecte significativement le teneur en α -tocophérol. De même, il a été démontré que l'urée ((NH₂)₂CO) est la source la plus favorable pour l'accumulation de vitamine C et que le nitrate favorise la production de vitamine E pour la souche *D. tertiolecta* (Abalde et al., 1991). La source de carbone a également un effet significatif sur la production des vitamines. En effet, la teneur en α -tocophérol dans des cultures hétérotrophes de *E. gracilis* était presque 4 fois plus élevée lorsque l'éthanol a été utilisé au lieu du glucose comme une source de carbone organique (Ogbonna et al., 1998). De plus, une corrélation positive a été observée entre l'augmentation de la teneur en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'augmentation des quantités d'antioxydants lipophiles (vitamine E) et d'antioxydants hydrophiles (vitamine C) (Abd El-Baky et al., 2009).

La vitamine E peut être trouvée sous différentes formes comme l' α -tocophérol, le β -tocophérol et l' α -tocotriénol (Skjanes et al., 2013). Ces composés vitaminiques ont des activités contre le cancer, les maladies cardiaques, les maladies oculaires, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et d'autres activités médicales (Pham-Huy et al., 2008). Ils possèdent également des applications dans l'industrie alimentaire, comme agents de conservation et additifs alimentaires (E306), et en cosmétique comme photoprotecteur dans les crèmes de la peau (Alberts et al., 1996). L'acide ascorbique ou la vitamine C est essentiel pour la biosynthèse du collagène, de la carnitine et des neurotransmetteurs (Skjanes et al., 2013). Cette vitamine a également montré une activité contre le cancer, l'athérosclérose et est utilisée comme additif alimentaire (E300) pour son rôle immunomodulateur (Skjanes et al., 2013). La vitamine C a une activité antioxydante qui fonctionne de manière synergique avec la vitamine E. Cependant, ces deux vitamines ont été contestées en ce qui concerne la sécurité alimentaire, par exemple, des doses quotidiennes de 400 UI ou plus d' α -tocophérol peuvent augmenter le risque de mortalité tandis qu'il n'y a pas de risque accru, et il peut même y avoir un avantage pour une dose quotidienne de 200 UI ou moins (Pham-Huy et al., 2008).

2.3.4 Les polysaccharides

La gamme de polysaccharides produits par les microalgues est grande. Ils sont utilisés comme agents de stabilisation des émulsions, biofloculants, épaississants et agents d'élimination des métaux lourds pour le traitement des eaux polluées. En outre, plusieurs polysaccharides ont montré de bonnes activités antitumorales, antivirales et immunostimulantes (Markou et Nerantzis, 2013). Il existe plusieurs microalgues comme *Chlorella* (Skjanes et al., 2013), *Botryococcus* (Lupi et al., 1994) et *Dunaliella* (Mishra et Jha, 2009) connues par leur capacité de produire et d'excréter des polysaccharides en quantités relativement élevées (Tableau 6). Cette production varie considérablement selon l'espèce de microalgues et elle peut aller d'environ 0,6 g.L⁻¹ jusqu'à plus que 18 g.L⁻¹ chez la microalgue *Cyanothece* (Chi et al., 2007). Les polysaccharides d'origine microalgale n'ont pas trouvé un intérêt significatif sur le marché en raison des alternatives moins coûteuses notamment ceux des macroalgues et des plantes (Borowitzka, 2013). Cependant, quelques polysaccharides produits par des microalgues ont trouvé des applications potentielles sur le marché du cosmétique (Borowitzka, 2013).

Tableau 6 : Production de polysaccharides par certaines espèces de microalgues

Microalgue	Production de polysaccharides (g.L ⁻¹)	Temps de culture (jour)	Température (°C)	Stress appliqué
<i>Botryococcus braunii</i> UC 58	4 - 5.5	31	27	Rien
<i>Dunaliella salina</i>	0.94	20	25	5 M NaCl
<i>Cyanospira capsulata</i>	2.17	17	30	Carence en Mg ²⁺
<i>Cyanothece</i>	2.42	21	30	Carence en azote
<i>Cyanothece 113</i>	22.34	11	29	Rien

Source : Markou et Nerantzis, 2013.

L'effet des conditions de culture sur la production microalgale de polysaccharides dépend principalement de l'espèce et de la souche (Tableau 6). Par exemple, la carence en azote conduit à la sécrétion de quantités plus élevées de polysaccharides par la microalgue *Anacystis nidulans*, tandis qu'elle n'a aucun effet sur *Synechocystis* et *Phormidium* (De Philippis et Vincenzini, 1998). De plus, la production cellulaire de polysaccharides par la microalgue rouge *Rhodella reticulata* est significativement améliorée par la carence en azote et en sulfate (Arad et al., 1992). Par contre, cette production est négativement corrélée avec la concentration d'azote chez *Botryococcus braunii* (Lupi et al., 1994). D'autres facteurs, tels que l'âge de la culture, la température et la forme d'azote, peuvent influencer la production de polysaccharides (Tableau 6). En effet, le nitrate favorise plus la production de polysaccharides que l'ammonium ou l'urée, mais la quantité de polysaccharides produite par gramme de cellules est significativement plus élevée en présence de l'azote d'ammonium ou d'urée qu'en présence de nitrate chez l'espèce *A. nidulans* (Sangar et Dugan, 1972). En outre, la qualité et l'intensité de la lumière affectent la production de polysaccharides. Par exemple, la lumière bleue et rouge améliore l'efficacité de la photosynthèse et augmente la production de polysaccharides par la microalgue *Porphyridium cruentum* (You and Barnett, 2004).

2.3.5 Les enzymes

Les microalgues ont plusieurs avantages dans la synthèse industrielle des enzymes par rapport à d'autres cellules microbiennes en raison de leurs faibles besoins nutritionnels (lumière naturelle ou artificielle, CO₂, eau, source d'azote et quelques sels minéraux), ce qui réduit les coûts de production. Néanmoins, les productions enzymatiques par les microalgues peuvent avoir des inconvénients comme le temps de culture plus long par rapport aux bactéries, aux levures ou aux champignons et la nécessité, en aval, des opérations supplémentaires pour récupérer les enzymes intracellulaires. En outre, la majorité des biomolécules sont produites intracellulairement en petites quantités, ce qui rend difficiles l'analyse et la mise à l'échelle industrielle. Cependant, les progrès les plus récents des techniques de lyse cellulaire ont fourni un rendement d'extraction élevé de plusieurs métabolites à partir de microalgues (Brasil et al., 2017). En 2014, le marché mondial des enzymes industrielles a été estimé à 4,2 milliards US \$ et devrait atteindre près de 7,1 milliards US \$ d'ici 2018 (Brasil et al., 2017). Bien qu'il n'y ait pas de production industrielle d'enzymes à partir de microalgues, plusieurs études ont montré la grande capacité des cellules microalgales à synthétiser des enzymes. Différentes classes d'enzymes ont été signalées, y compris les hydrolases, les oxydoréductases et les lyases.

● Les cellulases: Les cellulases, les hémicellulases et les pectinases peuvent être collectivement appelées holocellulases; Ces enzymes sont capables de dégrader les polymères glucidiques de la paroi cellulaire des plantes ou des algues (Siqueira et Ferreira-Filho, 2010). Ce groupe enzymatique se trouve généralement dans des décomposeurs microbiens de matières organiques végétales et algales. Les cellulases sont principalement utilisées dans les industries alimentaires (pour décomposer les glucides non digestibles et pour améliorer la dégradation des fibres), dans le domaine du textile (pour le lavage biologique des jeans et pour le biopolissage du coton), dans les procédés de fabrication des biocarburants (éthanol cellulosique) et dans les industries chimiques (Bhat et Bhat, 1997). Les souches de microalgue *Anabaena* ont été signalées comme des organismes potentiels qui produisent des enzymes hydrolytiques avec une activité fongique possible (Prasanna et al.,

2008). Les polysaccharidases microalgales identifiées à ce jour (agarases, carraghénases et alginate lyases) présentent des structures et des caractéristiques biochimiques uniques et sont lointainement apparentées aux glycosides hydrolases actuellement connues (Martin et al., 2014). Ces résultats soulignent le potentiel d'utilisations biotechnologiques nouvelles et originales de ces enzymes.

● Les lipases: Les lipases (triacylglycérol acyl hydrolases, E.C. 3.1.1.3) sont des enzymes qui hydrolysent naturellement les triglycérides en acides gras et en glycérol et dans certains cas ils peuvent catalyser l'estérification, la trans-estérification, l'inter-estérification et l'aminolyse (Baron et al., 2005). Ils ont plusieurs applications biotechnologiques notamment la production des détergents, des arômes, des produits pharmaceutiques, chimiques, agrochimiques et cosmétiques (Hasan et al., 2006). Les lipases d'origine microalgale n'ont pas été largement étudiées, comparativement aux lipases bactériennes, fongiques, animales et végétales. Au cours des dix dernières années, l'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* a été comme modèle pour comprendre le métabolisme lipidique chez les microalgues vertes (Brasil et al., 2017). De nombreuses lipases putatives sont codées dans le génome de *Chlamydomonas*. En cas de carence d'azote, les microalgues photosynthétiques *C. reinhardtii* accumulent des triacylglycérols, ce qui provoque des modifications de la transcription à l'échelle du génome notamment la régulation des nombreux gènes codant des lipases (Miller et al., 2010). Récemment, Savvidou et al. (2016) ont utilisé la sonication pour extraire puis caractériser une lipase à partir de l'espèce de microalgues *Nannochloropsis oceanica*. Cette lipase a montré une activité d'hydrolyse contre les esters de différentes chaînes d'acides gras. Yong et al. (2016) ont également signalé la production d'une lipase extracellulaire à partir de la souche de microalgues *Botryococcus sudeticus*. Ils ont étudié l'effet de l'utilisation de plusieurs sources d'huiles (palmier, canola, maïs et olive) dans le milieu de culture ainsi que l'effet de l'agitation sur la production de lipase.

● Les protéases: Les protéases constituent un groupe d'enzymes qui catalysent le clivage des fragments peptidiques dans les protéines et les peptides (Zhu et al., 2011). Ils ont

une large gamme de fonctions métaboliques et d'applications industrielles, notamment dans la fabrication des détergents et des produits pharmaceutiques et dans les industries alimentaires (Rao et al., 1998). L'activité des protéases microalgales augmente pendant le stress environnemental comme la limitation de la lumière, la carence en éléments nutritifs et l'apoptose cellulaire (Brasil et al., 2017). La production des protéases est également associée à la disponibilité et à la nature de la source d'azote (Souza et al., 2015). Le premier rapport de purification des aminopeptidases (EC 3.4.11.15) par les cyanobactéries a été effectué par Niven (1995) en utilisant la microalgue bleu-vert *Anabaena variabilis*. Deux enzymes (188 kDa et 59 kDa) ont été séparées par Chromatographie de filtration sur gel et ont montré différentes spécificités pour les substrats. En effet, l'enzyme la plus grande a montré une spécificité pour les dipeptides et les tripeptides, alors que l'enzyme la plus petite était capable d'hydrolyser les oligopeptides. De plus, la souche *Arthospira platensis* a montré une capacité de produire une nouvelle sérine protéase associée à la protéolyse sélective des phycobiliprotéines (Nanni et al., 2001) et une nouvelle protéase spécifique de l'arginine qui peut hydrolyser la gélatine et la fibrine (Yada et al., 2005).

- Les galactosidases: L' α -D-galactoside galactohydrolase (EC 3.2.1.22), appelée aussi α -galactosidase, hydrolyse la liaison α -1,6 des résidus de galactose qui existe dans les oligosaccharides et les polysaccharides de galactomannane (Katriola et al., 2014). Les α -galactosidases sont utilisées dans les industries des pâtes à papier, dans la fabrication du sucre et en médecine (Weignerová et al., 2009). L'activité de l' α -galactosidase intracellulaire optimale a été détectée chez la microalgue dorée *Poteroiochromonas malhamensis* à pH 7,0 (Brasil et al., 2017). La β -galactosidase (β -D-galactohydrolase, EC 3.2.1.23), appelée aussi la lactase, hydrolyse les résidus de D-galactosyle à partir d'oligosaccharides, de polymères et de métabolites secondaires (Husain, 2010). La principale application industrielle a été l'hydrolyse du lactose dans le lait et les produits laitiers. En effet, Davies et al. (1994) ont testé l'activité β -galactosidase des espèces macro et microalgales. Huit espèces de microalgues d'eau douce notamment *Cosmarium*, *Ankistrodesmus* et *Scenedesmus obliquus* ainsi que neuf espèces de microalgues marines comme *Dunaliella tertiolecta* et *Asterionella glacialis* ont présenté une activité β -D-galactosidase. De plus, Girard et al. (2014) ont testé

l'utilisation du perméat de lactosérum doux en tant que substituant partiel du milieu de culture dans la culture mixotrophique de la microalgue *Scenedesmus obliquus*. Le lactose présent dans le perméat a été hydrolysé par les microalgues, favorisant ainsi une réduction de la concentration de lactose et une accumulation de glucose et de galactose dans le milieu de culture, ce qui indique la présence d'une activité β -galactosidase. Plus récemment, les β -galactosidases avec des activités de transgalactosylation ont été largement exploitées pour la synthèse de galacto-oligosaccharides utilisés comme ingrédients alimentaires probiotiques (Mlichová et al., 2006 ; Oliveira et al., 2011). Plusieurs études ont rapporté la production d' α -galactosidase et de β -galactosidase à partir de levures, de moisissures et de bactéries en utilisant du lactosérum et d'autres déchets agro-industriels comme substrats (Brasil et al., 2017). Ces sous-produits agro-industriels pourraient être des inducteurs potentiels de la synthèse de galactosidase par les microalgues. Par exemple, l'inducteur de β -galactosidase est le lactose.

La variété des enzymes trouvées chez les espèces de microalgues démontre l'importance de ces microorganismes polyvalents comme usines cellulaires. Bien qu'une grande partie des ressources génétiques des microalgues reste inexploree, un nombre croissant d'enzymes avec des applications potentielles dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et chimique ont été signalés. Le développement de nouvelles stratégies et méthodes pour induire et optimiser la production d'enzymes à partir des microalgues, dans une optique d'augmentation de la concentration d'enzymes et de réduction du coût des opérations, est une approche importante pour l'extension et l'industrialisation des enzymes potentielles. L'avancement de l'ingénierie génétique et de la biologie synthétique, conjugué à l'utilisation de la biomasse microalgale entière pour produire plusieurs bioproduits dans une stratégie de bioraffinerie, offre des possibilités prometteuses pour obtenir une production rentable d'enzymes industrielles à partir des cellules microalgales à l'avenir (Brasil et al., 2017).

2.4 LES BETA-GALACTOSIDASES ET LEURS APPLICATIONS POTENTIELLES

Les β -galactosidases (EC 3.2.1.23) constituent une grande famille de protéines qui sont connues par leur capacité à catalyser les réactions hydrolytiques et de transgalactosylation (Figure 6). L'activité hydrolytique de cette enzyme a été appliquée dans l'industrie alimentaire pendant des décennies pour réduire la teneur en lactose dans le lait, tandis que l'activité de transgalactosylation a été utilisée, ces dernières années, pour synthétiser des galacto-oligosaccharides et des produits chimiques contenant du galactose (Oliveira et al., 2011).

2.4.1 Les sources de β -galactosidase

De nombreux organismes synthétisent naturellement la β -galactosidase notamment les microorganismes (levures, bactéries, microalgues, etc.), les cellules végétales et animales (Panesar et al., 2006). Les β -galactosidases fongiques comme celles purifiées à partir d'*Aspergillus oryzae* ont généralement un pH optimal acide (2.5 à 5.4), donc elles sont plus efficaces pour l'hydrolyse du lactose présent dans des produits acides tels que le lactosérum du yaourt grec (Husain, 2010). Ces β -galactosidases sont des enzymes thermostables; cependant, ils sont plus sensibles à l'inhibition par les produits notamment par le galactose (Boon et al., 2000). La production de β -galactosidase par les levures comme *Kluyveromyces lactis* pourrait être intéressante, car cette enzyme est utilisée dans l'industrie alimentaire pour la production du lait à lactose réduit, un produit industriel exceptionnel utilisé par un grand nombre de personnes intolérantes au lactose (Pivarnik et al., 1995). Les lactases de levure sont plus actives à des pH relativement neutres (6.0 à 7.0) (Genari et al., 2003). La levure *Kluyveromyces marxianus* présente la possibilité de produire des enzymes homologues telles que les β -galactosidases, ainsi que des protéines hétérologues et d'utiliser différents substrats pour sa croissance, y compris le lactose en tant que seule source de carbone et d'énergie (Husain, 2010). La β -galactosidase issue de sources bactériennes a été largement utilisée pour l'hydrolyse du lactose en raison de la facilité de fermentation, de l'activité élevée de l'enzyme et de sa bonne stabilité (Picard et al., 2005). En effet, cette enzyme est très présente dans le

côlon de l'être humain. Elle catalyse la première étape de la fermentation du lactose dans le côlon grâce à des bactéries présentes dans l'intestin (Jain et al., 2007). De plus, les β -galactosidases sont largement distribuées dans les tissus végétaux, en particulier dans les amandes, les pêches, les abricots et les pommes (Husain, 2010). Ces enzymes ont été impliquées dans un certain nombre de processus biologiques, y compris la croissance des plantes, la maturation des fruits et l'hydrolyse du lactose. Des approches moléculaires ont également été utilisées pour démêler le rôle des β -galactosidases dans le développement et la maturation des fruits (Husain, 2010). En effet, la β -galactosidase est la seule enzyme capable d'hydrolyser les résidus de galactosyle à partir de polysaccharides de la paroi cellulaire des plantes (Smith et al., 1998). Les β -galactosidases végétales présentent des différences significatives par rapport à celles purifiées à partir des bactéries. Les enzymes bactériennes sont généralement tétramères ou monomères et beaucoup plus grandes que les enzymes végétales, qui sont généralement dimères et beaucoup plus petites (Biswas et al., 2003). Il a également été rapporté que le pH optimal des enzymes végétales se situe dans la gamme acide, alors que le pH optimal des bactéries se situe près de la gamme neutre (McGee et Muray, 1986).

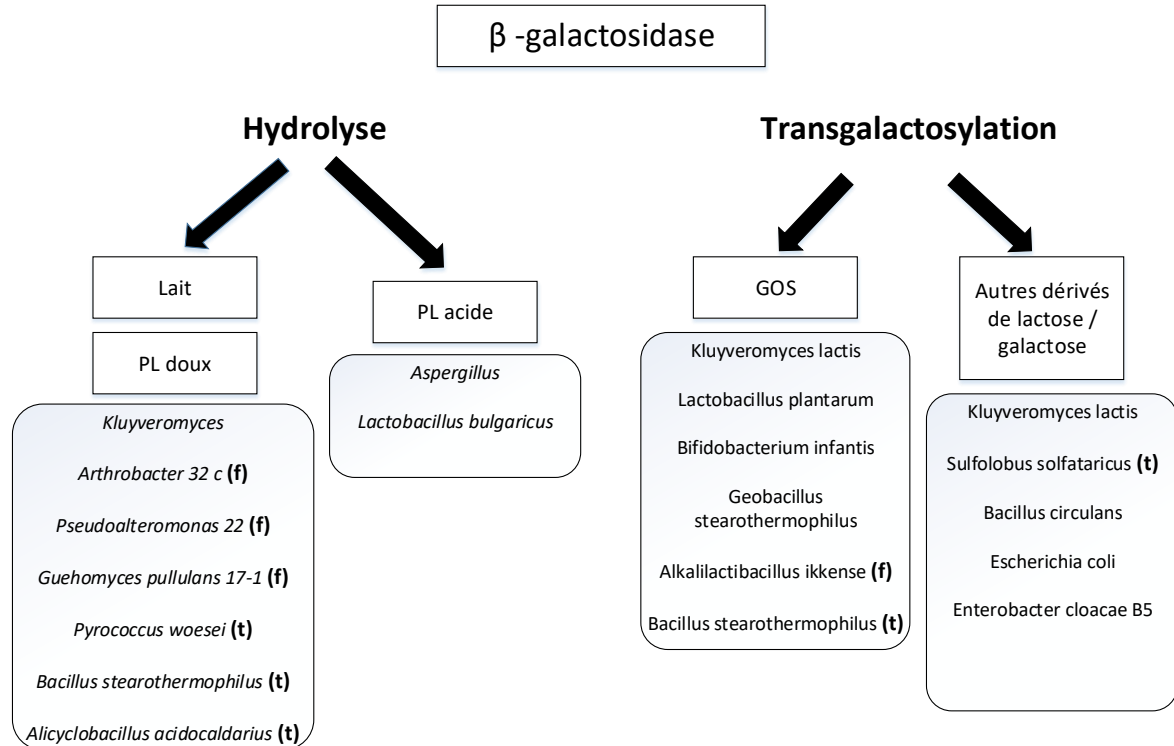


Figure 6 : Applications biotechnologiques des β-galactosidases. (f) enzymes actives au froid; (t) enzymes thermophiles (Oliveira et al., 2011)

Les microorganismes produisent de l'enzyme à des rendements plus élevés, d'où un coût de production plus bas par rapport aux sources animales et végétales (Santos et al., 1998). Par conséquent, les β-galactosidases microbiennes sont les plus étudiées (Figure 6). Les propriétés (Tableau 7), la spécificité et la structure de la β-galactosidase diffèrent de manière significative selon la source microbienne de l'enzyme tel que le poids moléculaire, la longueur de chaîne des acides aminés, la position du site actif, le pH et la température optimaux et la stabilité (Mlichova et Rosenberg, 2006). Le choix de la source de β-galactosidase appropriée dépend des conditions de réaction de l'hydrolyse du lactose. L'activité de différentes β-galactosidases dépend également de la présence d'ions. Les β-galactosidases fongiques sont actives sans présence d'ions en tant que cofacteurs, les β-galactosidases de levures isolées à partir de *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces fragilis* nécessitent des ions tels que Mn^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} et K^+ (Jurado et al., 2002). Par contre, le Ca^{2+} et les métaux lourds inhibent l'activité enzymatique de toutes les β-galactosidases (Mlichova

et Rosenberg, 2006). Bien que la β -galactosidase la plus étudiée soit celle produite par *Escherichia coli*, les facteurs toxiques possibles associés aux coliformes empêchent l'utilisation des isolats bruts de cette enzyme dans les processus alimentaires (Santos et al., 1998). Par conséquent, les β -galactosidases les plus utilisées dans l'industrie ont été obtenues à partir d'*Aspergillus* et *Kluyveromyces* (Husain, 2010) qui ont des productivités et des rendements plus élevés comparativement à d'autres organismes et qui sont approuvés comme GRAS, ce qui est essentiel pour les applications alimentaires (Oliveira et al., 2011). Deux types de β -galactosidases ont une importance croissante dans le traitement industriel: les enzymes thermostables et les enzymes actives au froid (Pivarnik et al., 1995) comme montré dans la figure 6. Leur utilisation offre un certain nombre d'avantages. L'application des enzymes thermostables à des températures élevées est liée à une diminution des viscosités de la solution de substrat et à une réduction de la contamination microbienne indésirable (Wolosowska et Synowiecki, 2004) tandis que les enzymes actives au froid fournissent un traitement qui préserve le goût et les valeurs nutritionnelles du lait et des produits laitiers (Fernandes et al., 2002).

Tableau 7 : Propriétés des β -galactosidases microbiennes

	microorganisme	Production d'enzyme	pH optimum	Température optimale (°C)
Champignons	<i>Aspergillus niger</i>	E	3.0 – 4.0	55 – 60
	<i>Aspergillus oryzae</i>		5.0	50 - 55
Levures	<i>Kluyveromyces lactis</i>	I	6.5 – 7.0	30 – 35
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>		6.6	30 - 35
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	I	7.2	40
	<i>Lactobacillus</i>		6.2	55
	<i>thermophilus</i>		6.5	66
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>		6.0	65
	<i>Bacillus circulans</i>			

*I : intracellulaire ; E : extracellulaire.

Source : Mlichová et al., 2006 .

2.4.2 Les applications potentielles des β -galactosidases

La β -galactosidase peut être utilisée en solution comme une enzyme libre ou en bioréacteurs en tant qu'enzyme immobilisée (Gänzle et al., 2008). En effet, les applications de l'enzyme libre étaient limitées dans les procédés industriels à cause du problème de l'instabilité et de la perte rapide d'activité catalytique pendant les périodes d'opération et de stockage qui peuvent être dues à un effet d'autolyse, du dépliement ou d'agrégation de protéines (Husain, 2010). L'élimination de l'enzyme libre du mélange réactionnel était également difficile et elle peut provoquer une contamination du produit (Xi et al., 2005). Par contre, les enzymes immobilisées ont été principalement utilisées dans la production des aliments, de produits pharmaceutiques et d'autres produits biologiquement importants (Bayramoglu et al., 2007). Leur susceptibilité à être réutilisées offre des avantages financiers qui représentent souvent une condition préalable essentielle pour diverses applications industrielles (Norouzian, 2003).

Les β -galactosidases provenant de microorganismes thermophiles ont une stabilité naturelle intégrée à la température et à d'autres agents d'inactivation et pourraient être utiles à la fois en solution et sous forme immobilisée dans les industries alimentaires, ce qui permet un traitement thermique modéré et une faible hydrolyse du lactose (Ladero et al., 2006). Ces enzymes ont été utilisées dans le traitement industriel des produits laitiers qui subissent un traitement thermique pour stériliser le produit afin de réduire les risques de contamination microbienne (Pessela et al., 2003). La β -galactosidase active au froid, isolée par exemple à partir de levures psychrophiles, est l'une des enzymes les plus importantes dans l'industrie alimentaire (Husain, 2010). Les β -galactosidases immobilisées peuvent être utilisées pour hydrolyser le lactose dans le lait, dans le lactosérum ou dans le perméat de lactosérum ainsi que pour la synthèse des oligosaccharides. Le choix de la technologie des procédés dépend de la nature du substrat, des caractéristiques de l'enzyme, du coût de production et de la commercialisation du produit (Panesar et al., 2006). La caractéristique principale qui détermine le choix et l'application d'une enzyme donnée est la plage de pH opérationnelle. Les enzymes à pH acide provenant de champignons sont appropriées pour le traitement du

lactosérum acide et du perméat du lactosérum acide alors que les enzymes à pH neutre des levures et des bactéries conviennent au traitement du lait et du lactosérum doux (Panesar et al., 2010).

● L'hydrolyse du lactose du lait: le lait délactosé a été utilisé pour la préparation de laits aromatisés, de fromages et de yaourts. En effet, l'hydrolyse du lactose dans le lait empêche la cristallisation du lactose dans les produits laitiers congelés et condensés. Par exemple, la β -galactosidase de *K. fragilis* peut être appliquée à la production de produits laitiers congelés pour éviter la cristallisation du lactose et pour améliorer la digestibilité et la saveur de ces produits (Panesar et al., 2006). En outre, l'utilisation du lait hydrolysé dans la fabrication du yaourt et du fromage accélère le processus d'acidification, car l'hydrolyse du lactose est l'étape déterminant la vitesse du procédé, ce qui réduit le temps de fabrication du yaourt et accélère le développement de la structure et de la saveur du fromage (Shukla, 1975). La qualité du lait glacé et de la crème glacée a également été considérablement améliorée par l'addition de la β -galactosidase (Panesar et al., 2006). De plus, cette enzyme a été utilisée pour améliorer la production et la maturation du fromage cheddar par hydrolyse préliminaire du lactose en glucose et galactose (Gooda et al., 1983). Elle entraîne une augmentation du taux d'azote (soluble et total) et d'azote non protéique dans le fromage cheddar. De ce fait, la production de fromage est devenue plus rapide et moins coûteuse avec des propriétés organoleptiques améliorées (Panesar et al., 2006). Des taux élevés de conversion (85-90%) de lactose dans le lactosérum, le perméat de lactosérum et le lait écrémé ont également été obtenus avec la β -galactosidase immobilisée de *K. lactis* (Ovsejevi et al., 1998).

● L'hydrolyse du lactose de lactosérum: L'hydrolyse du lactosérum en utilisant la β -galactosidase est une autre application importante de la technologie enzymatique dans l'industrie alimentaire. Le lactosérum ou le perméat de lactosérum hydrolysé et concentré peut être utilisé comme édulcorant dans des produits comme les sirops de fruits en conserve et les boissons gazeuses (Shukla, 1975). Les cellules entières de *Kluyveromyces fragilis* ont montré une hydrolyse de 80% dans le lactosérum et les solutions de lactose, tandis que l'hydrolyse de 87% à 100% du sirop de lactose provenant du lactosérum doux ultrafiltré a été

obtenue à l'aide de la β -galactosidase de *S. lactis* (Panesar et al., 2006). De plus, les cellules de levure perméabilisées par la digitonine ont hydrolysé 70 à 80% de la teneur en lactose dans le lactosérum en 2 heures, tandis que la β -galactosidase immobilisée sur des hydrogels a entraîné une hydrolyse de 70 à 75% de la teneur en lactose dans le lactosérum en 7 heures (Panesar et al., 2006).

● Synthèse des oligosaccharides: La β -galactosidase a été connue par sa capacité d'hydrolyse du lactose. L'activité transférase par laquelle l'enzyme produit et hydrolyse une série d'oligosaccharides a également attiré l'attention des chercheurs vu l'effet bénéfique des oligosaccharides sur la croissance de la microflore intestinale notamment les bifidobactéries intestinales et les lactobacilles (Panesar et al., 2006). De plus, la transférase peut être utilisée pour attacher du galactose à d'autres produits chimiques et, par conséquent, avoir une application potentielle dans la production des ingrédients alimentaires, de produits pharmaceutiques et d'autres composés biologiquement actifs. Différentes cultures ayant une activité de transgalactosylation élevée ont été identifiées (Panesar et al., 2006). La quantité et la nature des oligosaccharides formés dépendent de plusieurs facteurs comme la source d'enzyme, la concentration, la nature du substrat et les conditions de réaction enzymatique (Mahoney, 1998). La température, la concentration de substrat et l'origine enzymatique jouent un rôle important dans la synthèse enzymatique des oligosaccharides (Boon et al., 2000). Cependant, l'influence de la concentration initiale en lactose peut être beaucoup plus grande (Chockchaisawasdee et al., 2005). En général, des concentrations initiales de lactose et/ou des températures plus élevées engendrent une production plus grande des galacto-oligosaccharides (Panesar et al., 2006). La β -galactosidase de *B. circulans* produit des oligosaccharides de plus grande taille; cependant, l'enzyme de *Kluyveromyces* produit principalement des trisaccharides. Les réacteurs de type «packed bed» et «plug-flow» ont été utilisés avec succès pour la production en continue des GOS à partir de lactose en utilisant la β -galactosidase immobilisée (Albayrak et Yang, 2002).

CHAPITRE 3

METHODOLOGIE DU TRAVAIL

3.1 ETAPES PREPARATOIRES : CULTURE ET MILIEU

La souche *Scenedesmus obliquus* a été obtenue du centre canadien de culture phycologique à Waterloo, Ontario, Canada (CCP5). Elle a été conservée dans des « cryovials » de 2 mL et préservée dans de l'azote liquide à des très basses températures (inférieures à -130°C). Cette cryoconservation permet aux microalgues vivantes d'être maintenues indéfiniment dans un état arrêté (Andersen, 2005). Après décongélation, une petite partie des microalgues appelé aussi culture mère a été maintenue en croissance dans du milieu de culture BBM modifié (Tableau 8) à pH égal à 6.8 après stérilisation de ce dernier (121°C , 15min). Une phase d'adaptation en phase exponentielle de croissance dans un erlenmeyer dans un incubateur de type Multitron II (Infors-HT, Suisse) à une température de 21°C , avec une agitation orbitale continue (120 rpm) et une intensité de lumière continue ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 15 jours.

Toutes les manipulations pour la préparation de différentes cultures ont été effectuées dans des conditions stériles sous une hotte biologique à flux laminaire. L'axénicité des échantillons a été confirmée au début et à la fin de chaque expérience en les fixant par du glutaraldéhyde (25% v/v) et en les analysant par la suite à l'aide de la cytométrie en flux de type Epic Altra (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) (Tremblay et al., 2009).

Des solutions concentrées de BBM modifié, du D-(+)-Glucose pur (Sigma-Aldrich, $\geq 99.5\%$), du D-(+)-Galactose pur (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), du monohydrate de D-lactose pur (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) (dans de l'eau nano-filtrée) et du perméat de lactosérum acide ont été préparées pour les cultures photoautotrophes, hétérotrophes et mixotrophes. Le perméat de lactosérum, obtenu après ultrafiltration du yogourt grec au sein du laboratoire de transformation alimentaire de l'Université Laval, a subi une ultrafiltration stérilisante à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration à fibres creuses (Koch HF, 1018-1.0-43-PM50) à une

surface active de 1 ft² et un poids moléculaire limite de 50 kDa : en effet, le flux de perméat a été forcé à travers la membrane afin de filtrer les particules supérieures à 50 kDa. Une photographie de l'unité expérimentale de filtre est présentée dans la figure 7. Le perméat récupéré a subi une deuxième ultrafiltration à travers un filtre stérile de 0.2 µm sous une hotte biologique à flux laminaire. Toutes les autres solutions ont été autoclavées séparément (121 °C, 15 min), puis diluées à la concentration souhaitée dans des conditions aseptiques.

Tableau 8 : Composition chimique du Bold's Basal Medium (BBM)

Composant chimique	Solution stock (par Litre)
1. KH ₂ PO ₄	175 mg
2. CaCl ₂ .2H ₂ O	25 mg
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	75 mg
4. NaNO ₃	250 mg
5. K ₂ HPO ₄	75 mg
6. NaCl	25 mg
7. Solution 1	1 mL
8. Solution 2	1 mL
9. Solution de micro-éléments	1 mL
10. H ₃ BO ₃	11.42 mg
*Solution 1 :	
Substance	par Litre
1. Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10 g
2. KOH	6.2 g
*Solution 2 :	
Substance	par Litre
1. FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98 g
2. H ₂ SO ₄ (concentré)	1 mL
*Solution de micro-éléments :	
Substance	par Litre
1. H ₃ BO ₃	2.86 g
2. MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g
3. ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222 g
4. Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.390 g
5. CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g
6. CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494 g

*Source : Stein, 1973



Figure 7 : Photo d'ultrafiltration stérilisante du perméat de lactosérum acide

3.2 PLAN EXPERIMENTAL

Deux séries d'expériences ont été effectuées afin de préciser et d'optimiser les paramètres qui peuvent influencer la production de l'enzyme de type β -galactosidase dans un milieu de culture déterminé, de maîtriser et d'optimiser la production enzymatique en présence du véritable perméat de lactosérum acide à l'échelle pilote et de valider les résultats en photobioréacteur de 5 L.

Dans la première série, on a vérifié si le mode de croissance peut affecter la production de l'enzyme ou non. En effet, les trois modes de croissance (photoautotrophe, hétérotrophe et mixotrophe) ont été comparés entre eux en utilisant le BBM (environ 180 ppm de NO_3^-) en photoautotrophie et un mélange de BBM et d'une solution de lactose en hétérotrophie et en mixotrophie. Ensuite, une autre expérience a été effectuée en mode mixotrophe afin de comparer trois échantillons en modifiant à chaque fois la source de carbone organique dans le milieu de culture. De ce fait, le glucose a été remplacé par le galactose puis par le lactose

en gardant à chaque fois la même concentration du mélange (BBM / solution de carbone organique). Un plan d'expérience à trois facteurs et à deux niveaux a été utilisé, dans une troisième expérience, pour vérifier si la concentration d'azote, la concentration de carbone organique et l'âge de culture ou l'interaction entre ces trois facteurs peuvent affecter la production de l'enzyme dans un mode de culture mixotrophe en utilisant des mélanges à différentes proportions en BBM et en lactose, utilisés respectivement comme seules sources d'azote et de carbone organique. Finalement, la production journalière d'enzyme de type β -galactosidase a été suivie pendant 21 jours en mixotrophie en utilisant un mélange de BBM et de lactose à 20 g.L^{-1} .

Dans la deuxième série d'expériences, l'effet d'augmentation des proportions du perméat de lactosérum allant de 20% (v/v) à 80% (v/v) dans le milieu de culture a été étudié sur la croissance de la microalgue *Scenedesmus obliquus* et sur la production enzymatique de type β -galactosidase. Par la suite, l'effet de l'augmentation des proportions de nitrate a été mis en question en utilisant différentes concentrations de BBM et en gardant une proportion de 20% (v/v) du perméat de lactosérum acide. Une troisième expérience a été effectuée en flacons agités pendant 13 jours afin de suivre la cinétique de la production de β -galactosidase en mixotrophie et dans le milieu de culture contenant 80% (v/v) BBM 1x et 20% (v/v) perméat de lactosérum acide. Ce suivi a été refait en utilisant un photobioréacteur Applikon de 5L de volume de culture pour valider l'utilisation et la valorisation du perméat de lactosérum acide par la microalgue *Scenedesmus obliquus* pour la production de l'enzyme spécifique de type β -galactosidase dans un modèle ayant les mêmes caractéristiques qu'un modèle industriel.

Toutes les expériences ont été effectuées dans des Erlenmeyer de 250 ml (75 ml de culture par flacon) et avec une concentration cellulaire initiale de $1 \times 10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$ (jour 0) en utilisant un compte cellulaire sur un hémacymètre. Pour des raisons statistiques, tous les échantillons représentant les différentes conditions de culture ont été préparés en triplicatas. Des mesures de poids sec ont également été effectuées pour toutes les expériences conformément à la méthode de Zhu et Lee (1997). Les mesures ont été prises aux jours 8

(phase exponentielle ou linéaire de croissance) et 16 (phase stationnaire de culture) pour comparer la production d'enzyme et l'évolution du poids sec dans chaque condition et ont été effectuées respectivement à chaque deux jours ou à chaque jour selon l'expérience. De plus, la culture de *Scenedesmus obliquus* dans un milieu contenant du perméat de lactosérum acide a été réalisée dans les mêmes conditions (agitation, température, intensité de lumière, etc.) après un ajustement du pH entre 6.8 et 7.0.

3.3 METHODES D'ANALYSE

3.3.1 Mesure de l'activité enzymatique

Les échantillons ont été centrifugés (3400 g, 6 min) puis lavés deux fois avec de l'eau distillée. L'activité enzymatique de culot cellulaire a été analysée en utilisant la méthode de Miller (1972) avec quelques modifications. En effet, cette méthode basée sur la détection spectrophométrique d'*o*-nitrophénol, un produit résultant de l'hydrolyse de l'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside (ONPG) par la β -galactosidase produite par le microorganisme, est initialement développée pour des bactéries notamment *E. coli*. Dans cette méthode, une solution de 0.5 ml contenant des cellules a été mélangée avec 0.5 ml de solution tampon Z contenant 0.06 M Na₂HPO₄, 0.04 M NaH₂PO₄.H₂O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄.7H₂O et 0.135 mL de 0.05 M β -mercaptoethanol dans 50 mL d'eau distillée avec un ajustement de pH à 7.0. La membrane cellulaire a été par la suite perturbée à l'aide de 100 μ l de chloroforme et 50 μ l de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0.1% en permettant, partiellement, aux molécules comme le *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) de pénétrer dans les cellules. La réaction est amorcée en ajoutant 0.2 ml d'ONPG (4 mg.ml⁻¹) aux cellules incubées à 28°C et qui, en présence de l'enzyme de type β -galactosidase, se dissocie en galactose (incolore) et en *o*-nitrophenol (couleur jaune). L'ajout de 0.5 ml de 1 M Na₂CO₃ permet d'arrêter la réaction enzymatique en augmentant le pH du milieu jusqu'à 11. À ce pH, l'enzyme est inactivée. En raison d'adaptation de cette méthode au cas de la microalgue *Scenedesmus obliquus*, les cellules ont subi une autre étape de centrifugation (3400 g, 6 min) pour améliorer la mesure d'absorbance à 420 nm du composé jaune (*o*-nitrophénol) en solution. De plus, deux

prélèvements de chaque échantillons, dont un subit la réaction enzymatique, ont été effectués simultanément et la mesure de l'absorbance à 420 nm a été effectuée pour les deux cas afin de compenser pour la coloration jaune due aux cellules (ex. : pigments). La différence entre ces deux mesures permet d'obtenir le résultat uniquement dû à la présence de *o*-nitrophénol après la réaction enzymatique.

Le résultat du test est linéairement proportionnel à la quantité d'enzyme présente (Miller, 1972), sous l'hypothèse que l'activité enzymatique mesurée est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente. Deux formules ont été établies pour mesurer l'activité enzymatique : l'activité enzymatique *spécifique* (*SEA*) et l'activité enzymatique *volumétrique* (totale) (*VEA*). La première (équation 1) est définie comme la quantité d'enzyme (U) par unité de biomasse microalgale (g^{-1} de cellules), qui peut être utilisée comme mesure de la sélectivité du processus (proportion d'enzyme par rapport à la biomasse totale produite). La seconde (équation 2) est une mesure de la quantité d'enzyme (U) produite par volume de culture (L^{-1} de culture). La définition de l'unité 1 U est équivalente à 1 nmol de *o*-nitrophénol produit par minute à 28°C et à un pH de 7.0 :

$$SEA \left(U \cdot g^{-1} \text{ cellules} \right) = 1000 \times \frac{\left(DO_{420} \text{ (avec ONPG)} - DO_{420} \text{ (sans ONPG)} \right)}{t \times v \times DW \times 0.0045} \quad (1)$$

$$VEA \left(U \cdot L^{-1} \text{ culture} \right) = SEA \times DW \quad (2)$$

Où :

- DO_{420} (avec ONPG) : l'absorbance due à la présence d'*o*-nitrophénol
- DO_{420} (sans ONPG) : l'absorbance due à la coloration jaune des cellules
- t : temps de réaction en minutes
- v : volume en ml de la culture utilisée pour le test
- DW : masse sèche en $g.L^{-1}$ de culture
- Le facteur 0,0045 est l'absorbance de 1 nmol d'*o*-nitrophénol à 420 nm dans un trajet de lumière de 10 mm
- Le facteur 1000 est un facteur de conversion des unités ($mL.L^{-1}$)

3.3.2 Mesure de la masse sèche

La mesure de la masse sèche a été effectuée selon la méthodologie de Zhu et Lee (1997). En effet, des échantillons de 10 ml des microalgues en suspension ont été filtrés à travers des filtres en microfibrilles de verre (VWR Grade 691, taille de pore nominale égale à 1.5 μm) préalablement séchés et pesés. En cours de filtration, la différence de pression sous vide a été maintenue entre 35 et 55 mm Hg (Goldman et Dennet, 1985). Les cellules ont été rincées à l'aide de 20 ml d'une solution de formiate d'ammonium à 0.5 M. Pour éviter l'exposition des cellules à l'air, la pompe à vide a été déconnectée lors de chaque rinçage de sorte que l'eau couvre le filtre, puis l'aspiration a été appliquée pour éliminer la solution de rinçage (Strickland et Parsons, 1968). La pompe à vide a été démarrée avant de commencer la filtration ce qui empêche le liquide de diffuser à la partie marginale du filtre. Les filtres sont ensuite séchés à 95°C jusqu'à atteindre un poids constant, refroidis dans un dessiccateur puis pesés.

3.3.3 Analyse statistique

Des tests d'analyse de variance (ANOVA) ont systématiquement été effectués pour la comparaison des moyennes avec le logiciel Excel. Les valeurs moyennes et l'écart-type des mesures ($n = 3$) ont été calculés pour chaque expérience et la signification statistique a été déterminée par le calcul des valeurs de p . Une valeur de p inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) indique une différence significative. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD (l'écart-type).

CHAPITRE 4
INVESTIGATION DE LA PRODUCTION DE BETA-GALACTOSIDASE PAR LA
MICROALGUE *SCENEDESMUS OBLIQUUS* DANS DES CONDITIONS DE CULTURE
DETERMINEES

AVANT-PROPOS

- Auteurs et affiliation :

Jihed Bentahar : étudiant en maîtrise en ingénierie, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Alain Doyen : professeur, Département des sciences des aliments, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval.

Lucie Beaulieu : professeure, Département des sciences des aliments, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval.

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

- Titre en anglais : Investigation of β -galactosidase production by microalgae *Scenedesmus obliquus* in determined growth conditions
- État de l'article : soumis pour publication au journal « Journal of Applied Phycology ».
- Contribution au mémoire :

Cet article contribue au mémoire en présentant une étude qui vise à quantifier et à optimiser la production β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus*. Différents paramètres de culture, notamment le mode de culture, la nature du carbone organique, le ratio C/N et les concentrations de nutriments carbonés et azotés ont été testés à l'échelle laboratoire afin d'identifier les variables les plus pertinentes pour

une productivité enzymatique optimale. Les résultats de cette étude ont servi à l'élaboration d'un deuxième travail qui vise à utiliser du véritable perméat de lactosérum acide dans la culture de notre microalgue pour une meilleure production de β -galactosidase.

- Résumé en français :

La β -galactosidase est une enzyme commercialement importante, largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour fabriquer des produits à teneur réduite en lactose et pour synthétiser des ingrédients alimentaires prébiotique. Elle peut également être utilisée pour limiter les impacts environnementaux de l'industrie laitière liés au rejet du lactose. Cette enzyme a été isolée de différentes sources, avec des propriétés variables et un potentiel pour des diverses applications. Plusieurs microalgues ont été analysées pour la production de β -galactosidase, parmi lesquelles la Chlorophyceae *Scenedesmus obliquus* a montré une activité enzymatique importante. La production d'enzymes à partir de microalgues pourrait devenir une avenue précieuse pour l'utilisation de sa biomasse. De plus, *Scenedesmus obliquus* peut être cultivée dans des conditions mixotrophiques en utilisant le lactose comme une source de carbone organique, offrant des possibilités supplémentaires pour sa valorisation. Cette étude explore la production de β -galactosidase à partir de la microalgue *Scenedesmus obliquus* dans différentes conditions et milieux de culture, afin d'évaluer leur influence sur sa productivité et sa sélectivité. Les résultats montrent que les cultures photoautotrophes offrent une sélectivité maximale, tandis que les conditions mixotrophiques fournissent des productivités plus élevées en raison d'une croissance plus rapide et de rendements de biomasse plus élevés. D'autres études sur des cultures mixotrophes utilisant du lactose n'ont révélé aucune différence significative sur la production de β -galactosidase lors de la variation des concentrations de carbone organique et de nutriments azotés. Le temps de culture a une influence significative sur la production d'enzyme, suggérant une dépendance à la phase de croissance. Les productivités maximales enzymatiques obtenues dans des conditions de culture mixotrophes, utilisant le lactose, atteignent environ $12,35 \text{ U.L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ après 7 jours, ce qui est une durée réaliste pour produire l'enzyme à plus grande échelle dans des bioréacteurs.

4.1 ABSTRACT

β -galactosidase is a commercially important enzyme, widely used in the food industry for the manufacturing of lactose-hydrolyzed products and synthesis of probiotic food ingredients. It could also be used to reduce the environmental impacts of the dairy industry relative to lactose disposal. This enzyme has

been isolated from different sources, with varying properties and potential for diverse applications. Several microalgae have been screened for β -galactosidase activity, among which the Chlorophyceae *Scenedesmus obliquus* showed significant levels. The production of enzymes from microalgae could emerge as a valuable avenue for the utilization of its biomass. In addition, this particular microalga can grow mixotrophically on lactose as an organic carbon source, offering additional possibilities for the utilization of lactose. This study investigates the production of β -galactosidase from *Scenedesmus obliquus* under different trophic conditions and known media composition, in order to assess their influence on its productivity and selectivity. Results show that the photoautotrophic cultures provide a highest selectivity, while mixotrophic conditions provide higher productivities due to faster growth and higher biomass yields. Further studies on mixotrophic cultures using lactose revealed no significant differences on β -galactosidase production when varying the concentrations of organic carbon and nitrogen nutrients. The time of culture has a strong influence on the enzyme production, suggesting a dependence on the growth phase. Maximal enzyme productivities obtained in mixotrophic conditions on lactose reach about $12.35 \text{ U L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ after 7 days, which is a realistic duration for producing the enzyme at larger scales in bioreactors.

Keywords— β -galactosidase; Lactose utilization; Microalgae; Biomass production; Specific enzymatic activity; Volumetric enzymatic activity.

4.2 INTRODUCTION

Lactose, the predominant carbohydrate in milk, dairy products and whey from dairy industries, is a disaccharide consisting of galactose bound to glucose. It makes up about 4.5-5.0 % of the total solids in fluid milk and about 4.8-4.9 % of the total solids in cheese whey (Kim and Rajagopal 2000). Its poor digestion may cause gastrointestinal problems in about 70% of the world adult population (Khabarova et al. 2011; Rosolen et al. 2015) and gastrointestinal symptoms may result, including diarrhea, bloating, flatulence, and abdominal discomfort (Shaukat et al. 2010). Another problem related to lactose is its low solubility, which often leads to its crystallization. This constitutes another problem because of the undesirable granular texture, which can occur in some dairy products, such as condensed milk, evaporated milk, dry milk, frozen milk, ice cream, and confectionery products with a high content of milk (Zarate and Lopez-Leiva 1990). Moreover, lactose is largely responsible for the high biological oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) leading to the environmental pollution of the by-products of dairy industries (Shukla 1975; González and Siso 1996). For example, a dairy farm processing 100 tons of milk per day produces approximately the same quantity of organic

products in its effluent as a town of 55 000 residents (Sienkiewicz and Riedel 1990). This sugar can be hydrolyzed by either acids or enzymes. However, in dairy products, enzymatic hydrolysis is preferred for its specificity, as their contents in proteins and other organic substances shouldn't be impacted (Kim and Rajagopal 2000).

β -galactosidase (EC 3.2.1.23) is widely distributed in nature and can be found in various microorganisms, plants and animal organs (Nagy et al. 2001; Haider and Husain 2007a). Depending on its origin, its properties (molecular weight, amino-acids chain length, active site position, pH and thermal optimum and stability), specificity and structure may differ significantly (Mlichova and Rosenberg 2006). A main characteristic for the selection of an enzyme in a particular application is its operational pH range: acidic pH enzymes derived from fungi are suitable for the treatment of acid whey and acid whey permeate whereas enzymes with neutral pH from yeasts and bacteria are suitable for the treatment of milk and sweet whey (Panesar et al. 2010). The main industrial productions are from microbial origin, as they present the highest productivity (Rosolen et al. 2015). For their part, microalgae as enzyme producers could have several advantages over other organisms, as their low nutritional requirements (CO₂, cheap nitrogen sources, light from either natural or artificial sources, water and salts) and synthesis of other valuable by-products might improve process profitability (Brasil et al. 2017).

The present work therefore addresses a first practical study for the quantification and the optimization of the β -galactosidase enzyme production with *Scenedesmus obliquus* specie. In our recent study (Girard et al. 2013, 2014), cultures of this microalgae in the presence of lactose allowed to improve biomass productivity compared to autotrophic cultures on CO₂. During growth, a decrease in lactose concentration was observed over time, along with a concomitant increase in glucose and galactose concentrations, revealing β -galactosidase activity. However, this level of activity was not quantified at the time. The objectives of this work are to investigate and evaluate the β -galactosidase production by *Scenedesmus obliquus* in different trophic modes under determined culture conditions. As this microalga can grow on lactose, there would be a particular interest for using this low-cost, largely available carbon source for the production of algal biomass in combination with the β -galactosidase enzyme. The paper is structured as follows: experimental methods including necessary adaptations to the standard approach for measuring β -galactosidase are first presented, followed by the experimental results. Influence of the trophic mode of culture, type of carbon source, nutrient concentrations, and production kinetics are investigated.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Culture and medium

Scenedesmus obliquus strain was obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Canada (CPCC 5). It was kept in autoclaved (121°C, 15 min, 1-2 bar) modified Bold's Basal medium (BBM), with an adjusted pH of 6.8 (Barsanti and Gualtieri 2014). Seed cultures (for all experiments) were kept in exponential growth phase in a Multitron II incubator shaker (Infors-ht Switzerland) under continuous orbital agitation (120 rpm), constant temperature (21°C), ambient air and light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 15 days prior to inoculation.

The preparation of all samples was done under sterile conditions in a laminar flow biological hood and axenic culture conditions were confirmed at the beginning and the end of each culture using a cytometric flow analysis as described in (Deschênes et al. 2015) and (Tremblay et al. 2009).

Concentrated solutions of BBM medium and nitrate were prepared to constitute the medium for the experiments, allowing the necessary flexibility for varying the growth conditions. Concentrated solutions of pure D-(+)-Glucose ($\geq 99.5\%$), pure D-(+)-Galactose ($\geq 99\%$) and pure D-lactose monohydrate ($\geq 98\%$) (all purchased from Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) were also prepared (in nano-filtered water) for the heterotrophic and mixotrophic cultures. All solutions were autoclaved separately, then diluted to the desired concentration under sterile conditions.

4.3.2 Experimental design

All experiments were carried out in 250 mL total volume Erlenmeyer flasks (75 mL operation volume) with an inoculation concentration of 1×10^6 cells mL^{-1} (day 0), using manual cell counts on a hemacytometer. The first experiment was conducted to verify whether the enzyme is produced in different trophic modes of growth (photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic), and if so, how it affects the production of the enzyme. Thus, these three conditions were compared in triplicates using normal BBM concentrations (containing about 180 ppm of nitrate as the sole nitrogen source) and a lactose concentration of 40 g L^{-1} for the heterotrophic and mixotrophic cultures. This concentration was selected from previous results (Girard et al. 2014), suggesting a certain optimum for cell growth.

The second experiment evaluated the influence of the dissolved organic carbon (DOC) source on the production of the enzyme in mixotrophic conditions. Glucose, galactose and lactose, used as DOC sources, were tested at a concentration of 40 g L⁻¹. All conditions were tested in triplicates, with the autotrophic condition as control.

In a third experiment, the data were subjected to a 2³ factorial analysis of variance to evaluate the influence of nitrogen availability (nitrate concentrations of 180 ppm and 360 ppm), carbon availability (lactose concentrations of 20 g L⁻¹ and 40 g L⁻¹) and time of culture (days 8 and 16) on the production of the β -galactosidase enzyme. All other ion concentrations were as in normal BBM composition.

A fourth experiment was finally carried out to study the kinetics of β -galactosidase production in mixotrophic conditions. Based on the results of the abovementioned experiments, a lactose concentration of 20 g L⁻¹ was selected, with other ion concentrations as in standard BBM conditions. Due to sample volume restrictions, the same condition was implemented simultaneously in five sets of triplicates, in which two measurements (at different days) were made for each set.

Measurements were taken at days 8 (growth phase) and 16 (expected stationary phase of culture) in the first three experiments to include the stage of culture in the comparisons. In the last (fourth) experiment, measurements were taken at days 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21 of culture to grasp a more complete view of the enzyme production throughout the culture stages.

Statistical analyses were systematically conducted on the results using standard analysis of variance (ANOVA) tests for comparison of means with the Excel software. Mean values and standard deviation of measurements ($n = 3$) were calculated for each experiment and statistical significance was determined by the calculation of p -values. A p -value of less than 0.05 ($p < 0.05$) was considered to indicate significance. Results are expressed as means \pm SD (the standard deviation).

4.3.3 Analytical methods

Samples were centrifuged (3400 g, 6 min) and then washed twice with distilled water to remove excess salts, sugars or any component that could influence the measurement of the optical density. Cell's enzymatic activity was analyzed based on Miller's method (Miller 1972), with a few adaptations for microalgae: a 0.5 mL concentrated cell solution was mixed with 0.5 mL of Z-buffer (0.43 g of 0.06 M Na₂HPO₄, 0.28 g of 0.04 M NaH₂PO₄·H₂O, 0.04 g of 0.01 M KCl, 0.01g of 0.001 M MgSO₄·7H₂O and 0.135 mL of 0.05 M β -mercaptoethanol in 50 mL distilled water solution with pH adjustment to 7.0). The cells membrane was

subsequently disturbed for 5 min using 100 μL of chloroform and 50 μL of 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) to allow small molecules such as *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) penetrating the cell walls. An enzymatic reaction was then started by adding 0.2 mL of ONPG (4 mg mL⁻¹) to the mixture incubated at 28°C. This reaction allows the ONPG molecules (colorless) to be dissociated into galactose (colorless) and *o*-nitrophenol (yellow color) in the presence of the β -galactosidase enzyme. The addition of 0.5 mL of 1M Na₂CO₃ after the development of a sufficient yellow color inactivates the enzyme and stops the reaction as the pH is increased to 11. The liberated *o*-nitrophenol was detected spectrophotometrically at 420 nm and was expressed in units (U) of enzyme activity: 1 U is equivalent to 1 nmol *o*-nitrophenol produced min⁻¹.

Other adaptations to Miller's method, initially developed for bacteria such as *E. coli*, include a mandatory centrifugation step (3400 g, 6 min) after stopping the enzymatic reaction to remove all cell debris, improving the absorbance measurement (420 nm in a clear solution) for the yellow compound *o*-nitrophenol. Another measurement of absorbance at 420 nm was also included for a similar sample without ONPG addition to obtain a correction for the background color of the sample (mainly from algae pigmentation, but also for the possible spontaneous splitting of ONPG over the time course of the reaction).

As the ONPG concentration is in excess, the result of the assay can be assumed linearly proportional to the amount of enzymes present (Miller 1972). We thus use the two following quantitative measurements for the enzyme produced: the *specific* enzymatic activity (SEA) and the (total) *volumetric* enzymatic activity (VEA). The first (equation 3) is defined as the amount of enzyme (U) per unit of algal biomass (g-cells), which can be used as a measure of process selectivity (proportion of enzyme relative to the total biomass produced, from the same carbon source). The second (equation 4) is a measure of process volumetric production (total amount of enzyme produced per unit volume of culture).

$$SEA \left(U \cdot g^{-1} \text{ cells} \right) = 1000 \times \frac{\left(OD_{420} \text{ (with ONPG)} - OD_{420} \text{ (without ONPG)} \right)}{t \times v \times DW \times 0.0045} \quad (3)$$

$$VEA \left(U \cdot L^{-1} \text{ culture} \right) = SEA \times DW \quad (4)$$

Where:

OD₄₂₀ (with ONPG) and OD₄₂₀ (without ONPG) are the absorbance measurements (discussed above),

t is the reaction time (minutes),

v is the volume of culture used in the assay (mL),

DW is the actual dry weight ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of the sample,

Factor 0.0045 is the absorbance of 1 nmol of *o*-nitrophenol at 420 nm in a 10 mm light path,

Factor 1000 is for conversion of units ($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) after the product of v and DW.

Dry weight (DW) measurements were carried out for all experiments as follows (Zhu and Lee 1997): a culture sample of 10 mL was filtered through a glass-microfiber filter (VWR Grade 691, nominal pore size 1.2 μm) previously dried and weighted. The cells were washed with a 20 mL solution of 0.5% ammonium formate to ensure the removal of all dissolved compounds that could alter the dry weight measurement. The filtration technique was conducted as described in (Strickland and Parsons 1968) and (Zhu and Lee 1997). The filters were then dried at 95°C until they reach a constant weight, cooled down in a dessicator for 5 minutes and then weighted.

4.4 RESULTS

4.4.1 Influence of the culture mode

Experiments demonstrated that β -galactosidase activities were observed in all trophic modes of growth. A comparison of the enzymatic activities however revealed significant differences between the cultures. Indeed, the *specific* production of the enzyme was always higher in photoautotrophic mode (fig. 8), whatever the time condition. Mixotrophic cultures then showed higher *specific* productivities than heterotrophic cultures at day 8 ($F = 25.96$, $p = 0.007$), though at day 16 the difference was not significant. All cultures showed an increase in *SEA* between days 8 and 16, whether the biomass concentration increased or not. The *VEA*, which accounts for the differences in biomass concentrations, was then higher in mixotrophic cultures at day 8, where the difference between photoautotrophic and heterotrophic cultures was not significant ($F = 3.13$, $p = 0.15$) (fig. 8). After 16 days, photoautotrophic cultures showed a higher production of the enzyme, followed by the mixotrophic and then the heterotrophic cultures.

A measure of process productivity (production of enzyme per unit of time) can be obtained by computing the ratio between the *VEA* and the time of culture. This overall daily-averaged quantity provides additional insights for scale-up perspectives and for determining an appropriate operation mode for an industrial setup. Experiments showed significant differences at this level between trophic modes: photoautotrophic cultures show much higher productivities over 16 days ($9.4 \text{ U L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) than over 8 days ($3.7 \text{ U L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), while

mixotrophic cultures show better productivities over 8 days ($7.3 \text{ U L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) than over 16 days ($6.6 \text{ U L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$). Heterotrophic cultures maintain a similar level of productivity (around $2.9 \text{ U L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) over either 8 or 16 days.

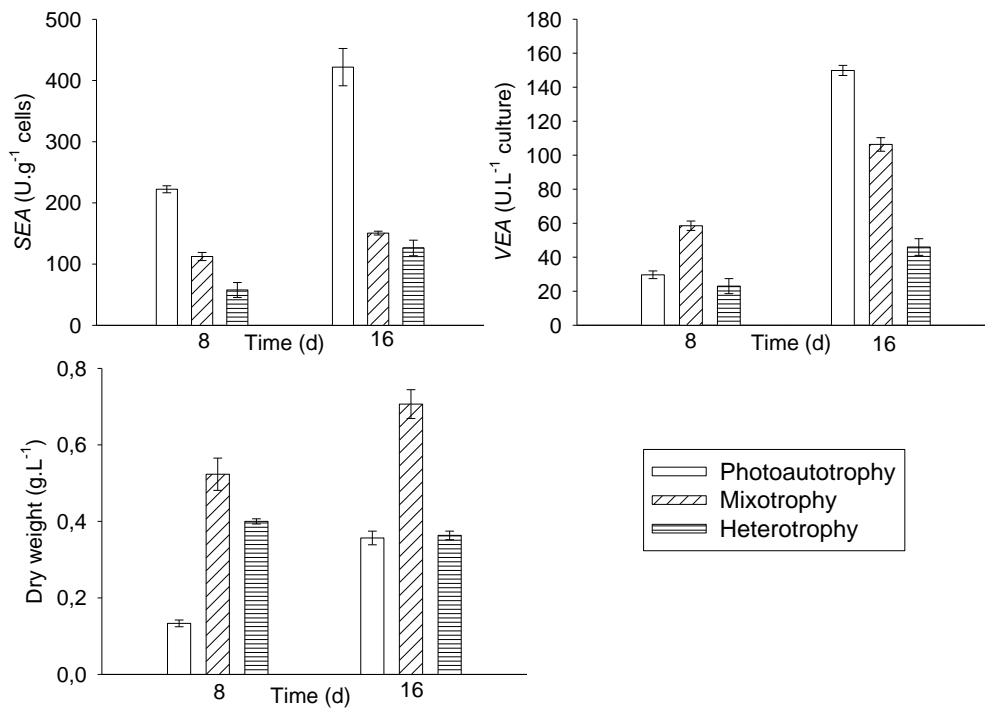


Figure 8 : Enzymatic activities and dry weights of microalgae cultures grown in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions; Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

4.4.2 Influence of the organic substrate

Mixotrophic cultures conducted with either pure glucose or pure galactose as the sole organic carbon source (the individual monosaccharides composing lactose) showed generally higher enzymatic activities compared to those with lactose (fig. 9). Also, similarly as in the previous experiment, *VEAs* were higher in mixotrophic cultures than in the photoautotrophic control at day 8 (due to higher biomass concentrations), whereas the *SEAs* remained higher in photoautotrophic cultures at days 8 and 16 (following a similar profile), suggesting repeatability. However, this time the *VEA* in the photoautotrophic cultures at day 16 was not higher than in the mixotrophic cultures at the same time condition. Also, comparing daily-averaged enzyme productivities, similar results were observed between photoautotrophic cultures over 16 days and mixotrophic cultures on lactose over 8 days: the latter produced about half the amount of the first in half the time. This

suggests that long-term cultures are not necessarily a better option than short-term cultures for producing the enzyme.

Daily-averaged volumetric enzyme productivities showed the highest results with microalgae grown on glucose ($17.7 \text{ U L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) and galactose ($15.6 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$) over 8 days; on lactose, a result of $9.8 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$ was obtained. All these (mixotrophic) cultures showed better productivities over 8 days than over 16 days ($9.8 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$ for glucose, $12.7 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$ for galactose, and $8.8 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$ for lactose). As in the previous experiment (section 3.1), photoautotrophic (control) cultures showed higher productivities over 16 days ($9.7 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$) than over 8 days ($4.9 \text{ U L}^{-1}\text{ day}^{-1}$), where its highest level is similar to that of cultures on lactose.

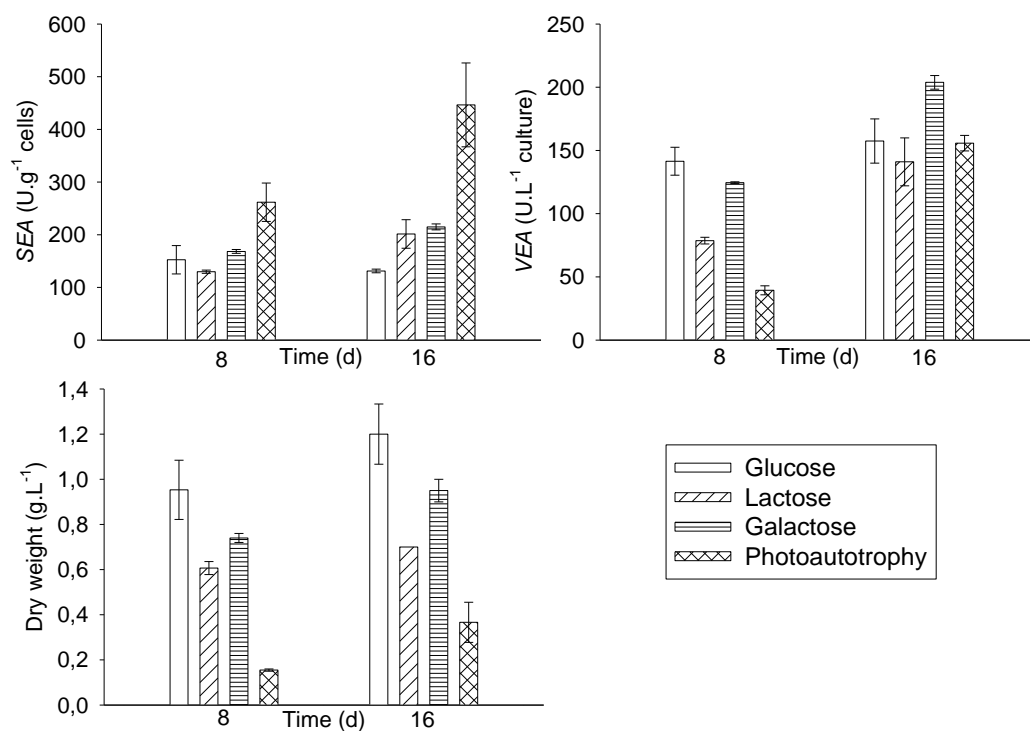


Figure 9 : Enzymatic activities and dry weights of microalgae cultures grown in mixotrophic and photoautotrophic conditions; Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

4.4.3 Influence of carbon and nitrogen concentrations

Under the conditions tested (lactose concentrations of 20 g L^{-1} and 40 g L^{-1} , and nitrate concentrations of 180 ppm and 360 ppm), results showed similar *SEA* values for most cultures at either time condition (fig. 10). The *VEA* appears to rise slightly as the nutrient concentrations are increased (fig. 10), though the only case of statistical significance is for a higher lactose concentration at a constant nitrate concentration of 360 ppm at

day 8 ($F = 192.6, p < 0.01$). Overall results of the statistical analyses about the influence of factors (time of culture, nitrate concentration and lactose concentration) showed that only the time of culture has a consistent influence on the *SEA* ($F = 48.02, p < 0.01$) and the *VEA* ($F = 8.90, p < 0.01$). Biomass production is not being affected by increased nitrate concentrations at either day 8 or 16. However, increased lactose concentrations do positively influence the biomass concentration over the first 8 days of production, whether the nitrate concentration is 180 ppm ($F = 18.43, p = 0.013$) or 360 ppm ($F = 31.56, p = 0.005$).

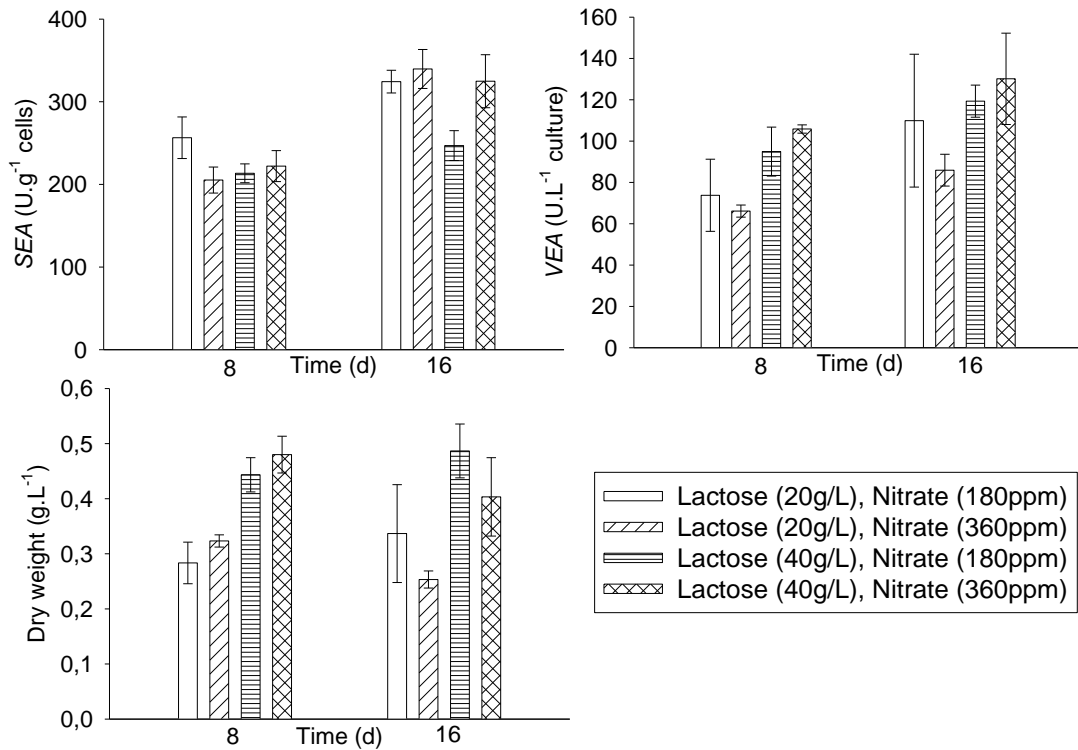


Figure 10 : Enzymatic activities and dry weights of microalgae cultures grown in mixotrophic conditions (initial nutrient concentrations indicated); Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

4.4.4 Kinetics of enzyme activity

As the time of culture has a significant influence on most results, characterizing the enzyme production through time was deemed of importance. Mixotrophic cultures on lactose (20 g L⁻¹) were used for this study based on previous volumetric productivities over a rather short period of time (higher than in the autotrophic case) and low cost of this organic carbon source.

The *SEA* and *VEA* evolution through time showed a somewhat similar pattern (steady increase followed by a stationary phase), as does the biomass concentration (fig. 11). At the end of the experiment (days 19 and 21), enzymatic activities tended to decrease (late stationary phase). To grasp a better view of the actual enzyme productivity, a daily-averaged volumetric enzyme productivity (*VEA* divided by culture time) was computed (fig. 12): results show an optimum at around day 7 ($12.35 \text{ U L}^{-1} \text{ day}^{-1}$), confirming the previous apprehensions in sections 1-3.

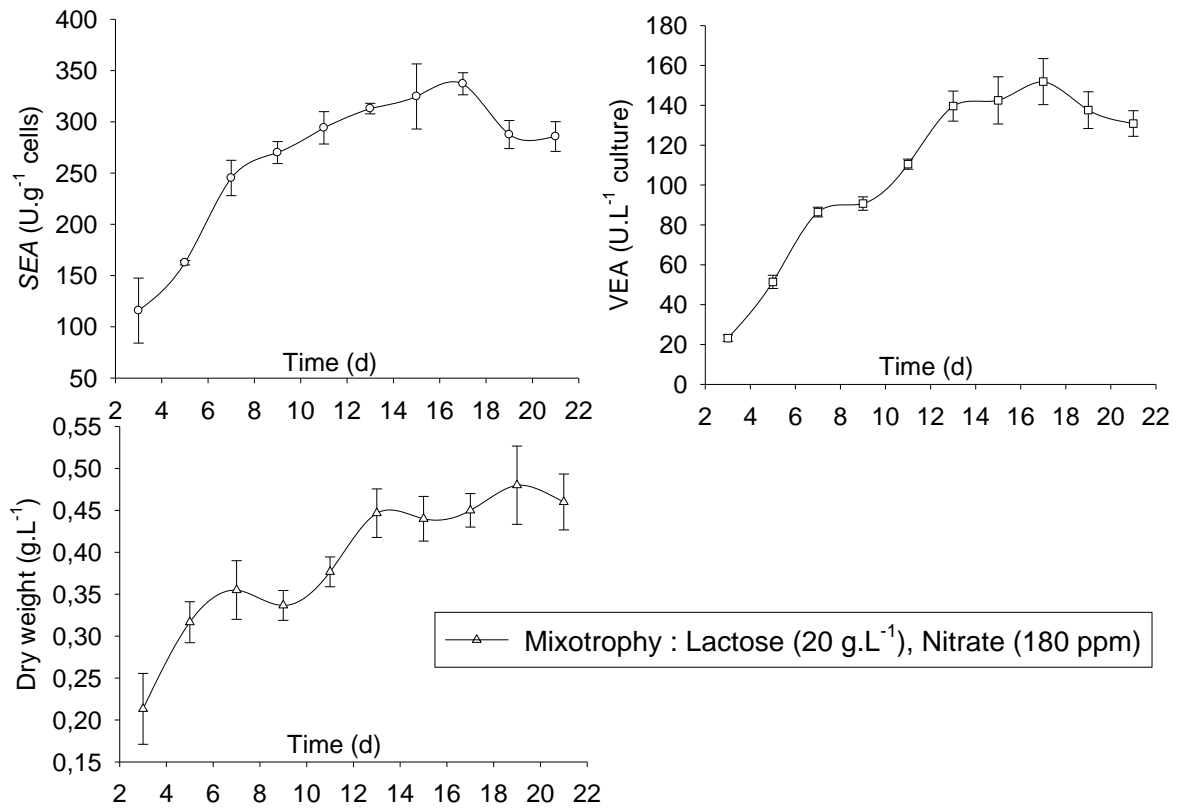


Figure 11 : Evolution of cell dry weights and enzymatic activities through time in mixotrophic conditions (initial nutrient concentrations indicated); Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

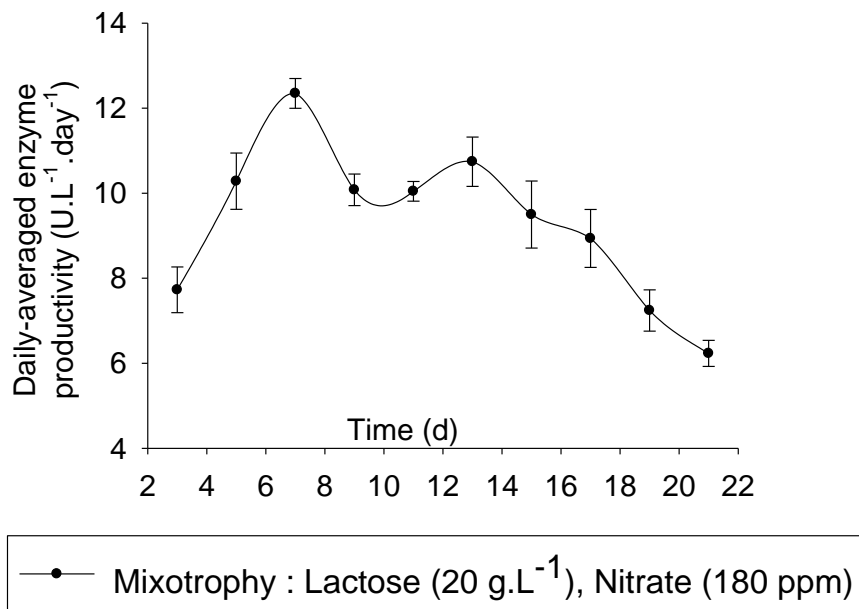


Figure 12 : Daily-averaged volumetric enzyme productivity in mixotrophic conditions (initial nutrient concentrations indicated); Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

4.5 DISCUSSION

This study investigated β -galactosidase production by *Scenedesmus obliquus* across a range of DOC and nitrogen conditions. Results showed that the trophic mode has a significant influence on both the production of enzyme and biomass. The *SEA* was always higher in photoautotrophic mode, while the use of a DOC source reduced the *specific* enzyme production (both in heterotrophic and mixotrophic modes). This observation contrasts with the case of bacteria *E. coli*, where lactose induces a higher *specific* enzyme production (Jacob and Monod 1961; Law et al. 2002). The use of a DOC source however significantly stimulated the growth of *Scenedesmus obliquus* (as observed in Girard et al. 2014): in mixotrophic cultures, this resulted in higher *volumetric* enzyme productions after 8 days, and overall higher enzyme productivities (U L⁻¹ day⁻¹). In heterotrophic cultures, however, the lowest enzyme productions were observed.

The highest enzyme productivities were observed in mixotrophic cultures over 8 days and in autotrophic cultures over 16 days. Since higher variability was observed in autotrophic cultures, mixotrophic conditions appear as a more viable alternative for producing the enzyme. Heterotrophic cultures presented the lowest enzyme production levels, and therefore do not appear suitable for producing the enzyme.

The supplementation levels of carbon and nitrogen nutrients in β -galactosidase productions have not been previously studied to a great extent (Kazemi et al. 2016). The present study however showed no significant influence on the *SEA* in the range of tested concentrations (20 to 40 g L⁻¹ lactose, and 180 to 360 ppm nitrate) in mixotrophic conditions. Most results on the *VEA* also suggested a similar pattern, though there some occurrences of small increases with increasing nutrient concentrations. These results suggested that further increasing these nutrient concentrations would not have a beneficial impact on enzyme production. In yeast *Kluyveromyces marxianus*, a generally positive influence was observed between the increasing nitrogen and lactose concentrations and the volumetric production of β -galactosidase (Perini et al. 2013): this study comprised a range of concentrations from near-zero to similar values as tested here with *Scenedesmus obliquus*. Under the hypothesis that similar relations govern the β -galactosidase production with this microalga, further work should investigate lower concentrations and determine acceptable levels for improving nutrient utilization for the production of this enzyme.

The main variable of influence on the *SEA* was the time of culture (thus possibly the growth phase). At day 16, it was greater than at day 8 in most cultures (where the stationary growth phase is mainly attained), except for the mixotrophic culture on glucose. In the case of the latter, the difference might be explained by the fact that growth occurred so much faster than in other cultures that they have remained in stationary phase longer before day 16, and entered a different metabolic state. Photoautotrophic cultures at day 16 might still be under a slow growth process or in early stationary phase. Growth-phase dependency of β -galactosidase production has been observed in various bacteria (Miksch and Dobrowolski 1995): levels of expression remained high as long as logarithmic growth was maintained, but enzyme levels dropped by 12 to 30-fold when cells entered stationary phase (Dickson and Markin 1980). Our results might suggest that *Scenedesmus obliquus* has a growth phase-dependent gene expression, as do other bacteria, though its maximum could be in the early stationary phase.

The kinetics of enzyme production in mixotrophic cultures grown on lactose showed that the *SEA*, *VEA* and the biomass concentration evolved in a somewhat similar pattern (Fig. 4). Computing the enzyme productivity from these results (averaging the *volumetric* production per number of days of culture) suggested a maximum at around day 7, at 12.35 U L⁻¹ day⁻¹. Such culture duration would be reasonable for productions in bioreactors (and larger production scales), and gives a perspective for the development of a scaled-up enzyme production strategy. Future work entails the characterization of the β -galactosidase enzyme produced from microalgae *Scenedesmus obliquus*, and the determination of its properties, specificity and structure.

4.6 ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank NSERC (National Science and Engineering Research Council of Canada), INAF (Institute of Nutrition And functional Foods - Pilot projects program) and FRQNT (Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies), and MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec - Innov'Action program) for their financial support.

4.7 REFERENCES

- Barsanti L, Gualtieri P, (2014) *Algae, Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Second edition. Taylor and Francis Group. 361 pp
- Brasil BSAF, De Siqueira FG, Salum TFC, Zanette CM, Spier MR (2017) Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Res* 25:76-89
- Deschênes J-S, Boudreau A, Tremblay R (2015) Mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors: Practicability and process considerations. *Algal Res* 10:80-86
- Dickson RC, Markin J (1980) Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol* 142:777-785
- Girard J-M, Deschênes J-S, Tremblay R, Gagnon J (2013) FT-IR/ATR univariate and multivariate calibration models for in situ monitoring of sugars in complex microalgal culture media. *Bioresour Technol* 144:664-668
- Girard J-M, Roy M-L, Ben Hafsa M, Gagnon J, Faucheux N, Heitz M, Tremblay R, Deschênes J-S (2014) Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Res* 5:241-248
- González Siso MI (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour Technol* 57:1-11
- Haider T, Husain Q (2007a) Preparation of lactose free milk by using ammonium sulphate fractionated proteins from almonds. *J Sci Food Agric* 87:1278-1283
- Jacob F, Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-356

- Khabarova Y, Tornianen S, Tuomisto S, Järvelä I, Karhunen P, Isokoski M, Mattila K (2011) Lactase non-persistent genotype influences milk consumption and gastrointestinal symptoms in Northern Russians. *BMC Gastroenterol*, 11.1:124
- Kazemi S, Khayati G, Faezi-Ghasemi M (2016) β -galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: Optimization by orthogonal arrays design. *Iran Biomed J* 20.5:287-294
- Kim JW, Rajagopal SN (2000) Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol* 45:29-34
- Law J, Lee S, Tseng A, Tsui KW, Yu N (2002) The role of glycerol and isopropyl thiogalactoside in *Escherichia coli* growth and lactose induction of β -galactosidase. *J Exp Microbiol Immunol* 2:97-102
- Miksch G, Dobrowolski P (1995) Growth phase-dependent induction of stationary-phase promoters of *Escherichia coli* in different gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 177:5374-5378
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Mlichova Z, Rosenberg M (2006) Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res* 45:47-54
- Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biro S (2001) Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol* 41:351-362
- Panesar PS, Kumari S, Panesar R (2010) Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Res* 2010: Article ID 473137 16 pp
- Perini BLB, Souza HCM, Kelbert M, Apati GP, Pezzin APT, Schneider ALS (2013) Production of β -galactosidase from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Chem Eng Trans* 32:991-996
- Rosolen MD, Gennari A, Volpato G, De Souza CFV (2015) Lactose hydrolysis in milk and dairy whey using microbial β -Galactosidases. *Enzyme Res* 2015: Article ID 806240 7 pp
- Shaukat A, Levitt MD, Taylor BC, MacDonald R, Shamliyan TA, Kane RL, Wilt TJ (2010) Systematic review: Effective management strategies for lactose intolerance. *Ann Intern Med* 152:797-803

- Shukla RT (1975) Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *CRC Crit Rev Food Technol* 5:325-356
- Sienkiewicz T, Riedel CL (1990) *Whey and whey utilization*. Verlag Th., Mann
- Strickland JDH, Parsons TR (1968) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, pp 181-184
- Tremblay G, Belzile C, Gosselin M, Poulin M, Roy S, Tremblay J (2009) Late summer phytoplankton distribution along a 3500 km transect in Canadian Arctic waters: strong numerical dominance by picoeukaryotes, *Aquat Microb Ecol* 54.1:55-70
- Zarate S, Lopez-Leiva MH (1990) Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review. *J Food Prot* 53.3:262-268
- Zhu CJ, Lee YK (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol* 9:189-194

CHAPITRE 5
PERMEAT DE LACTOSERUM ACIDE : UN MILIEU DE CULTURE ALTERNATIF POUR
LA MICROALGUE *SCENEDESMUS OBLIQUUS* ET LA PRODUCTION DE BETA-
GALACTOSIDASE

AVANT-PROPOS

- Auteurs et affiliation :

Jihed Bentahar : étudiant en maîtrise en ingénierie, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Alain Doyen : professeur, Département des sciences des aliments, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval.

Lucie Beaulieu : professeure, Département des sciences des aliments, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval.

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

- Titre en anglais: Acid whey permeate: an alternative growth medium for microalgae *Scenedesmus obliquus* and production of β -galactosidase.
- État de l'article : en préparation pour publication.
- Contribution au mémoire :

Cet article contribue au mémoire en exposant une première utilisation du perméat de lactosérum acide dans la culture mixotrophe de *Scenedesmus obliquus* après ajustement du pH. Les productions de biomasse et de β -galactosidase ont été évaluées pour différentes compositions du milieu de culture en variant les

proportions de perméat acide et de milieu de culture basal (BBM) afin de déterminer un optimum d'utilisation du perméat de lactosérum acide. Les cinétiques de productivité enzymatique et de biomasse algale ont été suivies sous cette condition optimale établie, et ont été évaluées en flacons agités puis en photobioréacteur de 5 L afin de s'approcher d'une mise en œuvre industrielle réaliste pour d'éventuelles applications commerciales.

- Résumé en français :

Le rejet du perméat de lactosérum acide, résultant de la production de produits laitiers coagulés par acidification, constitue l'un des principaux problèmes de l'industrie laitière et exige des solutions simples et économiques pour sa valorisation. En raison de sa teneur élevée en lactose et la présence d'autres nutriments essentiels tels que les sels minéraux et les vitamines hydrosolubles, le perméat de lactosérum acide présente un excellent milieu de culture pour la croissance de nombreux microorganismes. À notre connaissance, le présent travail étudie pour la première fois l'utilisation du perméat de lactosérum acide pour la croissance et la production de l'enzyme de type β -galactosidase à partir de l'espèce de microalgue *Scenedesmus obliquus*. Cette espèce est connue par sa capacité à assimiler une grande variété de sources de carbone et à produire différents composés bioactifs. Lorsque la proportion de perméat acide et le temps de culture augmentent, la biomasse et la productivité enzymatique *volumétrique* augmentent aussi. Ceci est concomitant à une diminution des activités enzymatiques *spécifiques* en le comparant avec l'utilisation du lactose pur (20 g.L^{-1}) dans des conditions mixotrophes de culture. Les résultats optimaux ont été obtenus lors de la substitution de 20% (v/v) du BBM (milieu de culture par défaut) par du perméat de lactosérum acide et une activité enzymatique *volumétrique* maximale de 122 U.L^{-1} culture a été maintenue après 11 jours de culture dans un incubateur-agitateur de type Multitron II ainsi que dans un photobioréacteur de 5 litres suggérant une répétabilité. De plus, une durée de culture optimale aux alentours de 7 jours a été suggérée pour assurer une productivité enzymatique quotidienne plus élevée.

5.1 ABSTRACT

The disposal of acid whey permeate, arising from the production of acid-coagulated dairy products, presents one of the major disposal problems of the dairy industry and demands simple and economical solutions. Its high lactose content and the presence of other essential nutrients such as mineral salts and water-soluble vitamins constitute an excellent basal medium for the growth of many microorganisms. To our

knowledge, the present work investigated for the first time the use of acid whey permeate for the growth and the production of β -galactosidase enzyme from *Scenedesmus obliquus* specie known for its ability to assimilate a wide variety of carbon sources and to produce different bioactive compounds. Interestingly, as the proportion of acid whey permeate increased, biomass and *volumetric* enzyme productivities increased over time with concomitant decrease in *specific* enzymatic activities compared to pure lactose (20 g.L⁻¹) under mixotrophic conditions. Optimum results were found when 20% (v/v) of the default culture medium (BBM) was substituted with acid whey permeate and a maximum *volumetric* enzymatic activity of 122 U.L⁻¹ culture was maintained after 11 days of cultures for Multitron II incubator shaker and 5 liters pilot-scale photobioreactor systems suggesting repeatability. Moreover, an optimum culture time around 7 days was suggested to ensure a higher daily-averaged enzyme productivity.

Keywords— Acid whey permeate. *Scenedesmus obliquus*. β -galactosidase. Biomass. Specific enzymatic activity (*SEA*). Volumetric enzymatic activity (*VEA*)

5.2 INTRODUCTION

Cheese whey is the serum or watery part of milk remaining after separation of the curd namely milk casein, which results from the coagulation of milk by acid or proteolytic enzymes during cheese-making (Panesar & Kennedy, 2012). This by-product represents about 85-95% of the milk volume and retains 55% of milk nutrients such as lactose (4.5-5% w/v), soluble proteins (0.6-0.8% w/v), lipids (0.4-0.5% w/v), mineral salts (8-10% of dried extract) and other components (González Siso, 1996). Its composition varies according to its origin (ewe, goat or cow) and to the cheese-making technique employed (Moulin & Galzy, 1984). According to the procedure used for casein precipitation, two main whey varieties are produced: acid (pH <5) and sweet (pH 6-7) whey (González Siso, 1996). Acid wheys, generated during production of acid-coagulated dairy products such as fresh cheeses, cream cheese, or strained (Greek-style) yogurt (Schmidt et al., 1984), typically have higher ash and lower lactose and protein contents than sweet wheys (Moulin & Galzy, 1984; González Siso, 1996).

According to the OECD-FAO (2011), the worldwide production of cheese was estimated to be 19670 kilo tons (kT) in 2010, generating approximately 177028 kT whey as a by-product. The annual growth rate is estimated to be 1.64%, resulting in approximately 211500 kT whey in 2020 (Fischer & Kleinschmidt, 2015). In Canada, cheese production increased from 366 kT in 2003 to 466 kT in 2016 (Canadian Dairy Information Centre) and Greek yogurt sales rose from 1.5% to 10% of the Canadian yogurt market between 2011 and

2013. For every 100 kg of milk used to make Greek yogurt, only 33 kg ends up used in the final product. The remaining two-thirds is acid whey (Arla Food Ingredients). Due to its low content of milk constituents (about 6-7% of the dry residue), whey was considered to be a waste product and its disposal poses serious pollution problems for the surrounding environment because of the high volumes produced and its high organic matter content, exhibiting a BOD₅ of a 50 g.L⁻¹ and COD of a 80 g.L⁻¹ (Marwaha et Kennedy, 1988). It affects the physical and chemical structure of soil resulting in a decrease of crop yield and when released in water bodies, reduces the aquatic life by depleting the dissolved oxygen (Panesar & Kennedy, 2012). Hence, whey represent a major threat to environment and human health, which urgently need an effective and permanent solution.

The first step in the majority of procedures for cheese whey valorization is to recover the protein proportion using methods like ultrafiltration and diafiltration to produce whey protein concentrates (González Siso, 1996). However, whey protein concentrate, with a price ten times higher than whey, does not appear economically profitable since only 1/6 volume of whey is used for the production of proteins (Domingues et al., 1999). This process concomitantly produces large quantities of permeate, which contains high concentrations of lactose (from 40 to 60 g.L⁻¹, by HPLC analysis) and mineral salts (up to 3500 mg.L⁻¹). The disposal of permeate is still a problem. Biological wastewater treatment technologies can provide a safe disposal of whey permeate within the environmental specifications, but these are expensive. To overcome this problem, a better alternative is to use whey for the manufacturing of a high value-added products. Availability of lactose as a dissolved organic carbon (DOC) in whey and presence of other essential nutrients for the growth of microorganisms makes the whey one of the most potent raw materials for the production of different bioproducts through biotechnological means (Panesar & Kennedy, 2012).

Since microalgae were known as a source for a wide range of metabolites such as polyunsaturated fatty acids, pigments/carotenoids, vitamins, polysaccharides and enzymes (Priyadarshani & Rath, 2012), whey permeate was successfully used in the culture medium of many microalgae species. Girard et al. (2014) studied the use of sweet whey permeate as a partial substituent of the culture medium in the mixotrophic culture of *Scenedesmus obliquus* specie for biodiesel production. Lactose present in the permeate was hydrolyzed by the microalgae, thus promoting a significant growth rates, a reduction in the lactose concentration and an accumulation of glucose and galactose in the culture medium, indicating the presence of β -galactosidase activity. β -galactosidase (EC 3.2.1.23) is a commercially important enzyme due to its ability to catalyze both hydrolytic and transgalactosylation reactions (Hsu et al., 2005). The hydrolytic activity has been used in the food industry for decades to reduce the lactose content in milk, while the transgalactosylation activity has

been applied for synthesizing galacto-oligosaccharides and galactose containing chemicals in recent years (Oliveira et al., 2011).

Properties, specificity and structure of β -galactosidase such as molecule weight, amino-acids chain length, active site position, pH and thermal optimum, and stability are significantly influenced by the microbial enzyme source (Mlichova & Rosenberg, 2006). Moreover, the reaction conditions of the lactose hydrolysis, the presence of certain ions in the medium, and the GRAS (generally recognized as safe) status represent the main factors in selecting the appropriate source of β -galactosidase (Mlichova & Rosenberg, 2006). Thus, the identification and the characterization of a new forms of this enzyme from different species seems to be necessary. The present work therefore investigates, for the first time, the possibility of using acid whey permeate (AWP) for the culture of *Scenedesmus obliquus* specie in order to valorize this waste product and to optimize the production of β -galactosidase enzyme.

To that end, as AWP is mainly composed of lactose, the hypothesis whether pure lactose compared to other dissolved organic carbon (DOC) sources (i.e. glucose and galactose) can support the β -galactosidase production of the *Scenedesmus* microalgae strains was first evaluated (Bentahar et al., submitted). Despite the fact that the use of carbohydrates (i.e. glucose, galactose and lactose) seems to have a repressive effect on the *specific* enzyme production, these freshwater species are selected since they have shown a better *total* enzymatic activity (*TEA*) under mixotrophic conditions due to its significant impact on algal growth and biomass productivity. The specific objectives of this study are thus: 1) to use AWP in the culture medium of *Scenedesmus obliquus* specie, 2) to quantify and to optimize the β -galactosidase activity and the growth rate of the microalgae in the presence of AWP by varying the medium culture parameters for mixotrophic conditions and 3) to study the kinetics of β -galactosidase production and the algal growth in agitated 250 mL Erlenmeyer flasks (75 mL of culture per flask) and in a 5 L pilot-scale photobioreactor that emulate a realistic industrial (scaled-up) implementation. The results will contribute to resolve problems associated with whey disposal, lactose crystallization in frozen and condensed milk products and milk consumption by lactose-intolerant individuals can be alleviated (Hsu, 2005).

5.3 MATERIALS AND METHODS

5.3.1 Culture maintenance and medium

Scenedesmus obliquus was obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Ontario, Canada (CPCC 5). Cultures were kept in heat sterilized (121°C, 15 min, 1-2 bar) Bold's Basal medium (BBM) adjusted to pH 6.8 (Barsanti & Gualtieri, 2014). All manipulations were done under sterile conditions in a laminar flow biological hood and culture uncontamination was confirmed at the beginning and the end of each culture using a cytometric flow analysis as described in (Deschênes et al., 2015) and (Tremblay et al., 2009). Seed cultures were maintained in exponential growth phase in Erlenmeyer flasks and incubated at constant temperature (21°C) with continuous orbital agitation (120 rpm) and light intensity of 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in a Multitron II incubator shaker (Infors-ht Switzerland) for 15 days prior to inoculation.

Acid whey permeate was obtained from STELA Dairy Research Center, Institute of Nutrition and Functional Foods, Department of Food Sciences, Laval University, Quebec (Canada) after yogurt ultrafiltration in order to produce Greek-style yogurt (Fig. 13) as described in (Paredes Valencia, 2016). Ultrafiltration (UF) of yogurt was carried out using a pilot-scale UF system (GEA NIRO, USA) with a single 80 mil spacer thickness membrane cartridge (1.48 m^2 surface area) and a molecular weight cut-off of 30 kDa under a transmembrane pressure of 551 kPa (80 psi) and a temperature of 50°C. Pasteurized skim milk used for the preparation of the Greek-style yogurt was provided from a local dairy supplier (Natrel, Quebec, Canada). Prior to utilization, the AWP was sent to a sterile filtration unit, which was a 1 ft^2 hollow fiber UF membrane (Koch HF, 1018-1.0-43-PM50) with a 50 kDa MWCO. The purpose of this HF unit was to filter particles larger than 0.01 μm from the feed stream by forcing a permeate stream through the tube wall and into the shell side of the module (Mehner, 2010) in order to sterilize the whey permeate. The feed peristaltic pump speed and concentrate flow rate were manually controlled to maintain the feed pressure between 10 and 20 psi. Permeate exited the module shell-side and flowed to a permeate receiver was sustained with a second ultrafiltration through a 0.2 μm sterile filter. Sterile ultrafiltration was carried out under a biological laminar flow hood and the filtration system was chemically sterilized before the operation by circulating a 2 L 0.3% solution of H_2O_2 through the membrane for 1 hour. This was followed by two separate 2 L washes with dionized and autoclaved water.

Concentrated solutions of BBM medium, nitrate and pure D-lactose monohydrate (Sigma-Aldrich) were prepared (in nano-filtered water) to constitute the medium for the experiments, allowing the necessary flexibility for varying the growth conditions of mixotrophic cultures. All solutions were autoclaved separately, then diluted to the desired concentration under aseptic conditions.

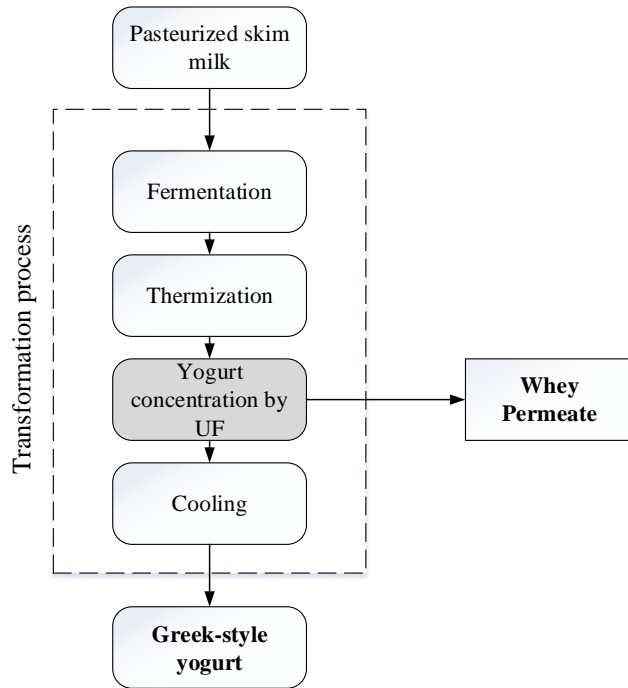


Figure 13 : Greek-style yogurt processing including Yogurt concentration by ultrafiltration (Paredes Valencia, 2016)

5.3.2 AWP use : growth optimization and enzyme production

Partial substitution of the BBM medium with AWP in *Scenedesmus obliquus* cultures was tested in various proportions (20, 40, 60 and 80% AWP (v/v)) under mixotrophic conditions. The pH adjustments of the culture medium solutions were carried out by drop-wise addition of 1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris base) to achieve a pH range of 6.8-7.0 and the initial cellular concentration (day 0) was fixed to 1×10^6 cells.mL⁻¹ using manual cell counts on a hemacytometer. Another experiment was then carried out as follow: the AWP proportion was fixed to 20%, allowing a constant amount of lactose as the sole organic carbone source, and the BBM concentration was modified to study the effect of nitrogen variations (180, 360 and 720 ppm (w/w) of nitrate) on the enzyme production.

All experiments were conducted in triplicate (n=3), in 250 mL Erlenmeyer flasks (75 mL of culture per flask) under continuous illumination. Algal growth and β -galactosidase activities of the different cultures grown in sterile mixtures of BBM and AWP were compared at days 8 (exponential growth phase) and 16 (stationary phase of culture). A mixotrophic culture containing 20 g.L⁻¹ of pure ($\geq 98\%$) D-lactose monohydrate (Sigma-Aldrich) as the DOC source and about 180 ppm of nitrate as the sole nitrogen source was used as a control.

Two kinetic experiments using a complex culture medium of 20% (v/v) AWP and 80% (v/v) of BBM (containing about 180 ppm of nitrate) were then plotted, after pH adjustment with Tris base, in order to study the daily-averaged enzyme and biomass productivities. For the first experiment, media (75 mL) were inoculated in 250 mL shake-flasks and the same mixotrophic conditions as the two previous experiments were maintained for 13 days. The last experiment was conducted in a 5 liters jacketed stirred tank Applikon photobioreactor controlled the cultivation parameters (pH and Temperature) and an ez-Control Bio controller (Applikon, Holland) acquired the on-line data, which were the temperature, pH, sterile air and carbon dioxide flow rate and their concentration in the headspace of the reactor and it lasted 16 days. The reactor was equipped with a water jacket connected to a water bath, which allowed controlling the temperature at 21°C. The pH was controlled at 7.2 by adding carbon dioxide to the air flow. The photobioreactor was illuminated on two opposite sides of the photobioreactor using two fluorescent tubes (PAR: Philips 17W/T8/TL841) on each side, and the incident light intensity at the reactor surface was between 45 and 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The light intensity was determined with an irradiance portable digital quantum radiometer model Q201.

5.3.3 Compositional and analytical analysis

Ion measurements of AWP were done using an ion chromatography system (Dionex ICS-1000, Thermo-Scientific, Sunnyvale, CA, USA) with AS40 automated sampler as follows (Girard et al. 2014): Anion analyses were performed with a pre-column (IonPac AG14A, 4 × 50 mm) coupled to the analytical column (IonPac AS14A, 4 x 250 mm) and a Suppressor (ASRS Ultra II, 4 mm) set to 45 mA using an aqueous solution of 8 mM Na₂CO₃ and 1 mM NaHCO₃ as eluent. Cation analyses were performed with a security guard cartridge (IonPac CG12A 4 × 50 mm) coupled to the analytical column (IonPac CS12A, 4 x 250 mm) and a suppressor (CSRS Ultra II, 4 mm) set to 59 mA using an eluent of 26 mM methylsulfonic acid. The apparatus was calibrated before every utilization with standard solutions in the concentration range of the samples that were to be analyzed and the major ions: chloride (Cl⁻), nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), phosphate (PO₄³⁻), sulfate

(SO₄²⁻), sodium (Na⁺), ammonium (NH₄⁺), potassium (K⁺), magnesium (Mg²⁺) and calcium (Ca²⁺) were quantified.

Lyophilized AWP was prepared and silylated sugars (i.e. lactose, glucose and galactose) were analyzed as described in (Girard et al. 2013) by GC-MS (Agilent Technologies, GC model 6850 series II and MS model 5975B) equipped with a HP-5MS capillary column with 5% phenyl methyl siloxane.

Enzyme activity was determined according to a procedure propagated by Miller (1972). This method, initially developed for bacteria (i.e. *E.coli*), was adjusted and few modifications were done to adapt it to the case of *Scenedesmus obliquus* microalgae as described in (Bentahar et al. submitted). Two formulas, based on the dry weight measurements, were used to compare the enzymatic activities (proportional to the enzyme production), one being *specific* (i.e. the amount of enzyme (U) per unit of algal biomass (g·cells)), and the other being *volumetric* (i.e. the amount of enzyme (U) per volume of cell culture (L·culture)):

$$SEA \left(U \cdot g^{-1} \text{ cells} \right) = 1000 \times \frac{\left(OD_{420} \text{ (with ONPG)} - OD_{420} \text{ (without ONPG)} \right)}{t \times v \times DW \times 0.0045} \quad (5)$$

$$VEA \left(U \cdot L^{-1} \text{ culture} \right) = SEA \times DW \quad (6)$$

Where:

SEA and *VEA* represent the *specific* (U. g⁻¹ cells) and *volumetric* (U. L⁻¹ culture) enzymatic activities respectively note that 1 U is equivalent to 1 nmol *o*-nitrophenol produced min⁻¹ at 28°C, pH 7.0.,

DO₄₂₀ (with ONPG) and DO₄₂₀ (without ONPG) are read from the reaction mixture,

t = time of the reaction in minutes,

v = volume of culture used in the essay, in mL,

DW = actual dry weight (g.L⁻¹) of the sample.

Factor 0.0045 is the absorbance of 1 nmol of *o*-nitrophenol at 420 nm in a 10 mm light path,

Factor 1000 is for conversion of units (mL.L⁻¹) after the product of v and DW.

Dry weights (DW) were quantified by precisely weighting 10 mL of filtered culture samples through a glass-microfiber filter (VWR Grade 691, nominal pore size 1.5 μm) after drying the algae at 95°C until they reach a constant weight and cooling it down in a dessicator. Filters were dried and weighted before sampling and the filtration technique was conducted as described in (Zhu and Lee, 1997) by using 20 mL solution of 0.5 M ammonium formate to wash cells.

5.3.4 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using standard analysis of variance (ANOVA) tests for comparison of means with the Excel software. Mean values and standard deviation of measurements ($n = 3$) were calculated for each experiment and statistical significance was determined by the calculation of p -values. A p -value of less than 0.05 ($p < 0.05$) was considered to indicate significance. Results are expressed as means \pm SD (the standard deviation).

5.4 RESULTS

5.4.1 Composition of AWP

The type and composition of whey at dairy plants mainly depends on that of milk and the processing technique resulting in casein removal from fluid milk (Panesar & Kennedy, 2012). Limited information is available regarding the properties of acid whey streams originating from production of fresh soft cheese, cream cheese, or Greek-style yogurt which complicates attempts to resolve the issues associated with its handling (Chandrapala et al., 2015). The composition of the AWP assessed in our study is presented in Table 9.

Tableau 9 : Compositional analysis of the acid whey solution obtained from STELA Dairy Research Center, Institute of Nutrition and Functional Foods, Department of Food Sciences, Laval University, Quebec (Canada). ^a

Component	Acid whey permeate (AWP)
pH	3.84 ± 0.03
total solids (g.L ⁻¹)	61.79 ± 0.88
Total sugars (g.L ⁻¹)	28.12 ± 1.51
Lactose (g.L ⁻¹)	19.65 ± 0.9
Glucose (g.L ⁻¹)	n.d.
Galactose (g.L ⁻¹)	8.46 ± 0.6
Cl ⁻ (mg.L ⁻¹)	938.43 ± 20.89
NO ²⁻ (mg.L ⁻¹)	0
NO ³⁻ (mg.L ⁻¹)	0
PO ₄ ³⁻ (mg.L ⁻¹)	1543.83 ± 34.76
SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹)	75.83 ± 4.71
Na ⁺ (mg.L ⁻¹)	388.40 ± 8.20
NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	126.60 ± 1.13
K ⁺ (mg.L ⁻¹)	1627.77 ± 18.38
Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	95.53 ± 0.91
Ca ²⁺ (mg.L ⁻¹)	1161.30 ± 11.33

^a Values are the mean of a triplicate determination ± standard deviation; n.d., not detected.

5.4.2 Influence of AWP use

The first experimental conditions, tested in mixotrophy in a Multitron II incubator shaker, have studied the influence of including AWP in *Scenedesmus obliquus*'s culture medium on biomass formation and β-galactosidase production. Figure 16 shows that substituting 20% (v/v) of BBM with AWP led to important growth stimulation in the microalgae cultures (about 4 times greater than the use of 20 g.L⁻¹ of pure lactose at days 8 and 16). This growth rate was significantly increased by AWP supply (p<0.05) to reach an interesting dry weight concentration of about 5 g.L⁻¹ after 16 days using 80% (v/v) of AWP. Similarly, AWP supply also increased the *volumetric* enzymatic activities (*VEA*) at days 8 and 16 which remained significantly higher than

the *VEA* generated by cells grown on pure lactose (20 g.L⁻¹). However, the use of AWP seems to have a repressive effect on the *specific* production of the β -galactosidase enzyme compared to the control samples using pure lactose. Furthermore, the *specific* enzymatic activities (*SEA*) were significantly decreased ($p = 2.95 \times 10^{-8}$) between days 8 and 16 whatever the AWP proportion resulting a decrease of the *TEA* of samples grown on 20% (v/v) AWP.

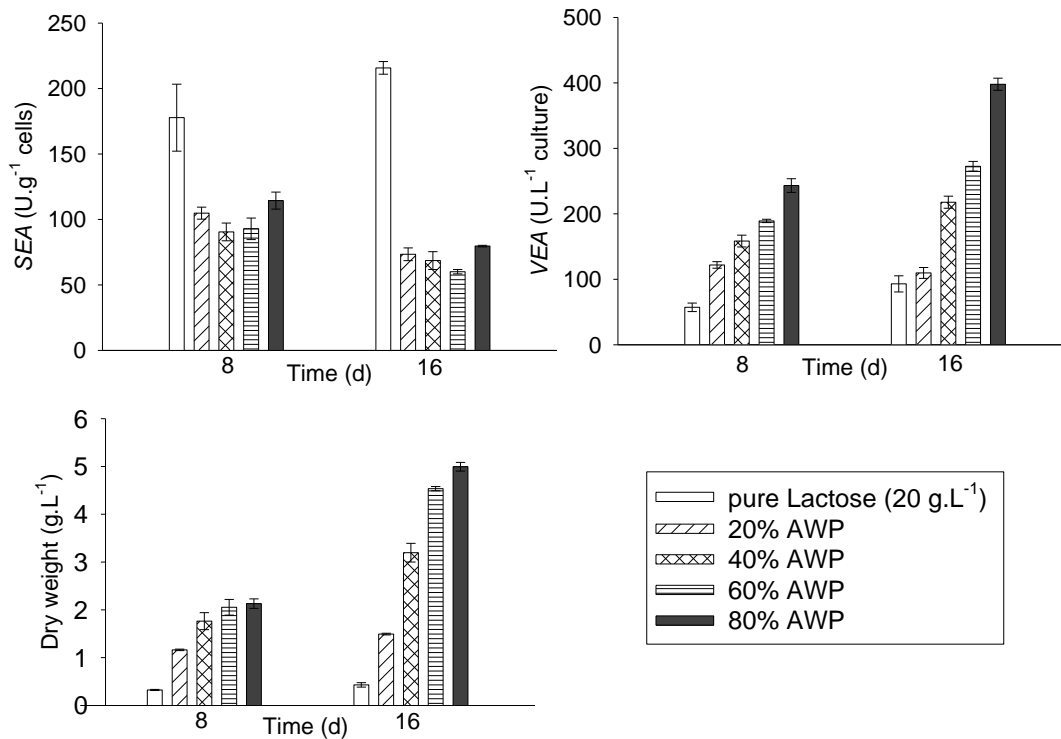


Figure 14 : Enzymatic activities and dry weights of cultures grown on various proportions of AWP, compared to a control with 20 g.L⁻¹ pure lactose. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

5.4.3 Influence of the nitrate concentrations

The supplementation of nitrogenous sources for the production of β -galactosidase enzyme has not been studied to a great extent in various microorganisms (Kazemi et al., 2016). While nitrate (NO₃⁻) represent the sole nitrogen source in BBM medium (about 180 ppm), it was necessary to study the effect of nitrate concentrations (180, 360 and 720 ppm (w/w)), in the presence of AWP, on the enzyme production and to compare it to the last experiment where concentrations of another nitrogenous source (NH₄⁺), presented in the AWP solution, were increased.

Enzymatic activities and biomass productivities are shown in Figure 5. *SEA* was higher after 8 days (growth phase) using 360 ppm of nitrate but not at day 16 (stationary phase). However, *VEA* appeared to significantly increase ($p < 0.01$) as increasing NO_3^- supply and time of culture (days 8 and 16). Similarly, the same factors seems to increase the biomass production although results showed insignificant effects ($p = 0.76$) by doubling nitrate concentration from 180 to 360 ppm after 8 days.

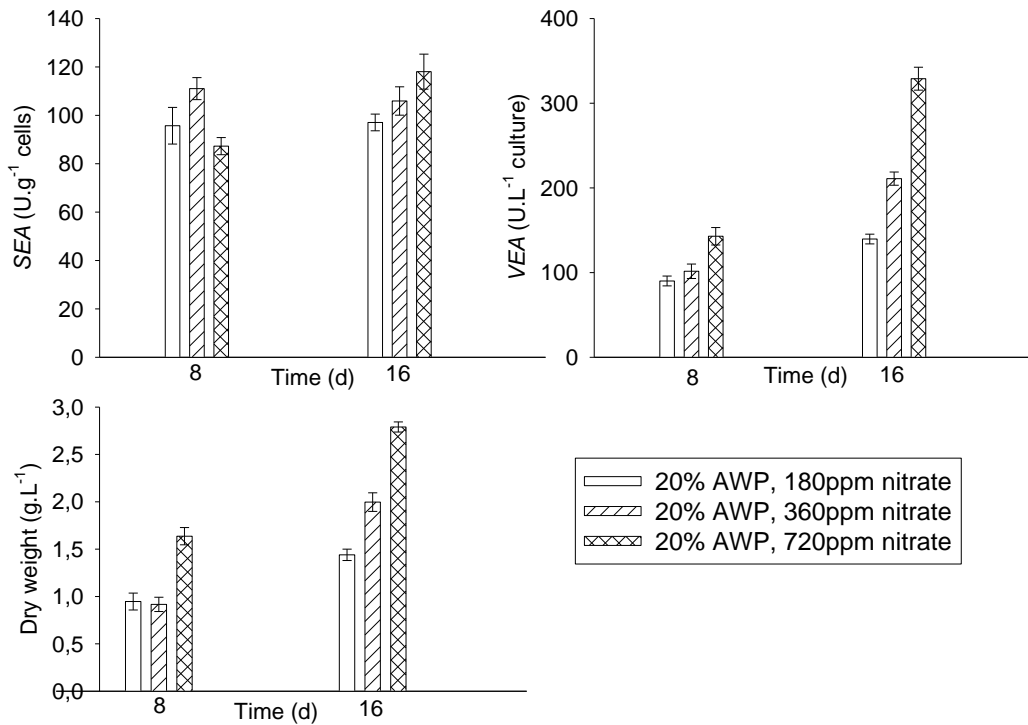


Figure 15 : Enzymatic activities and dry weights of cultures grown on a constant proportion of AWP and various concentrations of BBM. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

5.4.4 Kinetics of growth and β -galactosidase production in the presence of AWP

Since previous experiments have shown that doubling AWP or nitrate concentrations does not result in doubling the amount of enzyme produced after 8 days, culture medium with the proportions of 20% (v/v) AWP and 80% (v/v) normal BBM (containing about 180 ppm of nitrate) was chosen for an economically viable industrial use of microalgae in order to valorize AWP and produce the β -galactosidase enzyme.

The time course of *specific* and *volumetric* β -galactosidase production as well as the growth of *Scenedesmus obliquus* was followed in 250 mL shake-flasks (containing 75 mL of culture) and 5 L pilot-scale

photobioreactor for a period of 13 and 16 days respectively under mixotrophic conditions. Results are shown in Figure 18 and Figure 19.

Mixotrophic cultures conducted in Multitron II incubator shaker (Fig. 18) showed that biomass productivity grows rapidly reaching stationary phase (about 1.3 g.L^{-1}) after 10 days. However, The *SEA* reaches a maximum of $129 \pm 7 \text{ U.g}^{-1}$ cells after 5 days of culture and tends to decrease as time of culture increased to achieve a lowest constant value (about 87 U.g^{-1} cells) in the stationary phase. On the other hand, the *VEA* seems to follow the growth behavior and gradually increases during the growth phase to reach a constant amount of about 122 U.L^{-1} culture in the stationary phase. The volumetric daily-averaged enzyme productivity (*VEA* divided by culture time) was determined to grasp a better view of the enzyme productivity and an optimum of $14 \text{ U.L}^{-1} \text{ culture.day}^{-1}$ was noticed around day 7.

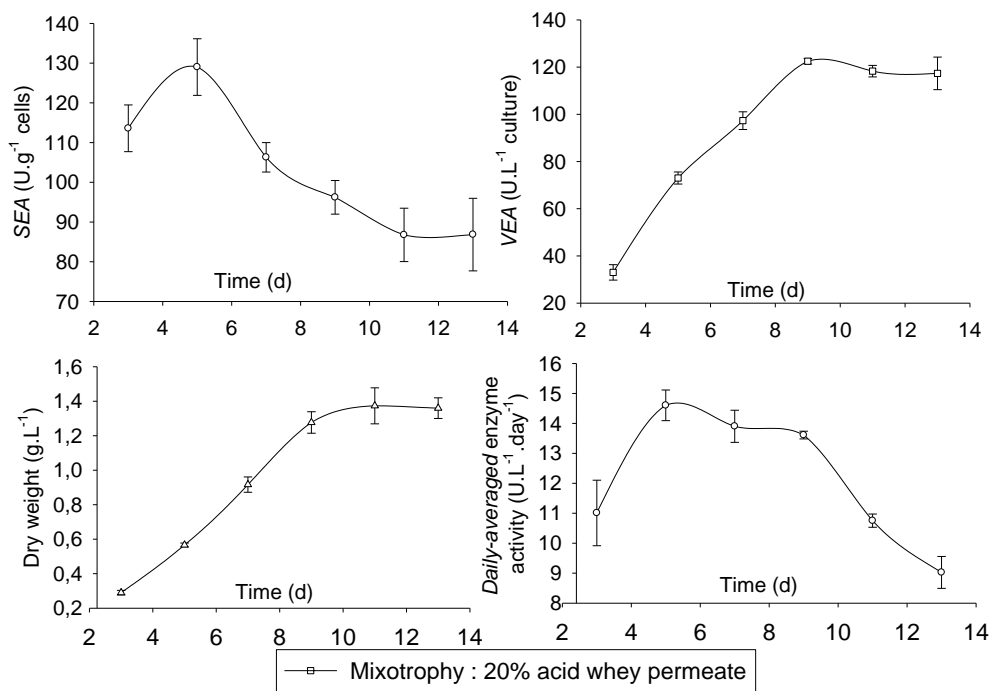


Figure 16 : Process kinetics with AWP in shake-flask conditions. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

On the other hand, the same culture conditions (20% (v/v) AWP and 80% (v/v) of normal BBM in mixotrophy) seems to have another influence on *Scenedesmus obliquus* when cultivated in a 5 liters jacketed stirred tank Applikon photobioreactor (Fig. 19). The microalgae exhibited what appears to be a definite diauxic growth pattern, when it was growing in the presence of two sources of nitrogen (about 180 ppm of NO_3^- and 127 ppm of NH_4^+) but the period of lag was missed. The *SEA* showed a similar maximum amount

(around 129 U.g^{-1} cells) which remained almost constant until day 11 and appeared to decrease after that. However, cultures seem to maintain the same *volumetric* enzymatic behavior as those grown in shake-flasks to show a maximum around 122 U.L^{-1} culture from day 11 to 16. Similarly, results showed an optimum volumetric daily-averaged enzyme productivity of $15.5 \text{ U.L}^{-1} \text{ cells.day}^{-1}$ around day 7, confirming the previous observations.

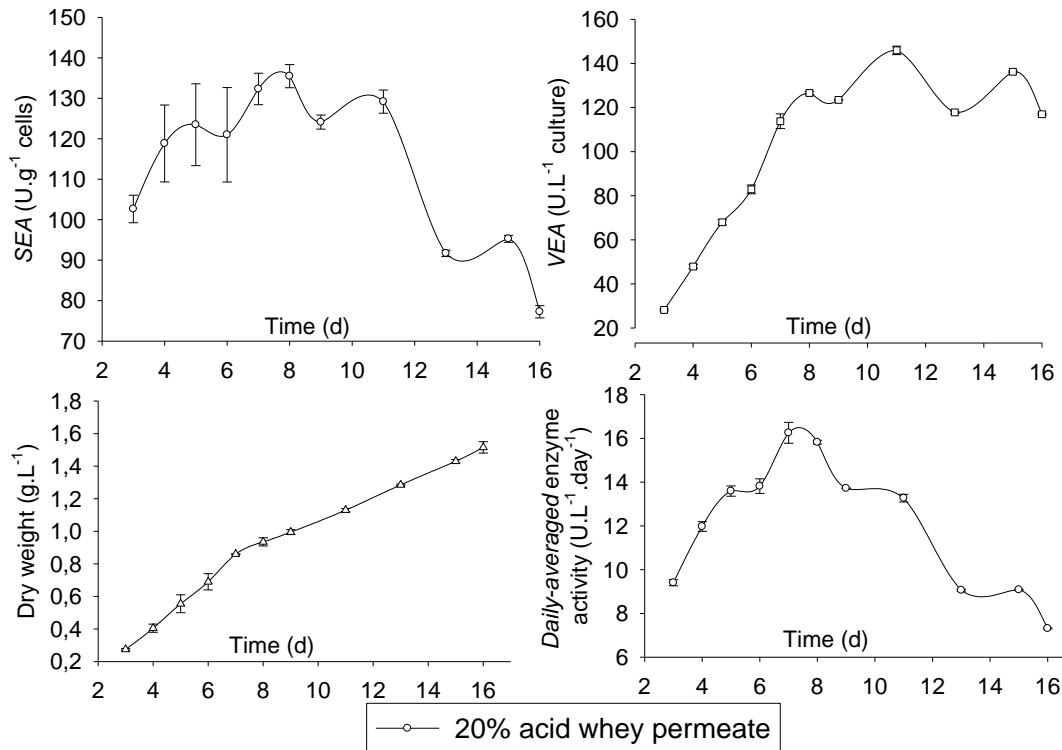


Figure 17 : Process kinetics with AWP in photobioreactor conditions. Results are expressed as the mean value from two measurements of the same system \pm SD ($n = 2$).

5.5 DISCUSSION

In this study we evaluated biomass and β -galactosidase productions of *Scenedesmus obliquus* specie as influenced by various mixotrophic culture conditions in the presence of different levels of AWP and nitrate. In comparison with other carbon substrates, whey as well as its permeate represent a potential substrate with numerous biotechnological applications. In fact, they contain all the minerals and trace elements required for the growth of microorganisms in addition of water-soluble vitamins which constitute an excellent basal medium for any type of culture required by the fermentation industry, whereas producing a culture medium

with wide applications from starchy materials seems to be difficult without a preliminary treatment (Moulin & Galzy, 1984).

Scenedesmus has exhibited the potential of being a source of high-value compounds with industrial and health promoting applications in human, animal and aquatic lives (Ishaq et al., 2016). The cheese whey permeate was successfully used in the mixotrophic microalgae cultures and the recent study of Girard et al. (2014) demonstrated that substituting 40% (v/v) of BBM with the sweet whey permeate significantly stimulates *Scenedesmus obliquus* growth ($\mu_{\max} = 1.083 \pm 0.030 \text{ day}^{-1}$) and showed a significant decrease in lactose concentration (-54.4%) between days 3 and 13 accompanied by an accumulation of galactose and glucose in the culture medium indicating a β -galactosidase activity. This enzyme can be utilized in the development of new products with hydrolyzed lactose allowing the possibility to diminish the lactose intolerance problem, prevalent in more than half of the world's population, to improve the technological properties of non-fermented milk products and to produce probiotic food ingredients especially galacto-oligosaccharides (Mlichová et al., 2006).

Our data showed that AWP by-product can be used as a good and inexpensive growth media for *Scenedesmus obliquus* cells after pH adjustment. The microalgal growth significantly increased ($p < 10^{-6}$) when AWP with an equivalent lactose concentrations of 4, 8, 12 and 16 g.L^{-1} were used instead of a medium containing 20 g.L^{-1} of pure lactose, which might be explained by a nitrogen nutrient limitation. In fact, nitrogen is considered within the quantitatively important factors in growth medium and also a limiting nutrient and the concentration at which nitrogen inhibits cell growth depended on culture condition and species (Arumugam et al., 2013). According to Deschênes et al. (2015) and Girard et al. (2014), adding a nitrogen source (i.e. nitrate and ammonium) would improve the biomass yield of *Scenedesmus obliquus* over time and its depletion coincided with the end of the exponential growth phase, confirming the limiting factor of this nutrient. However, our results exhibited a considerable difference in terms of biomass growth when ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) concentrations were increased separately. There was almost threefold enhancement in biomass growth when ammonium concentration was 4 times increased (from 25 to 100 ppm of NO_3^- including in 20% and 80% of AWP respectively) compared to a twofold enhancement when nitrate concentration was similarly increased (from 180 to 720 ppm of NO_3^- including in BBM 1x and BBM 4x respectively) at day 16. By contrast, nitrate was found to be a preferred form of nitrogen source and performed better for biomass growth of *Scenedesmus bijugatus* compared to other nitrogen sources including ammonium (Arumugam et al., 2013).

On the other hand, our study revealed that biomass production does not linearly follow the AWP concentrations and it continues to increase as the AWP concentration and the culture time increase. However, when *Scenedesmus obliquus* was grown in Multitron under mixotrophic conditions with the proportions of 20% (v/v) AWP and 80% (v/v) normal BBM, stirred cultures showed what appeared to be a stationary phase (about 1.3 g.L⁻¹ after 13 days) which was not the case when the microalgae was grown in a pilote-scale photobioreactor system under the same culture conditions. While photobioreactor is a more controlled environment system, *Scenedesmus obliquus* showed a much longer growth phase and biomass productivity continued to grow up after 16 days of culture. Moreover, a diauxic growth pattern was observed. A possible explanation is related to the fact that two different nitrogen sources (ammonium and nitrate contained in AWP and BBM respectively) were supplied together. For example, when ammonium and nitrate were supplied together, the microalgae *Chlorella vulgaris* preferentially assimilate ammonium–nitrogen first, which is incorporated into the organic compounds produced by the microalgae (De-Bashan et al., 2005). Girard et al. (2014) showed also that NH₄⁺ consumption by *Scenedesmus obliquus* become more rapid under mixotrophic conditions.

The increase in AWP concentration exerted no influence on the *specific* enzymatic activity (*SEA*) at day 8 and 16 while this productivity significantly decreased ($p = 2.9 \cdot 10^{-8}$) over time from an average of 100 U.g⁻¹ cells at day 8 to an average of 69 U.g⁻¹ cells at day 16. However, the use of pure lactose (20 g.L⁻¹) in mixotrophic cultures led to a higher *specific* enzyme productivity which increased over time to reach about 1 U mg⁻¹ protein mg⁻¹ cells at day 16. In previous work by our group (Bentahar et al. submitted), we compared photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Scenedesmus obliquus* and we noticed that lactose supply had a repression impact on the *specific* β -galactosidase production compared to photoautotrophic condition. Moreover, the same study revealed that *SEA* was growth phase-dependent and was enhanced during stationary growth phase to maintain a maximum of about 322 U.g⁻¹ cells under mixotrophic cultures grown on lactose (20 g.L⁻¹). However, this work showed a different *specific* enzymatic pattern when 20% of AWP with an equivalent lactose concentration of 4 g.L⁻¹ lactose was used under mixotrophic conditions. *SEA* reached a maximum (around 129 U.g⁻¹ cells) at the beginning of the growth phase and seemed to decrease over time whatever the stationary phase was achieved (Fig. 18) or not (Fig. 19). A possible explanation might be related to the ions presence in the whey permeate, which could have a repressive effect on the *specific* production of the β -galactosidase enzyme especially calcium. Jurado et al. (2004) reported that Ca²⁺ ions inhibit the functioning of the enzyme, while Mg²⁺ ions increase their activity regardless to the origin of the enzyme. On

the contrary, although monovalent cations are often required to stabilize β -galactosidase (Flores et al., 1996), the effect of Na^+ and K^+ on enzyme activity varied greatly between species (Garman et al., 1996).

Nevertheless, the higher biomass concentrations obtained in mixotrophic cultures grown on AWP compensate for their lower *specific* β -galactosidase production. Hence, as the biomass concentration increased, total *volumetric* enzyme production also increased. The highest *VEAs* (about 400 U.L^{-1} culture) were observed at day 16 when 80% (v/v) of BBM (containing about 180 ppm of nitrate) were substituted with AWP, followed by cultures using a complex medium of 20% (v/v) AWP and 80% (v/v) modified BBM containing about 720 ppm of nitrate (about 329 U.L^{-1} culture). These *total* β -galactosidase productions were two-fold above those observed in Bentahar et al. (submitted) when *Scenedesmus obliquus* was grown in photoautotrophic or mixotrophic conditions using carbohydrates (i.e. glucose, galactose and lactose). However, daily-averaged volumetric enzyme productivities showed a better amounts at day 8 compared to day 16 suggesting a more focus on short-term cultures for producing the enzyme. Moreover, since *VEAs* does not linearly follow the AWP concentrations, the complex culture medium of 20% AWP and 80% of BBM (containing about 180 ppm of nitrate) was proposed to be a better option for an economical short-term production of β -galactosidase enzyme in mixotrophy. Under these conditions, kinetic studies showed a same *volumetric* enzymatic pattern when cultures was upgraded from 250 mL shake-flasks (75 mL of media) to a 5 L pilot-scale photobioreactor and a maximum *VEA* of 122 U.L^{-1} culture was maintained after 11 days of cultures suggesting repeatability.

In conclusion, acid whey permeate has been investigated as a potential nutrient for *Scenedesmus obliquus* cultivation in order to produce β -galactosidase enzyme. Its presence in the culture media significantly enhanced biomass and *volumetric* enzyme productivities but seemed to reduce *specific* enzymatic activity. Substituting 20% (v/v) of the default culture medium (BBM) with AWP was found to be more efficient for algal growth and *volumetric* enzyme production under mixotrophic conditions. Moreover, independently from the growth phase, aiming a time of culture around 7 days seems to guarantee an optimum daily-averaged enzyme productivity. Future work is however necessary to monitor medium sugars and total dissolved solids content (e.g. using FT-IR/ATR technology) and thus to have a better perception of the enzyme production mechanism. Besides β -galactosidase production, our study makes a contribution to use AWP as a substrate for *Scenedesmus obliquus* culture, which is rather known as a rich source of bioactive metabolites, allowing the possibility to study the production of other chemicals compounds (e.g. oligosaccharides).

5.6 ACKNOWLEDGMENT

I am grateful to Mr. Jonathan Gagnon for helping me in compositional analysis of acid whey permeate. Financial support from NSERC (National Science and Engineering Research Council of Canada), INAF (Institute of Nutrition And functional Foods - Pilot projects program), FRQNT (Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies), and MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec - Innov'Action program) is gratefully acknowledged.

5.7 REFERENCES

- Arla Food Ingredients. Greek yogurt process promises an end to 1 million tons of acid whey. <https://www.arlafoodsingredients.com/about/press-centre/2014/pressrelease/greek-yogurt-process-promises-an-end-to-1-million-tons-of-acid-whey-1008010/>. Accessed 29 June 2017
- Arumugam M, Agarwal A, Arya MC, Ahmed Z (2013) Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology* 131: 246–249
- Bentahar J, Doyen A, Beaulieu L, Deschênes J-S (submitted) Production of β -galactosidase by *Scenedesmus obliquus* as influenced by various culture conditions. *Journal of Applied Phycology*
- Canadian Dairy Information Centre. “Production du fromage par province”. http://www.dairyinfo.gc.ca/pdf/prod_cprov_f.pdf. Accessed 29 June 2017
- Chandrapala J, Duke MC, Gray SR, Zisu B, Weeks M, Palmer M, vasiljevic T (2015) Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *J. Dairy Sci* 98 :4352–4363
- De-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y (2005) Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 197–203
- Deschênes J-S, Boudreau A, Tremblay R (2015) Mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors: Practicability and process considerations. *Algal Research* 10: 80–86
- Domingues L, Lima N, Teixeira JA (1999) Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo. In: *Actas da 6.a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. 3: 271-280
- Fischer C, Kleinschmidt T (2015) Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal* 48: 15-22

- Flores MV, Ertola RJ, Voget CE (1996) Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Lebensm-Wissu Technol* 29: 503–506
- Garman J, Coolbear T, Smart J (1996) The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 22–27
- Girard J-M, Deschênes J-S, Tremblay R, Gagnon J (2013) FT-IR/ATR univariate and multivariate calibration models for in situ monitoring of sugars in complex microalgal culture media. *Bioresource Technology* 144 (0): 664-668
- Girard J-M, Roy M-L, Ben Hafsa M, Gagnon J, Faucheux N, Heitz M, Tremblay R, Deschênes J-S (2014) Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research* 5 : 241-248
- González Siso MI (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57: 1-11.
- Hsu CA, Yu RC, Chou CC (2005) Production of beta-galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int J Food Microbiol* 104: 197–206
- Ishaq AG, Matias-Peralta HM, Basri H (2016) Bioactive Compounds from Green Microalga – *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 39 (1): 1–16
- Jurado E, Camacho F, Luzón G, Vicaria JM. 2004. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 33-40
- Kazemi S, Khayati G, Faezi-Ghasemi M (2016) β -galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: Optimization by orthogonal arrays design. *Iranian Biomedical Journal* 20 (5): 287-294
- Marwaha SS, Kennedy JF (1988) Review: whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol* 23 : 323-336
- Mehner AC (2010) Multimedia and ultrafiltration of reverse osmosis pretreatment aboard naval vessels. *Inquiry: The University of Arkansas Undergraduate Research Journal* 11 (14)
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Mlichova Z, Rosenberg M (2006) Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research* 45 (2): 47-54

- Mogedas B, Salguero A, Casal C, Vilchez C (2007) UV-A promotes long-term carotenoid production of *Dunaliella* in photobioreactors with retention of cell viability. En: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Microbiology Book Series, VOL. I, 348-355 pp. Formatex. Badajoz, España. ISBN-13: 978-84-611-9421-6(SERIE), ISBN-13: 978-84-611-9422-3(VOL. I)
- Moulin G, Galzy P (1984) Whey, a Potential Substrate for Biotechnology, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1 (1): 347-374
- OECD-FAO Agriculture Outlook (2011) “ Perspectives agricoles de l'OECD-FAO 2011-2020”. 9: 159-173. 196 pp
- Oliveira C, Guimarães PMR, Domingues L (2011) Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.* 29: 600–609
- Panesar PS, Kennedy JF (2012) Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical reviews in biotechnology* 32 (4): 327-348
- Paredes Valencia A (2016) Étude comparative de deux méthodes de fabrication de yogourt grec à échelle pilote utilisant l'ultrafiltration comme technique de concentration, mémoire de maîtrise en sciences et technologie des aliments, Québec: Université Laval, 86 p.
- Priyadarshani I, Rath B (2012) Commercial and industrial applications of micro algae –A review. *J. Algal Biomass Utiln.* 3 (4): 89–100
- Schmidt, RH, Packard VS, Morris HA (1984) Effect of processing on whey protein functionality. *J. Dairy Sci.* 67: 2723–2733
- Zhu CJ, Lee YK (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol.* 9: 189–194

CHAPITRE 6

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce mémoire présente une étude visant l'utilisation du perméat de lactosérum acide par la microalgue *Scenedesmus obliquus* pour la production de l'enzyme spécifique de type β -galactosidase. Les trois objectifs principaux étaient : 1) d'étudier la production de cette enzyme par notre microalgue dans un milieu déterminé et sous l'effet de différentes conditions de culture, afin d'optimiser la production enzymatique, 2) de maîtriser la culture de microalgue en présence d'un véritable perméat de lactosérum acide dans une optique d'optimisation de la production β -galactosidase et 3) de valider les résultats à l'échelle laboratoire (cultures en flacon agités) puis en photobioréacteur, en effectuant le suivi des activités enzymatiques sous un certain optimum d'utilisation du perméat de lactosérum acide.

La revue de littérature s'avère nécessaire pour assurer une bonne conception du plan d'expériences et atteindre ses objectifs. Une telle revue a mis l'accent sur le problème lié au rejet du lactosérum et de son perméat et les différents aspects pour valoriser un tel sous-produit. En raison de leurs faibles besoins nutritionnels, et grâce à leur capacité de production de plusieurs composés à haute valeur ajoutée comme les enzymes, les microalgues y compris l'espèce *Scenedesmus obliquus* ont été choisies comme une potentielle source de valorisation de ce coproduit riche en lactose, en minéraux et en oligo-éléments nécessaires pour leur croissance. De ce fait, la deuxième partie de la revue de littérature a présenté les détails sur la culture des microalgues et les différents systèmes de production pour une éventuelle application commerciale et a montré leur grand potentiel de production des plusieurs molécules bioactives, notamment les enzymes de type β -galactosidase, ayant des applications industrielles et de santé qui peuvent promouvoir la vie humaine, animale et aquatique.

La méthodologie du travail a été présentée au chapitre 3. Celui-ci a présenté un résumé des étapes préparatoires à la préparation et à la culture de la microalgue *Scenedesmus obliquus*. Cependant, les données sur le mécanisme de production de l'enzyme à partir cette espèce ne sont pas suffisantes pour comprendre le mécanisme de production β -galactosidase, d'où la nécessité d'étudier les facteurs qui peuvent influencer la production enzymatique notamment le mode de culture, la source du carbone organique et le ratio C/N. La première série des expériences a été élaborée pour répondre à cet objectif et les résultats qui en résultent ont été utilisés pour l'élaboration d'une deuxième série d'expériences qui visaient à maîtriser et à optimiser la production enzymatique en présence du véritable perméat de lactosérum acide. Les résultats ont été validés à l'échelle laboratoire en flacons agités et en photobioréacteur de 5 L de volume de culture. L'activité enzymatique (principalement retrouvée dans le culot cellulaire) a été analysée en s'inspirant de la méthode de Miller (1972), initialement développée pour des bactéries notamment *E. coli* : quelques modifications ont été nécessaires afin d'adapter la méthode pour le cas des microalgues. Deux types d'activités enzymatiques (proportionnelles à la quantité d'enzyme) ont été utilisées pour comparer les résultats : la première est la production *spécifique* (c'est-à-dire la quantité d'enzyme (U) produite par unité de biomasse microalgale (g^{-1} cellules)) et la deuxième étant *volumétrique totale* (c'est-à-dire la quantité d'enzyme (U) produite au total par volume de la culture (L^{-1} culture)). La productivité enzymatique quotidienne moyenne (productivité enzymatique volumétrique totale divisée par le temps de culture) et la masse sèche (productivité en biomasse de microalgues) ont également été évaluées à différents instants de culture.

Le premier article présente une première étude pratique qui vise à quantifier et à optimiser la production β -galactosidase par la microalgue *Scenedesmus obliquus*. En effet, l'influence du mode de culture (photoautotrophe, mixotrophe et hétérotrophe), de la forme du carbone organique (glucose pur, galactose pur et lactose pur), du ratio C/N et des concentrations de nutriments carbonés et azotés sur la productivité enzymatique a été étudiée. La production *volumétrique* totale de β -galactosidase semble être meilleure dans les conditions mixotrophes pour les cultures à court terme en raison de leur forte productivité de

biomasse microalgale. Cependant, la présence d'une source de carbone organique (glucose, galactose et lactose) a eu des effets inverses sur la production *spécifique* de l'enzyme et le mode de culture photoautotrophe semble être un meilleur choix pour une production unitaire (par unité de biomasse) d'enzyme (procédé plus sélectif). De plus, l'augmentation des concentrations de carbone organique et d'azote n'a eu aucun effet significatif sur la production *spécifique* et *volumétrique* de β -galactosidase, suggérant le besoin d'une étude supplémentaire à d'autres concentrations en lactose et en nitrates. La production d'enzyme semble fortement liée au stade de croissance cellulaire et le niveau de production d'enzymes le plus élevé a été observé en conditions de culture mixotrophes pendant la phase stationnaire.

Le deuxième article consiste à utiliser le perméat de lactosérum acide pour une culture mixotrophe de *Scenedesmus obliquus*. La composition du milieu de culture a été variée afin d'évaluer et d'optimiser le taux de croissance et la production de β -galactosidase. La présence du véritable perméat de lactosérum acide met à la disposition de la microalgue à la fois une source de carbone organique (lactose) et une source d'azote (ammonium) en plus du nitrate (autre source d'azote) existant dans le milieu de culture basal (BBM). De ce fait, l'influence d'augmentation de la proportion du perméat acide (20, 40, 60 et 80% (v/v)) et du BBM notamment la concentration de nitrate (180, 360 et 720 ppm (w/w)) a été étudiée. Les résultats révèlent que le perméat de lactosérum acide présente un nutriment potentiel et peu coûteux pour la culture de *Scenedesmus obliquus*, après l'ajustement du pH. Sa présence augmente significativement la biomasse et la productivité enzymatique *volumétrique*, mais semble réduire l'activité enzymatique *spécifique*. Le milieu de culture complexe de 20% (v/v) perméat acide et 80% (v/v) BBM (contenant environ 180 ppm de nitrate) a été proposé, en mixotrophie, comme une meilleure option pour une production économique à court terme de l'enzyme de type β -galactosidase. Dans ces conditions, les études cinétiques ont montré un comportement similaire de production *volumétrique* d'enzyme avec un maximum de 122 U.L⁻¹ de culture lorsque la microalgue a été cultivée en flacons agités (75 mL de culture par flacon) et en photobioréacteur de 5 L. Cette étude vise à s'approcher d'une mise en œuvre industrielle réaliste et les résultats sont répétables. De plus, indépendamment de la phase de

croissance, viser un temps de culture autour de 7 jours semble garantir une productivité enzymatique quotidienne optimale.

De façon globale, les résultats obtenus dans ce projet sont avérés très satisfaisants et ont permis d'avancer de façon pertinente les connaissances en introduisant pour la première fois le perméat de lactosérum acide dans le milieu de culture de l'espèce de microalgue *Scenedesmus obliquus* et en étudiant d'avantage sa capacité de produire l'enzyme de type β -galactosidase sous différentes conditions. Cette étude pourra contribuer à résoudre les problèmes associés à l'élimination du lactose, du lactosérum et de son perméat, à la cristallisation du lactose dans les produits laitiers congelés et condensés et à l'intolérance au lactose après vérification du statut « GRAS » de la β -galactosidase produite et advenant une évaluation économique positive du procédé. Cette enzyme pourra peut-être également être exploitée pour la synthèse de galacto-oligosaccharides pouvant être utilisés comme ingrédients alimentaires probiotiques. Toutefois, des travaux futurs sont nécessaires pour surveiller la consommation des nutriments (par exemple les sucres et les minéraux) en utilisant des technologies comme le FT-IR/ATR et ainsi avoir une meilleure perception et un meilleur contrôle de la production de l'enzyme en conditions de culture mixotrophe. De plus, une étude approfondie basée sur des approches biochimiques et génétiques pourrait être envisagée afin de purifier l'enzyme et de bien caractériser le mécanisme d'induction de la β -galactosidase produite par la microalgue *Scenedesmus obliquus*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abalde, J., Fabregas, J., Herrero, C. 1991. β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresour Technol* 38: 121–125.
- Abd El-Baky, H., El Baz, F.K., El-Baroty, G. 2009. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. *Acta Physiol Plant* 31: 623–631.
- Albayrak, N. et Yang, S.-T. 2002. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol Bioeng* 77: 8–19.
- Alberts, D.S., Goldman, R., Xu, M.J., Dorr, R.T., Quinn, J., Welch, K., Guillen-Rodriguez, J., Aickin, M., Peng, Y.M., Loescher, L., Gensler, H. 1996. Disposition and metabolism of topically administered alphanatocopherol acetate: a common ingredient of commercially available sunscreens and cosmetics. *Nutr Cancer* 26: 193–201.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, 578 p.
- Anupama et Ravindra, P. 2000. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances* 18: 459–479.
- Arad, S., Lerental, Y., Dubinsky, O. 1992. Effect of nitrate and sulfate starvation on polysaccharide formation in *Rhodella reticulata*. *Bioresour Technol* 42:141–8.
- Arevalo, A.T.2017. “Étude environnementale comparative des procédés de valorisation du lactosérum”. Mémoire, Université Laval, 78 p.
- Arla Food Ingredients. “Greek yogurt process promises an end to 1 million tons of acid whey”. [En ligne]. <https://www.arlafoodsingredients.com/about/press-centre/2014/pressrelease/greek-yogurt-process-promises-an-end-to-1-million-tons-of-acid-whey-1008010/>. (Page consultée le 29 juin 2017).

- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., Zamir, A. 2002. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 129: 1320–1329.
- Bailey, R.B., Benitez, T., Woodward, A. 1982. *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Resistant to Catabolite Repression: Use in Cheese Whey Hydrolysate Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 44: 631–639.
- Baldasso, C., Barros, T.C and Tessaro, I.C. 2011. Concentration and purification of Whey proteins by ultrafiltration. Elsevier, volume 278, Issues 1-3, 381-386.
- Baron, A.M., Sarquis, M.I., Baigori, M., Mitchell, D.A., Krieger, N. 2005. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water restricted environments, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 34: 25–32.
- Bayramoglu, G., Tunali, Y., Arica, M.Y. 2007. Immobilization of β galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Cataly Comm* 8: 1094–1101.
- Becker, E.W. 1984. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. *Biomass* 4(1): 1-19.
- Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition, p. 312–351. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford.
- Belem, M.A.F et Lee, B.H. 1998.b. Production of bio-ingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38(7): 565-598.
- Ben-Amotz, A., Avron, M. 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: Cresswell, R.C., Rees, T.A.V., Shah, N. (eds). *Algal and cyanobacterial biotechnology*. Longman Scientific & Technical, Harlow, 91–114 p.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G., Thomas, W.H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J Phycol* 21: 72–81.
- Bhat, M.K., Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnol. Adv.* 15: 583–620.
- Biswas, S., Kayastha, A.M., Seckler, R. 2003. Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris L.*) cv. PDR14. *J Plant Physiol* 160: 327–337.

- Boon, M.A., Janssen, A.E.M., van't Riet, K. 2000. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 26: 271-281.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.* 7: 3-15.
- Borowitzka, M.A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313-321.
- Borowitzka, M.A. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology.* 25: 743-756. DOI 10.1007/s10811-013-9983-9.
- Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiol Plant* 108: 111-117.
- Brasil, B.S.A.F., De Siqueira, F.G., Salum, T.F.C., Zanette, C.M., Spier, M.R. 2017. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Research* 25: 76-89.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 11, 247-255.
- Carballo-Cárdenas, E.C., Tuan, P.M., Janssen, M., Wijffels, R.H. 2003. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol Eng.* 20: 139-147.
- Cardozo, K.H., 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. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146: 60-78.
- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog.* 22: 1490-1506.
- Casal, M., Linares, M.J., Morales, M.M. 1985. Enzymatic profile of *Prototheca* species. *Mycopathologia* 92: 81-82.
- Castillo, F.J. 1990. Lactose metabolism by yeasts. In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, ed. H. Verachtert & R. De Mot. Marcel Dekker, New York, 297-320 p.

- Centre canadien d'information laitière. "Production fromage par province", en chiffres. [En ligne]. http://www.dairyinfo.gc.ca/pdf/prod_cprov_f.pdf. (Page consultée le 29 juin 2017).
- Chacón-Lee, T.L., González-Marino, G.E. 2010. Microalgae for healthy foods – Possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(6): 655-675.
- Chantarangsee, M., Tanthanuch, W., Fujimura, T., Fry, S.C., Ketudat Cairns, J. 2007. Molecular characterization of beta-galactosidases from germinating rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* 173: 118-134.
- Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5: 593–604.
- Chen, C-Y., Yeh, K-L., Aisyah, R., Lee, D-J., Chang, J-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102: 71–81.
- Chen, G.Q., Jiang, Y., Chen, F. 2008. Salt-induced alterations in lipid composition of diatom *Nitzschia laevis* (Bacillariophyceae) under heterotrophic culture condition. *J Phycol.* 44: 1309–1314.
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. 2008. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J Dairy Sci.* 91: 1751–1758.
- Chi, Z., Su, C.D., Lu, W.D. 2007. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece sp.* 113. *Bioresour Technol*; 98: 1329–32.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.
- Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V.I., Niranjan, K., Rastall, R.A. 2005. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 89: 434–443.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J., 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 3: 21–34.
- Christaki E., Florou-Paneri P. and Bonos E., 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62(8): 794-799.

- Coesel, S.N., Baumgartner, A.C., Teles, L.M., Ramos, A.A., Henriques, N.M., Cancela, L., Varela, J.C. 2008. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar Biotechnol* 10: 602–611.
- Cornet, J.F. 1998. Le technoscope: les photobioréacteurs. *Biofutur* 176: 1–10.
- Coton, S.G. 1980. Whey technology. The utilization of permeates from the ultrafiltration of whey and skim milk. *Journal of the Society of Dairy Technology* 33: 89-94.
- Daniels, M.J. 1985. Low cost process for lactose hydrolysis with immobilized lactase. *Food Tech.* 39(10): 68-70.
- Da-Silva, T.L., Gouveia, L., Reis, A. 2014. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 1043–1053.
- Davies, C.M., Apte, S.C., Peterson, S.M and Stauber J.L. 1994. Plant and algal interference in bacterial beta-D-galactosidase and beta-D-glucuronidase assays. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 3959-3964.
- Del Campo, J.A., García-González, M., Guerrero, M. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 1163–1174.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J., Guerrero, M.G. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J Biotechnol.* 76: 51–59.
- Del Campo, J.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M.Á., Rivas, J., Guerrero, M.G. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol*; 64: 848–854.
- Dembitsky, V.M. 2006. Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. *Lipids* 41: 883–924.
- De Philippis, R., Vincenzini, M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol Rev.* 22: 151–175.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J.Z. 2001. Probiotics compensation for lactose insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 421s-429s.

- Domingues, L., Lima, N., Teixeira, J.A., 1999. Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo. In: Actas da 6.a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, vol. 3. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. 271-280 p.
- Durand-Chastel, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: Shelef G, Soeder, C.J. (eds). Algae biomass. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 51–64 p.
- Durmaz, Y. 2007. Vitamin E, (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272: 717–722.
- El-Samragy, Y.A., Khorshid, M.A., Foda, M.I., Shehata, A.E. 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. *Int J Food Microbiol* 29: 411–416.
- Farizoglu, B., Keskinler, B., Yildiz, E., Nuhoglu, A. 2004. Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 39(12): 2283–2291.
- Fernandes, S., Geueke, B., Delgado, O., Coleman, J., Hatti-Kaul, R. 2002. β -galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 313-321.
- Galvez, A., Ramirez, M.J., Garcia-Garibay, M. 1990. Chemical composition of a mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. *Arch-Latinoam-Nutr.* 40(2): 252–262.
- Gänzle, M.G., Haase, G., Jelen, P. 2008. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int Dairy J.* 18: 685–694.
- Garbayo, I., Cuaresma, M., Vilchez, C., Vega, J.M. 2008. Effect of abiotic stress on the production of lutein and β -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochem.* 43: 1158–1161.
- Gatenby, C.M., Orcutt, D.M., Kreeger, D.A., Parker, B.C., Jones, V.A., Neves, R.J. 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J Appl Phycol.* 15: 1–11.
- Gekas, V., Lopez-Leiva M.H. 1985. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* 20: 2-12.

- Genari, A.N., Passos, F.V., Passos, F.M.L. 2003. Configuration of a bioreactor for milk lactose hydrolysis. *J Dairy Sci.* 86: 2783–2789.
- Girard, J.-M., Deschênes, J.-S., Tremblay, R., Gagnon, J. 2013. FT-IR/ATR univariate and multivariate calibration models for in situ monitoring of sugars in complex microalgal culture media. *Bioresource Technology* 144(0): 664-668.
- Girard, J.-M., Roy, M.-L., Ben Hafsa, M., Gagnon, J., Faucheux, N., Heitz, M., Tremblay, R., Deschênes, J.-S. 2014. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research* 5: 241-248.
- Girard, J.M. Septembre 2014. “Utilisation du lactosérum dans un procédé de culture de microalgues mixotrophes pour la production de biodiesel”, thèse de doctorat en genie biotechnologique, Sherbrook: Université de Sherbrook, 186 p.
- Goldman, J.C., Denner, M.R. 1985. Susceptibility of some marine phytoplankton species to cell breakage during filtration and post filtration rinsing. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 86: 47–58.
- González-Delgado, Á.D., Kafarov, V. 2011. Microalgae based biorefinery: issues to consider. *CT & F Cienc Tecnol Futuro* 4: 5–21.
- González Siso, M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57: 1-11.
- Gooda, E., Bednarski, W., Poznanski, S. 1983. The protein degradation in cheddar cheese manufactured from milk treated with lactase. *Milchwissenschaft* 38: 83–86.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21: 493–507.
- Gross, R., Gross, U., Ramirez, A., Cuadra, K., Collazos, C., Feldheim, W. 1978. Nutritional tests with green *Scenedesmus* with health and malnourished children. *Archiv fur Hydrobiologie, Beihefte Ergebnisse der Limnologie* 11: 174-183.
- Guil-Guerrero, J.L., Navarro-Juarez, R., Lopez-Martinez, J.C., Campra-Madrid, P., Reboloso-Fuentes, M.M. 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering* 65(4): 511–517.
- Haider, T., Husain, Q. 2007a. Preparation of lactose free milk by using ammonium sulphate fractionated proteins from almonds. *J Sci Food Agric.* 87: 1278–1283.

- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme Microb. Tech.* 39: 235–251.
- Hemlata, Fatma, T. 2009. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. *Bull Environ Contam Toxicol.* 83: 509–515.
- Hifney, A.F., Issa, A.A., Fawzy, M.A. 2013. Abiotic stress induced production of b-carotene, allophycocyanin and total lipids in *Spirulina sp.* *J Biol Earth Sci.* 3: B54–64.
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C. 2005. Production of beta-galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int J Food Microbiol* 104: 197–206.
- Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition, In: Richmond, A. (Ed.). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science Ltd, Oxford. 83–93 p.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008b. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621–639.
- Hu, Z.Y., Li, Y.T., Sommerfeld, M., Chen, F., Hu, Q. 2008c. Enhanced protection against oxidative stress in an astaxanthin-overproduction *Haematococcus* mutant (Chlorophyceae). *Eur J Phycol.* 43: 365–376.
- Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W., Chen, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energ.* 87: 38–46.
- Husain, Q. 2010. β -galactosidases and their potential applications: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 41–62.
- Ikawa, M. 2004. Algal polyunsaturated fatty acids and effects on plankton ecology and other organisms. *UNH Center Freshwat Biol Res.* 6: 17–44.
- Ip, P.F., Chen, F. 2005. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochem.* 40: 3491–3496.
- Ishaq, A. G., Matias-Peralta, H. M. and Basri, H. 2016. Bioactive Compounds from Green Microalga – *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 39(1): 1–16.

- Iwamoto, H. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species-*Chlorella*, 255–263 p. In Richmond, A. (ed.), Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford.
- Jacques, D. 1993. Valorisation des sous-produits de l'industrie de transformation du lait. Cahier technique réalisé pour le Centre québécois de valorisation de la biomasse, Ste-Foy, Canada.
- Jain, A., Gupta, Y., Jain, S.K. 2007. Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon. *J Pharm Sci.* 10: 86–128.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J. M. 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 300-309.
- Kargi, F et Ozmihci, S. 2006. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme Microb Technol* 38: 711–718.
- Kathrein, H.R. 1964. Production of carotenoids by the cultivation of algae. USA Patent 3,142,135.
- Katriola, P., Rajashekhara, E., Yan, Q., Jiang, Z. 2014. Biotechnological potential of microbial α -galactosidases, *Crit. Rev. Biotechnol.* 34(4): 307–317.
- Khabarova, Y., Tornianen, S., Tuomisto S. et al. 2011. Lactase non-persistent genotype influences milk consumption and gastrointestinal symptoms in Northern Russians. *BMC Gastroenterology* 11 (124): 1-6.
- Kim J.W., Rajagopal, S.N. 2000. Isolation and characterization of betagalactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol (Praha)* 45: 29–34.
- Klewicki, R. 2007. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with β -galactosidase. *Food Chem.* 100: 1196–1201.
- Kosikowski, F.V. 1979. Whey utilization and whey products. *Journal of dairy Science* 62(7): 1149-1160.
- Kosikowski, F.V., Wierzbicki, L.E. 1973. Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase. *J. Dairy Sci.* 56(1): 146-148.
- Kyle, D.J. 2005. The future development of single cell oils. In: Cohen, Z., Ratledge, C. (eds). Single cell oils. AOCS Publishing, Urbana, 239–248 p.

- Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A., Garcia-Ochoa, F. 2006. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β galactosidase from *Thermus sp.* strain T2: Comparison to the free enzyme. *Biochem Eng J.* 31: 14–24.
- Lee, Y-K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 13: 307–315.
- Leya, T., Rahn, A., Lütz, C., Remias, D. 2009. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology. *FEMS Microbiol Ecol.* 67: 432–443.
- Liang, S., Xueming, L., Chen, F., and Chen, Z. 2004. Current microalgal health food R&D activities in China. *Hydrobiologia* 512: 45–48.
- Linko, S., Enwald, S., Vahvaselkija, M., Mayra-Makinen, A. 1992. Optimization of the production of β -galactosidase by an autolytic strain of *Streptococcus salivarius* subsp, *thermophilus*, 588-594 p in A. Tanaka, H.W. Blanch (Eds): *Enzyme Engineerings XI*. The New York Academy of Sciences, New York.
- Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160–167.
- Lupi, F.M., Fernandes, H.M.L., Tomé, M.M., Sá-Correia, I., Novais, J.M. 1994. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme Microb Technol.* 16: 546–550.
- Ma, R.Y-N., Chen, F. 2001. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum sp.* *Process Biochem.* 36: 1175–1179.
- Mahoney, R.R. 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem.* 63: 147–154.
- Markou, G., Nerantzis, E., 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances* 31: 1532–1542.
- Martin, M., Portetelle, D., Michel, G., Vandenbol, M. 2014. Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions and biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 2917–2935.

- Marwaha, S.S. et Kennedy, J.F. 1988. Review: whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 323-336.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14: 217–232.
- Mawson, A.J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technol.* 47: 195-203.
- McGee, C.M., Muray, D.R. 1986. Comparative studies of acid glycosidases from three legumes. *Ann Botany* 57: 179–190.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorg Chim Acta.* 356: 328–334.
- Mendiola, J.A., García-Martínez, D., Rupérez, F.J, Martín-Álvarez, P.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Barbas, C., Ibanez, E., Senoràns, F.J. 2008. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *J Supercrit Fluids* 43: 484–489.
- Metting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.* 17: 477–489.
- Milk and Dairy Products. “Whey is the milk serum that is obtained during the manufacture of cheese after separation of casein and fat during milk coagulation”. [En ligne]. [http:// http://www.dairyforall.com/whey.php](http://www.dairyforall.com/whey.php) (Page consultée le 27 juin 2017).
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R.R. et al. 2010. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism, *Plant Physiol.* 154: 1737–1752.
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J-P., Morant-Manceau, A., Schoefs, B. 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13(15): 2733-2750.
- Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs. 2011. Lignes directrices applicables à l'industrie agroalimentaire hors réseau. (G. de Québec, Ed.), Ministère du développement durable, environnement et Parcs 1-81p. Québec,

- Canada. Récupéré de <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/agroalimentaire-horsreseau/lignes-directrices.pdf>.
- Mishra, A., Jha, B. 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresour Technol.* 100: 3382–3386.
- Mlichova, Z., Rosenberg, M. 2006. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research* 45(2): 47-54.
- Molina Grima, E., Fernández, J., Acién Fernández, F.G., Chisti, Y. 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J Biotechnol.* 92: 113–131.
- Moulin, G et Galzy, P. 1984. Whey, a Potential Substrate for Biotechnology, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1(1): 347-374.
- Muller-Feuga, A. 1996. Microalgues marines. Les enjeux de la recherche. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Plouzané.
- Muller-Feuga, A. 2004. Microalgae for aquaculture. The current global situation and future trends, 352–364 p. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., Biró, S. 2001. Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr Purif.* 21: 24–29.
- Nakkharat, P., Haltrich, D. 2006. Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Appl Biochem Biotechnol* 129-132: 215–225.
- Nanni, B., Balestreti, E., Dainese, E., Cozzani, I., Felicioli, R. 2001. Characterisation of a specific Phycocyanin-hydrolysing protease purified from *Spirulina platensis*, *Microbiol. Res.* 156: 259–266.
- Natrah, F.M.I., Yusoff, F.M., Shariff, M., Abas, F., Mariana, N.S. 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology* 19(6): 711-718.
- Niven, G.W. 1995. The characterization of two aminopeptidase activities from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1253: 193–198.

- Norouzian, D. 2003. Review article: enzyme immobilization: The state of art in biotechnology. *Iranian J Biotechnol.* 1: 197–206.
- Norton, S., Lacroix, C., Vuilleumard, J-C. 1994. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 457-466.
- OECD-FAO Agriculture Outlook. 2011. “Perspectives agricoles de l'OECD-FAO 2011-2020”. 9: 159-173. 196 p.
- Ogbonna, J., Tomiyamal, S., Tanaka, H. 1998. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *J Appl Phycol.* 10: 67–74.
- Oliveira, C. Guimarães, P.M.R., Domingues, L. 2011. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.* 29: 600–609.
- Ovsejevi, K., Grazu, V., Batista-Viera, F. 1998. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiosulfinate/ thiosulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products. *Biotechnol Techn* 12: 143–148.
- Ozmiñci, S., Kargi, F. 2007a. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enzyme Microb Technol* 41: 169–174.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F. 2012. Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical reviews in biotechnology* 32(4): 327-348.
- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R. 2010b. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries - Review Article. *Enzyme Research.* 2010: 1-16. ID 473137.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S. Kennedy, J.F., Kumar, H. 2006. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase - Review. *J Chem Technol Biotechnol.* 81: 530–543.
- Paredes Valencia A. 2016. “Étude comparative de deux méthodes de fabrication de yogourt grec à échelle pilote utilisant l’ultrafiltration comme technique de concentration”, mémoire de maîtrise en sciences et technologie des aliments, Québec: Université Laval, 86 p.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Guisan, J.M., Lafuente, R.F. 2003. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase

- on sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzym Microb Technol.* 33: 199–205.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 4: 89–96.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky, C. 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.* 22: 495–512.
- Pivarnik, L.F., Senecal, A.G., Rand, A.G. 1995. Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial beta-galactosidase (lactase) in food processing. *Adv Food Nutr Res.* 38: 1–102.
- Ponomarenko, L.P., Stonik, I.V., Aizdaicher, N.A., Orlova, T.Y., Popovskaya, G.I., Pomazkina, G.V., Stonik, V.A. 2004. Sterols of marine microalgae *Pyramimonas cf. cordata* (Prasinophyta), *Attheya ussurensis* sp. nov. (Bacillariophyta) and a spring diatom bloom from Lake Baikal. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 138: 65–70.
- Poirier et Micheline. 1996. Industrie de transformation du lait et environnement: Guide technique sectoriel”. Gouvernement du Québec. Ministère de l’Environnement et de la Faune. Direction des politiques du secteur industriel.
- Prasanna, R., Lata, N., Tripathi, R., et al. 2008. Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria—possible role of hydrolytic enzymes, *J. Basic Microbiol.* 48: 186–194.
- Priyadarshani, I., Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utiln.* 3(4): 89–100.
- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635–648.
- Pulz, O., Scheibenbogen, K. 1998. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 59: 123–151.
- Qin, S., Liu, G-X., Hu, Z-Y. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochem.* 43: 795–802.
- Rania, M.A. et Hala, M.T. 2008. Antibacterial and antifungal activity of Cyanobacteria and green Microalgae evaluation of medium components by Plackett-Burman design

- for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 3(1): 22-31.
- Rapin, J.-D., Marison, I.W., Von Stockar, U., Reilly, P.J. 1994. Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. Enzyme Microb. Technol. 16: 143-150.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597–635.
- Reboloso Fuentes, M.M., Ación Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A., Guil-Guerrero, J.L. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. Food Chem. 70: 345–353.
- Rosolen, M.D., Gennari, A., Volpato, G and De Souza, C.F.V. 2015. Lactose hydrolysis in milk and dairy whey using microbial β -Galactosidases. Hindawi Publishing Corporation. Enzyme Research. 2015: 1-7. Article ID 806240.
- Roy, D., Goulet, J., Le-Duy, A. 1986. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Appl Microbiol Biotechnol. 24: 206–213.
- Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Ación, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., Molina, E. 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. Process Biochem. 43: 398–405.
- Sangar, V.K., Dugan, P.R. 1972. Polysaccharide produced by *Anacystis nidulans*: its ecological implication. Appl Microbiol. 24: 732–734.
- Santos, A., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F. 1998. Kinetic modelling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology 22: 558-567.
- Satyanarayana, K.G., Mariano, A.B., Vargas, J.V.C. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. International Journal of Energy Research. 35: 291–311.
- Savvidou, M.G., Sotiroudis, T.G., Kolisis, F.N. 2016. Cell surface and cellular debris-associated heat-stable lipolytic enzyme activities of the marine alga *Nannochloropsis oceanica*, Biocatal. Biotransformation 34 (1): 24–32.
- Shukla, R.T. 1975. Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. CRC Critical Reviews in Food Technology 1: 325-356.

- Sienkiewicz, T et Riedel, C.L. 1990. Whey and whey utilization. Verlag Th., Mann.
- Siqueira, F.G., Ferreira-Filho, E.X. 2010. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications, *Mini-Rev. Org. Chem.* 7: 54–60.
- Skjanes, K., Celine, R., Peter, L. 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in Biotechnology* 33(2): 172-215.
- Smith, D.L., Starrett, D.A., Gross, K.C. 1998. A gene coding for tomato fruit beta-galactosidase II is expressed during fruit ripening. Cloning, characterization, and expression pattern. *Plant Physiol.* 117: 417–423.
- Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins: From gutter to gold. *International Dairy Journal* 18(7): 695-704.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Converti, A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture* 243: 217–224.
- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol.* 20: 245–251.
- Song, D., Fu, J., Shi, D. 2008. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology* 24(3): 341-348.
- Soong, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: Shelef, G., Soeder, C.J (eds). *Algae biomass*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 97–113 p.
- Souza, P.M., Bitterncourt, M.L., Caprara, C.C., et al. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases, *Braz. J. Microbiol.* 46: 337–346.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isamber, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87–96.
- Stein, J. 1973. (Ed.) *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. 448 p.
- Stolz, P., Obermayer, B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries* 120: 99–106.

- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1968. A Practicle Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Bd Canada, Ottawa: 181–184.
- Subhadra, B., Edwards, M. 2010. Algal biofuel production using integrated renewable energy park approach in United States. *Energy Policy* 38: 4897–4902.
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M., Yamamoto, Y. 1996. Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. *J Phycol.* 32: 598–601.
- Tin, C.S.F., Mawson, A. J. 1993. Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Proc. Biochem.* 28: 217-221.
- Tu, R., Jin, W., Wang, M., Han, S., Abomohra, A.E-F., Wu, W-M. 2016. Improving of lipid productivity of the biodiesel promising green microalga *Chlorella pyrenoidosa* via low-energy ion implantation. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-015-0783-2.
- Weignerová, L., Simerská, P., Kren, V. 2009. α -galactosidases and their applications in biotransformations, *Biocatal. Biotransfor.* 27: 79–89.
- Wolosowska, S., Synowiecki, J. 2004. Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. *Food Chemistry* 85: 181-187.
- Xi, F., Wu, J., Jia, Z., Lin, X. 2005. Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Proc Biochem.* 40: 2833–2840.
- Yada, E., Nagata, H.N., Noguchi, Y., et al. 2005. Arginine specific protease from *Spirulina platensis*. *Mar. Biotechnol.* 7: 474–480.
- Yong, S.K., Lim, B.H., Saleh, S., Tey, L-H. 2016. Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629), *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 126: 99–105.
- You, T., Barnett, S.M. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem Eng J.* 19: 251–258.
- Zadow, J.G.Z. 1993. Economic considerations related to the production of lactose and lactose by-products. *Lactose hydrolysis, IDF Bulletin* 289. IDF, Brussels, 10-15 p.

- Zarate, S and Lopez-Leiva., M.H. 1990. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review. *Journal of Food Protection* 53(3): 262-268.
- Zhu, C.J et Lee, Y.K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9: 189–194.
- Zhu, D., Wu, Q., Wang, N. 2011. Industrial enzymes, in: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Academic Press, Burlington, 3–13 p.