

ÉVALUATION DE LA CROISSANCE D'UNE SOUCHE DE SPIRULINE AUTOCHTONE ISOLÉE DU SAHARA ALGERIEN (*ARTHROSPIRA SP.*) ET ÉTUDE DE L'EFFET DE L'INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE SUR LE TAUX DE PHYCOCYANINE

CHENTIR Imène¹ et
DOUMANDJI Amel¹

1. Laboratoire de
Biotechnologie des
Productions et Végétales,
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie,
Université de Blida 1, BP
270, Route de Soumâa,
Blida (Algérie) Email :
chentir.imene@hotmail.com

Reçu le 22 aout 2015,
accepté le 19 mai 2016

Résumé

La Spiruline (Arthrospira sp) est une cyanobactérie qui a longtemps était utilisée comme source alimentaire vu sa richesse nutritionnelle, où les protéines pourraient atteindre les 70% PS. Cette cyanobactérie a fait l'objet de plusieurs études dans de nombreux pays, parmi ces derniers, l'Algérie, qui représente une ressource naturelle locale de spiruline (Arthrospiras) et tente à son tour d'aller vers sa valorisation. C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail, dont le but est l'évaluation de la croissance d'une souche d'Arthrospira sp isolée depuis le désert du Sahara. Cultivée à une température de 30°C et sous une lumière de 60 µmol photons m² S⁻¹ dans le milieu Zarrouk, la détermination de son profil nutritionnel, et étude de l'influence de la variation de l'intensité de lumière (10, 20, 40 et 60 µmol photons m² S⁻¹) sur le taux de phycocyanine produite sur des cultures axéniques (n= 12). Cette étude indique que cette souche s'adapte rapidement aux conditions choisies et au milieu Zarrouk, avec une biomasse maximale de 0,67 ± 0,0043 g/L au bout de 4 jours de culture et que d'après son profil nutritionnel, cette souche est riche en protéines (58,15% ± 5.45 PS) mais relativement faible en phycocyanine (5,02% ± 1,35). L'analyse statistique (ANOVA) a montré que le taux de phycocyanine extraite est significativement influencé par la variation de la lumière induite dans l'expérimentation et ainsi, pourrait être améliorée en contrôlant les conditions de lumière. Le taux le plus élevé en phycocyanine (9,1% ± 0,07 PS) a été enregistré à des lumières faibles (10 µmol photons m² S⁻¹).

Mots clés : *Arthrospira sp, culture, lumière, protéines, phycocyanine*

INTRODUCTION

La spiruline connaît depuis quelques décennies un regain d'intérêt par la communauté scientifique, de par sa richesse nutritionnelle, notamment en protéines (jusqu'à 70% du poids sec total) et est devenue l'objet d'une large gamme d'application et d'utilisation, à la fois en nutrition, en pharmacologie, et en cosmétologie [1]. La composition fort intéressante en protéines, en phycocyanine, en Acide γ -linoléique, fait de la spiruline, d'une part, un bon complément alimentaire testé à travers des études précliniques et cliniques de

réhabilitation nutritionnelle [2, 3]. D'une autre part, des travaux ont indiqué que le genre *Arthrospira* pouvait avoir des effets thérapeutiques importants notamment des effets antioxydants et anti-inflammatoire [4,3 et 5], anti-cancer [6] et hypocholestérolémiant [7] du à la présence de phycocyanine. Parallèlement à ces multiples intérêts, cette cyanobactérie a fait aussi l'objet de quelques études en l'Algérie, qui représente une ressource naturelle locale de spiruline (*Arthrospiras*) et tente à son tour d'aller vers sa valorisation.

Revue Agrobiologia, (2016), volume 6(2)

Ainsi sur le plan alimentaire Doumandji *et al.* [8] ont essayé de mettre en place un nouveau produit céréalier type Couscous enrichi en Spiruline où le taux de protéines du Couscous basique a été majoré avec l'ajout de la Spiruline. Aussi, dans un second travail, Doumandji *et al.* [7] ont montré l'effet hypocholestérolémiant d'un régime à base de Spiruline autochtone isolée en association avec *Bifidobacterium adolescentis in vivo et in vitro*. Cependant, à notre connaissance, peu d'études se sont intéressées au côté biotech-nologique de la culture de cette souche autochtone. Il est connu actuellement que la production de microalgues, notamment d'*Arthrospira*, dépend essentiellement des conditions environnementales, pouvant influencer leur croissance, et provoquant des changements dans leur composition [9, 10]. L'intensité de la lumière et la température sont deux facteurs importants qui affectent les microalgues notamment chez la Spiruline. Plusieurs études ont traité l'effet de ces deux facteurs environnementaux, en plus du pH, du carbone, et de la salinité, sur la croissance et la composition des microalgues, notamment la Spiruline [11, 12, 13, 14 et 15]. C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail, dont l'objectif est l'évaluation de la composition et la cinétique de croissance d'*Arthrospira sp* isolée du Sahara Algérien et l'investigation de son taux de phycocyanine par l'exposition des cultures à différentes intensités de lumière. Cependant, plusieurs travaux ont conclu que les intensités de lumières utilisées pour la culture de quelques microalgues contenant des

phycobiliprotéines, notamment la phycocyanine, tel que *Nostoc sp*, auraient un effet antagoniste sur la synthèse de ces molécules [16, 17]. En se basant sur ces considérations, nous proposons donc d'utiliser des intensités de lumière inférieures aux intensités de lumière communes de culture citées dans la bibliographie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Echantillonnage et conduite de la culture mère

Les échantillons de Spiruline (*Arthrospira sp*) ont été prélevés depuis la Guelta du Palmier, à Tamenrasset dans le désert du Sahara Algérien, à une altitude de 1824m. Les échantillons recueillis ont été traités par filtration et dilution afin de purifier les cellules suivant le protocole de Khatum [18]. Cette cyanobactérie a été maintenue dans des flacons d'1 L et cultivée en batch en triplicata dans le milieu Zarrouk (1966) [19] contenant en g. L⁻¹ : NaNO₃, 2.50; K₂HPO₄, 0.50; NaHCO₃, 10.00; NaCl, 1.00; MgSO₄·7 H₂O, 0.2; CaCl₂·2H₂O, 0.02; FeSO₄·7H₂O, 0.01, 1mL solution d'oligo-éléments (g L⁻¹): 2.86 H₃BO₃, 1.81 MnCl₂ 4H₂O, 0.39 Na₂MoO₄ 2H₂O, 0.079 CuSO₄ 5H₂O, 0.049 Co(NO₃)₂ 6H₂O, et 0.222 ZnSO₄ 7H₂O, avec un ensemencement initial de 0,093g/L, dans les conditions communes de croissances d'une température de 30°C et d'une intensité de lumière de 60 μmol photons m⁻² S⁻¹ préétablies par Danesi *et al.* [20]. Le pH a été ajusté à 9,2. Cette culture mère va servir dans un premier temps à l'étude du comportement de la croissance d'*Arthrospira sp* isolée en suivant la cinétique de la concentration de sa biomasse (g/L) qui est déterminée

quotidiennement par la mesure de la densité optique (670nm), (JAS.CoV-630 Spectrophotometer) de chaque prélèvement et la comparaison des valeurs enregistrées avec une courbe d'étalonnage du poids sec en fonction de la l'absorbance antérieurement effectuée selon la méthode de Costa *et al.* [21]. Dans un second temps, la culture mère servira à la détermination du profil nutritionnel de cette souche. Après 8 jours de culture, la biomasse est récoltée par filtration sur toile en nylon (20μm de diamètre), lyophilisée et maintenue à -20°C afin d'être analysée en, lipides totaux, sucres neutres, phycocyanine et protéines.

2. Conduite des cultures expérimentales

Quatre cultures expérimentales axéniques en batch d'*Arthrospira sp* purifiée ont été menées en triplicata, effectuées dans des Erlen Mayer stériles de 2L contenant 1,5L du milieu Zarrouk [19], et soumises aux mêmes conditions de température (28°C), de pH (9,2) et d'agitation. L'ensemencement a été réalisé simultanément à 10% à partir de la culture mère (0,08 ±0,0047 g/L) pour les quatre cultures expérimentales. Ces cultures ont été traitées par des intensités de lumière différentes : 10, 20, 40 et 60 μmol photons m⁻² S⁻¹ Choisies sur la base de la bibliographie et des expériences préliminaires. Après 10 jours de culture, la biomasse obtenue des cultures expérimentales a été récupérée par filtration sur toile en nylon (20μm de diamètre), lyophilisée et maintenue à -20°C afin d'être analysée en phycocyanine.

Toutes les cultures menées dans cette étude, ont été effectuées sous des conditions de lumière et de température contrôlée. Un tube lumineux d'une puissance de 46W donnant une lumière blanche, a été utilisé. L'intensité de la lumière incidente a été mesurée à l'aide d'un photomètre type QSPAR Quantum Sensor.

3. Dosage nutritionnel

3.1. Extraction et quantification des lipides

Les lipides totaux ont été estimés par gravimétrie selon la méthode de Folch [22]. Une quantité de biomasse lyophilisée est pesée (environ 10mg) et mélangée à 2mL d'un solvant composé de chloroforme et de méthanol (2 : 1 v/v). La mixture est agitée pendant 15min à l'aide d'un shaker à une température ambiante. L'extrait obtenu est ensuite filtré sur membrane à 0,22µm de diamètre (Millipores) et 10mL d'eau distillée sont ajoutés. Une fois que les deux phases sont bien distinguées, la phase supérieure est prélevée et évaporée avec du N₂. Les lipides totaux sont exprimés par mg de lipides par mg de biomasse.

3.2. Extraction et quantification sucres neutres

Les sucres neutres ont été analysés par la méthode de Dubois [23]. Brièvement, 5mg d'*Arthrospira sp* lyophilisée est soumise à un milieu sulfurique à chaud, cette réaction donne des dérivés du furfural qui se condensent avec le phénol (5%) pour donner un complexe de couleur brun, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de sucres neutres. La densité optique est déterminée à 490 nm. La

concentration des sucres neutres est obtenue par courbe d'étalonnage préétablie. Le taux sucres neutres est exprimé par mg de sucres neutre par mg de biomasse.

3.3. Extraction et quantification phycocyanine

L'extraction de la phycocyanine est réalisée à partir de 10mg de biomasse lyophilisée suspendue dans 10mL de CaCl₂ puis filtrée sur papier Whatman(0,47µm) après 24h, suivi d'une centrifugation à 4000tr/min pendant 30min. La concentration de phycocyanine est déterminée selon la formule suivante établie par Bryant et al (1976) [24] et après lecture de la DO à 620 et 650nm : $[Pc] = (DO\ 620 - 0,72\ DO\ 650)/6,29$ (en mg/mL d'extrait). Le taux de phycocyanine est exprimé par mg de phycocyanine par mg de biomasse.

3.4. Extraction et quantification protéines

Les protéines ont été analysées suivant la méthode de Bradford [25]. Brièvement, pour 1 mg de biomasse, 1 mL tampon phosphate est ajoutée et laisser pendant 48H. Pour un triplicata de 100µL, on ajoute, 1mL de Réactif de Bradford. La mesure de la densité optique est effectuée à 595nm. La concentration des échantillons en protéines est alors déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations croissantes connues. Le taux protéines est exprimé par mg de protéines par mg de biomasse.

4. Analyse statistiques des données

Les valeurs de phycocyanine

obtenues suite au traitement par différentes intensités de lumière sont comparées par ANOVA à l'aide du logiciel SPPSS (version 19) à un seuil de signification de 0,5%.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Culture mère d'*Arthrospira sp*.

1.1. Cinétique de croissance

La croissance de la souche saharienne d'*Arthrospira sp* a été évaluée par le suivi de l'évolution de la concentration de biomasse de la culture mère, en batch, sur une période de 8 jours sous une lumière de 60 µmol Photons m⁻²s⁻¹, 30°C de température et un pH de 9. Sous ces conditions, le maximum de concentration de biomasse a été de 0,67 ± 0,0043 g/L. La cinétique de croissance (Fig. 1) indique que la phase exponentielle est observée entre les jours 2 et 4 de la culture où le poids sec passe de 0,28 ± 0,003 g/L à 0,67 ± 0,004 g/L. Alors que la phase de latence a été observée du jour 1 au jour 2. Dans cette phase la concentration en biomasse n'a pas été différente de celle enregistrée lors de l'ensemencement (jour 0) (0,117 ± 0,0044 g/L et 0,080 ± 0,0047 g/L) respectivement. Le 5^{ème} jour de croissance confirme qu'*Arthrospira sp* est entrée en phase stationnaire avec une concentration de biomasse égale à 0,663 ± 0,032 g/L qui se stabilise à la fin de la culture, durant le jour 6 et 7 avec des valeurs de 0,066 ± 0,0095 g/L et 0,0659 ± 0,025 g/L respectivement. Cette même tendance a été observée dans l'étude de Doumandji *et al.* [8], où les trois principales phases décrites ont été observée distinctement.

Cependant, dans notre étude, la phase de latence a été courte et la phase exponentielle a été observée plutôt (jour 2 à jour 4) que celles indiquées dans l'étude de Doumandji *et al.* [8] (jours 7 et 8) ayant travaillé avec un milieu de

culture expérimental donnant une biomasse n'excédant pas les 0,5g/L au moment de la phase exponentielle. Ceci pourrait s'expliquer par l'adaptation rapide et efficace de cette souche saharienne d'*Arthrospira sp* au milieu Zarrouk

[19], qui est en évidence le milieu optimal pour une croissance optimale, mais aussi aux conditions de culture choisies de température et d'intensité de lumière.

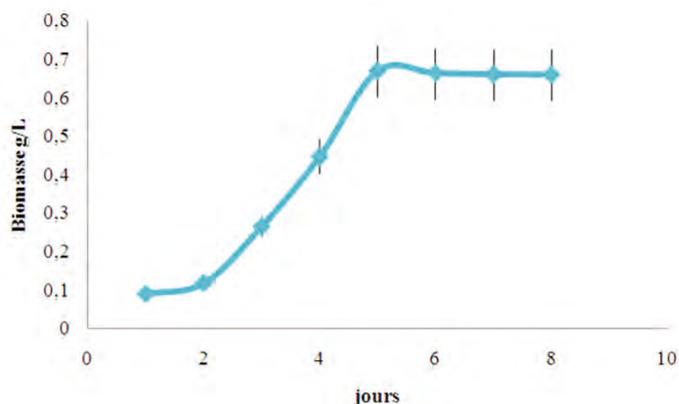


Figure 1 : Cinétique de croissance d'*Arthrospira Sp*, biomasse (g/L) en fonction des jours

1.2. Profil nutritionnel d'*Arthrospira sp*

Les résultats de l'analyse nutritionnelle effectuée sur la biomasse de la culture mère d'*Arthrospira sp* sont présentés dans la figure 2. Ces résultats indiquent que les composants les plus prédominants sont les protéines avec un taux de 58,15%± 5,24 (PS), ajouté à un taux de 5,02%±1,35 (PS) de phycocyanine, suivi des lipides et des sucres estimés à 8,2%±0,6 et

7,2%±0,45 (PS) respectivement. Plusieurs auteurs ont expliqué cette variation dans la composition en composants majeurs du genre *Arthrospira* par les conditions environnementales de culture mais aussi par la souche et l'espèce d'*Arthrospira* elle-même [26]

Plusieurs travaux ont admis que le taux de protéines chez la Spiruline varie entre 55 et 70% [26]. Le taux de protéines obtenu (58,15%± 5,24 PS) montre cette souche étudiée

constitue une bonne source de protéines végétales, où elle est 1,53 fois supérieure que le taux de protéines contenus dans les meilleures sources de protéines végétales notamment le Soja avec 38% faisant d'*Arthrospira* un bon correcteur du taux de protéines des aliments qui en sont pauvres. De plus, selon Charpy [27] le genre *Arthrospira* contient des acides aminés essentiels d'une digestibilité élevée estimée entre 83 % et 90%.

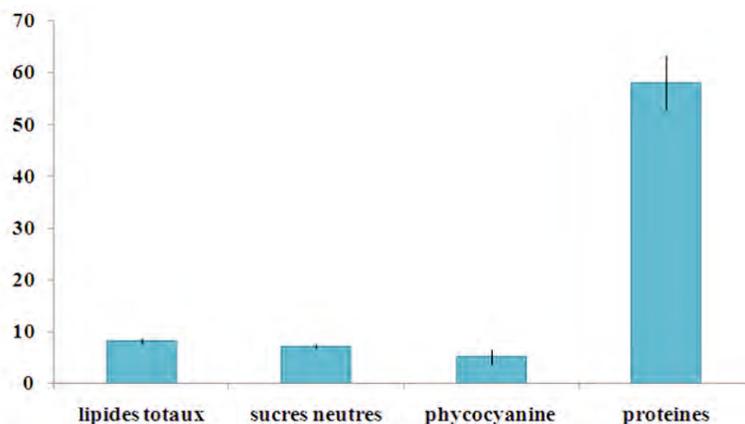


Figure 2 : Profil nutritionnel majeur d'*Arthrospira sp* dans les conditions communes de croissance

Les phycobiliprotéines sont une fraction importante des protéines de la Spiruline dont le composé majeur est la phycocyanine pouvant aller de 15 à 20% [28, 5]. Plusieurs études ont montré principalement l'effet antioxydant et anti radicalaire de la phycocyanine [29,30 et 31]. Ce taux très bas de phycocyanine ($5,02\% \pm 1,35$ PS) contenu dans cette souche d'*Arthrospira* ($5,02\% \pm 1,35$) pourrait s'expliquer par l'environnement extrême à partir duquel elle a été isolée, qui se caractérise par une forte radiation solaire et une forte température allant de 45-55°C en été [32]. Il est donc supposé que cette souche isolée de cet environnement aurait tendance à avoir un mécanisme synthétique pas très efficace pour la production de phycocyanine.

Le taux de lipides totaux obtenu ($8,2\% \pm 0,6$ PS) est compris dans l'intervalle atteint dans plusieurs travaux allant de 5,6 à 11% [33], [34], [35], [36]. Il est bien établi que la Spiruline n'est pas riche en lipides devant à d'autres microalgues tel que *Dunaliella tertiolecta* avec 71,4% [37] et *Chlorella protothecoides* avec 15-55 % [38]. Cependant, la fraction lipides du genre *Arthrospira* se

caractérise par un bon équilibre d'acides gras saturés et insaturés [39]. De plus, sur un plan technologique, l'absence de lipides en un taux élevé chez *Arthrospira*, lui confère une stabilité lors de la conservation du produit fini, évitant ainsi leur oxydation et leur rancissement. Le taux de sucres neutres atteint dans ce travail est de $7,2\% \pm 0,45$ (PS), une valeur inférieure à celle trouvée dans plusieurs travaux, qui varie en moyenne entre 10 et 25% [40], [41].

2. Variation du taux de phycocyanine dans les cultures expérimentales d'*Arthrospiras*

Se basant sur les résultats préliminaires de cette étude et ayant obtenu un taux bas en phycocyanine dans les conditions de culture communes de lumière ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$), les résultats de l'effet des différentes intensités de lumière sur le taux de phycocyanine d'*Arthrospira sp* étudiée (Fig. 3) montrent que pour l'ensemble des cultures expérimentales, le taux de phycocyanine varie de $5,45\% \pm 0,58$ à $9,10\% \pm 0,07$ % (PS). La valeur maximale ($9,10\% \pm 0,07$ PS) a été obtenue lorsque les cultures sont soumises à des intensités de lumière

faibles égales à $10 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$. L'analyse statistique a montré que le taux de phycocyanine a été influencé significativement par les différents traitements d'intensité de lumière ($p < 0,05$). En effet la phycocyanine, et les phycobiliprotéines en général, sont des pigments secondaires de la photosynthèse, leur taux chutent quand les intensités de lumière sont très importantes, cette chute sert à prévenir l'excès d'absorption de lumière et joue ainsi un rôle photo-protecteur [42]. Ce phénomène photo-protecteur a été étudié sur la cyanobactéri *Nostoc spp*, il se produit suite à l'augmentation de l'émission fluorescente par la Pe *Nostoc Spp* qui est induite soit par l'énergie solaire ou UV-B artificiels qui a pour résultat le non transfert d'une quantité d'énergie significative au Photosystème II, ce qui inhibe l'appareil photosynthétique et ainsi l'oxydation de la molécule ciblée. Cependant l'étude de Ma et al. [43] faite sur *Nostoc sphaeroides* a montré que les taux les plus élevés en phycobiliprotéines étaient atteints à des intensités de lumières fortes ($90 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$)

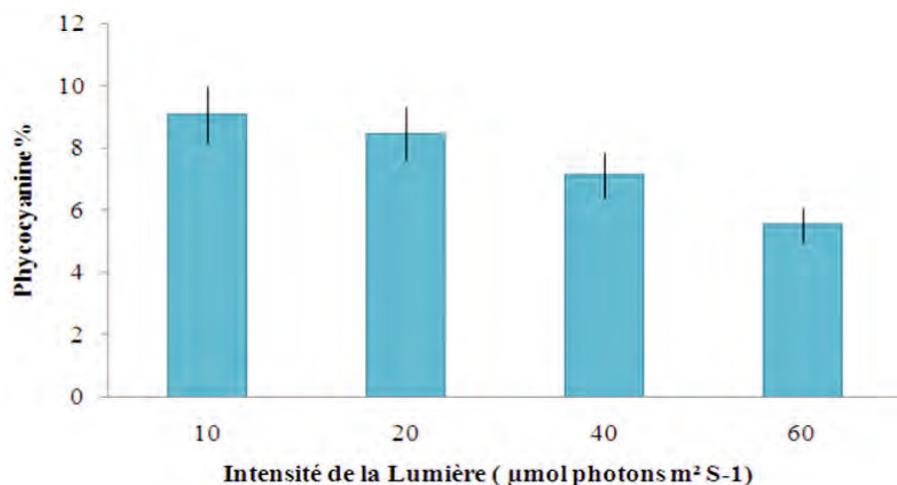


Figure 3 : Taux de phycocyanine d'*Arthrospiras*(%) en fonction de l'intensité de la lumière ($\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$)

A l'inverse, l'étude d'Olievra *et al.* [16] sur une autre souche de *Nostoc spp* affirment que le taux de la phycocyanine est à son maximum quand l'intensité de lumière est faible de $10\mu\text{mol Photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$. De même, Pojidaeva *et al.* [17] rapportent, dans leur étude sur *Synechocystis sp*, qu'à de fortes intensités de lumière, les phycobilibiprotéines diminuent, et ce à cause de la diminution de leur synthèse et l'augmentation de leur dégradation par les protéases. Parallèlement, notre résultat confirme l'hypothèse émise sur le fait que les environnements extrêmes, dont les radiations solaires sont élevées, affaiblissent les mécanismes de production de

phycocyanine. Ainsi en baissant l'intensité de la lumière de 60 à $10\mu\text{mol Photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$ il s'y est produit une amélioration de presque 2 fois du taux de phycocyanine.

CONCLUSION

Arthrospira sp, isolée du Sahara algérien, représente une source naturelle importante de composants bioactifs utiles à la nutrition humaine notamment en protéines. Bien que son taux de phycocyanines soit faible par rapport aux résultats présentés dans la bibliographie dans les conditions communes de culture, *Arthrospira sp* Saharienne a montré une grande flexibilité

métabolique significative, lui permettant une amélioration de son taux de phycocyanine quand les conditions de lumières sont réduites. L'influence statistique significative de la lumière sur le taux de phycocyanine confirme ainsi que les lumières nécessaires à la croissance d'*Arthrospira sp* ne sont pas forcément celles qui stimulent la synthèse de la phycocyanine, et laisse envisager d'élargir l'étude vers d'autres intervalle d'intensités de lumière mais également d'autres facteurs environnementaux, afin d'avoir une meilleure amélioration dynamique du taux de phycocyanine

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Skjånes, K., Rebours, C., Lindblad, P. (2012). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process, *Crit Rev Biotechnol*, 1-44
- [2] Simpoire, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., Bondi, D., Rubrto, G., Musumeci, S. (2006) Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutrition Journal*. 2006, 5 (3), 1-7.
- [3] Estrada, J.E., Bermejo Bescos, P., Villar Del Fresno, A.M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract, // *Farmaco*, 56, 497-500.
- [4] Romay, C., Ledon, N., Gonzalez, R. (1998). Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflammation Research*, 47, 334-338
- [5] Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*. 47(1), 36-41.
- [6] Mishima, T., Murata, J., Toyoshima, M., Fujii, H., Nakajima, M., Hayashi, T., Kato, T., Saiki, I. (1998). Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical and Experimental Metastasis*, 16, 541-550
- [7] Doumandji, A., Allili, D., Benzaïche, A. (2012). The Effect of a Dietary Supplement *Spirulina* and *Bifidobacterium adolescentis* on the Cholesterol-Lowering in Vitro and in Vivo, *Journal of Life Sciences*, 6, 740-746
- [8] Doumandji, A., Boutekrabb, L., Saidi, N., A., Doumandji, S., Hamerouch, D., Haouari, S. (2009). Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal, *Nature et Technology (Algérie)*, 06, 40-50
- [9] Pandey, J.P., Tiwari, A., Singh, S., Tiwari, D. (2011). Potential of different light intensities on the productivity of *Spirulina maxima*. *J of Algal Biomass Utilization*, 2, 9-14

- [10] Hu, Q., (2004). Industrial production of microalgae cell mass and secondary products major industrial species : *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In Richmond, A. Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology, Blackwell, Oxford, 264-272.
- [11] Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S., Richmond, A. (1982). Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density, *Biomass*, 2, 175-185.
- [12] Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. D. O., De Carvalho, J. C. M. and Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*, *Biomass and Bioenergy*, 23(4), 261-269.
- [13] Zhang, T., Gong, H., Wen, X., Lu, C. (2010). Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacteria *Spirulina platensis*, *J. Plant Physiol*, 167, 951-958
- [14] Chaiklahan, R., Khonsarn, N., Chirasawan, N., Ruengjitchachawalya, M., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (2007). Response of *Spirulina platensis* C1 to high temperature and high light intensity. Kasetsart J, *Nat. Sci*, 41, 123-9.
- [15] Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D. (2011). Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresour Technol*, 102, 10-6.
- [16] Oliveiraa, C.A., Oliveiraa, W. C., Sônia ; Ribeirob, M.R. , Stringhetac, P.C., Do Nascimento, A.G. do. (2014). Effect of light intensity on the production of pigments IN NOSTOC SPP, *European Centre for Research*, 2(1), 23-36.
- [17] Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Shestakov, S.V., and Sokolenko, A. (2004). Involvement of the SppA1 Peptidase in Acclimation to Saturating Light Intensities in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, *J. Bacteriol*, 186, 3991-3999
- [18] Khatum, R., Hossain, M.M., Begum, S.M.S., Majid, F.Z. (1994). *Spirulina* culture in Bangladesh IV. Development of simple, inexpensive culture media suitable for rural or domestic level cultivation of *Spirulina* in Bangladesh. (Bangladesh), *J. Sc. Ind. Res*, 29, 163-166.
- [19] Zarrouk, C. (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Ph.D. Thesis, University of Paris, Paris, France
- [20] Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Sato, S., De Carvalho, J.C. (2011). Growth and Content of *Spirulina Platensis* Biomass Chlorophyll Cultivated at Different Values of Light Intensity and Temperature Using Different Nitrogen Sources, *Braz J Microbiol*, 42(1), 362-373.
- [21] Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, Filho, P.F., Kabke, K., Weber, A. (2002) Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J Microbiol Biotechnol*, 18, 603-607
- [22] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animals Tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226 (1), 497 - 509.
- [23] Dubois, M., Gillies, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances, *Anal. Chem*, 28, 350-356.
- [24] Bryant, D.A., Glazer, A.N., Eiserling, F.A. (1976). Characterization and Structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp, *Arch. Microbiol*, 110, 61-75.
- [25] Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- [26] Hu, Q., (2013). Environmental effects on cell composition. In: Richmond, A., Hu, Q. Handbook of microalgae culture: applied phycology and biotechnology. Wiley, Oxford, 114-122.

- [27] Charpy, L., Langlade, M.J., Alliod, R. (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique, N°17, 31-41.
- [28] Sall, M.G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehua, E., Kuakuwin, N. (1999). Résultats d'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline à Dakar; 46 (3), 143-146.
- [29] Chopra, K., Bishnoi, M. (2007). Antioxydant profile of Spirulina. Blue-Green microalgae in Spirulina in Gershwin & belay (Ed.) Spirulina in *Human Nutrition and Health*. 101-118.
- [30] Wu, L.C., Hu, J.A. (2007). Antioxydative and Hepatoprotective effect of Spirulina in Gershwin & belay (Ed.) Spirulina in *Human Nutrition and Health*. 119-151
- [31] Chen, T., Wong, Y.S. (2008). In vitro antioxidant and antiproliferative activity of selenium-containing phycyanin from selenium-enriched Spirulina Platensis, *Journal food chemistry*, 56 (12), 4352-4356
- [32] Grama, B.S., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S.N., Clayton, J. (2014). Induction of canthaxanthin production in a Dactylococcus microalga isolated from the Algerian Sahara, *Bioresource Technology*, 151, 297-305.
- [33] Ross, E., Dominy, W., (1990). The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (Spirulina platensis) for poultry. *Poultry Science*, 69(5), 94-80.
- [34] Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang, Z., Li, Z., Cai, Y., Ou, C., Lin, H., Imbs, A. (2002). Molecular species composition of glycolipids from Spirulina platensis. *Food Chemistry*, 77, 9-13.
- [35] Harriman, G.R., Smith, P.D., Horne, M.K., Fox, C.H., Koenig, S., Lack, E.E., Lane, H.C. (1989). Vitamin B12 malabsorption in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 149 (9), 2039-2041.
- [36] Girardin-Andréan, C. (2005). Spiruline : système sanguin, système immunitaire et cancer. *Phytothérapie*, 4, 158-161.
- [37] Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cell. *J Biosci Bioeng*. 101 (3), 223-226
- [38] Xu, H., Miao, X.L., Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499-507
- [39] Charpy, L., Langlade, M.J., Vicente, N. (2004). Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement". *Colloque international*. 1-6.
- [40] Fox, R.D. (1999). La Spiruline : Technique, Pratique et Promesse. EDISUD. Aix en Provence. N°26
- [41] Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., Georgakakis, D. (2013). Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis, *Energies*, 6, 3937-3950
- [42] Aráoz, R., Häder, D.P. (1999). Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV-B in the cyanobacterium Nostoc. *Plant Physiol Biochem*, 37, 223-229.
- [43] Ma, R., Lu, F., Zhengyu, Y.B. (2015). Effects of light intensity and quality on phycobiliprotein accumulation in the cyanobacterium Nostoc sphaeroides Ku'tzing, *Biotechnol Lett*, 37, 1663-1669