

Recherche des facteurs les plus influents sur le rendement et la qualité de l'agar- agar de la rhodophycée *Gelidium spinosum* (S.G. Gmelin) P.C. Silva

Rafik BEN SAID^{1*}, Mohamed Salah ROMDHANE², Amor EL ABED¹ et Ridha M'RABET¹

¹Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM). Salammbô. 28 Rue 2 Mars 1934, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Marines, Le Kram. 2025 Tunis, Tunisie

²Institut National Agronomique de Tunisie (INAT)

* Correspondance, courriel : rafik.bensaid@instm.rnrt.tn

Résumé

Cinq (5) facteurs physico-chimiques : concentration en carbonate de sodium, température et durée de carbonatation, temps de digestion et pression, ont été étudiés simultanément pour voir leur effet sur l'extrait d'agar de *Gelidium spinosum*. L'étude a mis en évidence l'influence plus ou moins importante de chacun de ces facteurs sur les réponses recherchées (rendement d'extraction, force de gel, point de gélification et point de fusion). Différentes interactions plus ou moins importantes ont pu être également mises en évidence entre les facteurs étudiés.

Mots-clés : *gelidium spinosum*, facteurs influents, interactions, agar-agar, rendement, qualité.

Abstract

Research of influent factors on agar-yield and quality of the rhodophyta *Gelidium spinosum* (S.G. Gmelin) P.C. Silva

Study of simultaneous effects of five (5) factors: concentration of sodium carbonate, temperature, carbonatation and digestion periods, and finally pressure, showed that each factor has more or less importance on these responses: agar-yield, gel strength, gelling and melting temperatures. Besides, interactions between these factors have been investigated.

Keywords : *gelidium spinosum*, influent factors, interactions, agar-yield, quality.

1. Introduction

Les végétaux marins, en général et les algues en particulier ne cessent d'attirer de plus en plus l'attention des chercheurs et des industriels, essentiellement pour la découverte et la valorisation de molécules ayant un potentiel économique important. C'est ainsi que l'intérêt porté, plus particulièrement aux polysaccharides pariétaux des algues marines est en progression continue de par le monde. Les espèces les plus recherchées dans ce domaine appartiennent aux algues brunes et aux algues rouges pour en extraire les alginates à partir de la première catégorie, les carraghénanes et les agars, de la seconde. Les algues collectées à travers le monde s'élèvent à 1 million de tonnes fraîches pour produire environ 55000

tonnes d'hydrocolloïdes [1]. Ces phycocolloïdes sont utilisés dans différents domaines pour leur pouvoir gélifiant et épaississant. La collecte des algues est effectuée généralement dans des champs naturels, mais la culture de plusieurs espèces est une activité de routine dans les pays asiatiques, tels que la Chine, la Corée et le Japon. Dans ce cadre, plusieurs espèces productrices de phycocolloïdes sont aussi bien récoltées que cultivées à l'échelle industrielle telle que l'alginophyte *Laminaria japonica* J.E. Areshoug., les carraghénophytes *Eucheuma saposum* Agardh, *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux [2] et les agarophytes appartenant aux genres *Gracilaria* [1] et *Gracilariopsis* [3]. Par ailleurs, parmi les algues agarophytes les plus recherchées commercialement, figurent les genres *Gelidium*, *Pterocladia* (= *Pterocladia*) [4]. Les algues appartenant au genre *Gelidium* constituent la principale matière première pour la préparation de la gélose ou agar-agar, soit 44% de la production mondiale après les gracilaires qui contribuent pour 53% à la production [5,6]. Dans ce cadre, différentes espèces de *Gelidium* telles que *G. sesquipedale* (Clem.) Bornet et Thuret., vivant sur les côtes marocaines [2], et dans la péninsule ibérique, *G. pristoides* (Turner.) Kützinger en Afrique du Sud, *G. robustum* (Gardner.) Hollen. & Abb. du Mexique, *G. amansii* (Lamouroux), au Japon, ainsi que d'autres espèces vivant au Chili font l'objet de collectes naturelles et de quelques essais de culture en mer tels qu'en Espagne, les tonnages récoltés sont très différents selon les pays [7].

En Tunisie, l'intérêt à la valorisation des algues marines est très récent, comparé à plusieurs pays. Il date d'une dizaine d'années. L'algue choisie pour le démarrage des travaux de recherche a porté sur la rhodophycée *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss réputée pour avoir un agar de bonne qualité sachant qu'elle est cultivée depuis longtemps dans différents pays tels que la Chine, le Chili, les Philippines, etc. Ces travaux ont porté sur l'étude de leurs potentialités et la cartographie des peuplements dans deux plans d'eau : le lac nord de Tunis et le lac de Bizerte [8,9,10]. Puis, des essais de culture à l'échelle expérimentale de cette algue ont été réalisés dans le lac de Bizerte, au nord de la Tunisie [11]. L'extraction de l'agar-agar à partir de cette algue a fait également l'objet de travaux dans le but d'explorer les potentialités des ressources algales tunisiennes [12]. La rhodophycée *Gelidium spinosum* (S.G. Gmelin.) Silva, a été signalée en Tunisie sous le nom de *G. latifolium* (Gréville) Thuret et Bornet., seulement à Tabarka, Le Galiton, Cap Serrat, Bizerte, Sousse ; mais pourrait se trouver dans d'autres localités [13,14]. Cette algue a fait l'objet d'une première étude en Tunisie de point de vue éco-morphométrique [15], sous le nom de *Gelidium latifolium*. Hormis ce travail, il n'y a pas eu, à notre connaissance, d'autres travaux sur la même espèce ni dans la même localité ni dans d'autres zones tout le long de la côte tunisienne. La Tunisie est un pays importateur de phycocolloïdes dont l'agar-agar et ne dispose pas actuellement de base industrielle en algues marines. Pour cette raison, le présent travail a pour objectif la contribution à l'étude des potentialités en agar de *Gelidium spinosum* de Tunisie, en faisant varier simultanément certains facteurs physico-chimiques pendant les opérations d'extraction à l'échelle expérimentale pour voir leurs effets sur l'extrait obtenu et connaître ceux qui sont les plus influents le rendement et la qualité du produit obtenu.

2. Matériel et méthodes

Le matériel biologique utilisé est constitué de l'algue rouge *Gelidium spinosum*. L'échantillonnage a été effectué sur la côte rocheuse de Monastir à l'Est de la Tunisie (**Figure 1**). Les spécimens collectés ont été ramenés au laboratoire où ils ont été bien nettoyés des épiphytes et du sable. Les algues ont été séchées tout d'abord au soleil, puis à l'étuve à 60°C, jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant entre 24 et 48 h.

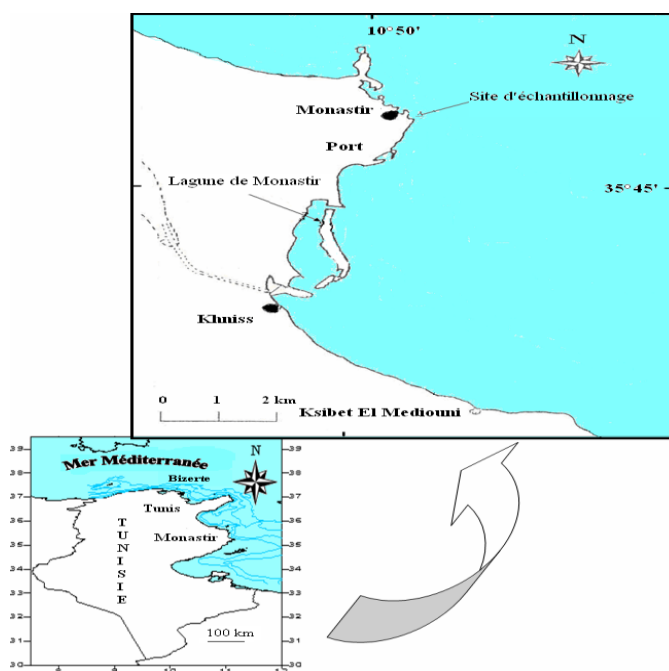


Figure 1 : Zone de récolte de *Gelidium spinosum*

De lots de 15g d'algues sèches ont été préparés pour en extraire l'agar-agar. La méthode utilisée dans ce travail est inspirée de celle appliquée à l'IFREMER (France), mais après avoir fait les modifications exposées dans ce papier. Cinq facteurs différents ont été testés simultanément afin d'étudier leur influence sur le rendement, la force de gel, le point de gélification et le point de fusion de l'agar extrait de *Gelidium spinosum*. Ces cinq facteurs sont les suivants: la concentration en carbonate de sodium (X_1), la durée (X_2) et la température (X_3) de carbonatation, le temps de digestion (X_4) et la pression (X_5). Pour ce faire, nous avons appliqué un plan d'expériences fractionnaire 2^{5-1} comportant 16 expériences (plus 3 au centre du domaine expérimental). Ce domaine est donné dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Domaine expérimental

Facteur étudié	Nombre de niveaux par facteur	Niveaux
Concentration en carbonate de sodium (g/l) : X_1	2	2
Durée de carbonatation (mn) : X_2	2	8 30 90
Température de carbonatation ($^{\circ}$ C) : X_3	2	50 100
Durée de digestion (mn) : X_4	2	60 180
Pression (bar) : X_5	2	0.1 1.3

Le plan d'expérimentation est indiqué dans le **Tableau 2**. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel NEMRODW, version 2000 [16].

Tableau 2 : Plan d'expérimentation

N° Essai	Concentration en carbonate de sodium (g/l)	Durée de carbonatation (mn)	Température de carbonatation (°C)	Durée de digestion (mn)	Pression (Bar)
1	2	30	50	60	1.3
2	8	30	50	60	0.1
3	2	90	50	60	0.1
4	8	90	50	60	1.3
5	2	30	100	60	0.1
6	8	30	100	60	1.3
7	2	90	100	60	1.3
8	8	90	100	60	0.1
9	2	30	50	180	0.1
10	8	30	50	180	1.3
11	2	90	50	180	1.3
12	8	90	50	180	0.1
13	2	30	100	180	1.3
14	8	30	100	180	0.1
15	2	90	100	180	0.1
16	8	90	100	180	1.3
17	5	60	75	120	0.7
18	5	60	75	120	0.7
19	5	60	75	120	0.7

2-1. Extraction de l'agar – agar

Une quantité d'algues sèches de 15g a été placée dans une solution de carbonate de sodium ayant une concentration bien déterminée, pendant un certain temps et une certaine température, tel qu'il est indiqué dans le plan d'expérimentation (**Tableau 2**).

Les thalles de *Gelidium* ont été ensuite rincés à l'eau de robinet pendant 1h afin d'éliminer le carbonate de sodium. Puis, ils ont été mis en congélation pendant 24h. Le lendemain, ils ont subi une digestion sous pression dans un certoclave (petit autoclave), dans les conditions indiquées dans le **Tableau 2**. Les algues ont été filtrées ensuite dans un filtre en inox maintenu sous la pression de l'air comprimé fourni par un compresseur. Le filtrat obtenu a été mis en congélation pendant une nuit, après laquelle il a subi une décongélation en lui ajoutant de l'eau de robinet. Une pellicule fine d'agar a été formée. Elle a été récupérée sur une toile à bluter maintenue sur une passoire puis mise à sécher à l'étuve pendant 24h à 105°C. L'agar sec obtenu a été broyé et pesé à l'aide d'une balance de précision de type Bosh. Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de la matière sèche initiale des algues utilisées.

2-2. Etude de la qualité de l'agar-agar

Pour l'étude de la qualité de l'agar obtenu, les trois paramètres suivants ont été suivis : force de gel, point de gélification et point de fusion .La méthode utilisée est celle appliquée à L'IFREMER (France) et que nous avons appliquée pour évaluer la qualité de l'agar-agar de *Gracilaria verrucosa* aussi bien des algues sauvages que de culture [17,18]. Le principe général consiste en l'utilisation, d'un gélomètre pour briser un gel d'agar dans une boîte après 24 h de refroidissement d'une solution d'agar à 1.5 %. Par ailleurs, la détermination des points de gélification et de fusion consiste en l'utilisation, dans le premier cas, d'une petite bille en verre et le suivi de son mouvement dans une solution d'agar chaud contenue dans un tube à essai jusqu'à sa stabilisation et dans le deuxième cas d'une bille en acier maintenue à la surface d'un gel contenu dans un autre tube à essai jusqu'à la chute de la bille. Dans ce dernier cas, le tube à essai est placé dans un bain-marie qui est chauffé lentement, la température étant contrôlée dans les deux cas à l'aide d'un thermomètre ordinaire.

3. Résultats et discussion

Les résultats globaux des 4 réponses expérimentales (Y_1 : rendement ; Y_2 : force de gel ; Y_3 : point de gélification et Y_4 : point de fusion) sont regroupés dans le **Tableau 3**.

3-1. Réponse Y_1 : Rendement d'extraction

Effets des facteurs sur le rendement d'extraction

Les réponses expérimentales Y_1 (rendement d'extraction) varient entre 3.5% (essai n°9) et 29.67% (essais n°1 et 4) de la matière sèche (**Tableau 3**).

Le logiciel NEMRODW calcule les coefficients du modèle mathématique associé au plan fractionnaire 2^{5-1} qui est du 1^{er} degré et dont la formule est la suivante :

$$Y_1 = 19.57 + 0.05X_1 - 0.75X_2 - 0.76X_3 + 0.41X_4 + 6.23X_5 + 2.54X_1X_2 - 3.70X_1X_3 - 0.90X_2X_3 + 0.83X_1X_4 - 0.02X_1X_5 + 0.07X_2X_5 - 2.37X_3X_5 + 1.33X_4X_5 \quad (1)$$

Ces coefficients sont représentés sous forme d'un diagramme plus facilement interprétable (**Figure 2**).

3-1-1. Facteurs influents

Le diagramme tracé sur la **Figure 2** met en évidence l'effet prépondérant de la pression (X_5), suivi de loin par les facteurs: température de carbonatation (X_3) et durée de carbonatation (X_2), qui ont tous les deux presque le même effet. Il permet aussi de préciser que pour augmenter le rendement, il faut maintenir la pression à son niveau supérieur (+1), c'est à dire $X_5 = 1.3\text{bar}$. Alors que la température de carbonatation (X_3) et la durée de carbonatation doivent être maintenues à leur niveaux inférieurs (-1), c'est à dire, respectivement $X_3 = (50^\circ\text{C})$ et $X_2 = (30\text{mn})$. La durée de digestion (X_4) a un effet positif sur la réponse expérimentale, mais de faible importance .Quant à la concentration en carbonate de sodium (X_1), elle n'a pratiquement pas d'effet.

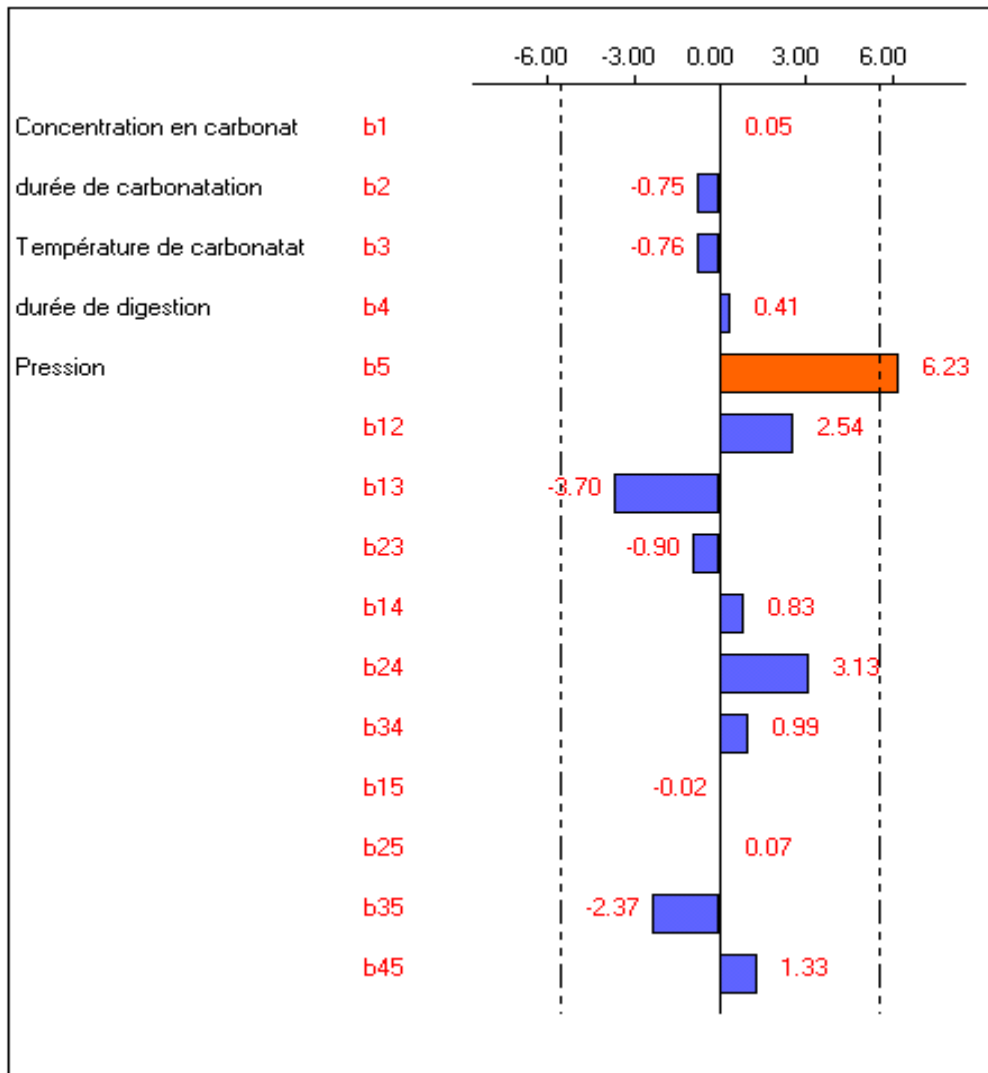


Figure 2 : Etude graphique des effets de la réponse Y1 : Rendement d'extraction

3-1-2. Effets d'interactions

Concernant les interactions entre les facteurs, c'est l'interaction X_1X_3 (entre la concentration en carbonate de sodium et la température de carbonatation) qui est la plus prépondérante, suivie de celle entre la durée de carbonatation et la durée de digestion (X_2X_4) puis l'interaction entre X_1 (concentration en carbonate de sodium) et X_2 (durée de carbonatation). Vient après, l'interaction entre X_3 (température de carbonatation) et X_5 (pression). Les autres interactions sont faibles à quasi-nulles.

3-2. Réponse Y_2 : Force de gel

3-2-1. Effets des facteurs sur la force de gel

Les valeurs expérimentales de la réponse Y_2 (force de gel) s'échelonnent entre un minimum

(20 g.cm⁻²) et un maximum (613 g.cm⁻²). Les valeurs minimales ont été obtenues avec les essais n° 3 et n° 8, tandis que la valeur maximale a été enregistrée avec l'essai n° 5 (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Réponses expérimentales Y_1, Y_2, Y_3 et Y_4
(Rendement d'extraction, force de gel, point de gélification et point de fusion)

N° Essai	Rendement D'extraction (% du poids sec De l'algue)	Force de gel (g.cm ²)	Point de gélification (°C)	Point de fusion (°C)
1	29.67	65.00	30.00	87.00
2	16.03	470.00	35.00	95.00
3	4.04	20.00	27.00	28.00
4	29.67	75.00	33.00	88.00
5	25.67	613.00	34.00	96.00
6	16.56	290.00	34.00	91.00
7	16.14	330.00	34.00	89.00
8	7.06	20.00	27.00	29.00
9	3.50	70.00	34.00	82.00
10	27.30	175.00	34.00	87.00
11	24.87	190.00	34.00	88.00
12	19.10	430.00	35.00	96.00
13	28.16	425.00	36.00	92.00
14	7.21	270.00	34.00	93.00
15	15.61	440.00	34.00	90.00
16	25.60	428.00	34.00	97.00
17	26.50	470.00	35.00	90.00
18	20.81	510.00	33.00	95.00
19	28.36	392.00	34.00	93.00

Le logiciel fournit les coefficients du modèle mathématique du premier degré traduisant la force de gel (Y_2) en fonction des 5 facteurs étudiés :

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & 299.10 + 0.31X_1 - 0.27.81X_2 + 82.56X_3 + 34.06X_4 - \\
 & 22.19X_5 - 3.69X_1X_2 - 100.31X_1X_3 - 19.69X_2X_3 + \\
 & 21.94X_1X_4 + 96.31X_2X_4 + 4.69X_3X_4 - 5.56X_1X_5 + \\
 & 36.31X_2X_5 + 38.44X_3X_5 + 23.19X_4X_5
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

Cette équation est rendue facilement interprétable par le diagramme des effets principaux et des interactions sur la réponse Y_2 = force de gel (**Figure 3**).

a) Facteurs influents

Le diagramme des effets (**Figure 3**) met en évidence l'influence prépondérante de 3 facteurs : la température de carbonatation (X_3), la durée de digestion (X_4) et la durée de carbonatation (X_2). Par ailleurs,

ce diagramme permet de préciser que, pour augmenter la force de gel, il faut que la température de carbonatation (X_3) et la durée de digestion (X_4) soient à leur niveau supérieur : $X_3=+1$ (100°C) et $X_4=+1$ (180mn), alors que la durée de carbonatation (X_2) doit être fixée à son niveau inférieur : $X_2=-1$ (30mn). L'effet de la pression (X_5) vient en 4^{ème} position de l'effet global. Ce facteur doit être maintenu à son niveau inférieur pour augmenter la force de gel : $X_5 = -1$ (0.1bar). La concentration en carbonate de sodium (X_1) n'a pratiquement pas d'effet sur la réponse expérimentale.

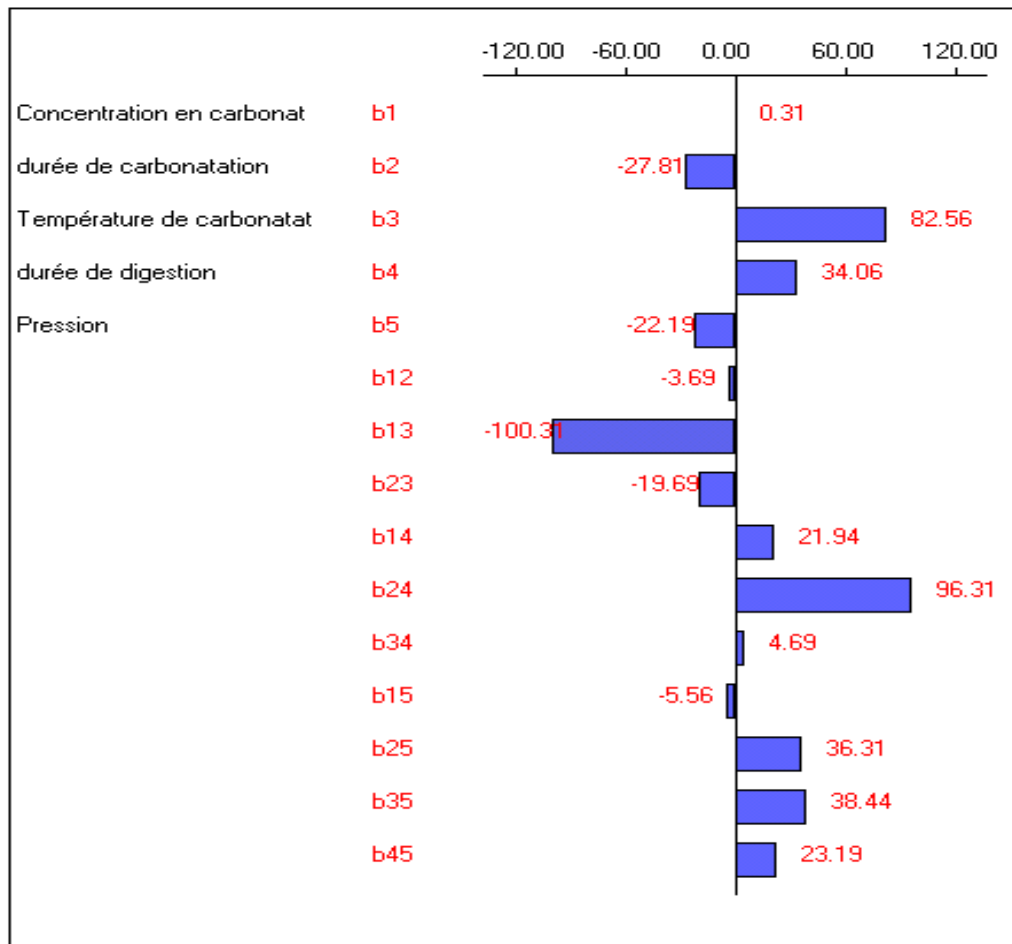


Figure 3 : Etude graphique des effets de la réponse Y2 : Force de gel

b) Effets d'interactions

Outre la mise en évidence des 3 facteurs principaux sur la force de gel, l'analyse de la **Figure 3** permet de faire ressortir l'effet de trois interactions majeures. Ce sont, par ordre décroissant : l'interaction X_1X_3 (concentration en carbonate de sodium -température de carbonatation); l'interaction X_2X_4 (durée de carbonatation -durée de digestion) et l'interaction X_3X_5 (température de carbonatation pression). L'interaction X_2X_5 (durée de carbonatation – pression) vient en 4^{ème} position quant à son effet sur la force de gel. La durée de digestion (X_4) et la pression (X_5) interagissent d'une façon moins importante. Les autres interactions sont faibles voire négligeables.

3-3. Réponse Y_3 : Point de gélification

3-3-1. Effets des facteurs sur le point de gélification

Les résultats pour l'ensemble des expériences relatives au point de gélification sont donnés dans le **Tableau 3**. Il est aisé de remarquer que le minimum (27°C) est obtenu avec les essais n°3 et 8 et le maximum (36°C) est enregistré avec l'essai n°13.

Les calculs fournis par le logiciel permettent d'établir l'équation du modèle mathématique traduisant la variation du point de gélification en fonction des 5 facteurs étudiés et leurs interactions. Cette équation est la suivante :

$$\begin{aligned}
 Y_3 = & 33.21 + 0.19X_1 - 0.81X_2 + 0.31X_3 + 1.31X_4 + \\
 & 0.56X_5 - 0.19X_1X_2 - 1.31X_1X_3 - 0.31X_2X_3 + \\
 & 0.69X_2X_4 - 0.19X_3X_4 - 0.06X_1X_5 + 0.94X_2X_5 + \\
 & 0.56X_3X_5 - 0.44X_4X_5 + 23.19X_4X_5
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

a) Facteurs influents

Les résultats obtenus ont été représentés sous forme d'un diagramme en bâton facilement interprétable (**Figure 4**). Ce diagramme met en évidence les effets prépondérants de 3 facteurs : la durée de digestion (X_4), la durée de carbonatation (X_2) et la pression (X_5). Il permet également de préciser que, pour augmenter le point de gélification, il faut que la durée de digestion (X_4) et la pression (X_5) soient à leur niveau supérieur: $X_4 = +1$ (180 mn) et $X_5 = +1$ (1.3bar). En revanche, la durée de carbonatation doit être maintenue à son niveau inférieur : $X_2 = -1$ (30 mn). Les deux autres facteurs restants ont un effet moins important. Ces deux facteurs sont respectivement la température de carbonatation et la concentration en carbonate de sodium. Néanmoins, il faudrait les maintenir à un niveau légèrement supérieur à 0 (entre 0 et 0.5) pour augmenter la réponse expérimentale

b) Effets d'interactions

En plus des effets principaux, le graphique des effets (**Figure 4**) permet de faire ressortir l'influence de 3 interactions prépondérantes : l'interaction entre la concentration en carbonate de sodium (X_1) et la température de carbonatation (X_3) ; l'interaction entre la durée de carbonatation (X_2) et la pression (X_5) et finalement l'interaction entre la durée de carbonatation (X_2) et la durée de digestion (X_4). Vient en 4^{ème} position, l'interaction entre la température de carbonatation (X_3) et la pression (X_5), mais avec une moindre importance.

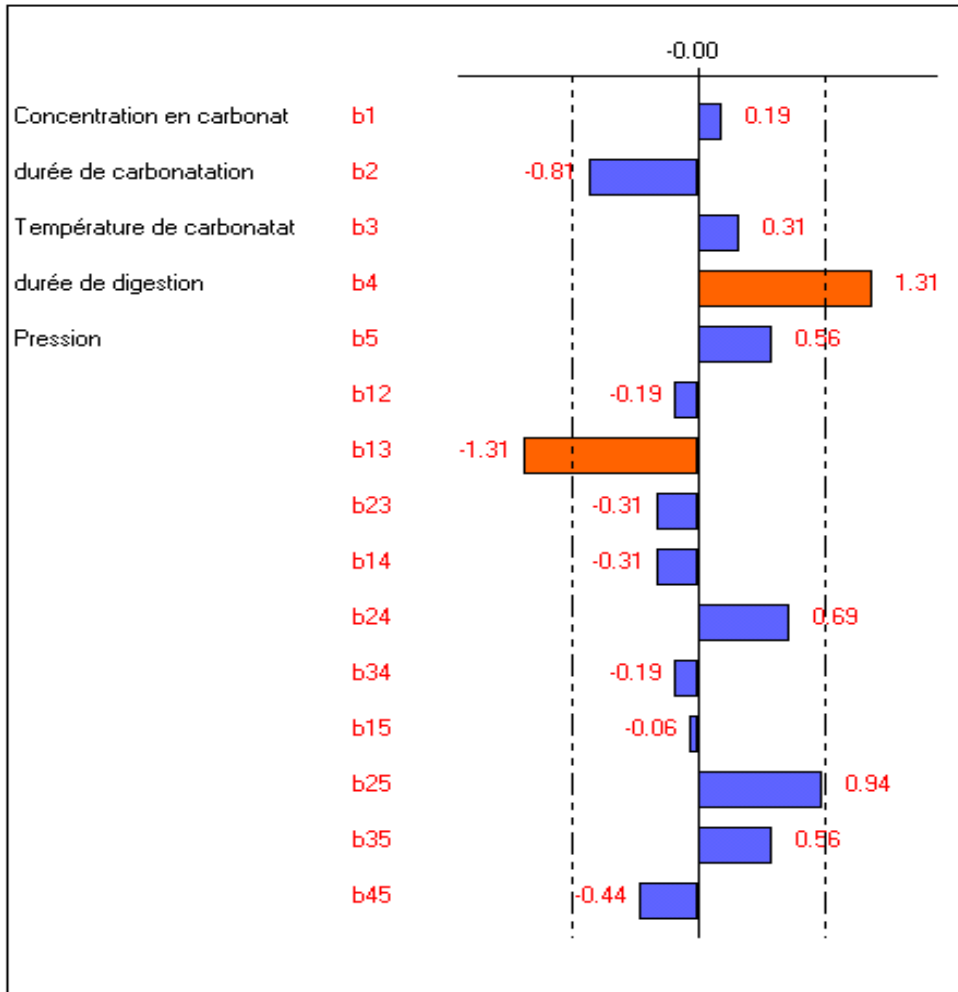


Figure 4: Etude graphique des effets de la réponse Y3 : Point de gélification

3-4. Réponse Y₄: Point de fusion

Les réponses expérimentales du point de fusion sont données dans le **Tableau 3**. Il varie entre un minimum (28°C), obtenu avec l'essai n°3 et un maximum (97°C), enregistré avec l'essai n° 16.

3-4-1. Effets des facteurs sur le point de fusion

Les résultats obtenus permettent d'établir l'équation du modèle mathématique suivant, calculé par le logiciel:

$$\begin{aligned}
 Y_3 = & 84.53 + 1.5X_1 - 7.38X_2 + 1.63X_3 + 7.63X_4 + \\
 & 6.88X_5 + 0.38X_1X_2 - 8.63X_1X_3 - 1.00X_2X_3 + \\
 & 1.13X_1X_4 + 9.50X_3X_4 + 0.75X_3X_4 - 0.63X_1X_5 + \\
 & 8.00X_2X_5 + 0.75X_3X_5 - 6.50X_4X_5
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

a) *Facteurs influents*

L'équation précédente est traduite en un diagramme (*Figure 5*) facile à analyser.

Ce diagramme permet de distinguer par ordre décroissant l'effet prépondérant de 3 facteurs : la durée de digestion (X_4) ; la durée de carbonatation (X_2) et la pression (X_5). Les effets de la durée de digestion (X_4) et la durée de carbonatation (X_2) sont très similaires, mais dans deux sens opposés. Les coefficients attribués à ces 2 facteurs étant très proches en valeur absolue, soit respectivement +7.63 et -7.38. Les effets des facteurs : concentration en carbonate de sodium (X_1) et température de carbonatation (X_3) sont très proches. Cependant, leur effet sont plus faibles que les trois premiers. Leurs coefficients sont respectivement : 1.5 et 1.63. Pour augmenter le point de fusion il faut fixer à leur niveau supérieur :

- la concentration en carbonate de sodium ($X_1=+1$, soit 8g/l)
- la température de carbonatation ($X_3=+1$, soit 100 °C)
- la durée de carbonatation ($X_4=+1$, soit 180 mn)
- la pression ($X_5=+1$, soit 1.3 bar).

Cependant, la durée de carbonatation doit être fixée à son niveau inférieur ($X_2= -1$, soit 30 mn).

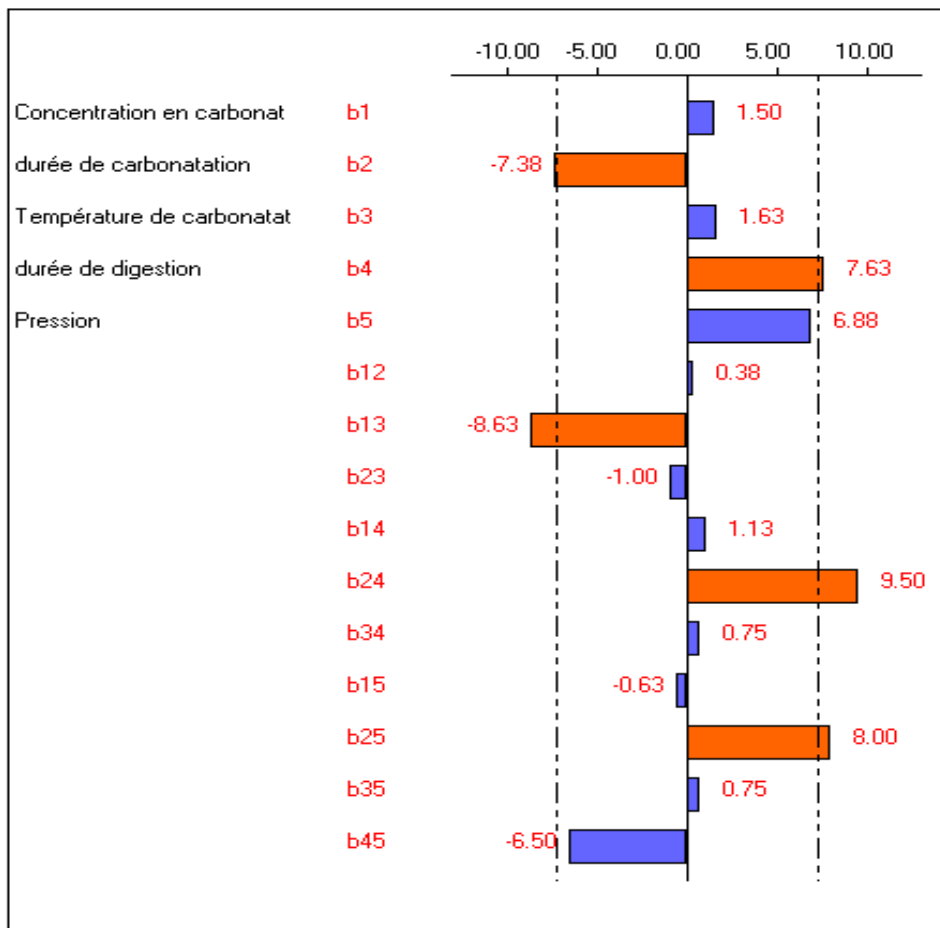


Figure 5 : Etude graphique des effets de la réponse Y4 : Point de fusion

b) *Effets d'interactions*

Les deux interactions : durée de carbonatation – durée de digestion ($X_2X_4=9.50$) et durée de carbonatation - pression ($X_2X_5=8.00$), tendent à augmenter le point de fusion, lorsque les deux facteurs sont au même

niveau , alors que les deux interactions (concentrations du carbonate de sodium – température de carbonatation ($X_1X_3 = -8.63$) et durée de digestion – pression ($X_4X_5 = -6.50$) produisent l'effet inverse, dans les mêmes conditions. Le même diagramme (*Figure 5*) permet de mettre en évidence l'effet significatif des interactions suivantes : durée de carbonatation – durée de digestion $X_2X_4 = 9.50$; concentration en carbonate de sodium – température de carbonatation : $X_1X_3 = -8.63$; durée de carbonatation – pression : $X_2X_5 = 8$ et durée de digestion – pression : $X_4X_5 = -6.5$. Les autres interactions sont négligeables.

3-5. Analyse du graphique des effets globaux sur les 4 réponses

a) Facteurs influents

Le graphique des effets globaux pour les 4 réponses étudiées (*Figure 6*) permet la mise en évidence des faits suivants :

- le facteur le plus influent, c'est à dire celui qui a l'effet le plus prépondérant est la pression (X_5). Ce facteur influence essentiellement le rendement d'extraction. Par ailleurs, ce facteur doit être maintenu à un niveau positif pour augmenter le rendement, le point de gélification et le point de fusion. En revanche, il doit être fixé à un niveau inférieur à 0 pour augmenter la force de gel.
- La durée de digestion (X_4) a un effet positif sur toutes les réponses, cependant avec un effet plus important sur le point de gélification.
- La température de carbonatation influence positivement, notamment la force de gel, puis secondairement le point de gélification et le point de fusion. En revanche, elle doit être fixée à un niveau inférieur à 0 pour augmenter le rendement.
- La durée de carbonatation possède une influence plus particulièrement sur le point de fusion. Pour augmenter toutes les réponses, elle doit être maintenue à un niveau inférieur à 0.
- La concentration en carbonate de sodium influence légèrement le point de gélification et le point de fusion et elle n'a pratiquement pas d'effet sur le rendement et la force de gel.

b) Effets d'interactions

En regardant les différentes interactions du graphique (*Figure 6*), les remarques suivantes peuvent être avancées:

- Les principales interactions sont par ordre décroissant d'importance : en premier lieu, celle entre la concentration en carbonate de sodium (X_1) et la température de carbonatation (X_3) ; entre la durée de carbonatation (X_2) et la pression (X_5), entre la température de carbonatation (X_3) et la pression (X_5) et enfin entre la durée de digestion (X_4) et la pression (X_5).
- l'interaction : concentration en carbonate de sodium- température de carbonatation (X_1X_3), doit être négative, pour augmenter les 4 réponses. Les 2 facteurs ont des effets antagonistes. Cette interaction est la plus prépondérante sur la force de gel.
- L'interaction entre la durée de carbonatation (X_2) et la durée de digestion (X_4) influence positivement les 4 réponses. Son effet est plus marqué sur la force de gel. Pour augmenter les réponses, il faut que les 2 facteurs soient de même signe (soit pris à leur niveau inférieur, soit à leur niveau supérieur).
- l'interaction entre la durée de carbonatation (X_2) et la pression (X_5) révèle son effet positif sur la force de gel, le point de gélification et surtout le point de fusion. Cette interaction est nulle voire

négligeable sur le rendement. Pour augmenter ces réponses, il faut que X_2 et X_5 soient de même signe.

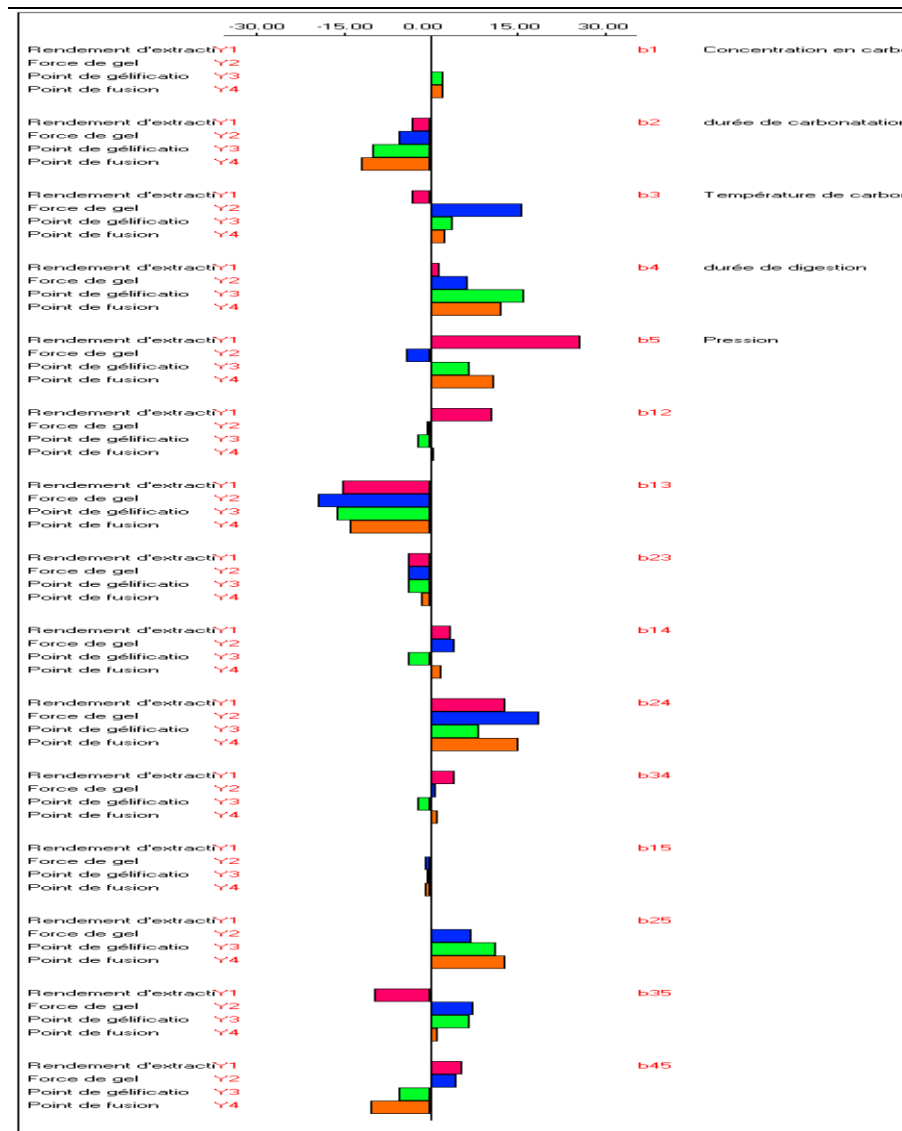


Figure 6 : Etude graphique des effets pour toutes les réponses

- l'interaction entre la température de carbonatation (X_3) et la pression (X_5) a un effet positif sur la force de gel, le point de gélificatio et le point de fusion. Par contre, elle a un effet négatif sur le rendement. Ce dernier effet est plus important que les autres. Pour augmenter le rendement, il faut que X_3 et X_5 soient de signes opposés. En revanche, il faut qu'ils soient de même signe pour augmenter les autres réponses.
- L'interaction entre la durée de digestion (X_4) et la pression (X_5) montre qu'elle est plus prépondérante sur le point de fusion. Pour augmenter le rendement et la force de gel, il faut que les 2 facteurs soient de même signe (négatif ou positif). Par contre, il faut qu'ils soient de signes opposés pour augmenter le point de gélificatio et le point de fusion.
- Les autres interactions sont faibles.

Le **Tableau 4** récapitule les niveaux et signes des cinq facteurs étudiés et leurs interactions les plus importantes dont il faut tenir compte.

Tableau 4 : Récapitulation des niveaux et signes des facteurs principaux et leurs interactions les plus prépondérantes

Facteur/interaction	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₁ X ₃	X ₂ X ₄	X ₂ X ₅	X ₃ X ₅	X ₄ X ₅
Rendement	0 ou -1	-1	-1	+1	+1	-	+	-	-	+
Force de gel	0 ou -1	-1	+1	+1	-1	-	+	+	+	+
Point de gélification	+1	-1	+1	+1	+1	-	+1	+1	+	-
Point de fusion	+1	-1	+1	+1	+1	-	+1	+	+	-

4. Discussion et conclusion

Tout d'abord, il faut remarquer qu'à notre connaissance, il n'y a pas de travaux antérieurs ayant trait à l'extraction de l'agar-agar, en particulier à partir de *Gelidium* et qui font appel à plusieurs facteurs simultanément, à l'exception des travaux de Pereira-Pacheco *et al.*; [19]. Ces travaux ont intéressé l'algue rouge *Hydropuntia cornea* Thuret et Bornet (= *Gracilaria cornea*). Ces auteurs ont appliqué la méthodologie des surfaces des réponses pour optimiser l'extraction de l'agar-agar natif à partir de cette algue. Dans ce cas, deux facteurs ont été optimisés : la température et la durée d'extraction. Par ailleurs, Ruitz [20] a utilisé la même méthodologie sur l'agar-agar commercial, mais pour l'appliquer dans un nouveau domaine industriel intéressant la fabrication de fibres synthétiques. En littérature, les auteurs utilisent généralement la méthode classique dite « méthode de un facteur à la fois » [21]. En plus, ils appliquent généralement une technique bien déterminée, sans changer des paramètres bien particuliers. Pour cette raison, la comparaison des résultats obtenus dans ce présent avec ceux d'autres auteurs est rendue un peu difficile.

Dans ce cadre, Pereira-Pacheco *et al.*; [19] ont trouvé qu'une température de 100°C et un temps de 3h donnent le rendement en agar le plus élevé (43.3%) et les plus hauts points de gélification (32°C) et de fusion (78°C). La température s'est révélé la plus influente sur le rendement d'extraction, chez *Hydropuntia cornea* issue de Yucatan, Mexico. Abbas [22], travaillant sur les alginates et leur extraction à partir de quelques espèces d'algues brunes collectées sur les côtes de la France, a réalisé des expérimentation en effectuant des matrices d'expériences (matrice d'Hadamard et matrice de Doelhart). Parmi les facteurs testés, figurent la température, la concentration en carbonate de sodium et la durée d'extraction. L'optimum de rendement d'extraction d'alginates à partir de *Laminaria* a été trouvé pour une température de 56°C, une concentration en carbonate de sodium de 2.6% et une durée d'extraction de 71mn. Par ailleurs, la méthodologie des plans d'expériences a été réalisée pour l'extraction des polysaccharides à partir d'*Asparagopsis armata* Harvey [23], collecté au Sud de la France. Parmi les facteurs testés, figurent la durée et la pression d'extraction. La durée a varié entre 0.5 et 5h, quant à la pression, elle a fluctué entre 0.3 et 1.1 bar. La réponse recherchée était le rendement par rapport à la matière sèche. Deux matrices

d'expériences ont été réalisées : une matrice d'Hadamard pour la recherche des facteurs les plus influents parmi 7 et une matrice de Doelhart pour optimiser ces 2 facteurs en plus de la concentration en soude. L'optimum de rendement a été trouvé avec une durée d'extraction de 2h30 mn et une pression de 1.25 bar. Mouradi – Givernaud [24] a montré que le rendement d'extraction de l'agar de *G. latifolium* (sur les côtes Ouest Françaises) varie entre un minimum (25.5%) obtenu en mars et un maximum (42.5%) enregistré en novembre. La force de gel minimale (407 g.cm⁻²) a été obtenue en mars, tandis que la maximale (788 g.cm⁻²) a été enregistrée en octobre. L'évolution de ce paramètre est sensiblement parallèle au rendement de l'extraction de l'agar, selon cet auteur. Les minima et les maxima, aussi bien du rendement que de la force de gel sont différents de ceux trouvés dans le présent travail. Ceci peut être expliqué en partie par la position géographique des populations de *Gelidium* dans les deux cas.

En cultivant *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon dans des bacs soumis aux conditions naturelles, et en voulant établir des modèles de régression, Boulus *et al.*; [25] ont trouvé que la température est le facteur limitant le plus important qui affecte positivement le taux de croissance, le poids sec et la force de gel de l'agar extrait. Par contre, ce même facteur, c'est-à-dire la température, influe négativement le rendement d'extraction. Chez les *Gelidium* du Pacifique nord, les rendements maximum trouvés sont les suivants : 35.9 % chez *Gelidium japonicum* (Harvey) [26], 34.0% chez *G. subcostatum* Okamura [27] et 15.7 % chez *G. purpurascens* Gardner [28]. Chez *G. rex* Santelices et Abbot. du Chili, les plus hauts rendements sont enregistrés en été pour les thalles végétatifs et ceux ayant des cystocarpes et en automne pour les thalles tétrasporophytiques [29]. Par ailleurs, il a été démontré que le plus haut rendement (de l'ordre de 40 %) a été enregistré en décembre (début d'été en hémisphère sud) [30]. En Espagne, *Gelidium spinolosum* (C. Agardh) J. Agardh et *G. sesquipedale* atteignent les plus hauts rendements en juillet-août et en novembre-décembre [31]. La force de gel de l'agar extrait de thalles tétrasporophytiques et végétatifs de *Gelidium chilense* (Montagne) Santelices et Montalva varie, respectivement entre 153 g. cm⁻² et 663 g. cm⁻² [30]. Par ailleurs, les points de gélification et de fusion de différentes stades du cycle biologique de *G. chilense*, *G. rex* et *G. linguatum* Kützinger. sont similaires. Ils varient respectivement entre 30 et 40 °C pour le premier et entre 80 et 95 °C pour le second [31].

Mouradi-Givernaud *et al.*; [32] montrent que le rendement d'agar de *Gelidium sesquipedale* des côtes marocaines, varie sensiblement de mars à août (environ 40 % du poids sec de l'algue), il diminue jusqu'à 36 % en septembre puis augmente jusqu'à son maximum de 44 % en novembre. Les températures de gélification et de fusion varient peu tout au long de l'année. Elles varient respectivement entre 35 °C et 36 °C et entre 89 °C et 92 °C. La force de gel est maximale entre mai et juillet (environ 1000 g.cm⁻²), diminue jusqu'au minimum de 890 g.cm⁻² en septembre, puis augmente en automne pour atteindre 1000 g.cm⁻² en octobre. Dans ce cas, il n'y a pas de corrélation entre la force de gel d'une part et les températures de gélification et de fusion, d'autre part. Dans le présent travail, la corrélation est faible entre le rendement et le point de fusion ($r=+0.58$); elle est absente entre le rendement, d'une part et la force de gel et le point de gélification, d'autre part. Par contre, il existe une corrélation entre la force de gel et les points de gélification et de fusion. Ces coefficients sont respectivement $r=+ 0.68$ et $r=+0.65$. En outre, la corrélation est très nette entre le point de gélification et le point de fusion; $r=+ 0.90$. Chez *Gracilaria gracilis* (Stackhouse.) Steentoft, Irvine et Farnham. et *Gracilaria bursa-pastoris* de l'étang de Thau (France), le rendement en agar varie significativement d'une saison à l'autre [6]. Le maximum a été enregistré au printemps (33%) et le minimum en automne (19%). Chez *Gracilaria bursa-pastoris* (Gmelin) Silva, le rendement maximum (36%) a été enregistré en été et le minimum en hiver (23%). Une corrélation positive ($r = +0.71$) a été trouvée entre le rendement et la force de gel pour *Gracilaria gracilis* et négative chez *G. bursa-pastoris* ($r = - 0.69$). Par ailleurs, une corrélation positive a été établie entre le point de gélification de la force de gel chez *G. bursa-pastoris*. Généralement, les plus hauts rendements sont observés en été et

au printemps comme chez beaucoup d'autres algues [33, 34,35]. . Roleda *et al*; [37]. rapportent que la variation du point de gélification est en relation avec l'augmentation et la diminution de la force de gel, chez *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldmann et Hamel, ce qui concorde avec nos résultats, comme il a été indiqué plus haut.

En conclusion, nous pouvons dire que *Gelidium spinosum* de Monastir (Est de la Tunisie) recèle un agar dont le rendement et la qualité varient selon les conditions d'extraction. D'autres expérimentations d'optimisation permettront de chercher un compromis entre le rendement et les paramètres de qualité ciblés. Ces résultats enregistrés laissent espérer de positionner l'agar extrait parmi ceux susceptibles d'être utilisés dans un premier stade en industries agro-alimentaires, puis secondairement dans d'autres secteurs économiques.

Références

- [1] - D.J.Mc HUGH. "A guide to the seaweed industry". *F.A.O. Fisheries Technical paper*. N° 441 (2003)105p.
- [2] - A.MOURADI, M.CHIKHAOUI, M.FEKHAOUI, R.AKALLAL, A. GUESSOUS and T. GIVERNAUD. "Variabilité interspécifique de trois algues rouges : *Hypnea musciformis*, *Gracilaria multipartita* et *Gelidium sesquipedale* (Rhodophycées) de la côte atlantique marocaine". *Afrique Science*. 2 (3) (2006) 365-389.
- [3] - R.IYER, J.J. BOLTON and V.E. COYNE. "Gracilarioid species (Gracilariaceae, Rhodophyta) in Southern Africa, with a description of *Gracilariopsis funicularis* sp. nov". *African Journal of Marine Science*. 27 (1) (2005) 97-105.
- [4] - I. SOUSA- PINTO, E.MURANO, S.COELHO, A. FELGA and R. PEREIRA. "The effect of light on growth and agar content of *Gelidium pulchellum* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in culture". *Hydrobiologia*. 398/399 (1999) 329-338.
- [5] - R. PEREZ. "Ces algues qui nous entourent. Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture". IFREMER. (1997)272p.
- [6] - E. MARINHO-SORIANO and E. BOURRET. "Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta)". *Bioresource Technology*. 90 (2003) 329-333.
- [7] - R.A. MELO. "*Gelidium* commercial exploitation: natural resources and cultivation". *Journal of Applied Phycology*. 10 (3) (1998)303-314.
- [8] - J.KSOURI, R. BEN SAID et O.BEJI. "Cartographie des peuplements de la macro algue *Gracilaria* (Gracilariales) dans le lac nord de Tunis". *Bulletin INSTM*.23 (2) (1996)55-72.
- [9] - J.KSOURI, R. BEN SAID et O.BEJI. "Evaluation des potentialités quantitatives naturelles des gracilaires (algues rouges) du lac nord de Tunis". *Bulletin INSTM*.24 (1997) 15-27.
- [10] - J.KSOURI et R. BEN SAID. "Potentialités en macro algues : cartographie et biomasse de l'agarophyte rhodophycée *Gracilaria verrucosa* dans le lac de Bizerte". *Bulletin INSTM*. 25 (1998) 17-34.
- [11] - J.KSOURI et R. BEN SAID. "Intégration de l'algoculture dans la gestion lagunaire du lac de Bizerte (Tunisie septentrionale)". Actes du 1^{er} *Symposium international sur la végétation marine en Méditerranée ; la Corse* (France) (2000) 155-158.
- [12] - R. BEN SAID et J.KSOURI. "La rhodophycée *Gracilaria verrucosa* du lac de Bizerte (Tunisie) : Variations mensuelles de la biomasse, du rendement d'extraction et de la qualité de l'agar". *Bulletin. INSTM*. 26(1999)127-136.

- [13] - N.BEN MAIZ. "Inventaire des algues et phanérogames marines d'intérêt économique : Bilan et potentiel des ressources sur le littoral tunisien". *Rapport de consultation. Plan Directeur de l'Aquaculture de Tunisie. Projet de coopération Tunisie/PNUD. Ministère de l'Agriculture de Tunisie.* (1993) 65p
- [14] - N.BEN MAIZ. " Etude nationale sur la diversité biologique de la flore marine et aquatique en Tunisie (Monographie)". *Projet MEAT/PNUE/GEF.* Ministère de l'Environnement, Tunisie. (1995) 78p.
- [15] - R. BEN SAID, J.KSOURI et O.BEJI. "Etude éco-morphométrique de l'algue rouge *Gelidium latifolium*". *Revue de l'INAT.* 1 (1999) 45-63.
- [16] - D.MATHIEU, J.NONY and R. PHAN-TAN-LUU "Logiciel NEMROD, version 2000".LPRAI. Marseille, France (2000).
- [17] - R. BEN SAID et J.KSOURI. " La rhodophycée *Gracilaria verrucosa* du lac de Bizerte (Tunisie) : teneur et qualité de l'agar-agar". *Actes du 1^{er} symposium international sur la végétation marine en Méditerranée ; la Corse* (France). (2000) 87-93.
- [18] - R. BEN SAID, J.KSOURI et F.MENSI. " L'algue rouge *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss, du lac nord de Tunis : Rendement et qualité de l'agar ". *Bulletin. INSTM. Actes des 4èmes congrès maghrébin des Sciences de la Mer.* Numéro spécial (6) (2001) 49-52.
- [19] - F.PEREIRA-PACHECO, D. ROBLEDO, L. RODRIGUEZ-CARVAJAL and Y.FREILE-PELEGRIN. "Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatan, Mexico". *Bioresource Technology.* 98 (6) (2007) 1278-1284.
- [20] - G.RUITZ. " Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges". Thèse de Doctorat d'Université. Limoges (2005) 256 p.
- [21] - J.GOUPY. "*Introduction aux plans d'expériences*". (Eds.) DUNOD. (2001)293 p.
- [22] - A.ABBAS. "Propriétés et potentialités de valorisation de nouveaux alginates à haute viscosité". Thèse de Doctorat. Université de Provence (Aix Marseille I). (2000)153p + annexes.
- [23] - C. HASLIN. "Composition chimique, structure et évaluation des activités antivirales des polysaccharides pariétaux de l'algue méditerranéenne introduite *Asparogopsis armata* (Bonnemaisoniales) et de quatre Némaliales". Thèse de Doctorat. Université de Provence. Aix Marseille ;France(2000)217p.
- [24] - A. MOURADI-GIVERNAUD, T. GIVERNAUD, H. MORVAN and J. COSSON. "Agar from *Gelidium latifolium* (Rhodophyceae, Gélidiales); Biochemical composition and seasonal variations". *Botanica Marina.* 35(1992)153-159.
- [25] - A.BOULUS, E. SPANEIR, and M.FRIEDLANDER. "Effect of outdoor conditions on growth rate and chemical composition of *Gelidium crinale* in culture". *Journal of Applied Phycology.* 19(5) (2007) 471.478.
- [26] - H. SU and K. S., YOUNG. "An investigation of agars prepared from some Taiwan red seaweeds. *Journal of Fisheries Society.* Taiwan. 6(1977)1-11.
- [27] - S.MURAKAMI. "Studies on the agar of Rhodophyceae III. The isolation and purification of agar". *Science Reports of Saitama University.* 3(1960)251-254.
- [28] - J.N.C.WHYTE and J.R.ENGLAR. "The agar component of the red seaweed *Gelidium purpurascens*". *Phytochemistry.* 20(1981)237-240.
- [29] - B.MATSUHIRO and C.C.URZÙA. "Agars from *Gelidium rex*" *Hydrobiologia.* 204/205(1990) 545-549.
- [30] - B.MATSUHIRO and C.C.URZÙA. "Agars from Chilean Gelidiaceae". *Hydrobiologia.* 221(1991) 149-156.
- [31] - H.H. SELBY and W. H., WYNNE. "Agar". In "*Industrial Gums*" (Ed.), Whistler, R.L. & J.N.Be Millier. Academic Press. New York, (1973) 29-48.

- [32] - A.MOURADI-GIVERNAUD, L.A.HASSANI, T. GIVERNAUD, Y. LEMOINE. and O.BENHARBET. "Biology and agar composition of *Gelidium sesquipedale* harvested along the Atlantic coast of Morocco". *Hydrobiologia* .398/399(1999)391-395.
- [33] - A.CHIRAPART. and M.OHNO. "Seasonal variation in the physical properties of agar and biomass of *Gracilaria* sp. (*Chordatype*) from Tosa Bay, southern Japan". *Hydrobiologia*. 151 /152(1993) 541-547
- [34] - H.B.PONDEVIDA and A.Q.HURTADO-PONCE. "Seasonal variations in the agar quality of *Gracilaria changii*, *Gracilaria manilaensis* and *Gracilariopsis hailinae* (Gracilariales, Rhodophyta). Assessment of some agarophytes from the coastal areas of Hoilo.Philippines". *Botanica Marina*.39 (1996) 123-127.
- [35] - Y.FREILE-PELEGRIN and D.ROBLEDO. "Influence of alkali treatment on agar from the red seaweed *Gracilaria cornea* from Yukatan, Mexico". *Journal of Applied Phycology*. 9(1997)533-539.
- [36] - M.Y.ROLEDA, E.T.GANZONFORTES,N.E.MONTANO and F.N. REYES. "Temporal variation in the biomass, quantity and quality of agar from *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldman et Hamel (Rhodophyta; Gélidiales) from Cape Boliano, NW Philippines". *Botanica Marina*. 40(1997) 487-495.