







Université du Québec  
à Rimouski

**DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES DE PRODUCTION  
DE BIOMASSE À HAUTE DENSITÉ CELLULAIRE ET DE  
COMPOSÉS À HAUTE VALEUR AJOUTÉE PAR LES  
MICROALGUES EN CONDITIONS MIXOTROPHES : LE  
CAS DE LA MICROALGUE VERTE *TETRADESMUS  
OBLIQUUS***

Thèse présentée

dans le cadre du programme de doctorat en ingénierie (3737)

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)

PAR

© [JIHED BENTAHAR]

[Octobre 2023]

**Composition du jury :**

- ❖ **Prof. Jonathan Gagnon, président du jury, [Université du Québec à Rimouski, UQAR]**
- ❖ **Prof. Jean-Sébastien Deschênes, directeur de recherche, [Université du Québec à Rimouski, UQAR]**
- ❖ **Prof. Réjean Tremblay, examinateur, [Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, UQAR-ISMER]**
- ❖ **Prof. Alejandro Vargas, examinateur externe, [Université nationale autonome du Mexique (Universidad Nacional Autónoma de México), UNAM]**

Dépôt initial le 27 avril 2023

Dépôt final le 08 octobre 2023



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 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 tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Dieu le tout-puissant qui m'a donné la force, la patience et la santé nécessaires pour mener à bien ce travail de doctorat.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de thèse, Jean-Sébastien Deschênes, pour son soutien constant et sa disponibilité sans faille tout au long de ce projet. Grâce à son approche rigoureuse et à ses précieux conseils, j'ai pu avancer à chaque étape de mes travaux. Sans l'aide et les conseils éclairés de Pr. Deschênes, ce travail n'aurait jamais abouti de la sorte. Je tiens à souligner que Pr. Deschênes a également supervisé mes travaux de recherche en ingénierie lors de ma maîtrise (2015-2017). Il a été plus qu'un directeur pour moi, il a été un mentor.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers les membres du jury. Tout d'abord, je remercie Pr. Jonathan Gagnon, professeur à l'Université du Québec à Rimouski (UQAR), pour avoir accepté d'agir en tant que président du jury de cette thèse. Je remercie également infiniment Pr. Réjean Tremblay, professeur à l'Institut des Sciences de la Mer de Rimouski (ISMER-UQAR), pour ses conseils précieux lors de mon examen doctoral et pour sa participation au jury. Enfin, je remercie Pr. Alejandro Vargas, professeur à l'Université Nationale Autonome du Mexique (UNAM), pour avoir accepté d'être l'évaluateur externe de ma thèse.

Je suis également reconnaissant envers le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) et l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels de l'Université Laval (INAF) pour leur financement de cette thèse, qui m'a permis d'approfondir mes connaissances sur la valorisation des microalgues.

Je tiens enfin à remercier M. Steeven Ouellet (UQAR), Mme Mélanie Simard (ISMER), M. Mathieu Babin (ISMER), Mme Véronique Richard (INAF), Mme Marie-Eve Anglehart (UQAR) et M. Jonathan Coudé (UQAR) pour leur soutien technique au

laboratoire et leur contribution à la réussite de mon projet de doctorat. Leur fierté et leur ambition m'ont inspiré tout au long de ce processus.

Sur le plan personnel, je tiens à exprimer ma gratitude envers mes parents et ma famille pour leur soutien indéfectible tout au long de ma démarche. Bien que j'aie dû m'éloigner pour poursuivre mon objectif, leur amour et leur encouragement ont été constants et m'ont permis d'aller de l'avant.

Je souhaite également remercier mes amis, notamment Josée Banville, Andrée Côté, Yan Lévesque, Atif Waqas, Mahdi Hadhri et tous les autres que j'ai rencontrés au club d'échecs, au club Toastmasters (La Causerie de Rimouski), aux équipes d'Ultimate Frisbee, aux équipes de soccer et volleyball, et avec qui j'ai partagé de bons moments aux soirées de jeux de société et aux randonnées d'été et d'hiver. Leur compagnie et leur soutien ont rendu ma vie à Rimouski des plus agréables, et j'ai eu la chance de découvrir cette belle région du Québec grâce à eux.

## AVANT-PROPOS

Comme Martin Luther King l'a dit dans son discours immortel « I have a dream », nous avons tous la possibilité de rêver et de contribuer à bâtir un avenir meilleur pour tous. Pour ma part, depuis l'obtention de mon diplôme d'ingénieur en 2012, j'ai toujours rêvé de bâtir une carrière productive en recherche et de devenir professeur universitaire. Les laboratoires du Centre d'Appui à l'Innovation par la Recherche à l'Université du Québec à Rimouski m'ont offert un environnement stimulant pour poursuivre mes objectifs, notamment dans le domaine de la biotechnologie, qui a suscité en moi un vif intérêt en raison de son potentiel exceptionnel pour les découvertes novatrices dans plusieurs domaines.

C'est ainsi que j'ai été amené à m'engager dans la filière de valorisation des microalgues, un domaine en plein essor au Québec et à l'international. La renommée du professeur Jean-Sébastien Deschênes dans ce domaine a motivé ma décision de m'adresser à lui pour diriger mes travaux de recherche dans le cadre d'un programme de maîtrise en ingénierie. Ces travaux ont abouti à des résultats très prometteurs, avec la mise au point d'un nouveau procédé de production de microalgues nourries au petit-lait, un déchet polluant de l'industrie laitière. Cette culture de microalgues permet d'extraire une enzyme spécifique qui élimine la présence de lactose dans certains aliments, ce qui ouvre des perspectives fascinantes pour la création de produits sans lactose et l'élaboration de nouveaux procédés de transformation alimentaire. En valorisant le petit-lait, ces recherches permettent également de réduire les émissions de gaz carbonique émis par ce déchet lorsqu'il se décompose.

Malgré ces résultats encourageants, la faible productivité en biomasse à grande échelle reste un obstacle majeur à l'essor de l'utilisation des microalgues. Mon projet de doctorat vise à résoudre cette problématique en déterminant les conditions de culture qui permettront

d'augmenter la productivité des systèmes de culture à plus forte densité cellulaire. La production de molécules à haute valeur ajoutée a également été étudiée via les pigments, notamment la lutéine ayant plusieurs applications nutritionnelles et pharmaceutiques. Mes contributions en matière de recherche ont donné lieu à des avancées notables dans ce domaine, se traduisant notamment par la publication de plusieurs articles scientifiques à fort impact. En outre, j'ai eu l'opportunité de présenter mes recherches dans plusieurs conférences scientifiques de renom.

Je suis convaincu que mon engagement et ma formation actuelle auront un impact significatif sur la société de demain. Les résultats de mon étude actuelle ouvriront la voie à de nouveaux projets de recherche et soutiendront l'essor d'entreprises biotechnologiques pour des applications dans des secteurs de pointe. Pour moi, le futur est synonyme de caractérisation de la biomasse. Nous devons explorer les différentes variétés de produits que nous pouvons produire avec cette ressource, ainsi que les méthodes pour améliorer la rentabilité de ces procédés pour encourager l'investissement de l'industrie dans cette direction. Je crois que les microalgues peuvent offrir une source d'énergie renouvelable pour les voitures, les bateaux et les avions, ainsi qu'être utilisées comme additifs alimentaires, composants de médicaments et de produits cosmétiques, et pour le traitement des eaux usées et la séquestration du gaz carbonique pour protéger l'environnement.

En résumé, je vois mon rôle dans la société de demain comme celui d'un chercheur engagé et motivé par l'utilisation de la biotechnologie, en particulier à travers les microalgues, pour des découvertes innovantes et durables. Je vois mon rôle dans la société de demain comme étant celui d'un mentor et d'un encadreur pour les nouveaux étudiants et chercheurs. En contribuant à la mise au point de procédés de valorisation des déchets et à l'augmentation de la productivité des systèmes de culture de microalgues, je souhaite aider à construire un avenir plus respectueux de l'environnement tout en ouvrant de nouvelles perspectives économiques pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

## RÉSUMÉ

Le présent ouvrage vise à développer de nouvelles stratégies pour la production de biomasse à haute densité cellulaire et de composés à haute valeur ajoutée par les microalgues en conditions mixotrophes. Le choix de la microalgue verte *Tetradesmus obliquus* comme modèle d'étude est justifié par son potentiel mixotrophe prometteur pour les applications industrielles et commerciales. Des améliorations pour maximiser la production de biomasse et de pigments sont proposées, en optimisant la disponibilité des nutriments. Les objectifs incluent l'étude des cinétiques de croissance, la modélisation multifactorielle de la production de biomasse et de pigments, ainsi que la mise au point de techniques de contrôle automatisé pour optimiser leur production dans des photobioréacteurs en utilisant des modèles mathématiques adaptés.

Une première étude, liant mon projet de doctorat à celui de maîtrise, a évalué l'utilisation du perméat de lactosérum doux (SWP), un déchet de l'industrie laitière, comme source de carbone organique pour la culture mixotrophe de *T. obliquus* et la production de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase comme molécule à haute valeur ajoutée. La substitution de 60% (v/v) du milieu de culture par du SWP a amélioré significativement la croissance de *T. obliquus* et la production totale d'enzymes. Cependant, une utilisation de 100% (v/v) de SWP n'était pas efficace, donc non-rentable, en raison du manque de certains nutriments essentiels. Une autre molécule à haute valeur ajoutée, présumée être un galacto-oligosaccharide, a également été détectée en présence de fortes proportions de SWP. Ces résultats suggèrent que le SWP pourrait être utilisé comme source de carbone alternative pour la culture de *T. obliquus*, avec des avantages potentiels pour la production d'enzymes et de biomasse.

Ensuite, nous avons approfondi notre étude en examinant les effets de huit nutriments clés (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnésium, fer, manganèse et calcium) ainsi que leurs interactions sur la production de biomasse en combinant la méthode Taguchi à la modélisation mathématique. Les résultats ont montré que cette approche a permis d'obtenir un rendement maximum de biomasse de  $7,98 \text{ g.L}^{-1}$ , l'un des plus élevés selon la littérature pour l'espèce *T. obliquus*. Le modèle mathématique, qui comprend cinq variables d'état et neuf paramètres, a permis d'intégrer avec succès les effets du nitrate, du phosphate, du glucose et du fer. La validation du modèle a confirmé des prévisions très précises. Cette méthodologie s'est révélée être un outil puissant pour améliorer la production de biomasse. Cela nous a permis de modéliser la production de biomasse et de lutéine en mixotrophie chez *T. obliquus* en intégrant les effets des trois nutriments les plus critiques (nitrate, phosphate et glucose) sur la croissance et la production de lutéine. Le modèle a été évalué à l'aide d'une conception expérimentale unique et de techniques d'optimisation de moindres carrés non linéaires. L'augmentation de la concentration initiale de nitrate a augmenté la production respective de biomasse et de lutéine jusqu'à 4 et 12 fois. Les résultats de validation ont confirmé la précision du modèle pour prédire les profils de concentration dynamiques. Ces résultats ont des implications importantes pour la modélisation de la croissance d'autres espèces de microalgues et pour la mise en place de stratégies de contrôle en temps réel pour les photobioréacteurs.

La dernière étape de cette thèse consiste à développer des approches de contrôle automatique afin de maximiser la production de biomasse microalgale et de pigments (lutéine) en utilisant des modèles mathématiques adaptés au mode continu de culture grâce à des simulations en temps réel. Les simulations ont montré que les productivités maximales en biomasse et en lutéine ont été atteintes après seulement 4 à 4,5 jours de culture, respectivement avec des concentrations maximales en continu de  $4,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et de  $6,70 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . En cas de concrétisation en pratique, cela constituerait l'un des rendements les plus élevés rapportés pour la microalgue *T. obliquus* en mode continu. Des travaux futurs pourraient consister à incorporer d'autres facteurs tels que la lumière, le  $\text{CO}_2$ , la température et le pH dans la modélisation mathématique du système afin de mieux

comprendre leur impact sur la production de biomasse et de pigments. L'exploration d'autres modes de culture pourrait également être envisagée pour améliorer davantage le rendement de production.

**Mots clés** : Microalgues ; Conditions mixotrophes ; Modélisation mathématique ; Disponibilité des nutriments ; Modélisation multifactorielle ; Production de biomasse ; Production de lutéine ; Contrôle automatique.

## ABSTRACT

This work aims to develop new strategies for the production of high-density cell biomass and high-value compounds by microalgae under mixotrophic conditions. The choice of the green microalga *Tetrademus obliquus* as a model for study is justified by its promising mixotrophic potential for industrial and commercial applications. Improvements to maximize the production of biomass and pigments are proposed by optimizing nutrient availability. Key objectives include the study of growth kinetics, the multifactorial modeling of biomass and pigment production, as well as the development of automated control techniques to optimize their production in photobioreactors using the developed mathematical models.

A first study linking my doctoral project to my master's thesis evaluated the use of sweet whey permeate (SWP), a waste product from the dairy industry, as a source of organic carbon for the mixotrophic culture of *T. obliquus* and the production of the enzyme  $\beta$ -galactosidase as a high-value molecule. Substitution of 60% (v/v) of the culture medium with SWP significantly improved *T. obliquus* growth and total enzyme production. However, the use of 100% (v/v) SWP was not effective, and therefore unprofitable, due to the lack of certain essential nutrients. Another high-value molecule, presumed to be a galacto-oligosaccharide, was also detected in the presence of high proportions of SWP. These results suggest that SWP could be used as an alternative carbon source for *T. obliquus* culture, with potential benefits for enzyme and biomass production.

We then furthered our study by examining the effects of eight key nutrients (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnesium, iron, manganese, and calcium) and their interactions on biomass production by combining Taguchi method with mathematical modeling. Results showed that this approach yielded a maximum biomass yield of 7.98 g.L<sup>-1</sup>



<sup>1</sup>, one of the highest reported for *T. obliquus*. The mathematical model, which includes five state variables and nine parameters, successfully integrated the effects of nitrate, phosphate, glucose, and iron. Model validation confirmed highly accurate predictions. This methodology proved to be a powerful tool for improving biomass production. This allowed us to model biomass and lutein production in *T. obliquus* mixotrophic culture by integrating the effects of the three most critical nutrients (nitrate, phosphate, and glucose) on growth and lutein production. The model was evaluated using a unique experimental design and nonlinear least squares optimization techniques. Increasing the initial nitrate concentration significantly increased biomass and lutein production up to 4 and 12-fold, respectively. Validation results confirmed the accuracy of the model in predicting dynamic concentration profiles. These results have important implications for modeling the growth of other microalgal species and for the implementation of real-time control strategies for photobioreactors.

The final step of this work consists in developing automatic control approaches to maximize the production of microalgal biomass and pigments (lutein) using mathematical adapted models for continuous culture mode through real-time simulations. The simulations showed that the maximum productivities in biomass and lutein were achieved after only 4 to 4.5 days of culture, with maximum continuous concentrations of  $4.10 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  and  $6.70 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , respectively. If realized in practice, this would constitute one of the highest reported yields for the microalga *T. obliquus* in continuous mode. Future work could involve incorporating other factors such as light, CO<sub>2</sub>, temperature, and pH into the mathematical modeling to better understand their impact on biomass and pigment production. Exploring other culture modes could also be considered to further improve production yield.

**Keywords:** Microalgae ; Mixotrophic conditions ; Mathematical modeling ; Nutrient availability ; Multifactorial modeling ; Biomass production ; Lutein production ; Automatic control.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	vii
AVANT-PROPOS .....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
ABSTRACT .....	xiv
TABLE DES MATIÈRES .....	xvi
LISTE DES TABLEAUX.....	xxi
LISTE DES FIGURES.....	xxiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xxvii
LISTE DES SYMBOLES .....	xxix
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
MISE EN CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE .....	1
DEFINITION DU PROJET DE THESE .....	3
OBJECTIFS DE LA THESE .....	5
CONTRIBUTIONS ORIGINALES.....	6
STRUCTURE DE LA THESE .....	7
CHAPITRE 1 ÉTAT DE L'ART .....	10
1.1 GENERALITE SUR LES MICROALGUES.....	10
1.2 APPLICATION DES MICROALGUES .....	12
1.2.1 Microalgues et biocarburants.....	13
1.2.2 Microalgues et composés à haute valeur .....	15
1.2.3 Microalgues et environnement.....	19
1.2.4 Microalgues en santé et nutrition humaine .....	20
1.2.5 Microalgues et alimentation des animaux, des organismes aquatiques et des volailles.....	22

1.3	LA CULTURE DES MICROALGUES .....	23
1.3.1	Les modes de nutrition .....	23
1.3.2	Les modes de culture .....	25
1.3.3	Les systèmes de culture .....	27
1.4	L'IMPACT DES PARAMETRES DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DES MICROALGUES.....	34
1.4.1	L'énergie lumineuse .....	34
1.4.2	La température.....	35
1.4.3	L'ajout de CO <sub>2</sub> et l'élimination de l'O <sub>2</sub> .....	36
1.4.4	Le pH et la salinité.....	37
1.4.5	L'agitation .....	38
1.4.6	Les nutriments .....	39
1.5	LES STRATEGIES DE CONTROLE DES MICROALGUES .....	40
1.6	PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> .....	55
CHAPITRE 2 INFLUENCE DE L'UTILISATION DU PERMÉAT DE LACTOSÉRUM DOUX SUR LA CROISSANCE DE LA MICROALGUE <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> ET LA PRODUCTION DES ENZYMES DE TYPE B- GALACTOSIDASE .....		58
ABSTRACT .....		60
2.1	INTRODUCTION .....	61
2.2	MATERIALS AND METHODS .....	63
2.2.1	Microalgal culture and medium.....	63
2.2.2	Experimental procedure.....	63
2.2.3	Analytical methods.....	64
2.3	RESULTS AND DISCUSSION .....	67
2.3.1	Influence of lactose concentrations .....	67
2.3.2	Influence of SWP use .....	69
2.4	CONCLUSIONS .....	77
2.5	ACKNOWLEDGMENTS.....	78
CHAPITRE 3 CONCEPTION D'UNE DÉMARCHE D'OPTIMISATION DES MILIEUX DE CULTURE POUR MAXIMISER LA PRODUCTION DE BIOMASSE DE LA MICROALGUE <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> EN CONDITIONS MIXOTROPHES.....		79

ABSTRACT .....	81
3.1 INTRODUCTION .....	82
3.2 MATERIAL AND METHODS .....	83
3.2.1 Microalgal strain .....	83
3.2.2 Culture conditions .....	84
3.2.3 Taguchi's statistical design .....	84
3.2.4 Biomass determination .....	85
3.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	87
3.3.1 Effect of factors on biomass production .....	87
3.3.2 Effect of individual factors .....	90
3.3.3 Analysis of variance (ANOVA) .....	93
3.3.4 Factors interactions .....	95
3.4 CONCLUSIONS .....	98
3.5 ACKNOWLEDGMENTS .....	98
<b>CHAPITRE 4 UN MODÈLE FIABLE A PLUSIEURS FACTEURS/NUTRIMENTS POUR LA PRODUCTION RAPIDE DE BIOMASSE MICROALGALE À HAUTE DENSITE SUR UN LARGE SPECTRE DE CONDITIONS MIXOTROPHES .....</b>	<b>99</b>
ABSTRACT .....	101
4.1 INTRODUCTION .....	102
4.2 MATERIAL AND METHODS .....	104
4.2.1 Microalgae and culture medium .....	104
4.2.2 Culture conditions .....	104
4.2.3 Taguchi's experimental design .....	105
4.2.4 Biomass production .....	106
4.2.5 HPLC analyses .....	107
4.2.6 Ionic analyses .....	107
4.2.7 Chemical analyses .....	108
4.2.8 Mathematical modeling .....	108
4.2.9 Parameter identification .....	110
4.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	112
4.3.1 Experimental results and parameters estimation .....	112
4.3.2 Model validation .....	120
4.3.3 Challenges and possible extensions .....	122

4.4	CONCLUSIONS .....	124
4.5	ACKNOWLEDGMENTS.....	124
<p>CHAPITRE 5 UN MODÈLE CINÉTIQUE ROBUSTE À PLUSIEURS  FACTEURS/NUTRIMENTS POUR AMÉLIORER LEs RENDEMENTs EN  LUTÉINE ET EN BIOMASSE LORS DE LA CULTURE MIXOTROPHE DE  MICROALGUES - UNE ÉTAPE VERS DES PRODUCTIONS RÉUSSIES À  GRANDE ÉCHELLE .....</p>		
	ABSTRACT .....	128
5.1	INTRODUCTION .....	129
5.2	MATERIAL AND METHODS.....	131
	5.2.1 Microalgae, media and cultivation conditions.....	131
	5.2.2 Experimental design .....	133
	5.2.3 Analytical methods.....	135
	5.2.4 Model construction methodology.....	137
	5.2.5 Parameter estimation methodology.....	140
5.3	RESULTS AND DISCUSSION .....	141
	5.3.1 Effects of various concentrations of nitrate and phosphate on biomass production.....	141
	5.3.2 Effects of various concentrations of nitrate and phosphate on lutein production.....	143
	5.3.3 Results of model construction and parameters estimation .....	145
	5.3.4 Validation of kinetic model predictability.....	149
5.4	CONCLUSIONS .....	152
5.5	ACKNOWLEDGMENTS.....	153
<p>CHAPITRE 6 SIMULATIONS PRÉDICTIVES EN MODE CONTINU POUR DES  PRODUCTIVITÉS MAXIMALES EN BIOMASSE ET EN PIGMENTS .....</p>		
6.1	INTRODUCTION .....	154
6.2	MODELE RETENU .....	155
6.3	STRATEGIE DE CONTROLE .....	156
6.4	PRODUCTIVITES EN REGIME STATIONNAIRE .....	158
6.5	OPERATION EN MODE CONTINU .....	162

6.6 TRAVAUX FUTURS .....	164
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	167
ANNEXE A.....	172
ANNEXE B.....	206
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	217

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b> Les quatre groupes les plus importants de microalgues en termes d'abondance (Khan <i>et al.</i> , 2009).....	12
<b>Tableau 1.2</b> Les avantages et les inconvénients liés aux modes de culture batch (discontinu), semi-continu et continu (Zhu, 2015).....	27
<b>Tableau 1.3</b> Comparaison entre les systèmes de culture ouverts et fermés (Carvalho <i>et al.</i> , 2006).....	32
<b>Tableau 1.4</b> Les avantages et les inconvénients des différents systèmes fermés (Chew <i>et al.</i> , 2018).....	33
<b>Tableau 1.5</b> Modèles cinétiques de croissance prenant en compte un seul facteur de substrat (Lee <i>et al.</i> , 2015).....	42
<b>Tableau 1.6</b> Modèles cinétiques de croissance prenant en compte des facteurs multiples (Lee <i>et al.</i> , 2015).....	49
<b>Table 2.1</b> Chemical characteristics of BBM (theoretical composition) and SWP (from analysis) solutions. ....	67
<b>Table 3.1</b> Selected factors and their respective coding levels.....	86
<b>Table 3.2</b> Experimental matrix using an L18 ( $2^1 \times 3^7$ ) orthogonal array.....	87
<b>Table 3.3</b> Response table for Means $\pm$ SD and S/N ratios. ....	89
<b>Table 3.4</b> Classification of factors according to their effect on the biomass production for the signal to noise (S/N) ratio. ....	91
<b>Table 3.5</b> Results of the analysis of variance (ANOVA) for the biomass production after 6, 9, and 15 days of culture. ....	95
<b>Table 4.1</b> Various experimental conditions using Taguchi's L16 ( $4^3$ ) orthogonal array.....	106
<b>Table 4.2</b> Results of the proposed model's parameter estimation and quantification of the uncertainty associated with the parameter estimators. 95% confidence interval, coefficient of variation. ....	120

<b>Table 4.3</b> Correlation coefficient ( $R^2$ ) between the predicted data from the proposed model and the experimental data used for validation. ....	121
<b>Table 5.1</b> Composition of modified Bold's Basal Medium (BBM) used for <i>Tetradesmus obliquus</i> mixotrophic growth, omitting nitrate and phosphate. ....	132
<b>Table 5.2</b> Selected factors and their corresponding level settings.....	134
<b>Table 5.3</b> Two-factor, four-level design of experiments ( $2^4$ ) with 16 trials, $n = 2$ .....	135
<b>Table 5.4</b> Estimated parameter values from model calibration for four initial nitrate concentrations. ....	147
<b>Tableau 6.1</b> Concentrations des substrats du flux d'entrée en mode continu selon les niveaux de nitrate.....	157
<b>Tableau 6.2</b> Conditions initiales de biomasse ( $x_0$ ), des quotas internes d'azote et de phosphore ( $Q_{N0}$ et $Q_{P0}$ ), de nitrate ( $N_0$ ), de phosphate ( $P_0$ ), de glucose ( $G_0$ ) et de lutéine ( $L_0$ ) pour les quatre niveaux de nitrate. ....	159
<b>Tableau 6.3</b> Taux de dilution optimaux pour des productivités maximales en biomasse ( $D_{opB}$ ) et en lutéine ( $D_{opL}$ ) selon les niveaux de nitrate.....	161
<b>Tableau 6.4</b> productivité maximale en biomasse ( $P_B$ ) et en lutéine ( $P_L$ ) pour chacun des quatre niveaux de nitrate ( $1\times$ , $2\times$ , $5\times$ et $10\times$ BBM).....	162



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b> Représentation schématique du taux de croissance des microalgues en mode batch (ligne continue) et de la concentration en éléments nutritifs (ligne pointillée) (Mata, Martins, & Caetano, 2010).....	11
<b>Figure 1.2</b> Organigramme montrant les applications des microalgues dans différents domaines (Rösch & Posten, 2012; Rizwan <i>et al.</i> , 2018).....	13
<b>Figure 1.3</b> Processus de conversion de la biomasse microalgale pour la production d'énergie (Chew <i>et al.</i> , 2017).....	14
<b>Figure 1.4</b> Schéma général du concept de micro-raffinerie de microalgues (Markou & Nerantzis, 2013). .....	19
<b>Figure 1.5</b> Schéma général du concept de photosynthèse dans les cellules de microalgues (Zeng <i>et al.</i> , 2011). .....	25
<b>Figure 1.6</b> Schéma de la culture continue des microalgues en chémostat (Sun <i>et al.</i> , 2018).....	26
<b>Figure 1.7</b> Systèmes ouverts de culture : (a) étang peu profond et non agité ; (b) étang de type « raceway » ; (c) étang circulaire (Chen <i>et al.</i> , 2010).....	29
<b>Figure 1.8</b> Systèmes fermés de culture : (a) photobioréacteur à tubes horizontaux ; (b) photobioréacteur à tube vertical, (à gauche) colonne à bulles, (à droite) colonne à portée d'air ; (c) photobioréacteurs à plaques plates ; (d) photobioréacteur à réservoir agitée (Chew <i>et al.</i> , 2018). .....	31
<b>Figure 1.9</b> Vue microscopique des cellules de <i>Tetrademus obliquus</i> (grossissement × 400).....	55
<b>Figure 2.1</b> (A) Dry weights and (B-D) enzymatic activities of <i>T. obliquus</i> cultures grown on Bold's basal medium (BBM) supplemented with various pure lactose concentrations under mixotrophic conditions.. .....	69
<b>Figure 2.2</b> (A) Dry weights and (B-D) enzymatic activities of <i>T. obliquus</i> cultures grown on different sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions under mixotrophic conditions; 40 g.L <sup>-1</sup> pure lactose-supplemented BBM is used as a control. ....	71

<b>Figure 2.3</b> Changes in lactose concentration during mixotrophic cultivation of <i>T. obliquus</i> under various sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions.....	72
<b>Figure 2.4</b> Changes in (A) glucose, (B) galactose, and (C) galactooligosaccharide (GOS) concentrations during mixotrophic cultivation of <i>T. obliquus</i> under various sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions.....	73
<b>Figure 2.5</b> (A) Changes in pH and (B-G) main ionic and trace metals concentrations during mixotrophic cultivation of <i>T. obliquus</i> under various sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions.....	75
<b>Figure 3.1</b> Biomass production for all the eighteen experimental trails/variations at days 6 (A), 9 (B), and 15 (C) of culture.....	90
<b>Figure 3.2</b> Effect of individual factors at different levels on the biomass production for the signal to noise (S/N) ratio at days 6 (A), 9 (B), and 15 (C) of culture.....	91
<b>Figure 3.3</b> Interaction effects plot on the biomass production for the signal to noise (S/N) ratio at days 6 (A), 9 (B), and 15 (C) of culture.....	97
<b>Figure 4.1</b> Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for <i>T. obliquus</i> 's growth under mixotrophic conditions.....	114
<b>Figure 4.2</b> Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for <i>T. obliquus</i> 's nitrate consumption under mixotrophic conditions.....	115
<b>Figure 4.3</b> Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for <i>T. obliquus</i> 's internal nitrogen quota under mixotrophic conditions.....	116
<b>Figure 4.4</b> Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for <i>T. obliquus</i> 's glucose consumption under mixotrophic conditions.....	117
<b>Figure 4.5</b> Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for <i>T. obliquus</i> 's phosphate consumption under mixotrophic conditions.....	118
<b>Figure 4.6</b> Comparison of model prediction (dashed lines) with validation experiments (circles). (A), (B), (C), (D), and (E) correspond to <i>T. obliquus</i> 's growth, nitrate consumption, internal nitrogen quota, glucose consumption, and phosphate consumption, respectively, under mixotrophic conditions.....	122
<b>Figure 5.1</b> Batch cultivation experiments of <i>Tetrademus obliquus</i> microalgae under mixotrophic conditions.....	133

<b>Figure 5.2</b> Changes in biomass concentration across 16 experimental variations.....	142
<b>Figure 5.3</b> Lutein concentration trends for 16 experimental variations.....	144
<b>Figure 5.4</b> Calibration results of proposed model compared to experimental data for cell growth (A), lutein production (B), consumption of glucose (C), nitrate (D) and phosphate (F) and internal nitrogen (E) and phosphorus (G) quotas.....	149
<b>Figure 5.5</b> Comparison of model prediction with validation experiments (4, 6, 9 and 15) for cell growth (A), lutein production (B), consumption of glucose (C), nitrate (D) and phosphate (F) and internal nitrogen (E) and phosphorus (G) quotas.....	150
<b>Figure 6.1</b> Schéma général du système en régime stationnaire. ....	160
<b>Figure 6.2</b> Identification des taux de dilution optimaux pour une productivité maximale en biomasse (A) et en lutéine (B)..	161
<b>Figure 6.3</b> Cinétique des productivités maximales simulées en biomasse (A) et en lutéine (B) en mode continu.....	164
<b>Figure 6.4</b> Exemples des modèles de photobioréacteurs disponibles dans notre laboratoire : (A) photobioréacteur Applikon à double paroi agitée (volume de travail = 5 L) ; (B) photobioréacteur à réservoir agitée (volume de travail = 6 L); (C) photobioréacteur à colonne à bulles verticale (volume de travail = 27 L) (Deschênes & Vande Wouwer, 2016).....	165
<b>Figure S.1</b> Résultats individuels en duplicata des 12 expériences de calibration (niveaux de nitrate et de phosphate présentés dans le Tableau 5.3) pour la biomasse, la lutéine, le glucose, le nitrate, le phosphate et les quotas internes d'azote et de phosphore.....	172
<b>Figure S.2</b> Résultats individuels en duplicata des 4 expériences de validation (niveaux de nitrate et de phosphate présentés dans le Tableau 5.3) pour la biomasse, la lutéine, le glucose, le nitrate, le phosphate et les quotas internes d'azote et de phosphore.....	197
<b>Figure S.3</b> Schéma détaillé représentant la résolution du système de culture en photobioréacteur (régime stationnaire) à l'aide du bloc Contrainte Algébrique ( $f(z) = 0$ ) de Simulink – MATLAB.....	206
<b>Figure S.4</b> Taux de dilution optimaux pour maximiser les productivités en biomasse et en lutéine pour différents niveaux initiaux de nitrate dans un photobioréacteur en mode continu (1×, 2×, 5×, 10× BBM). ....	208

**Figure S.5** Simulation en régime permanent de la cinétique de la biomasse, des quotas internes d'azote et de phosphore, du nitrate, du phosphate, du glucose et de la lutéine pour différents niveaux initiaux de nitrate.. ..... 209

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>SIGLE</b>	<b>Définition du sigle</b>
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance (analyse de variance)
<b>AWP</b>	Acid Whey Permeate (perméat de lactosérum doux)
<b>BBM</b>	Bold's Basal Medium (milieu de culture basal)
<b>BOD</b>	Biochemical Oxygen Demand (demande biochimique en oxygène)
<b>C/N ratio</b>	Carbon to Nitrogen ratio (ratio carbone/azote)
<b>CPCC</b>	Canadian Phycological Culture Centre (centre canadien de culture Phycologique)
<b>DEA</b>	Daily-averaged Enzymatic Activity (activité enzymatique moyenne quotidienne)
<b>DOE</b>	Design Of Experiment (plan d'expériences)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylènediaminetétraacétique)
<b>GOS</b>	Galacto-oligosaccharide
<b>HPLC</b>	High-Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide haute performance)
<b>IC</b>	Ionic Chromatography (chromatographie ionique)
<b>ICP</b>	Inductively Coupled Plasma (plasma à couplage inductif)
<b>LHC</b>	Light Harvesting Complex (antenne collectrice)
<b>MP-AES</b>	Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-onde)
<b>NEA</b>	Normalized Enzymatic Activity (activité enzymatique normalisée)
<b>OA</b>	Orthogonal Array (matrice orthogonale)
<b>ONPG</b>	<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

---

<b>PBR</b>	Photobioréacteur
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>RID</b>	Refractive Index Detector (détecteur à indice de réfraction)
<b>SD</b>	Standard Deviation (écart-type)
<b>S/N ratio</b>	Signal to Noise ratio (ratio signal/bruit)
<b>SWP</b>	Sweet whey permeate (perméat de lactosérum doux)
<b><i>T. obliquus</i></b>	<i>Tetrademus obliquus</i>
<b>VEA</b>	Volumetric or total Enzymatic Activity (activité enzymatique volumétrique ou totale)
<b>WLS approach</b>	Weighted Least Squares approach (approche des moindres carrés pondérés)

---

## LISTE DES SYMBOLES

$\alpha$	Rendement instantané de la production de lutéine liée à la croissance cellulaire
$\beta$	Vitesse spécifique de formation de lutéine (non associée à la croissance)
$\rho$	Taux d'absorption d'azote
$\rho_{\max}$	Taux d'absorption maximal d'azote
$\rho_N$	Taux d'absorption d'azote
$\rho_{N\max}$	Taux d'absorption maximal d'azote
$\rho_P$	Taux d'absorption de phosphore
$\rho_{P\max}$	Taux d'absorption maximal de phosphore
$\mu$	Taux de croissance de la biomasse
$\mu_{\max}$	Taux de croissance maximal de la biomasse
$\theta$	Vecteur de paramètres du modèle
$\hat{\Sigma}$	Matrice de covariance du bruit de mesure
$c_v$	Coefficient de variation (ou erreurs relatives)
$D$	Taux de dilution
$D_{opB}$	Taux de dilution optimal pour la productivité maximale en biomasse
$D_{opL}$	Taux de dilution optimal pour la productivité maximale en lutéine
$DEA$	Daily-averaged enzymatic activity (activité enzymatique moyenne quotidienne)
$DW$	Dry weight (poids sec)
$F$	Débit d'alimentation
$FIM$	Matrice d'information de Fisher

<b>G</b>	Concentration du substrat glucose
<b>G<sub>0</sub></b>	Condition initiale de glucose
<b>J(θ)</b>	Fonction de coût
<b>K<sub>G</sub></b>	Coefficient de rendement du glucose sur les cellules
<b>K<sub>G</sub></b>	Constantes de demi-saturation pour l'absorption de glucose
<b>K<sub>N</sub></b>	Constantes de demi-saturation pour l'absorption de nitrate
<b>K<sub>P</sub></b>	Constantes de demi-saturation pour l'absorption de phosphate
<b>K<sub>sG</sub></b>	Constantes de demi-saturation pour l'absorption de glucose
<b>K<sub>sN</sub></b>	Constantes de demi-saturation pour l'absorption de nitrate
<b>K<sub>sP</sub></b>	Constantes de demi-saturation pour l'absorption de phosphate
<b>L</b>	Concentration en lutéine
<b>L<sub>0</sub></b>	Condition initiale de lutéine
<b>N</b>	Concentration du substrat nitrate
<b>N<sub>0</sub></b>	Condition initiale de nitrate
<b>n</b>	Nombre de réponses
<b>NEA</b>	Normalized enzymatic activity (activité enzymatique normalisée)
<b>OD</b>	Optical density (densité optique)
<b>P</b>	Concentration du substrat phosphate
<b>P<sub>0</sub></b>	Condition initiale de phosphate
<b>P<sub>B</sub></b>	Productivité en biomasse
<b>P<sub>L</sub></b>	Productivité en lutéine
<b>q</b>	Quota interne d'azote
<b>Q<sub>max</sub></b>	Quota d'azote maximum
<b>Q<sub>min</sub></b>	Quota d'azote minimum
<b>q<sub>N</sub></b>	Quota interne d'azote



<b>q<sub>N0</sub></b>	Condition initiale de quota d'azote
<b>Q<sub>Nmax</sub></b>	Quota d'azote maximum
<b>Q<sub>Nmin</sub></b>	Quota d'azote minimum
<b>q<sub>P</sub></b>	Quota interne de phosphore
<b>q<sub>P0</sub></b>	Condition initiale de quota de phosphore
<b>Q<sub>Pmax</sub></b>	Quota de phosphore maximum
<b>Q<sub>Pmin</sub></b>	Quota de phosphore minimum
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de corrélation (ou coefficient de détermination)
<b>S<sub>G</sub></b>	Concentration du substrat glucose
<b>S<sub>N</sub></b>	Concentration du substrat nitrate
<b>S<sub>P</sub></b>	Concentration du substrat phosphate
<b>SSE</b>	Sum of squares due to the error (somme des carrés des erreurs)
<b>SSR</b>	Sum of squares due to regression (somme des carrés des résidus)
<b>t</b>	Temps
<b>TSS</b>	Total sum of squares (somme totale des carrés)
<b>V</b>	Volume
<b>VEA</b>	Total or volumetric enzymatic activity (activité enzymatique totale ou volumétrique)
<b>X</b>	Concentration en biomasse
<b>X<sub>0</sub></b>	Condition initiale de biomasse
<b>Y<sub>i</sub></b>	Réponse mesurée
<b><math>\hat{Y}_t</math></b>	Réponse prédite par le modèle
<b><math>\bar{Y}</math></b>	Moyenne des réponses mesurées
<b>Y<sub>X/G</sub></b>	Coefficients de rendement de croissance sur le glucose
<b>Y<sub>X/P</sub></b>	Coefficients de rendement de croissance sur le phosphate
<b>W</b>	Matrice de pondération d'erreur



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### MISE EN CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

La microalgue verte *Tetradesmus obliquus* (auparavant connue sous le nom de *Scenedesmus obliquus* (Wynne & Hallan, 2015) est l'une des espèces les plus étudiées en raison de son taux de croissance rapide et de sa capacité à accumuler des quantités substantielles de macromolécules d'intérêt (Rajabi Islami & Assareh, 2019). Cette espèce a été considérée comme un candidat prometteur pour la production de biodiesel renouvelable et a été utilisée pour produire des bioproduits commercialement pertinents tels que les caroténoïdes (Yang *et al.*, 2014; Di Caprio *et al.*, 2018). De plus, sa capacité à s'adapter à des conditions stressantes et à utiliser plusieurs sources de carbone inorganique et organique attire l'attention des chercheurs pour son utilisation dans la bioremédiation et le traitement des eaux usées (Di Caprio *et al.*, 2018, 2019). Cette espèce a fait l'objet de plusieurs années de recherche dans notre laboratoire. Mon mémoire de maîtrise (2018) et mes publications scientifiques (2019) ont également exploré, pour la première fois, son potentiel à utiliser un déchet très polluant de l'industrie laitière (le perméat de lactosérum acide) pour produire une enzyme spécifique d'intérêt alimentaire et pharmaceutique ( $\beta$ -galactosidase). Cette microalgue peut donc être une partie de la solution aux problèmes énergétiques et environnementaux actuels.

Cependant, la production de *T. obliquus* pour ces applications à grande échelle ne peut être commercialement compétitive que si cette production est conçue par une vision systémique. En effet, les faibles concentrations encore atteintes engendrent des coûts importants pour séparer l'eau de la biomasse produite (Oliveira *et al.*, 2021). La principale étape à franchir avant ces applications commerciales est d'améliorer la productivité des systèmes de culture à plus forte densité cellulaire. Ce projet de doctorat vise précisément

cette problématique en recherchant à déterminer les conditions de culture qui permettront de tels résultats. La production des molécules à haute valeur ajoutée sera également étudiée via les pigments, notamment la lutéine ayant plusieurs applications nutritionnelles et pharmaceutiques (del Rio-Chanona *et al.*, 2017). Le mode de production « mixotrophe » a été proposée pour augmenter le taux de croissance de la biomasse et pour améliorer la production de la lutéine. Ce mode, impliquant la consommation par les microalgues de sucres simples en plus du gaz carbonique, favorise un taux de croissance plus rapide mais doit être étudié, caractérisé et contrôlé pour une meilleure utilisation des ressources. Le mode mixotrophe est encore peu maîtrisé à ce jour, donc le potentiel de contribution de ce projet est énorme.

D'autre part, afin de réduire l'écart entre les observations en laboratoire à petite échelle et la réalité à grande échelle en industrie, le développement de modèles mathématiques prenant en compte plusieurs facteurs est envisagé. Ces modèles permettent la surveillance, le contrôle et l'optimisation des systèmes de production (Bernard, Mairet, & Chachuat, 2016), en permettant d'observer l'influence de chaque variation des conditions de processus sans avoir besoin de la tester expérimentalement (Darvehei, Bahri, & Moheimani, 2018). Toutefois, la mise au point de tels modèles rencontre actuellement de nombreux défis, notamment en raison de la complexité des structures mathématiques et de l'estimation difficile des paramètres. La culture mixotrophe ajoute à cette difficulté de modélisation, rendant la tâche encore plus ardue. De plus, le manque de validation expérimentale subsiste, car les bases de données expérimentales sont souvent réutilisées d'une publication à l'autre.

À notre connaissance, ce projet présente, pour la première fois, l'utilisation de plans d'expériences uniques pour concevoir un ensemble de données efficace permettant l'étude d'un large éventail de facteurs avec un nombre limité d'expériences, économisant ainsi du temps et des coûts. Les données expérimentales ont été utilisées pour développer un modèle multifactoriel réaliste assez complexe et aussi pour améliorer la production de biomasse et de la lutéine par la microalgue *T. obliquus* cultivée dans des conditions mixotrophes, en

mettant l'accent sur les concentrations de nutriments dans la composition du milieu. Le modèle mathématique ainsi développé a été utilisé pour développer des approches de contrôle automatique pour la production de biomasse et des pigments à grande échelle. Les résultats de cette thèse ont une portée générale et pourront être utiles pour d'autres espèces de microalgues. De plus, ils fournissent des données de référence précieuses qui complètent la littérature existante.

### **DEFINITION DU PROJET DE THESE**

Le présent projet s'inscrit dans un contexte où la productivité en biomasse est devenue un principal facteur qui limite l'essor du domaine de la valorisation des microalgues. En ce sens, une nouvelle méthodologie est développée pour améliorer la productivité en biomasse des microalgues cultivées en conditions mixotrophes, en se concentrant sur les concentrations en nutriments dans la composition du milieu. Cette méthodologie exploite le mode nutritif mixotrophe et utilise des approches de contrôle pour une utilisation optimale des ressources. Le but est de développer de nouvelles conditions opératoires pour la culture des microalgues qui permettent d'augmenter la productivité en biomasse et en molécules à haute valeur ajoutée. La réussite de ce projet ouvrira la voie à de nouveaux partenariats avec l'industrie sur l'utilisation des microalgues ou de leurs co-produits.

Nous avons appliqué cette méthodologie au cas de la microalgue verte *T. obliquus* qui a été obtenue auprès du Centre Canadien de Culture Phycologique (CCCP) à l'Université de Waterloo (Ontario, Canada). Cette souche a été cultivée en mode mixotrophe dans du milieu de culture basal (BBM) supplémenté par du glucose (10 g.L<sup>-1</sup>) en conditions axéniques. Les souches sont maintenues en phase exponentielle de croissance avant toute expérience, à une température de 21.0 °C, sous agitation orbitale continue (120 rpm), une concentration en CO<sub>2</sub> de 1%, un pH de 7,2 et soumises à une intensité lumineuse continue (100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) 24 heures sur 24. Notre laboratoire dispose d'incubateurs permettant d'effectuer des expériences en flacons agités et de photobioréacteurs (différents modèles et

différentes volumes) pour réaliser des productions d'échelle plus importante. Pour des raisons statistiques, tous les échantillons représentant les différentes conditions de culture ont été répliqués. Des analyses statistiques ont été systématiquement effectuées à l'aide de tests standard d'analyse de variance (ANOVA) et la signification statistique a été déterminée en calculant les valeurs-*p*.

Pour faire le lien avec mon projet de maîtrise à l'UQAR, un premier article, qui étudie l'effet d'utilisation de différentes proportions du perméat de lactosérum doux (un autre déchet très polluant de l'industrie laitière) sur la production de biomasse et des molécules à haute valeur ajoutée ( $\beta$ -galactosidase et galacto-oligosaccharides) par la microalgue *T. obliquus*, a été publié. Un deuxième article, qui utilise l'approche expérimentale de Taguchi (des plans d'expériences permettant d'étudier plusieurs facteurs à plusieurs niveaux avec un nombre réduit d'expériences), a été également publié. Cet article a évalué l'influence des huit (8) nutriments (facteurs), dont la variation a un effet significatif sur la productivité des microalgues en biomasse. Les résultats de l'article ont été utilisés pour identifier les 3 nutriments les plus limitants pour la croissance de la microalgue *T. obliquus*. Des expériences qui utilisent différentes concentrations de ces 3 nutriments ont été effectuées pour développer des modèles mathématiques de croissance. Un suivi journalier (deux fois par jour durant la phase de croissance) a été effectué pour chacun des nutriments et pour la concentration en biomasse. Les équations mécanistes de Monod, Droop et Haldane ont été utilisés pour déterminer les paramètres des modèles de croissance en utilisant le logiciel MATLAB® 2019a. L'obtention des paramètres a été effectuée via des routines de minimisation d'un critère de moindres carrés, similairement à ce que nous avons réalisé dans le passé (Deschênes & Vande Wouwer, 2016), où des approches de recherche de minimum absolu (Nedler-Mead) et d'estimation des matrices de covariance des paramètres (Levenberg-Marquardt) ont été combinées. La validation des modèles est faite avec des données expérimentales indépendantes de celles qui ont été utilisées pour l'identification, mais réalisées dans des conditions d'opération similaires à celles explorées pour l'obtention du modèle. Ce travail a fait l'objet d'un troisième article scientifique. Ensuite, d'autres expériences qui se concentrent sur l'effet de la variation du

nitrate et du phosphate (deux nutriments majeurs) ont été réalisées. Les masses sèches, les quotas internes, les sucres, les anions et les pigments (dont la lutéine) ont été analysés pour avoir les données nécessaires au développement des modèles de croissance et de production des pigments. Ces données ont été utilisées (combinées entre elles) pour obtenir des modèles pour la contribution de chacun des éléments nutritifs, ce qui a permis de maximiser la valeur de l'information obtenue dans chacune des expériences. L'équation de Luedeking-Piret a été utilisée pour développer le modèle de production de la lutéine. Les résultats de ces travaux ont été présentés sous la forme d'un quatrième article scientifique. Enfin, le développement de l'approche de contrôle a été effectué en se basant sur les modèles obtenus et son application a été validé en simulation afin d'être appliqué sur des systèmes réels (photobioréacteurs) éventuellement.

#### **OBJECTIFS DE LA THESE**

La thèse vise à développer des méthodes de production de biomasse à haute densité cellulaire et de molécules à haute valeur ajoutée (notamment la lutéine) par la microalgue *Tetrademus obliquus* en mode mixotrophe. Le travail a été organisé pour atteindre les quatre (4) objectifs spécifiques suivants :

Objectif spécifique #1 : Déterminer les productivités en biomasse maximales qu'il est possible d'atteindre en mode mixotrophe par l'étude détaillée des cinétiques de croissance en lien avec la disponibilité des nutriments.

Objectif spécifique #2 : Développer des modèles cinétiques multifactoriels pour la croissance de la microalgue *T. obliquus* en fonction de la quantité de nutriments en conditions mixotrophes.

Objectif spécifique #3 : Développer des modèles cinétiques multifactoriels (à plusieurs facteurs/nutriments) pour la production de biomasse et de pigments (en particulier la lutéine) par la microalgue *T. obliquus* en conditions mixotrophes.

Objectif spécifique #4 : Conceptualiser des approches de contrôle automatique pour la production de biomasse microalgale et de la lutéine en utilisant les modèles mathématiques ainsi développés et en vérifier les prédictions de comportement en photobioréacteurs par des simulations.

#### **CONTRIBUTIONS ORIGINALES**

La soutenance de la thèse de doctorat a été planifiée pour le mois de septembre 2023 avec un total de quatre (4) publications scientifiques. Le mode de production mixotrophe est encore peu maîtrisé à ce jour, donc le potentiel de contribution de ce projet est énorme. Bien que quelques modèles de cinétique de croissance pour l'espèce *Tetradismus obliquus* en mode mixotrophe et de production de pigments aient été développés, leur utilisation pour la régulation de ces processus reste très limitée. Ainsi, l'intégration de ces modèles dans une approche de contrôle de ce type de processus reste largement inexplorée. À notre connaissance, ce projet présente, pour la première fois, l'utilisation des plans d'expériences uniques pour concevoir un ensemble de données efficace permettant l'étude d'un large éventail de facteurs avec un nombre limité d'expériences, économisant ainsi du temps et des coûts. Les résultats de cette étude permettront de déboucher sur plusieurs nouveaux projets de recherche entre l'UQAR, l'INAF (Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels à Québec) et ses partenaires industriels, et offriront un soutien à l'essor d'entreprises biotechnologiques québécoises comme Iso-BioKem (nouvelle entreprise spécialisée dans la production des microalgues à Rimouski) pour alimenter des secteurs de pointes tels que la recherche scientifique, l'alimentaire, le biomédical et le pharmaceutique. De plus, les publications scientifiques envisagées serviront comme matière de base pour d'autres activités de recherche visant la production à plus large échelle d'autres espèces de microalgues.



## STRUCTURE DE LA THESE

Ce manuscrit est présenté sous la forme d'une thèse par articles composée de quatre articles scientifiques originaux intégrés dans six chapitres. La structure du document inclut une introduction générale, un état de l'art, les quatre articles scientifiques, un chapitre synthétique et une conclusion générale ainsi qu'une annexe fournissant des informations supplémentaires. Le détail de la structure est présenté ci-dessous :

### ✓ *Introduction générale*

Ce chapitre établit le contexte et la problématique de la recherche, définit clairement les objectifs du projet ainsi que ses contributions originales, et présente de manière détaillée le plan du document.

### ✓ *Chapitre 1 : État de l'art*

Ce chapitre propose une revue systématique des connaissances existantes sur les aspects clés de l'utilisation et de la culture des microalgues. Il examine l'impact des différents paramètres de culture sur la croissance microalgale et présente les stratégies de contrôle disponibles, y compris l'utilisation de la modélisation mathématique. En outre, il expose l'espèce de microalgue sélectionnée comme modèle d'étude (*T. obliquus*), en précisant ses caractéristiques clés.

### ✓ *Chapitre 2 : Influence de l'utilisation du perméat de lactosérum doux sur la croissance de la microalgue *Tetrademus obliquus* et la production des enzymes de type $\beta$ -galactosidase*

Ce chapitre sert de pont entre mon projet de maîtrise et mon projet de doctorat en étudiant l'influence de l'utilisation du perméat de lactosérum doux, un rejet industriel très polluant mais à faible coût en tant que source de carbone organique, sur la croissance de la microalgue *T. obliquus* et la production de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. Cette étude vise à optimiser l'utilisation de ce rejet pour une valorisation accrue.

- ✓ *Chapitre 3 : Conception d'une démarche d'optimisation des milieux de culture pour maximiser la production de biomasse de la microalgue *Tetrademus obliquus* en conditions mixotrophes*

Dans ce chapitre, l'approche expérimentale de Taguchi est utilisée pour optimiser la production de biomasse de la microalgue *T. obliquus*. Cette méthode permet d'étudier plusieurs facteurs à plusieurs niveaux, tout en minimisant le nombre d'expériences nécessaires. Les résultats obtenus sont analysés à l'aide de techniques statistiques pour déterminer une composition optimale du milieu de culture, qui maximisera la production de biomasse de cette microalgue.

- ✓ *Chapitre 4 : Un modèle fiable à plusieurs facteurs/nutriments pour la production rapide de biomasse microalgale à haute densité sur un large spectre de conditions mixotrophes*

Ce chapitre présente une approche novatrice pour le développement d'un modèle mathématique réaliste de la production de biomasse de microalgues *T. obliquus* en conditions mixotrophes, qui se focalise sur les concentrations des nutriments dans le milieu. Cette méthode utilise pour la première fois l'approche expérimentale de Taguchi pour concevoir un ensemble de données efficace en vue de développer le modèle.

- ✓ *Chapitre 5 : Un modèle cinétique robuste à plusieurs facteurs/nutriments pour améliorer les rendements en lutéine et en biomasse lors de la culture mixotrophe de microalgues - Une étape vers des productions réussies à grande échelle*

Ce chapitre a développé un modèle cinétique multifactoriel complexe qui caractérise l'impact de trois nutriments critiques (nitrate, phosphate et glucose) sur la croissance et la production de lutéine par la microalgue *T. obliquus* en flacons agités. Les résultats obtenus dans ce chapitre sont pertinents pour la modélisation de la croissance d'autres espèces de microalgues, ainsi que la mise en place de stratégies de contrôle en temps réel pour les photobioréacteurs.

- ✓ *Chapitre 6 : Simulations prédictives en mode continu pour des productivités maximales en biomasse et en pigments*

Ce chapitre décrit la conceptualisation de méthodes de contrôle automatique pour optimiser la production de biomasse et de lutéine chez *T. obliquus* en mode continu de culture, en utilisant les modèles mathématiques développés précédemment. Des simulations en temps réel ont été utilisées pour vérifier le comportement attendu du système et des perspectives d'amélioration ont été présentées.

✓ *Conclusion générale*

Cette dernière partie de la thèse expose le bilan global des différents travaux réalisés, en particulier concernant l'application de stratégies de contrôle pour les photobioréacteurs à travers l'utilisation de simulations et de validations expérimentales à effectuer. Des propositions sont ainsi faites dans la continuité du sujet abordé.

✓ *Annexes*

Le présent ouvrage comporte deux annexes. La première annexe fournit des informations détaillées sur les résultats complets de la calibration et de la validation du modèle présenté dans le chapitre 5. La deuxième annexe présente les résultats de la simulation en régime continu dans un photobioréacteur, fournissant ainsi des compléments d'information au chapitre 6.

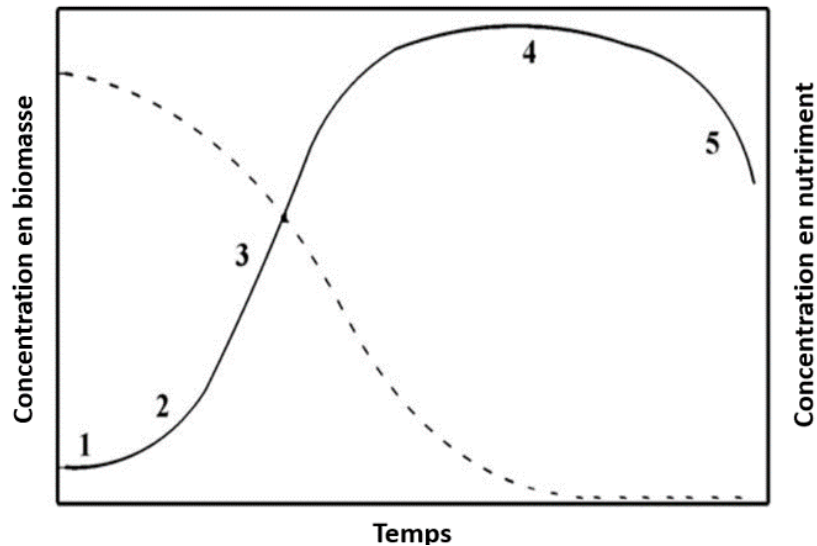
# CHAPITRE 1

## ÉTAT DE L'ART

### 1.1 GENERALITE SUR LES MICROALGUES

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques microscopiques présents dans les environnements aquatiques, marins ou d'eau douce (Priyadarshani & Rath, 2012). Le nombre d'espèces est estimé de 200 000 à 800 000, dont environ 35 000 seulement ont été décrites dans la littérature soulignant leur grande diversité (Odjadjare, Mutanda, & Olaniran, 2017). La majorité des microalgues croissent à une température de 25-35°C avec un pH neutre (Zeng *et al.*, 2011). Celles-ci ont principalement besoin de trois composants pour leur croissance : la lumière du soleil, l'eau et une source de carbone. La présence d'autres éléments est néanmoins nécessaire : les principaux sont l'azote (N), le phosphore (P) et le soufre (S) (Skjånes, Rebours, & Lindblad, 2013). Enfin, il est nécessaire d'ajouter à cela plusieurs autres nutriments (oligoéléments essentiels) au milieu de culture. Ceux-ci sont : le fer (Fe), le magnésium (Mg), le manganèse (Mn), le calcium (Ca), le sodium (Na), le chlore (Cl), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le molybdène (Mo), le bore (B) et le cobalt (Co).

Dans des conditions environnementales adéquates et avec suffisamment de nutriments, les microalgues peuvent se multiplier assez rapidement. En général, elles ont la capacité de doubler leur biomasse sur une durée variant de 3.5 à 24 h en phase exponentielle de croissance (Chisti, 2007). Comme l'ensemble des microorganismes, les microalgues ont une courbe de croissance divisée en cinq phases (Figure 1.1). Cette courbe est caractéristique de la croissance des microalgues en milieu non renouvelé appelé aussi mode de culture batch.



**Figure 1.1** Représentation schématique du taux de croissance des microalgues en mode batch (ligne continue) et de la concentration en éléments nutritifs (ligne pointillée) (Mata, Martins, & Caetano, 2010).

- (1) Phase de latence ou d'adaptation au milieu de culture : la vitesse de croissance durant cette période est quasi nulle;
- (2) Phase de croissance exponentielle, représentant le taux de croissance maximal dans les conditions spécifiques;
- (3) Phase de croissance linéaire : la vitesse de croissance est à son maximum et est constante.
- (4) Phase de croissance stationnaire : la capacité du milieu est atteinte, la croissance est nulle ou le taux de multiplication cellulaire est égal au taux de mortalité;
- (5) Phase de déclin ou de mort : les microalgues meurent et ne se reproduisent plus à cause de l'épuisement complet d'au moins un des nutriments (courbe en tirets).

La classification des microalgues a traditionnellement été réalisée par pigmentation, cycle de vie et structures cellulaires de base (Odjadjare *et al.*, 2017). Cependant, des méthodes moléculaires telles que l'électrophorèse sur gel dénaturant et le séquençage de nouvelle génération sont des techniques en plein développement pour la détection et la classification de nouvelles espèces de microalgues (Ebenezer, Medlin, & Ki, 2012).

Généralement, les microalgues sont classées en deux divisions procaryotes (cyanophytes et prochlorophytes) et neuf divisions eucaryotes (glaucophytes, rhodophytes, heterokontophytes, haptophytes, cryptophytes, dinophytes, euglenophytes, chlorarachniophytes et chlorophytes) (Mutanda *et al.*, 2011). Cependant, selon Khan *et al.* (2009), les groupes de microalgues les plus importants en termes d'abondance sont les suivants : les diatomées, les algues vertes, les algues bleues-vertes et les algues dorées (Tableau 1.1).

**Tableau 1.1** Les quatre groupes les plus importants de microalgues en termes d'abondance (Khan *et al.*, 2009).

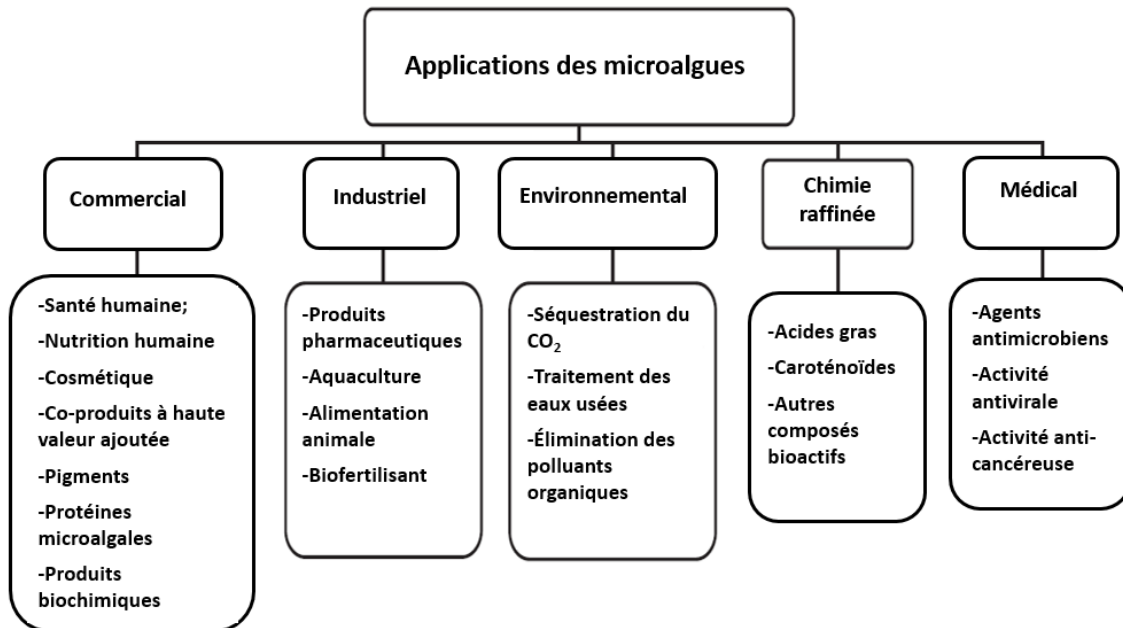
Groupe de microalgue	Espèces connues (estimé)	Habitat
Diatomées (bacillariophycées)	100000	Océans, eau douce et saumâtre
Algues vertes (chlorophycées)	8000	Eau douce
Algues bleues (cyanophycées)	2000	Différents habitats
Algues dorées (chrysophyceae)	1000	Eau douce

La crise énergétique mondiale a récemment suscité un intérêt croissant pour la filière de valorisation des microalgues. La découverte du potentiel des microalgues à produire une large gamme de composés bioactifs ayant des applications nutritionnelles, cosmétiques et pharmaceutiques a également renforcé cet intérêt. La plupart des recherches (Rösch & Posten, 2012; Rizwan *et al.*, 2018) portent sur : (1) la production de biocarburants, (2) de composés bioactifs pour les cosmétiques et les nutraceutiques, (3) la dépollution des eaux usées et la réduction des émissions de CO<sub>2</sub>, (4) la santé et la nutrition humaine et (5) l'alimentation du bétail et des organismes aquatiques.

## 1.2 APPLICATION DES MICROALGUES

La biomasse des microalgues peut être utilisée comme matière première pour la production de biocarburants, de biofertilisants, de produits pharmaceutiques, de nutraceutiques et d'autres bioproduits. De plus, Bhalamurugan *et al.* (2018) estiment que

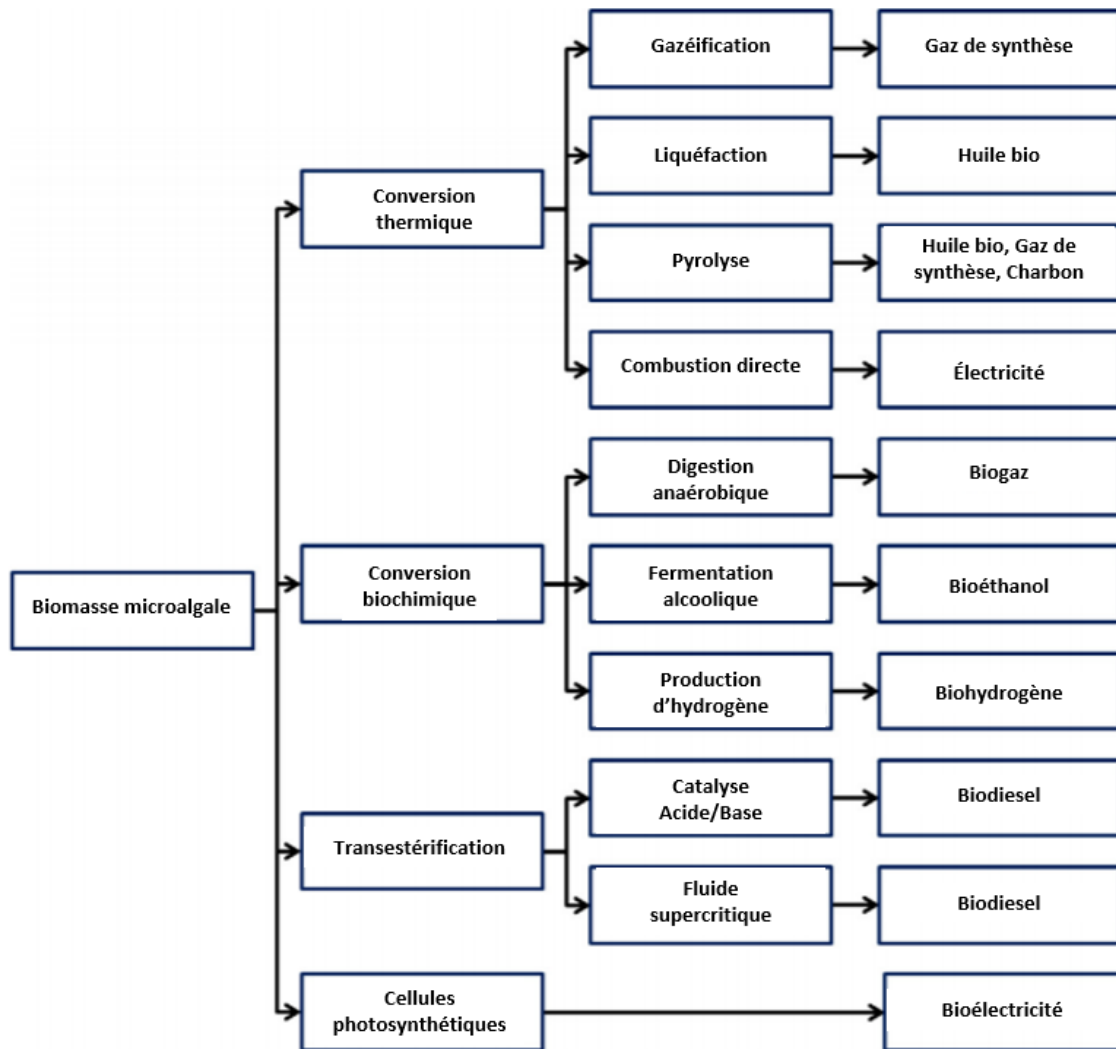
les microalgues vont jouer un rôle central dans notre alimentation quotidienne dans un proche avenir grâce à leur richesse en protéines, en glucides et en lipoprotéines de haute densité. Ils contiennent de nombreux composés bioactifs pouvant être utilisés à des fins commerciales (Priyadarshani & Rath, 2012). La Figure 1.2 donne une idée sur les domaines d'application de microalgues.



**Figure 1.2** Organigramme montrant les applications des microalgues dans différents domaines (Rösch & Posten, 2012; Rizwan *et al.*, 2018).

### 1.2.1 Microalgues et biocarburants

Les microalgues peuvent fournir des matières premières pour différents types de biocarburant tels que le biodiesel, le méthane, l'hydrogène, l'éthanol, et autres (Mata *et al.*, 2010). Les technologies de conversion utilisées peuvent être divisées en quatre catégories, à savoir la conversion thermochimique, la conversion biochimique, la transestérification et la pile à combustible microbienne photosynthétique (Figure 1.3).



**Figure 1.3** Processus de conversion de la biomasse microalgale pour la production d'énergie (Chew *et al.*, 2017).

En raison de leur forte teneur en huile et de leur production rapide de biomasse, elles offrent de nombreux avantages comparativement aux biocarburants d'origine végétale :

- Les microalgues peuvent potentiellement produire de 1000 à 4000 gallons/acre/an de biocarburant, soit de 30 à 100 fois plus élevé que le soja et les autres plantes oléagineuses (Demirbas, 2010; Priyadarshani & Rath, 2012) ;
- Elles ont besoin de moins d'eau que les cultures terrestres, ce qui permet de réduire également la charge sur les sources d'eau douce. Par exemple, la quantité d'eau



requis pour produire 1 kg de biomasse microalgale est de 333 litres par rapport au soja qui nécessite 2204 litres pour produire la même quantité (Bhalamurugan *et al.*, 2018) ;

- Elles requièrent beaucoup moins de superficie terrestre (jusqu'à 49 ou 132 fois moins comparées aux cultures de colza ou de soja). Par conséquent, la concurrence pour l'utilisation des terres arables est fortement réduite (Mata *et al.*, 2010) ;

Cependant, il existe également des inconvénients tels que :

- La faible concentration de biomasse en raison de la limite de pénétration de la lumière qui, en combinaison avec la petite taille des cellules microalgales, rend la récolte de biomasse relativement coûteuse (Demirbas, 2010);
- La difficulté de développer des procédures simples et peu coûteuses pour convertir les lipides en biodiesel (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016);
- La sélection des espèces avec un temps de production et un rendement approprié. Les espèces idéales doivent également avoir une biomasse facilement séparable du milieu de culture, adaptée à des conditions de culture peu coûteuses, résistante aux organismes envahissants et aux contaminations bactériennes (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016).

Pour améliorer le rapport coût-efficacité de la stratégie de production de biocarburants à partir de microalgues, leur production peut être associée à capturer de CO<sub>2</sub>, au traitement des eaux usées et à la production de produits chimiques à haute valeur ajoutée. De plus, le développement des nouvelles stratégies de culture et de transformation des microalgues est nécessaire (Demirbas, 2010).

### **1.2.2 Microalgues et composés à haute valeur**

Les microalgues peuvent accumuler un pourcentage élevé de lipides (environ 30 à 50% de leur poids total). La teneur en lipides dépend des conditions de culture notamment le rapport carbone sur azote (C/N). Une augmentation de ce rapport engendre une

augmentation de la teneur en lipides (Chew *et al.*, 2017). Des conditions de stress, telles que la carence en nutriments, la concentration élevée en sels, les températures élevées et le décalage du pH peuvent également améliorer la productivité lipidique en raison de la capacité des microalgues à synthétiser des lipides neutres tels que le triacylglycérade (TAG) comme mécanismes de défense (Kwak *et al.*, 2016). Par exemple, un nombre élevé d'espèces de la famille des algues vertes augmenteront leur teneur en lipides d'environ 15-30% à environ 25-65% lorsqu'elles sont privées d'azote (Skjånes *et al.*, 2013).

Les protéines font également partie des constituants principaux des microalgues et constituent 50 à 70% de leur composition (Chew *et al.*, 2017). La teneur en protéines peut être considérée comme ayant plus de valeur que les biocarburants, et l'extraction de protéines en tant que premier produit pourrait être plus intéressante et la biomasse résiduelle pourrait être utilisée pour produire des biocarburants (Lupatini *et al.*, 2017). En raison de la teneur élevée en protéines de certaines espèces, elles peuvent être utilisées pour la fabrication des aliments, tant pour l'homme que pour les animaux. Les microalgues ont la capacité de synthétiser des protéines dont le profil en acides aminés est équivalent ou meilleur que d'autres protéines de haute qualité (Spolaore *et al.*, 2006). Bien que certaines microalgues contiennent des protéines toxiques, des analyses peuvent être effectuées pour identifier les protéines sûres à utiliser (Chew *et al.*, 2017). Il est important de noter que les protéines de microalgues contiennent des profils d'acides aminés bien équilibrés, comparables à ceux de sources conventionnelles de protéines (œuf et soja) (Becker, 2007). La composition en acides aminés des microalgues ne semble pas être fortement affectée par les changements de luminosité ou de conditions nutritionnelles (Blackburn & Volkman, 2012).

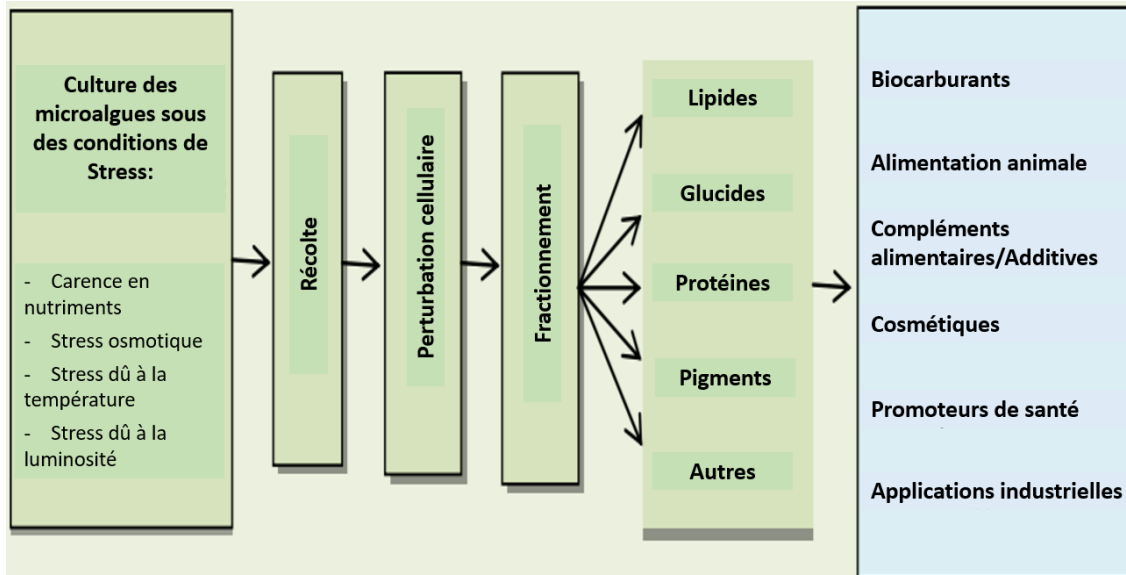
Les glucides représentent le troisième constituant principal des microalgues (Phong *et al.*, 2018). Leur teneur varie énormément en fonction de l'espèce et des conditions de culture, avec des valeurs allant de 5% jusqu'à 30% du poids sec chez certaines espèces (Volkman & Brown, 2006). Les saccharides des microalgues sont principalement composés de glucose, d'amidon, de cellulose et de divers types de polysaccharides. Parmi ceux-ci, le

glucose ou l'amidon sont généralement utilisés pour la production de biocarburants tels que le bioéthanol et l'hydrogène, tandis que les polysaccharides ont des fonctions biologiques en tant que molécules de stockage, de protection et de structure (Chew *et al.*, 2017). Certaines espèces excrètent des polysaccharides (exopolysaccharides) dans leurs milieux de culture, en particulier lorsque l'azote est limité, comme dans la phase de croissance stationnaire (Blackburn & Volkman, 2012). Les exopolysaccharides de microalgues ont une gamme d'applications potentielles notamment pour les industries de la colle, de l'huile, du papier, de la peinture, du textile, des cosmétiques, de l'agroalimentaire et des boissons en tant qu'adhésifs ou agents gélifiants, floculants et épaississants (Blackburn & Volkman, 2012). De plus, les polysaccharides microalgaux peuvent être utilisés comme additifs cosmétiques, ingrédients alimentaires et agents thérapeutiques naturels grâce à leur capacité de moduler le système immunitaire et les réactions inflammatoires, ce qui les rend extrêmement favorables en tant que sources de molécules biologiquement actives (Chew *et al.*, 2017).

Les microalgues sont également une excellente source de pigments. Ces pigments sont principalement regroupés en trois classes : les caroténoïdes, les chlorophylles et phycobiline (Markou & Nerantzis, 2013). Les caroténoïdes sont connus pour leurs applications industrielles et leur demande mondiale est en augmentation grâce à une préférence pour les caroténoïdes naturels par rapport aux synthétiques (Ambati *et al.*, 2019). Une distinction est faite entre les caroténoïdes primaires (*ex.* lutéine et  $\beta$ -carotène) et secondaires (*ex.* astaxanthine). Tous les caroténoïdes directement impliqués dans la photosynthèse sont appelés caroténoïdes primaires. Cependant, les caroténoïdes secondaires sont ceux que les microalgues produisent en grande quantité après une exposition à des stimulants environnementaux, tels que l'exposition à une forte intensité lumineuse, la privation de nutriments, les changements de température, un pH élevé ou bas, une salinité élevée et un stress oxydatif (Skjånes *et al.*, 2013). Plus de 600 caroténoïdes naturels sont identifiés et caractérisés, parmi lesquels l'astaxanthine, le  $\beta$ -carotène et la lutéine sont considérés comme des caroténoïdes importants pour leur application potentielle dans le domaine alimentaire (Zhang *et al.*, 2014). Ils ont été utilisés comme des colorants

alimentaires, des additifs pour l'alimentation humaine et animale et suppléments pour la promotion de la santé dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Spolaore *et al.*, 2006). Bien qu'il existe déjà un marché pour certains caroténoïdes d'origine microalgale, tels que le  $\beta$ -carotène, d'autres pigments peuvent être utilisés dans de nouvelles applications ou comme source alternative pour des applications établies notamment la lutéine qui fait l'objet de beaucoup d'attention pour la prévention de la dégénérescence maculaire des yeux liée au vieillissement (Blackburn & Volkman, 2012).

Certaines microalgues sont d'excellentes sources de vitamines et d'antioxydants, notamment l'acide ascorbique (vitamine C), l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine A) et la riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) (Blackburn & Volkman, 2012). Il a été constaté que la teneur en vitamines d'origine microalgale est affectée par la source et la concentration en azote dans le milieu de culture ainsi que la phase de croissance de microalgues (Chew *et al.*, 2017). Selon Ishaq *et al.* (2016), cette teneur est nettement supérieure à celle des plantes d'ordre supérieur. Les microalgues, souvent exposées à des niveaux élevés d'oxygène et à un stress lié à l'irradiance, ont développé des systèmes de défense sous la forme d'antioxydants destinés à prévenir les dommages aux cellules. Les caroténoïdes constituent le principal groupe d'antioxydants produits par les microalgues, mais il existe également des quantités importantes d'autres antioxydants tels que les vitamines (C et E), l'hydroxytoluène butylé (BHT) entre autres (Skjånes *et al.*, 2013). La Figure 1.4 présente une synthèse des divers composés à haute valeur ajoutée dérivés des microalgues.



**Figure 1.4** Schéma général du concept de micro-raffinerie de microalgues (Markou & Nerantzis, 2013).

### 1.2.3 Microalgues et environnement

Comme la plupart des nutriments dont les microalgues ont besoin (*ex.* l'azote, le phosphore et l'ammoniac) se trouvent souvent dans les eaux post-consommation, l'utilisation des microalgues dans le traitement des eaux usées est devenue une notion répandue (Aishvarya *et al.*, 2015). Plusieurs études ont suggéré des systèmes à double usage combinant la culture de microalgues avec le traitement des eaux usées (Montero *et al.*, 2018). L'utilisation des eaux usées peut réduire les coûts énergétiques et fournir les éléments nutritifs et l'eau douce nécessaires pour la culture de microalgues (Pittman, Dean, & Osundeko, 2011). Certaines espèces de microalgues vertes unicellulaires sont particulièrement tolérantes aux conditions courantes des effluents d'eaux usées, notamment celles des genres *Chlorella* et *Scenedesmus* (Pittman *et al.*, 2011). Ces microalgues peuvent résoudre le problème de l'eutrophisation en éliminant l'azote et le phosphore des eaux usées et produire de l'oxygène photosynthétique, ce qui permet de réduire le besoin d'aération externe des eaux usées (Rizwan *et al.*, 2018). Ils peuvent également éliminer les contaminants organiques, les produits chimiques, les métaux lourds et les agents

pathogènes. En effet, le traitement biologique d'eau contenant des métaux lourds est possible avec les microalgues au moyen de la biosorption, de la bioaccumulation, de la rétention et de la désorption (Aishvarya *et al.*, 2015). Il est à noter que la biomasse de microalgues produite en utilisant des eaux usées ne peut pas être utilisée pour l'alimentation humaine ou animale. Cependant, elle peut être utilisée pour la production de composés chimiques à haute valeur ajoutée (Rizwan *et al.*, 2018).

L'inquiétude mondiale sur le phénomène du réchauffement climatique, dû à l'augmentation constante des émissions de gaz à effet de serre, a mis en avant la séquestration du CO<sub>2</sub> en utilisant des microalgues (Cheah *et al.*, 2015). Les microalgues ont une capacité distinctive à séquestrer le CO<sub>2</sub> avec une efficacité 10 à 50 fois supérieure à celle des plantes terrestres (Zhou *et al.*, 2017). Le processus photosynthétique des microalgues utilise le CO<sub>2</sub> issu des gaz de combustion pour synthétiser les molécules nécessaires à leur croissance. Approximativement 1,83 kg de CO<sub>2</sub> peuvent être fixés dans chaque kilogramme de biomasse microalgale (Aishvarya *et al.*, 2015). La sélection des espèces de microalgues appropriées détermine le succès de la bioconversion du CO<sub>2</sub> pour la production de biomasse. Les espèces idéales doivent avoir une grande capacité de rétention, une grande tolérance à des concentrations élevées de CO<sub>2</sub>, à des polluants toxiques et à des conditions de stress liées à la température, au pH et à la limitation en éléments nutritifs (Cheah *et al.*, 2015).

#### **1.2.4 Microalgues en santé et nutrition humaine**

En raison de leur richesse en plusieurs sources de macro et de micronutriments, les microalgues ont été utilisées avec succès dans la nutrition humaine. Ils sont également riches en diverses molécules bioactives susceptibles de promouvoir la santé humaine. Le principal intérêt des microalgues pour la nutrition humaine provient de leur teneur élevée en protéines.

Quatre espèces de microalgues (*Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella salina*, *Aphanizomenon flos-aquae*) ont trouvé une application dans l'industrie alimentaire

(Varfolomeev & Wasserman, 2011). Les microalgues sont utilisées dans l'alimentation sous forme de comprimés, de gélules et de liquides. Ils sont également ajoutés aux nouilles, au pain, aux biscuits, aux bonbons, à la crème glacée, au tofu et à d'autres aliments courants en tant qu'additifs alimentaires afin d'en améliorer la valeur nutritive. Les extraits sont principalement utilisés pour enrichir des aliments liquides tels que des boissons santé, des boissons gazeuses, du thé, de la bière ou des boissons spiritueuses (Liang *et al.*, 2004).

Il a été démontré qu'un régime alimentaire à base de microalgues contribue significativement à l'amélioration de la santé chez l'homme (Bhalarugan *et al.*, 2018). Cependant, l'utilisation de microalgues comme source de nourriture est encore peu développée en raison des difficultés techniques liées à leur culture et aux connaissances limitées de leur composition chimique et de leur valeur nutritionnelle (Graziani *et al.*, 2013). De plus, avant qu'un nouveau produit alimentaire soit déclaré sans danger pour la consommation humaine, il doit être soumis à une série de tests toxicologiques détaillés pour prouver l'innocuité du produit (Becker, 2007).

Les microalgues présentent également une source naturelle de composés à haute valeur ajoutée avec des propriétés bénéfiques pour la santé humaine (Zhang *et al.*, 2014). Les pigments, notamment les caroténoïdes, possèdent des activités antioxydantes, anticancéreuses et anti-inflammatoires (Pangestuti & Kim, 2011). Les acides gras polyinsaturés, produits par de nombreuses espèces microalgales, fournissent les acides gras essentiels nécessaires à la santé cardiovasculaire, oculaire et neurologique (Spolaore *et al.*, 2006). Cependant, le niveau sécuritaire de consommation de biomasse microalgale est de 20 g par jour ou de 0.3 g des microalgues par kg de poids corporel (Matos, 2017).

À l'heure actuelle, le coût élevé de la commercialisation de ces ingrédients constitue une limite majeure, car le rendement en microalgues est encore trop faible pour répondre aux exigences d'une application industrielle (Zhang *et al.*, 2014). Leur utilisation à l'échelle mondiale semble être limitée aux aliments de santé et aux compléments alimentaires (Milledge, 2011). Par conséquent, la mise au point de modes de culture de

masse rentables pourrait constituer une orientation essentielle pour la biotechnologie des microalgues (Zhang *et al.*, 2014).

### **1.2.5 Microalgues et alimentation des animaux, des organismes aquatiques et des volailles**

La biomasse microalgale peut être incorporée dans l'alimentation des animaux, des poissons ou des volailles et peut influencer positivement leur croissance, leur réponse immunitaire et leur fonction intestinale (Bhalamurugan *et al.*, 2018).

Actuellement, jusqu'à 30% de la biomasse produite est utilisée comme complément de fourrage et environ 50 % de la production mondiale de la microalgue *Arthrospira* est destinée à l'alimentation animale (Varfolomeev & Wasserman, 2011). De plus, l'utilisation de la biomasse de *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Spirulina* dans le régime alimentaire des animaux permet d'améliorer leur réaction immunitaire et leur reproduction, de réguler leur poids et de fournir aux animaux des minéraux et des acides gras naturels (Varfolomeev & Wasserman, 2011).

Les microalgues sont également utilisées pour améliorer les propriétés des produits aquacoles. Ils servent de fourrage aux larves de nombreux coquillages, crustacés et poissons (Pulz & Gross, 2004). L'astaxanthine, obtenue à partir des microalgues *Haematococcus*, a été reconnue au Canada comme agent colorant dans l'alimentation des salmonidés (Spolaore *et al.*, 2006). En France, l'utilisation de la microalgue *Haslea ostrearia* pour la coloration des huîtres a augmenté leur vente jusqu'à 40% (Muller-Feuga, 2000). Les espèces de microalgues *Spirulina* et *Dunaliella* ont également été utilisées pour nourrir les poissons (Varfolomeev & Wasserman, 2011).

De plus, il a été découvert que l'utilisation de 5 à 10% des microalgues dans l'alimentation des volailles peut remplacer partiellement les protéines conventionnelles et peut avoir un effet positif sur le développement de la couleur jaune dans la peau et dans le jaune d'œuf grâce aux caroténoïdes (Spolaore *et al.*, 2006). Des concentrations plus élevées des microalgues dans le fourrage peuvent avoir des effets néfastes (Milledge, 2011).



Malheureusement, la tendance est d'éviter l'utilisation des microalgues vivantes en raison de leur coût élevé et de leurs difficultés de production. L'utilisation des levures peut être une alternative. Cependant leur utilisation se traduit souvent par une performance de culture moins prévisible et le remplacement total des microalgues dans les régimes d'aquaculture n'est pas encore considéré comme suffisamment avancé pour une utilisation généralisée (Spolaore *et al.*, 2006).

### **1.3 LA CULTURE DES MICROALGUES**

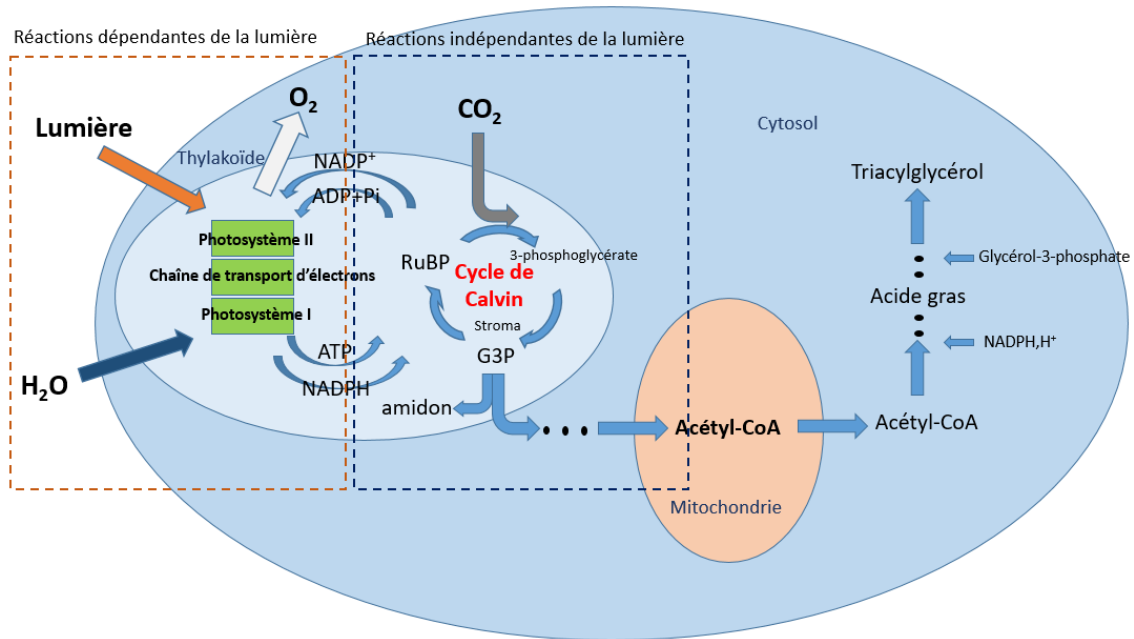
#### **1.3.1 Les modes de nutrition**

Le carbone est un élément essentiel pour la survie et la croissance des microalgues. Certaines espèces peuvent pousser en métabolisant des sources de carbone inorganique et organiques, qui peuvent se produire simultanément et indépendamment, tandis que l'énergie peut être fournie par la lumière et/ou par une source de carbone organique. La façon avec laquelle le microorganisme se procure le carbone définit son mode de nutrition. En général, les microalgues obtiennent les nutriments des habitats aquatiques, absorbent la lumière du soleil, captent le CO<sub>2</sub> de l'air et produisent environ 50% de l'oxygène atmosphérique (Rizwan *et al.*, 2018). Ce mode de nutrition est appelé photoautotrophe (Figure 1.5). Cependant, il existe des espèces qui sont facultativement hétérotrophes et préfèrent, le cas échéant, un substrat de carbone organique (Shi, Zhang, & Chen, 2000). Certaines microalgues sont mixotrophes et peuvent simultanément entraîner la phototrophie et l'hétérotrophie pour utiliser à la fois des substrats de carbone inorganique (*ex.* CO<sub>2</sub>) et de carbone organique (Salati *et al.*, 2017). Finalement, on parle de mode de nutrition photohétérotrophe lorsque les microalgues utilisent la lumière comme source d'énergie pour assimiler les sucres (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

Les microalgues photoautotrophes utilisent la lumière comme source d'énergie pour former de l'énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH dans la phase lumineuse de la photosynthèse (Figure 1.5). Dans la phase sombre, le cycle de Calvin utilise cette énergie

pour transformer le CO<sub>2</sub> en composés organiques qui peuvent être utilisés dans l'organisme (Figure 1.5). Les microalgues hétérotrophes utilisent le carbone organique comme source d'énergie. Les organismes photohétérotrophes ne peuvent pas croître en utilisant seulement la lumière ou seulement une source de carbone organique (*ex.* glucose). Ils nécessitent la présence de ces deux éléments en même temps alors que les organismes mixotrophes peuvent facilement basculer entre le mode de nutrition autotrophe et hétérotrophe.

La culture mixotrophe de microalgues peut améliorer le taux de croissance, réduire le cycle de croissance, minimiser la perte de biomasse due aux heures noires de respiration pure et améliorer la productivité lipidique et protéique (Salati *et al.*, 2017). Certains scientifiques ont rapporté que le taux de croissance des microalgues cultivées en mode mixotrophe est approximativement égal à la somme de celles en mode photoautotrophe et hétérotrophe (Marquez *et al.*, 1993). D'autres ont révélé que la croissance en mixotrophie n'était pas la simple combinaison de ceux de la photoautotrophie et de l'hétérotrophie et que les deux processus métaboliques s'affectaient, contribuant à des effets synergiques qui améliorent la productivité de la biomasse (Mohammad Mirzaie *et al.*, 2016).



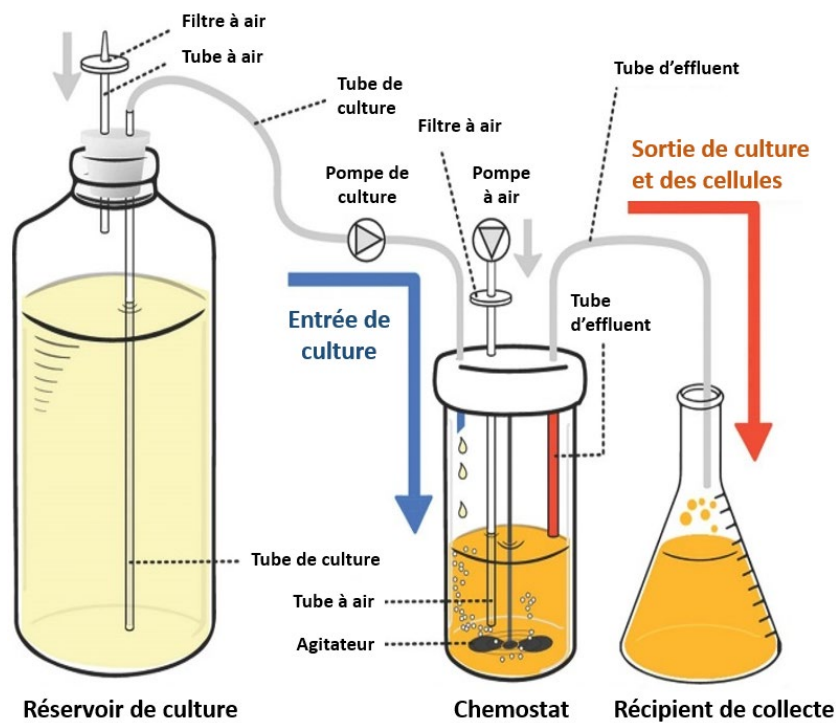
**Figure 1.5** Schéma général du concept de photosynthèse dans les cellules de microalgues (Zeng *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Les modes de culture

Il existe trois modes d'opération basiques pour cultiver les microalgues : le mode batch (discontinu), le mode semi-continu et le mode continu. Les avantages et les inconvénients liés aux modes de culture sont illustrés au Tableau 1.2.

Le mode batch est le plus courant en raison de sa simplicité et de son faible coût. Dans ce système, les cellules se multiplient dans un récipient fermé (un système fermé) dans lequel il n'y a ni entrée ni sortie de substances. La densité cellulaire des microalgues augmente constamment avec une diminution concomitante des éléments nutritifs du milieu de culture. Lorsqu'un nutriment essentiel est épuisé, la croissance des microalgues cesse et elles finissent par mourir. Ce mode de culture dure généralement environ une semaine. Après cela, une inoculation de l'ancienne culture dans un nouveau système fermé contenant un milieu de culture frais doit être effectuée. Tous les composés produits par les cellules au cours de la croissance augmentent également en concentration dans le milieu de culture.

Dans les modes de culture continu et semi-continu, un milieu frais est ajouté à la culture à un taux constant et le vieux milieu (et certaines cellules de microalgues) est éliminé au même taux. La culture ne manque donc jamais de nutriments. Pour la production semi-continue, une certaine quantité de culture de microalgues sera récoltée par intermittence et la même quantité de milieu sera injectée (Zhu *et al.*, 2013). En mode continu (Figure 1.6), le milieu de culture frais est apporté dans le réacteur de façon continue et la biomasse de microalgues est retirée simultanément afin de garder un volume constant et maintenir la culture continuellement en phase exponentielle (Zhu, 2015).



**Figure 1.6** Schéma de la culture continue des microalgues en chémostat (Sun *et al.*, 2018).

En raison de l'épuisement des nutriments et de l'auto-ombrage des cellules provoqué par l'augmentation de la densité cellulaire, la productivité de la biomasse volumétrique des cultures en mode batch est beaucoup plus faible que celle en mode continu et semi-continu (Zhu, 2015). En général, les chercheurs débutent la culture de microalgues en mode batch jusqu'à ce que la concentration cellulaire souhaitée soit obtenue, puis la culture s'effectue en mode continu ou semi-continu pour une productivité de biomasse plus importante. Tang

et al. (2012) ont pu atteindre une productivité stable de biomasse de 137 et 91 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> respectivement pour les espèces de microalgues *Chlorella minutissima* et *Dunaliella tertiolecta* après avoir cultivé les microalgues en mode batch pendant 6 jours puis en mode continu pendant plus de trois mois.

**Tableau 1.2** Les avantages et les inconvénients liés aux modes de culture batch (discontinu), semi-continu et continu (Zhu, 2015).

<b>Mode de culture</b>	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>
Batch (discontinu)	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ Facile à mettre en place;</li> <li>□ Facile à opérer;</li> <li>□ Élimination efficace des nutriments;</li> <li>□ Faible risque de contamination;</li> <li>□ Facile à gérer selon les produits finaux désirés;</li> <li>□ Très connu à l'échelle laboratoire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Prendre du temps pendant la culture et avant et après la préparation du système;</li> <li>■ Une capacité limitée du traitement des eaux usées;</li> <li>■ Une faible productivité de biomasse;</li> <li>■ Une mise à l'échelle coûteuse.</li> </ul>
Semi continu ou continu	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ Système autonome après le démarrage;</li> <li>□ Possibilité du maintien des conditions d'état stables;</li> <li>□ Forte productivité de biomasse;</li> <li>□ Forte capacité du traitement des eaux usées;</li> <li>□ Mise à l'échelle facile.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Installation et exploitation complexes du système;</li> <li>■ L'ajout des nutriments peut affecter la croissance et les produits finaux;</li> <li>■ Stabilité incertaine des performances d'opération à long terme;</li> <li>■ Risque élevé de contamination par d'autres espèces;</li> <li>■ Infrastructure plus chère.</li> </ul>

### 1.3.3 Les systèmes de culture

Outre l'identification de la meilleure souche, la sélection de l'environnement est essentielle pour la production de la biomasse microalgale car une eau différente fournit des éléments nutritifs et des aspects environnementaux différents (Chew *et al.*, 2018). De plus,

la biomasse dépend fortement du mode de nutrition et de culture, car chacun fournit une quantité différente de nutriments et d'énergie. En outre, la technique de culture joue un rôle important dans la productivité des microalgues.

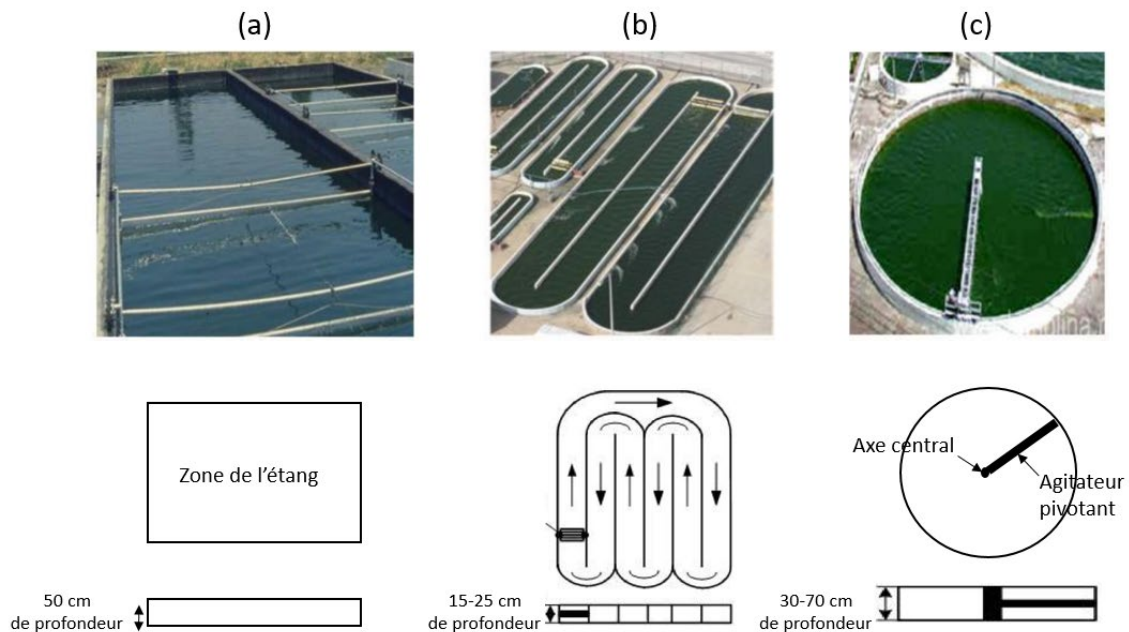
Des nombreuses techniques de culture de microalgues ont été rapportées dans la littérature (Klinthong *et al.*, 2015). Le système de culture dépend principalement du type de souche, du coût d'investissement, des produits finaux désirés et de la source de nutriments (Chew *et al.*, 2018). Il peut être classé en deux catégories : systèmes ouverts et systèmes fermés. Une comparaison entre ces deux catégories est illustrée au Tableau 1.3.

Les systèmes ouverts sont des installations extérieures comprenant des étangs, des lagunes, des canaux profonds, des unités de circulation peu profondes et autres (Razzak *et al.*, 2013).

Les étangs peu profonds et non agités (Figure 1.7a) constituent le type de système ouvert le plus simple pour la culture de microalgues (Chew *et al.*, 2018). La faible dissolution du dioxyde de carbone de l'air dans l'eau, la lente diffusion des nutriments et la faible pénétration de la lumière solaire due à la flottation des algues mortes et vivantes, représentent des facteurs qui limitent la croissance des microalgues et entraînent un faible rendement en biomasse dans ce système (Chew *et al.*, 2018).

Les étangs de type « raceway » (Figure 1.7b) ont été largement utilisés pour la culture en systèmes ouverts ainsi que pour la production commerciale à grande échelle des microalgues. Cette technique de culture existe depuis les années 1950 (Chisti, 2007). Elle est construite d'un canal unique ou d'un groupe de canaux avec une profondeur de 15 à 25 cm (Razzak *et al.*, 2013). Le mélange dans cette configuration est induit par des roues à aubes afin de maintenir une densité uniforme de microalgues et de recevoir suffisamment d'échanges de lumière solaire et de CO<sub>2</sub> avec l'atmosphère. Une productivité de 60 à 100 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> de poids sec peut être atteinte (Razzak *et al.*, 2013). Cependant, la perte d'eau par évaporation peut être importante dans ce système et nécessite une addition constante en eau (Chisti, 2007).

Les étangs circulaires (Figure 1.7c) sont dérivés de l'innovation des étangs de traitement des eaux usées. La profondeur de ces étangs est généralement de 30 à 70 cm et leur diamètre peut atteindre 45 m (Chen *et al.*, 2010). Le mélange du milieu de culture et des cellules de microalgues est fait par un bras rotatif se déplaçant dans la direction axiale (Razzak *et al.*, 2013). L'absence de contrôle de la température et la forte possibilité de contamination en raison de la présence d'autres microorganismes compétitifs (*ex.* protozoaires, bactéries et virus) sont les principaux inconvénients des systèmes ouverts (Chew *et al.*, 2018).



**Figure 1.7** Systèmes ouverts de culture : (a) étang peu profond et non agité ; (b) étang de type « raceway » ; (c) étang circulaire (Chen *et al.*, 2010).

Les systèmes fermés sont des vaisseaux ou des tubes avec des parois en matériaux transparents situés dans des installations extérieures exposées au rayonnement solaire ou dans des installations intérieures exposées à une lumière artificielle (Razzak *et al.*, 2013). Les avantages et inconvénients des différents systèmes fermés (photobioréacteurs) sont mentionnés dans le Tableau 1.4.

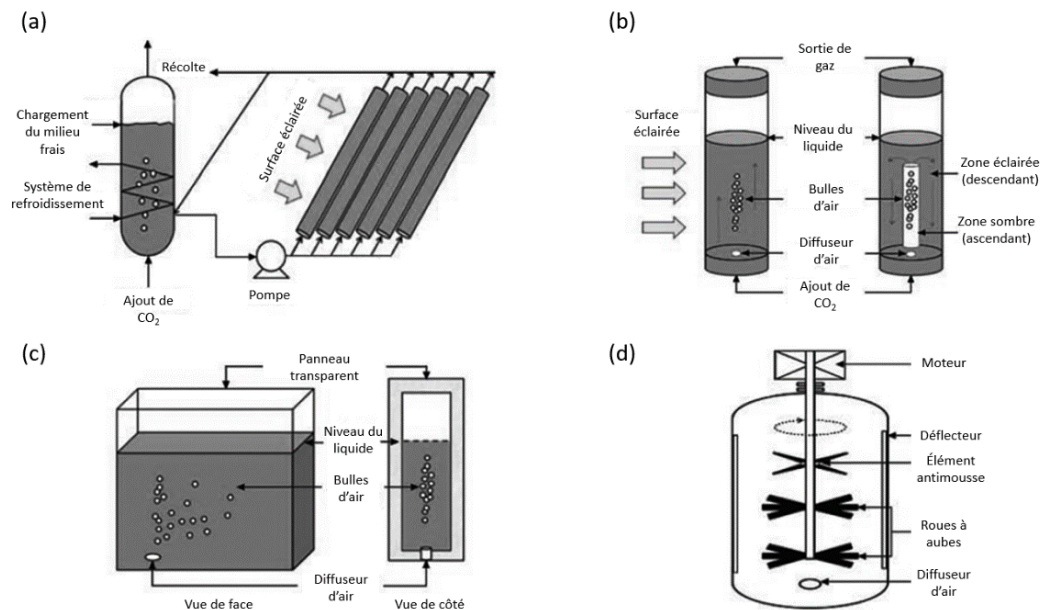
Le photobioréacteur à tubes horizontaux (Figure 1.8a) est le premier modèle construit de réacteur fermé pour la culture de microalgues. Il est composé de longs tubes horizontaux qui peuvent être placés dans de nombreuses variantes pour former des murs, des hélices ou des panneaux (Chew *et al.*, 2018). De tels systèmes peuvent générer des quantités de chaleur considérables, pouvant atteindre des amplitudes de température de 20°C en une seule journée si des systèmes de contrôle de la température (coûteux) ne sont pas prévus (Carvalho, Meireles, & Malcata, 2006). Cependant, ils nécessitent une grande surface de terrain et ils ne conviennent que pour certaines microalgues utilisant la lumière du soleil (Chew *et al.*, 2018).

Le photobioréacteur à tube vertical (Figure 1.8b) ont été fréquemment utilisés (Carvalho *et al.*, 2006). Ils ont un purgeur d'air fixé au fond du réacteur qui génère des bulles d'air permettant un bon mélange global, une alimentation suffisante en CO<sub>2</sub> et une élimination efficace de l'oxygène (Carvalho *et al.*, 2006). Ce système de culture, composé généralement de tubes en polyéthylène ou en verre suffisamment transparents pour permettre une bonne pénétration de la lumière, présente l'efficacité photosynthétique et la productivité volumétrique moyennes les plus élevées (Chew *et al.*, 2018).

Les photobioréacteurs à plaques plates (Figure 1.8c), constitués de deux panneaux parallèles transparents formant une boîte rectangulaire, est le système de culture le plus courant (Chew *et al.*, 2018). Cette technique de culture remonte au début des années 1950 (Acién Fernández, Fernández Sevilla, & Molina Grima, 2013). Ces photobioréacteurs sont conçus pour une utilisation efficace de la lumière du soleil ou de la lumière artificielle (Carvalho *et al.*, 2006). Le mélange et la circulation du milieu de culture sont effectués à l'aide d'un diffuseur d'air qui génère des bulles d'air (Chew *et al.*, 2018). Le principal avantage de ce système réside dans la fourniture d'une unité de transfert de gaz ouverte, qui s'est révélée efficace pour résoudre le problème de l'accumulation d'oxygène. Cependant, une telle zone ouverte limite l'efficacité du contrôle de la contamination par rapport aux réacteurs complètement fermés (Carvalho *et al.*, 2006).



Les photobioréacteurs à réservoir agité (Figure 1.8d) sont dérivés de la conception de la cuve de fermentation et nécessitent une source de lumière externe supplémentaire (Chew *et al.*, 2018). Pour ce système de culture, l'agitateur mécanique assure un mélange optimal du milieu de culture et des cellules de microalgues et l'addition de l'aération permet une meilleure solubilité des gaz (Chew *et al.*, 2018). Ce photobioréacteur a été exploité en mode batch, semi-continu et continu où les cultures axéniques ont été maintenues pendant de longues périodes grâce à la possibilité de contrôle des paramètres de culture (Carvalho *et al.*, 2006). Cependant, Chew et al. (2018) ont rapporté que ce type de photobioréacteur n'est actuellement utilisé qu'à l'échelle pilote car il présente un faible rapport surface/volume, ce qui réduit l'efficacité photosynthétique des microalgues et diminue la productivité en biomasse (généralement de 30 à 50 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>). D'où une amélioration des paramètres de culture est nécessaire pour intensifier la concentration de biomasse et conduire à une conception à plus grande échelle pour ce système.



**Figure 1.8** Systèmes fermés de culture : (a) photobioréacteur à tubes horizontaux ; (b) photobioréacteur à tube vertical, (à gauche) colonne à bulles, (à droite) colonne à portée d'air ; (c) photobioréacteurs à plaques plates ; (d) photobioréacteur à réservoir agitée (Chew *et al.*, 2018).

**Tableau 1.3** Comparaison entre les systèmes de culture ouverts et fermés (Carvalho *et al.*, 2006).

<b>Caractéristique</b>	<b>Systèmes ouverts</b>	<b>Systèmes fermés</b>
Rapport surface/volume	grand (4 à 10 fois plus élevée que les systèmes fermés)	petit
Choix des espèces microalgales	limité	flexible
Principaux critères de sélection des espèces	concurrence de croissance	résistance au cisaillement
Densité cellulaire	faible	forte
Efficacité de récolte	faible	forte
Durée de culture	limitée	prolongée
Contamination	possible	peu probable
Perte d'eau par évaporation	possible	empêchée
Efficacité d'utilisation de lumière	faible/correcte	correcte/excellente <sup>a</sup>
Transfert gazeux	faible	correct/élevé
Control de température	aucun	excellent
Paramètres les plus coûteux	agitation	contrôle d'O <sub>2</sub> et de température
Investissement en capital	petit	important

<sup>a</sup> Dépend de la transparence du matériau de construction.

**Tableau 1.4** Les avantages et les inconvénients des différents systèmes fermés (Chew *et al.*, 2018).

Type de photobioréacteur (PBR)	Avantages	Limitations
PBR à tubes horizontaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ Circulation des microalgues facile grâce à la technologie de pompage ou de portée d'air;</li> <li>□ Le contrôle de la température peut être surveillé efficacement;</li> <li>□ Le transfert de masse peut être amélioré en installant des mélangeurs internes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Difficulté à augmenter le volume de production;</li> <li>■ Les longs tubes vont provoquer une accumulation d'oxygène;</li> <li>■ L'acidification peut se produire en raison d'une fixation inadéquate du CO<sub>2</sub>;</li> <li>■ La forte densité des microalgues peut masquer la pénétration de la lumière dans les tubes.</li> </ul>
Colonne verticale à bulles	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ Faible stress physique aux cellules microalgales;</li> <li>□ Transfert de masse élevé dû au barbotage;</li> <li>□ Les bulles favorisent la diffusion et la pénétration de la lumière.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Sédimentation des cellules des microalgues;</li> <li>■ Écoulement aléatoire dans la culture.</li> </ul>
Colonne verticale à portée d'air	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ Production et concentration de biomasse élevées;</li> <li>□ Pénétration et utilisation efficaces de la lumière;</li> <li>□ Opération peu coûteuse;</li> <li>□ Haute efficacité d'utilisation du CO<sub>2</sub>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Le processus de mise à l'échelle est difficile ;</li> <li>■ Volume limité par rapport à la capacité de désoxygénation;</li> <li>■ Création insuffisante de turbulences lors de portée d'air.</li> </ul>
PBR à plaques plates	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ Surface d'illumination élevée ;</li> <li>□ Productivité élevée de biomasse;</li> <li>□ Faible accumulation d'oxygène dissous;</li> <li>□ Opération peu coûteuse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Le processus de mise à l'échelle nécessite de nombreux supports;</li> <li>■ Possibilité d'adhérence des microalgues à la paroi du PBR;</li> <li>■ Dégâts de stress élevés dus à l'aération;</li> <li>■ Difficulté à contrôler la température de culture.</li> </ul>

**Tableau 1.4** (Poursuite)

Type de photobioréacteurs (PBR)	Avantages	Limitations
PBR à réservoir agité	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Bon mélange et provision de lumière;</li><li>□ Bonne aération qui peut conduire à une meilleure solubilité des gaz.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Difficulté pour une conception à grande échelle;</li><li>■ Pénétration de lumière insuffisante à grande échelle;</li><li>■ Nécessité d'un mélange puissant et continu pour une croissance optimale des microalgues.</li></ul>

#### **1.4 L'IMPACT DES PARAMETRES DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DES MICROALGUES**

La croissance des microalgues dépend des conditions de culture, qui varie selon les espèces de microalgues. En général, trois famille de facteurs influencent la croissance des microalgues (Mata *et al.*, 2010) : (i) les facteurs abiotiques tels que la lumière (qualité et quantité), la température, la concentration en éléments nutritifs (N, P, S, K, etc.), la concentration en O<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub>, le pH, la salinité et la présence de composés chimiques toxiques; (ii) les facteurs biotiques notamment les agents pathogènes (bactéries, champignons, virus) et la compétition avec d'autres espèces de microalgues pour obtenir les matières abiotiques; (iii) les facteurs opérationnels tels que le cisaillement produit par l'agitation, le taux de dilution, la profondeur du récipient de culture, la fréquence de récolte et l'ajout de substrats organiques.

Pour réussir à cultiver des microalgues, des conditions environnementales spécifiques sont nécessaires, variant selon l'espèce. Les paramètres les plus susceptibles d'affecter leur croissance sont décrits brièvement ci-dessous.

##### **1.4.1 L'énergie lumineuse**

La lumière est le principal facteur limitant la culture des microalgues dans les systèmes extérieurs fermés et ouverts (Mata *et al.*, 2010). Elle affecte leurs performances de

croissance ainsi que leur composition chimique. Les microalgues peuvent être trouvés dans des zones où l'intensité lumineuse peut devenir très élevée (*ex.* le désert) et dans des zones dans lesquelles l'intensité lumineuse varie considérablement au cours de l'année (*ex.* la région arctique) (Skjånes *et al.*, 2013).

Selon Zhu (2015), au-dessus du point de compensation (intensité lumineuse où le taux de photosynthèse correspond exactement au taux de respiration cellulaire), la croissance augmente proportionnellement à l'augmentation de l'intensité de lumière et le taux maximum de photosynthèse se produit lorsqu'il atteint le point de saturation de lumière. Cependant, une intensité lumineuse élevée peut endommager les cellules microalgales à cause d'une surexcitation de l'appareil photochimique (Skjånes *et al.*, 2013). Après le point de saturation de lumière, l'augmentation de l'intensité lumineuse n'entraîne pas une augmentation du taux de croissance en raison de la photoinhibition (Ye *et al.*, 2012).

La photoinhibition est strictement proportionnelle à l'intensité lumineuse (Tyystjärvi, 2008), et elle augmente lorsque la cellule de microalgue est soumise à des conditions de stress limitant la croissance, telles que la limitation en CO<sub>2</sub>, la limitation en nutriments, le stress dû au pH, à la concentration de sel ou à la température (Skjånes *et al.*, 2013). Skjånes *et al.* (2013) a également révélé que les microalgues exposées à de fortes intensités lumineuses utilisent principalement deux systèmes de défense : (i) la réduction de la taille de leur antenne collectrice afin de limiter la quantité d'énergie absorbée et (ii) la production d'antioxydants tels que les caroténoïdes, les vitamines, l'hydroxytoluène butylé (BHT) et autres afin de neutraliser les radicaux libres avant qu'ils n'endommagent leurs systèmes photosensibles.

#### **1.4.2 La température**

De nombreuses microalgues peuvent facilement tolérer des températures inférieures de 15°C à leur température optimale alors qu'un dépassement de 2 à 4°C de la température optimale peut entraîner la perte totale de la culture (Mata *et al.*, 2010). Ceci peut être dû au

fait que les enzymes peuvent être dénaturées et donc inactivées de manière irréversible par la chaleur, alors que les basses températures ne provoquent souvent qu'une inhibition réversible des enzymes (Skjånes *et al.*, 2013).

En général, la croissance des microalgues augmente exponentiellement avec l'augmentation de la température jusqu'à ce qu'elle atteigne un niveau optimal, après lequel l'augmentation de température n'entraîne pas une augmentation de la croissance mais plutôt une perte de biomasse (Zhu, 2015). Les différentes espèces des microalgues ont différentes températures optimales. Cependant, les températures optimales sont également influencées par d'autres paramètres environnementaux, tels que l'intensité lumineuse (Zeng *et al.*, 2011). Pour de nombreuses espèces, la température doit être maintenue entre 25 et 35°C afin de permettre une croissance optimale avec des densités cellulaires maximales obtenues autour de 30°C (Zeng *et al.*, 2011).

Les réponses au stress induit par la température peuvent être utilisées pour la production de métabolites utiles tels que les acides gras insaturés, les protéines antigel, les enzymes, l'astaxanthine et d'autres antioxydants tels que les phénols (Skjånes *et al.*, 2013). Par exemple, les microalgues incorporent des acides gras insaturés dans leurs membranes pour maintenir leur fluidité et produisent plus d'enzymes pour compenser une activité spécifique plus faible dû à des températures sous-optimales froides (Skjånes *et al.*, 2013).

### **1.4.3 L'ajout de CO<sub>2</sub> et l'élimination de l'O<sub>2</sub>**

La biomasse microalgale contient environ 45 à 50% de carbone provenant de plusieurs sources tels que le CO<sub>2</sub>, les sels de carbonate soluble (*ex.* NaHCO<sub>3</sub> et Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), l'acide acétique et les sucres (Zhu, 2015). Les cultures de microalgues peuvent croître d'environ 10 à 50 fois plus vite que les plantes terrestres, ce qui permet d'atteindre un taux de fixation du CO<sub>2</sub> beaucoup plus élevé (Ho *et al.*, 2013). Le CO<sub>2</sub> fixé provient de trois sources différentes : CO<sub>2</sub> de l'atmosphère, CO<sub>2</sub> dans les gaz de décharge des industries et CO<sub>2</sub> provenant de carbonates solubles (Wang *et al.*, 2008).

Pour produire 1 kg de biomasse de microalgues, jusqu'à 1.7 kg de CO<sub>2</sub> sont nécessaires (Singh & Singh, 2014). En général, l'augmentation de la biomasse est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de CO<sub>2</sub> (Singh & Singh, 2014). Cependant, un excès de CO<sub>2</sub> signifie à la fois un gaspillage et une inhibition de la croissance des microalgues alors qu'un apport insuffisant en CO<sub>2</sub> limite leur croissance (Li, Luo, & Guo, 2012). Par exemple, la croissance des microalgues peut être limitée si la culture n'est alimentée que par l'air contenant 0.033% de CO<sub>2</sub> (Zhu, 2015). La concentration optimale en CO<sub>2</sub> recommandée pour la plupart des espèces de microalgues est généralement comprise entre 0.038% et 10% (pourcentage volumétrique de CO<sub>2</sub> dans le mélange gazeux utilisé pour la culture et le barbotage) (Klinthong *et al.*, 2015).

Lorsque le CO<sub>2</sub> se dissout dans l'eau à pH neutre, du bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) est produit. Au cours de la photosynthèse des microalgues, le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formé est converti en CO<sub>2</sub> et en ion hydroxyde (OH<sup>-</sup>). Ainsi, lorsque les microalgues consomment du CO<sub>2</sub>, l'OH<sup>-</sup> se forme et le pH devient plus alcalin (Cheirsilp, Suwannarat, & Niyomdecha, 2011). De plus, la consommation du CO<sub>2</sub> au cours de la photosynthèse est accompagnée par une libération d'O<sub>2</sub>. Lorsque la concentration en O<sub>2</sub> dépasse la saturation, elle provoque du stress oxydatif au niveau des centres de réaction à la chlorophylle, ce qui entrave la photosynthèse et entraîne une réduction de la productivité en biomasse (Zhu, 2015).

#### **1.4.4 Le pH et la salinité**

Les microalgues vertes peuvent être retrouvées dans de nombreux environnements à différents pH (Skjånes *et al.*, 2013). La plupart des espèces microalgales favorisent un pH neutre. Cependant, certaines espèces ont une croissance optimale dans des conditions acides ou alcalines (Zeng *et al.*, 2011). Les valeurs de pH ne sont pas constantes pendant la culture en raison de l'influence du CO<sub>2</sub> dans le milieu (Zhu, 2015). Dans certains cas, elles peuvent être contrôlées en ajustant les concentrations de CO<sub>2</sub> et de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Zeng *et al.*, 2011). En général, la plupart des espèces de microalgues semblent tolérer une large gamme de valeurs de pH et leur capacité de tolérance dépend de chaque espèce (Zhu, 2015).

En raison de l'évaporation, la salinité peut augmenter en cours de culture, ce qui peut entraîner un stress osmotique (Zhu, 2015). Certaines espèces peuvent tolérer un large éventail de salinités différentes (Skjånes *et al.*, 2013). Cependant, la tolérance à la salinité et l'optimum de salinité dépendent fortement des conditions de luminosité, de température et de la limitation en éléments nutritifs (Skjånes *et al.*, 2013). En général, le stress osmotique entraîne une diminution du taux de croissance (Zhu, 2015). Dans certains cas, une augmentation de la salinité peut entraîner une augmentation des métabolites précieux tels que le glycérol, les caroténoïdes (*ex.* lutéine,  $\beta$ -carotène) et les acides gras insaturés (*ex.* acide palmitique, acide oléique) (Skjånes *et al.*, 2013). De plus, la tolérance élevée à la salinité peut être utilisée comme protection contre la contamination d'autres espèces pour une production commerciale à grande échelle (Skjånes *et al.*, 2013).

#### **1.4.5 L'agitation**

L'agitation est une caractéristique cruciale dans la culture des microalgues (Huang *et al.*, 2017). Sans agitation, la lumière ne peut pas pénétrer profondément dans la culture, surtout lorsque sa concentration est élevée, laissant le reste dans l'obscurité et réduisant ainsi la productivité en biomasse (Zhu, 2015). Par conséquent, un bon mélange est une solution permettant aux cellules d'avoir un accès identique à la lumière, augmentant ainsi efficacement la photosynthèse, minimisant l'auto-ombrage et la phototoxicité, et réduisant la toxicité due au stock d'oxygène dissous accumulé (Anjos *et al.*, 2013). L'agitation peut également réduire les gradients de concentration en nutriments, de pH et de température ainsi qu'empêcher la sédimentation cellulaire, l'apparition de zones mortes, l'agglutination cellulaire et la fixation des cellules aux parois du récipient de culture (Huang *et al.*, 2017).

Cependant, un mélange excessif peut endommager les cellules des microalgues en raison de la force de cisaillement (Huang *et al.*, 2017). Selon Posten (2009), une vitesse supérieure à  $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  provoque des micro-tourbillons d'un diamètre inférieur à  $50 \mu\text{m}$  pouvant potentiellement endommager les cellules et un pompage du milieu avec des vitesses de liquide de  $20$  à  $50 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  est recommandé. Le temps nécessaire au système pour



atteindre un état d'homogénéité, appelé aussi temps de mélange ( $t_m$ ) est un paramètre important au niveau de l'agitation. Ce temps est affecté non seulement par l'agitation axiale et radiale, mais aussi par l'écoulement de liquide (Huang *et al.*, 2017).

#### 1.4.6 Les nutriments

La composition générale de la biomasse microalgale est  $CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$  (Chisti, 2007). Les principaux nutriments pour la culture des microalgues sont l'azote (N), le phosphore (P) et le soufre (S) (Skjånes *et al.*, 2013). L'azote et le phosphore entrent dans la composition de l'ADN et de l'ARN. L'azote, principalement absorbé sous forme d'ammonium ou de nitrate, est également essentiel dans la formation des protéines où chaque bloc de construction d'acides aminés contient au moins un atome de cet élément majeur (Skjånes *et al.*, 2013). Le phosphore, principalement absorbé sous forme de phosphate, est également essentiel au transport de l'énergie sous forme d'ATP et fait partie des phospholipides qui composent les membranes cellulaires (Skjånes *et al.*, 2013). Le soufre, principalement absorbé sous forme de sulfate, est également un composant essentiel des protéines, car les acides aminés importants comme la cystéine et la méthionine contiennent cet élément (Skjånes *et al.*, 2013).

Les métaux-traces, telles que Fe, Mg, Mn, B, Mo, K, Co et Zn, sont également nécessaires pour la culture des microalgues (Zhu, 2015). Certains métaux-traces sont des composants importants des protéines, souvent en tant que cofacteurs enzymatiques. Par exemple, le fer fait une partie importante d'enzymes comme l'hydrogénase et il joue un rôle important dans la photosynthèse (Skjånes *et al.*, 2013).

Selon Markou *et al.* (2014), la production de microalgues nécessite de fortes concentrations de nutriments essentiels (C, N, P, S, K, Fe, etc.). Cependant, tous les éléments essentiels doivent être présents dans des rapports appropriés, en quantités suffisantes et sous forme chimique biodisponible dans le milieu de culture afin de ne pas limiter la croissance microalgale. Skjånes *et al.* (2013) ont également révélé que lorsque les cellules des microalgues sont privées d'un élément nutritif important, le cycle de croissance

cesse et la production de métabolites cellulaires est modifiée. Les cellules commencent à produire des enzymes qui améliorent les mécanismes d'absorption du nutriment limitant. Dans le même temps, certaines protéines et certains lipides qui ne sont pas essentiels sont dégradés, ce qui constitue souvent un moyen de libérer le nutriment limitant pouvant être utilisé pour des processus essentiels à l'intérieur de la cellule. Par exemple, une carence majeure en N, P ou S, conduit à une augmentation significative de pigments protecteurs (*ex.* astaxanthine et  $\beta$ -carotène). Dans certains cas, la carence en nutriments peut entraîner une augmentation de la teneur en lipides et en acides gras polyinsaturés.

## **1.5 LES STRATEGIES DE CONTROLE DES MICROALGUES**

La production des microalgues à grande échelle présente de nombreux problèmes en raison de la grande différence entre les conditions de culture à l'échelle pilote et à l'échelle industrielle. Dans ce contexte, la modélisation mathématique peut être très utile pour minimiser l'écart entre les observations en laboratoire et la réalité à l'échelle industrielle, ainsi que pour la surveillance, le contrôle et l'optimisation des systèmes de production (Bernard *et al.*, 2016). La modélisation mathématique permet de créer une liaison mathématique entre les paramètres de culture (température, lumière, nutriments, etc.) et les paramètres de production (taux de croissance, productivité, etc.), de sorte que l'effet de chaque changement des conditions du processus peut être observé sans qu'il soit nécessaire de le tester expérimentalement (Darvehei *et al.*, 2018).

La modélisation dynamique permet de suivre la cinétique de croissance des microalgues dans le temps. Cette modélisation est essentielle à la fois pour l'estimation et l'optimisation des paramètres de production et le contrôle des conditions de culture (Darvehei *et al.*, 2018). Bien que la modélisation dynamique soit actuellement à un stade avancé, la validation expérimentale des modèles reste insuffisante et les bases de données expérimentales sont rares et souvent réutilisées d'une publication à une autre (Deschênes & Vande Wouwer, 2016). Un modèle performant doit inclure les effets de tous les paramètres et leur contribution. Lorsqu'il est associé au modèle de réacteur, il doit être en mesure de

prédire la performance et la productivité d'un système de culture dans différentes conditions de fonctionnement (Darvehei *et al.*, 2018).

De nombreuses études ont été menées pour comprendre l'impact de chaque paramètre de culture sur la croissance et la productivité des microalgues. Cette revue s'intéresse aux modèles qui étudient l'effet de la disponibilité (concentration) des nutriments sur la croissance de microalgue. Darvehei *et al.* (2018) ont présenté les modèles existants et ont expliqué comment leurs formulations ont évolué au fil du temps pour devenir plus précises. Les modèles les plus importants sont présentés dans le Tableau 1.5. Ces modèles sont classés en deux groupes (groupe A-I et groupe A-II) :

- Les modèles du groupe A-I supposent que le taux de croissance est contrôlé par une concentration de nutriments externe qui existe dans la solution de culture. Les modèles de ce groupe sont largement appliqués en raison de la facilité de mesure de concentration externe en nutriments (Lee, Jalalizadeh, & Zhang, 2015) ;
- Les modèles du groupe A-II sont basés sur l'hypothèse que le taux de croissance dépend de la concentration interne en nutriments dans la cellule, mesurée par le quota cellulaire, qui correspond à la quantité de nutriments intercellulaire par cellule (Lee *et al.*, 2015). Ces modèles sont exprimés en fonction du quota cellulaire du nutriment limitant. Les modèles de ce groupe peuvent décrire le taux de croissance de façon plus réaliste car ils peuvent expliquer la croissance en l'absence d'éléments nutritifs externes en raison de l'accumulation d'éléments nutritifs dans la cellule (Lee *et al.*, 2015).

**Tableau 1.5** Modèles cinétiques de croissance prenant en compte un seul facteur de substrat (Lee *et al.*, 2015).

Catégorie	Source	Formule	Considération	Application	Estimation
Groupe A-I: Modèle qui considère la concentration en éléments nutritifs externes	(Monod, 1949)	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$	(1) Limitation des nutriments	<p><b>CO<sub>2</sub>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0-13.1 mg.L<sup>-1</sup> sous forme de carbone inorganique total</li> <li>• 0-880 mg.L<sup>-1</sup> en CO<sub>2</sub></li> <li>• 0-0.2 mg.L<sup>-1</sup> sous forme de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></li> <li>• 206-4150 mg.L<sup>-1</sup> sous forme de carbone inorganique total</li> </ul> <p><b>N:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0-0.4 mg.L<sup>-1</sup> Azote inorganique dissous-N</li> <li>• 13.2 à 410 mg.L<sup>-1</sup> sous forme de NH<sub>4</sub>-N</li> <li>• 2.5-25 mg.L<sup>-1</sup> sous forme de NO<sub>3</sub>-N</li> </ul>	<p><b>CO<sub>2</sub>:</b></p> <p><i>Senedesmus quadricauda</i> (à 600 fc, 27 °C)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\mu_{\max} = 0,057 \text{ h}^{-1}</math></li> <li>• <math>K_s = 0.17 \text{ mg.L}^{-1}</math></li> </ul> <p><b>N:</b></p> <p><i>Scenedesmus</i> sp. (à 55–60 <math>\mu\text{mol}</math> de photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, ratio lumière/obscurité = 14:10, 25 °C)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\mu_{\max} = 1.78 \times 10^6 \text{ cellules.(mL.j)}^{-1}</math></li> <li>• <math>K_s = 11.8 \text{ mg.L}^{-1}</math></li> </ul> <p><b>P:</b></p> <p><i>Scenedesmus</i> sp. (à 55–60 <math>\mu\text{mol}</math> de photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, ratio lumière/obscurité = 14:10, 25 °C)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\mu_{\max} = 1.02 \times 10^6 \text{ cellules.(mL.j)}^{-1}</math></li> <li>• <math>K_s = 0.28 \text{ mg.L}^{-1}</math></li> </ul>

Tableau 1.5 (Poursuite).

Catégorie	Source	Formule	Considération	Application	Estimation
				<b>P:</b> • 7.7-199 mg.L <sup>-1</sup> sous forme de PO <sub>4</sub> -P • 0.1 à 2 mg.L <sup>-1</sup> sous forme de PO <sub>4</sub> -P	
	(Andrews, 1968)	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$	(2) Limitation et inhibition des nutriments	<b>CO<sub>2</sub>:</b> • 0-0.2 mg.L <sup>-1</sup> sous forme de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> • 0-0.2 pCO <sub>2</sub> • Acétate : 0-10 mg.L <sup>-1</sup>	<b>CO<sub>2</sub>:</b> <i>Chlorococcum littorale</i> (à >300 µmol photon.m <sup>-2</sup> . S <sup>-1</sup> , pH 5.5, 25 °C) • µmax = 0,12 h <sup>-1</sup> • Ks = 0.00048 pCO <sub>2</sub> • Ki = 0.31 pCO <sub>2</sub>
	(Martínez Sancho, Jiménez Castillo, & El Yousfi, 1997)	$\mu = \frac{\mu_{m1}S + \mu_{m2}K_s}{K_s + S}$	(3) Limitation et absence des nutriments	<b>P:</b> • 0-10.1 mg.L <sup>-1</sup> sous forme de PO <sub>4</sub> -P	<b>P:</b> <i>Scenedesmus obliquus</i> (à 11.334 klx, 30 °C) • µ <sub>m1</sub> = 0.0466 h <sup>-1</sup> • µ <sub>m2</sub> = 0.0256 h <sup>-1</sup> • Ks = 0.20 µM

Tableau 1.5 (Poursuite).

Catégorie	Source	Formule	Considération	Application	Estimation
	(Martínez, Jiménez, & El Yousfi, 1999)	$\mu = \frac{\mu_{m1}S + \mu_{m2}K_s + \mu_{m3}\frac{S^2}{K_i}}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$	(4) Absence, limitation et inhibition des nutriments	<b>P:</b> • 0-10.1 mg.L <sup>-1</sup> sous forme de PO <sub>4</sub> -P	<b>P:</b> <i>Scenedesmus</i> obliquus (à 11.334 klx, 30 °C) • $\mu_{m1} = 0.0471 \text{ h}^{-1}$ • $\mu_{m2} = 0.0350 \text{ h}^{-1}$ • $\mu_{m3} = 0.0272 \text{ h}^{-1}$ • $K_s = 0.25 \text{ }\mu\text{M}$ • $K_i = 955.72 \text{ }\mu\text{M}$
Groupe A-II: Modèle qui considère le stockage interne des nutriments	(Droop, 1968)	$\mu = \mu'_{\max} \left( 1 - \frac{Q_{\min}}{Q} \right)$	(5)	<b>N:</b> 0.014-0.061 mol N.mol <sup>-1</sup> C <b>P:</b> 0.352-324×10 <sup>-15</sup> mol P.cell <sup>-1</sup>	<b>N:</b> <i>Ceratium hirundinella</i> $\mu'_{\max}: 0.26 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min}: 0.033 \text{ mol N.mol}^{-1} \text{ C}$ <b>P:</b> <i>Scenedesmus</i> (à 1016 quanta.cm <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> , pH 7.2, 12 °C) $\mu'_{\max}: 0.755 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min}: 5.16 \text{ fmol.cell}^{-1}$
	(Caperon & Meyer, 1972a,b)	$\mu = \mu^*_{\max} \frac{Q - Q_{\min}}{Q - Q_{\min} + K_c}$	(6) Fonction intégrée de Michaelis-Menten	<b>P:</b> 0-5.6×10 <sup>-6</sup> mol P.cell <sup>-1</sup>	<b>P:</b> <i>S. quadricauda</i> (à 3000 lx, ratio lumière/obscurité = 12:12, 25 °C) $\mu^*_{\max}: 0.0002 \text{ min}^{-1}$

Tableau 1.5 (Poursuite).

Catégorie	Source	Formule	Considération	Application	Estimation
					$Q_{\min}: 0.25 \times 10^{-8}$ $\mu\text{mol.cell}^{-1}$ $K_c: 0.25 \times 10^{-8}$ $\mu\text{mol.cell}^{-1}$
	(Flynn, 2002)	$\mu = \mu'_{\max} \frac{(1 + K_q)(Q - Q_{\min})}{(Q - Q_{\min}) + K_q(Q_{\max} - Q_{\min})}$	(7) Fonction normalisée de Michaelis-Menten	<b>N:</b> 0-0.25 g N.g <sup>-1</sup> C <b>P:</b> 0-0.14 g P.g <sup>-1</sup> C 0-0.04 g P.g <sup>-1</sup> C	<b>P:</b> <i>Alexandrium minutum</i> (à 200 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , ratio lumière/obscurité = 14:10, 18 °C) $\mu'_{\max}: 0.55 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min}: 3.7 \text{ g P.cell}^{-1}$ $Q_{\max}: 32.6 \text{ g P.cell}^{-1}$ $K_q: 4.24$
		$\mu = \mu'_{\max} \frac{Q - Q_{\min}}{Q_{\max} - Q_{\min}}$	(8) Modèle de quota simplifié	C 0-1.3 $\times 10^{-12}$ mol.cell <sup>-1</sup>	

Ces modèles ont été conçus pour prendre en compte l'effet de seulement un paramètre alors qu'en réalité, les interactions entre les différents éléments nutritifs peuvent affecter la croissance des microalgues. Depuis les années 1970, plusieurs études ont porté sur la manière dont les interactions entre nutriments peuvent affecter la croissance du phytoplancton (Bougaran, Bernard, & Sciandra, 2010). La co-limitation dû à une limitation spontanée par plusieurs nutriments a été bien expliqué par Saito et al. (2008) qui a divisé la co-limitation en trois catégories sur la base de leurs formulations et visualisations mathématiques :

- Type I : Co-limitation indépendante des nutriments (*ex.* N et P) où les nutriments sont indépendants et ne peuvent pas se substituer l'un à l'autre dans leurs fonctions biochimiques.
- Type II : Co-limitation biochimique par substitution (*ex.* Co et Zn) où certains éléments notamment les métaux peuvent se remplacer dans une métalloenzyme ou plusieurs formes d'enzymes avec des fonctionnalités équivalentes, mais avec différents métaux dans leurs sites actifs peuvent coexister dans un organisme.
- Type III : Co-limitation biochimiquement dépendante (*ex.* Zn et C) où la capacité d'acquérir un nutriment dépend d'un apport suffisant en un autre.

Outre la disponibilité des nutriments, les autres paramètres de culture (*ex.* température, lumière, CO<sub>2</sub>, salinité) jouent un rôle important dans la croissance. Par conséquent, une combinaison de différents modèles est nécessaire pour former un modèle complet capable de prédire la croissance sous diverses modifications des conditions de culture (Darvehei *et al.*, 2018). La littérature propose cinq méthodes pour combiner plusieurs paramètres telles que décrites dans la revue de Darvehei et al. (2018) : (1) la loi de minimum de Liebig, (2) la multiplication, (3) la moyenne arithmétique, (4) la résistance moyenne, et (5) les taux additifs. La loi de minimum de Liebig, également connue sous le nom de modèle de seuil, relie la croissance à la valeur minimale des nutriments en supposant que le nutriment le plus limitant détermine le taux de croissance (Équation 1.1). Ainsi, l'expression mathématique finale du modèle est similaire aux modèles de croissance



prenant en compte un seul facteur (Lee *et al.*, 2015). La méthode de multiplication suppose que tous les nutriments contribuent de manière égale à la croissance des microalgues (Équation 1.2). En d'autres termes, plusieurs nutriments peuvent contrôler la croissance simultanément (Bougaran *et al.*, 2010). La troisième méthode utilise la moyenne arithmétique des fonctions (Équation 1.3). La quatrième méthode s'inspire de l'effet d'une résistance dans un circuit électrique et utilise l'inverse de chaque fonction (Équation 1.4). La dernière méthode utilise un modèle additif basé sur le modèle de Monod (Équation 1.5).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \min(f(S_1), f(S_2), \dots, f(S_n)) \quad (1.1)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot f(S_1) \cdot f(S_2) \cdot (\dots) \cdot f(S_n) \quad (1.2)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{f(S_1) + f(S_2) + \dots + f(S_n)}{n} \quad (1.3)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{1}{\frac{1}{f(S_1)} + \frac{1}{f(S_2)} + \dots + \frac{1}{f(S_n)}} \quad (1.4)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S_1 \cdot S_2}{K_1 \cdot S_2 + S_1 \cdot S_2 + K_2 S_1} \quad (1.5)$$

Deux modèles principaux ont été testés pour décrire la co-limitation (Tableau 1.6). (i) Le modèle de seuil. (ii) Le modèle multiplicatif. Le modèle multiplicatif, contrairement au modèle de seuil, a été largement utilisé, non seulement pour la co-limitation, mais également pour la prise en compte des effets d'autres paramètres tels que la lumière et la température (Darvehei *et al.*, 2018). Cependant, lorsque le nombre d'éléments nutritifs limitants augmente, la multiplication semble sous-estimer la croissance (Darvehei *et al.*, 2018).

La mise en place d'un modèle de croissance complet, qui prend en considération l'effet de plusieurs paramètres de processus pour prédire le taux de croissance en conditions extérieures, présente des défis majeurs. À mesure que le nombre de paramètres de culture augmente, le modèle devient plus difficile à valider en raison de la nécessité d'une grande quantité de données qui implique beaucoup de temps et de ressources (Darvehei *et al.*, 2018). Le sur-ajustement est un autre problème courant lorsque le nombre de constantes de

modèle augmente ce qui peut converger le modèle vers des valeurs irréalistes (Darvehei *et al.*, 2018).

Deschênes and Wouwer (2016) ont utilisé la minimisation d'un critère de moindres carrés pondéré à l'aide d'une stratégie à plusieurs départs et une combinaison d'algorithmes de Nelder-Mead (*ex.* `fminsearch` et `fmincon` dans MATLAB) et de Levenberg-Marquardt (*ex.* `lsqnonlin` dans MATLAB) afin d'identifier les paramètres d'un modèle dynamique assez complexe de culture de l'espèce de microalgues *Tetradismus obliquus* dans des photobioréacteurs à l'échelle pilote. La validation du modèle était satisfaisante et le modèle résultant peut être utilisé dans les modèles de contrôle.

**Tableau 1.6** Modèles cinétiques de croissance prenant en compte des facteurs multiples (Lee et al., 2015).

Structure du modèle	Source	Formule	Facteurs considérés	Valeurs des paramètres
Modèle de seuil	(Klausmeier, Litchman, & Levin, 2004)	$\mu = \mu'_{\max,\min} \left(1 - \frac{Q_{\min,N}}{Q_N}, 1 - \frac{Q_{\min,P}}{Q_P}\right)$	(1) N, P	<i>Scenedesmus</i> sp. $\mu'_{\max,\min} = 1.35 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min,N} = 45.4 \times 10^{-9} \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$ $Q_{\min,P} = 1.64 \times 10^{-9} \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$
	(Bougaran <i>et al.</i> , 2010)	$\mu = \mu'_{\max,\min} \left(\frac{1 - \frac{Q_{\min,N}}{Q_N}}{1 - \frac{Q_{\min,N}}{Q_{\max,N}}}, \frac{1 - \frac{Q_{\min,P}}{Q_P}}{1 - \frac{Q_{\min,P}}{Q_{\max,P}}}\right)$	(2) N, P	<i>Isochrysis affinis galbana</i> $\mu'_{\max,\min} = 1.5 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min,N} = 6.5 \times 10^{-2} \text{ molN}\cdot\text{molC}^{-1}$ $Q_{\max,N} = 0.14 \text{ molN}\cdot\text{molC}^{-1}$ $Q_{\min,P} = 0.9 \times 10^{-3} \text{ molP}\cdot\text{molC}^{-1}$ $Q_{\max,P} = 0.006 \text{ molP}\cdot\text{molC}^{-1}$
	(Spijkerman, de Castro, & Gaedke, 2011)	$\mu = \mu_{\max,\min} \left(\frac{S_P}{K_{S,P} + S_P}, \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2}}\right)$	(3) CO <sub>2</sub> , P	<i>Chlamydomonas acidophila</i> $\mu_{\max,\min} = 0.076 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 1.43 \text{ } \mu\text{M}$ $K_{S,P} = 1.46 \text{ nM}$
	(Packer <i>et al.</i> , 2011)	$\mu = \mu'_{\max,\min} \left(1 - \frac{Q_{\min,N}}{Q_N}, \text{Pho}/x\right)$  $\text{Pho} = \text{Pho}_{\max} \left(1 - e^{-\alpha' I \phi / \text{Pho}_{\max}}\right)$	(4) N, intensité de lumière	<i>Pseudochlorococcum</i> sp. $\mu'_{\max,\min} = 3.26 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min,N} = 0.0278 \text{ gN}\cdot\text{g}^{-1}$ $^1\text{poids sec}$ $x = 0.610 \text{ gC}\cdot\text{g}^{-1} \text{ poids sec}$ $\text{Pho}_{\max} = 90.1 \text{ gC}\cdot\text{g}^{-1} \text{ chl}\cdot\text{j}^{-1}$ $a' = 4.82 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1} \text{ chl}$ $\phi = 9.84 \times 10^{-2} \text{ molC}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\text{photon}$

Tableau 1.6 (Poursuite).

Structure du modèle	Source	Formule	Facteurs considérés	Valeurs des paramètres
	(Guest <i>et al.</i> , 2013)	$\mu = \mu'_{\max,\min} \left[ 1 - \left( \frac{Q_{N,\min}}{Q_N} \right)^4, 1 - \left( \frac{Q_{P,\min}}{Q_P} \right)^4 \right] \cdot f(I_{av})$	(5) N, P, intensité de lumière	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> $\mu'_{\max,\min} = 0.82 \text{ j}^{-1}$ $Q_{\min,N} = \text{NA}$ $Q_{\min,P} = \text{NA}$
Modèle multiplicatif	(Kunikane & Kaneko, 1984; Kunikane, Kaneko, & Maehara, 1984)	$\mu = \left[ \mu_{c,\max} \cdot \left\{ f\left(\frac{C_p}{C_n}\right) \right\}^a - \left(\frac{1}{y_c} - 1\right) \right] \cdot \left[ \mu_{f,\max} \cdot \left\{ f\left(\frac{C_p}{C_n}\right) \right\}^b - \left(\frac{S_N}{K_{S,N} + S_N}\right) - K_d \right] \cdot \left(\frac{C_n}{C_{n,\max}}\right)$	(6) N, P	<i>Scenedesmus dimorphus</i> $\mu_{c,\max} = 7.0 \text{ mg.mg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ $\mu_{f,\max} = 5.0 \text{ mg.mg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ $k_d = 0.5 \text{ mg.mg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ $C_{n,\max} = 12\%$ $K_{S,N} = 18 \text{ } \mu\text{g N.L}^{-1}$ comme $\text{NO}_3\text{-N}$ $a = 0.18$ $b = 0.35$ $y_c = 0.8 \text{ mg.mg}^{-1}$
	(Zhang, Zhang, & Chen, 1999b)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S_{OC}}{K_{S,OC} + S_{OC} + \frac{S_{OC}^2}{K_{i,OC}}} \right) \left( \frac{I}{K_I + I} \right) \left( 1 - \frac{C_x}{C_{x,m}} \right) \left( 1 - \frac{C_{pro}}{C_{pro,m}} \right)$	(7) Acétate, concentration cellulaire, produit cellulaire, intensité lumineuse	<i>Haematococcus pluvisalis</i> $\mu_{\max} = 0.5258 \text{ j}^{-1}$ $C_{x,m} = 2.92 \text{ g.L}^{-1}$ $C_{pro,m} = 55.6 \text{ mg.L}^{-1}$ $K_{S,OC} = 0.0211 \text{ g.L}^{-1}$ $K_{i,OC} = 56.6813 \text{ g.L}^{-1}$

Tableau 1.6 (Poursuite).

Structure du modèle	Source	Formule	Facteurs considérés	Valeurs des paramètres
				$K_I = 53.26 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
	(Haario, Kalachev, & Laine, 2009)	$\mu = \mu_{\max} \cdot \theta^{T-T_{\text{ref}}} \left( \frac{I}{K_I + I} \right) \left( \frac{S_P}{K_{S,P} + S_P} \right) \left( \frac{S_N}{K_{S,N} + S_N} \right)$	(8) N, P, intensité de lumière	Algues sauvages ( <i>Chrysophycea</i> ) $\mu_{\max} = 0.0465 \text{ j}^{-1}$ $\theta = 1.137$ $T_{\text{ref}} = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ $K_{S,P} = 8.27 \text{ g.L}^{-1}$ $K_{S,N} = 32.9 \text{ g.L}^{-1}$ (total N) $K_I = 115 \text{ Wm}^{-2}$
	(Bernard, 2011)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{I_{av}}{K_I + I_{av} + \frac{I_{av}^2}{K_{i,L}}} \right) \left( 1 - \frac{Q_{\min,N}}{Q_N} \right)$	(9) Intensité de lumière, N	<i>Isochrysis galbana</i> $\mu_{\max} = 1.7 \text{ j}^{-1}$ $K_I = 1.4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $K_{i,L} = 295 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $Q_{\min,N} = 0.050 \text{ gN.gC}^{-1}$
	(Filali <i>et al.</i> , 2011)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{I_{av}}{K_I + I_{av}} \right) \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2}} \right)$	(10) CO <sub>2</sub> , intensité de lumière	<i>Chlorella vulgaris</i> $\mu_{\max} = 0.8 \text{ h}^{-1}$ $K_I = 0.14 \mu\text{E.s}^{-1} \cdot 10^9 \text{ cell}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 1.28 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot 10^9 \text{ cell}^{-1}$
	(Spijkerman <i>et al.</i> , 2011)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S_P}{K_{S,P} + S_P} \right) \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2}} \right)$	(11) CO <sub>2</sub> , P (co-limitation indépendante)	<i>Chlamydomonas acidophila</i> $\mu_{\max} = 0.073 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 0.38 \mu\text{M}$ $K_{S,P} = 1.09 \text{ nM}$

Tableau 1.6 (Poursuite).

Structure du modèle	Source	Formule	Facteurs considérés	Valeurs des paramètres
		$\mu = \mu_{\max} \frac{S_{CO_2}}{\left( \frac{S_p + K_{S,P}}{S_p} \right) \mu_{\max} + S_{CO_2} \cdot \alpha_{C,\max}}$	(12) CO <sub>2</sub> , P (co-limitation dépendante avec acquisition de C en fonction de limitation de P)	<i>Chlamydomonas acidophila</i> $\mu_{\max} = 0.059 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,P} = 0.70 \text{ nM}$ $\alpha_{C,\max} = 0.039$
		$\mu = \mu_{\max} \frac{S_p}{\left( \frac{S_{CO_2} + K_{S,CO_2}}{S_{CO_2}} \right) \mu_{\max} + S_p \cdot \alpha_{P,\max}}$	(13) CO <sub>2</sub> , P (co-limitation dépendante avec acquisition de P en fonction de limitation de C)	<i>Chlamydomonas acidophila</i> $\mu_{\max} = 0.066 \text{ h}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 0.77 \text{ }\mu\text{M}$ $\alpha_{P,\max} = 0.075$
	(Yang, 2011)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2}} \right) \left( \frac{S_N}{K_{S,N} + S_N} \right) \frac{I_{av}}{I_{opt}} \exp\left(1 - \frac{I_{av}}{I_{opt}}\right)$	(14) CO <sub>2</sub> , intensité de lumière, N	Algues sauvages $\mu_{\max} = 0.9991 \text{ j}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 0.001 \text{ mol.m}^{-3}$ $K_{S,N} = 0.001 \text{ mol.m}^{-3}$ comme NH <sub>4</sub> -N $I_{opt} = 14.63 \text{ MJ.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$
	(Franz <i>et al.</i> , 2012)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{I}{K_I + I} \right) \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2}} \right) \left( \frac{S_{nu}}{K_{S,nu} + S_{nu}} \right) \cdot f(T)$	(15) CO <sub>2</sub> , intensité de lumière, nutriments, température	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> $\mu_{\max} = 1.4 \text{ j}^{-1}$ $K_I = 215 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 0 \text{ g.L}^{-1}$ $K_{S,nu} = 0 \text{ g.L}^{-1}$ $f(T) = 1$
	(He, Subramanian, & Tang, 2012)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{I_{av}}{K_I + I_{av}} \right) \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2} + \frac{S_{CO_2}^2}{K_{I,CO_2}}} \right)$	(16) CO <sub>2</sub> , intensité de lumière	<i>Chlorella sp.</i> <i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>Tetraselmis suecica</i> $\mu_{\max} = 0.041 \text{ j}^{-1}$ $K_I = 14 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Tableau 1.6 (Poursuite).

Structure du modèle	Source	Formule	Facteurs considérés	Valeurs des paramètres
				$K_{S,CO_2} = 0.00021$ $\text{mol.m}^{-3}$ $K_{i,CO_2} = 10 \text{ mol.m}^{-3}$
	(Pegallapati & Nirmalakhandan, 2012)	$\mu = \mu_{\max} \cdot 1.066^{T-20} \left( \frac{I_{av}^m}{K_I^m + I_{av}^m} \right) \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2} + \frac{S_{CO_2}^2}{K_{i,CO_2}}} \right)$	(17) CO <sub>2</sub> , intensité de lumière, température	<i>Nannochloropsis salina</i> <i>Scenedesmus</i> sp. $\mu_{\max} = 1.2 \text{ j}^{-1}$ $K_I = 181 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $m = 1.75$ $K_{S,CO_2} = 2.316 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ $K_{i,CO_2} = 0.0046 \text{ mol.L}^{-1}$
	(Ketheesan & Nirmalakhandan, 2013)	$\mu = \mu_{\max} \cdot 1.066^{T-20} \left( \frac{S_N}{K_{S,N} + S_N} \right) \left( \frac{S_{CO_2}}{K_{S,CO_2} + S_{CO_2} + \frac{S_{CO_2}^2}{K_{i,CO_2}}} \right) \left( \frac{I_{av}}{K_I + I_{av} + \frac{I_{av}^2}{K_{i,L}}} \right)$	(18) N, CO <sub>2</sub> , intensité de lumière, température	<i>Nannochloropsis salina</i> <i>Scenedesmus</i> sp. $\mu_{\max} = 2.0 \text{ j}^{-1}$ $K_I = 200 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $K_{i,L} = 2800 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $K_{S,CO_2} = 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol.m}^{-3}$ $K_{i,CO_2} = 180 \text{ mol.m}^{-3}$ $K_{S,N} = 0.02 \text{ g.m}^{-3}$ comme NO <sub>3</sub> -N
	(Wu <i>et al.</i> , 2013)	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S_N}{K_{S,N} + S_N} \right) \left( 1 - \frac{Q_{\min,P}}{Q_P} \right) \frac{I}{I_{opt}} \exp\left(1 - \frac{I}{I_{opt}}\right)$	(19) N, P, intensité de lumière	<i>Scenedesmus</i> sp. $\mu_{\max} = 0.79 \text{ j}^{-1}$ $I_{opt} = 5227 \text{ lx}$

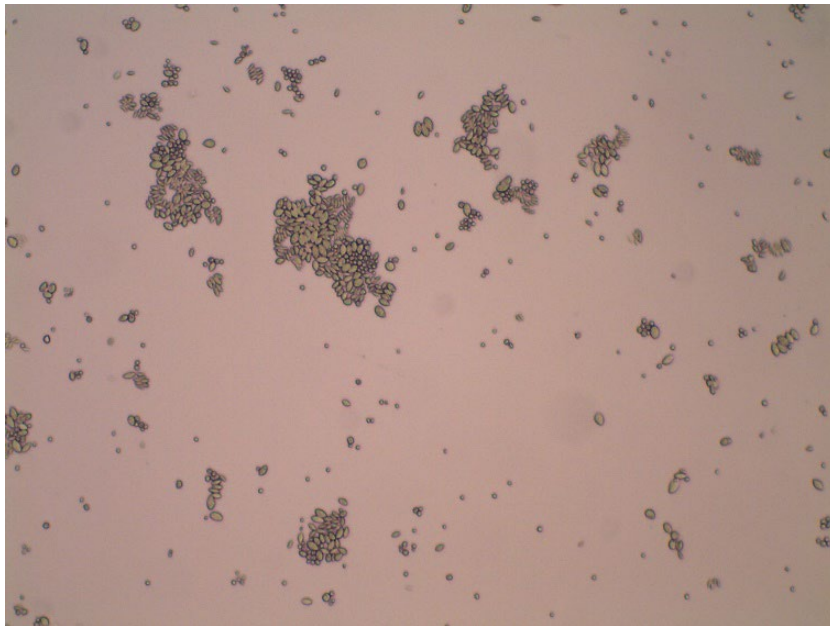
Tableau 1.6 (Poursuite).

Structure du modèle	Source	Formule	Facteurs considérés	Valeurs des paramètres
				$K_{S,N} = 9.5 \text{ mg.L}^{-1}$ (N dissous total) $Q_{\min,P} = 0.019\%$
	(Deschênes & Vande Wouwer, 2016)	$\mu = \mu_{av} \left( \frac{I_{av}}{\frac{K_{S,I}^*}{\theta} + I_{av} + \left( \frac{I_{av}^2}{K_{i,I}} \right) \cdot \exp(chl \cdot L/2)} \right) \left( 1 - \frac{Q_{\min,N}}{Q_N} \right)$	(20) Intensité de lumière, N	<i>Scenedesmus obliquus</i> $\mu_{av} = 1.47 \text{ j}^{-1}$ $K_{S,I}^* = 0.22 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $K_{i,L} = 700 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $Q_{\min,N} = 0.011 \text{ gN.gC}^{-1}$ $L = 1.35 \text{ m}$



## 1.6 PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : *TETRADESMUS OBLIQUUS*

La microalgue *Tetradesmus obliquus* est mieux connue sous le nom de *Scenedesmus obliquus* ou *Acutodesmus obliquus* selon l'ancienne classification (Krienitz & Bock, 2012). Récemment, elle a été reclassée comme *Tetradesmus obliquus* par Wynne and Hallan (2015). C'est une microalgue verte unicellulaire d'eau douce appartenant à la classe des *chlorophycées* (Figure 1.9).



**Figure 1.9** Vue microscopique des cellules de *Tetrademus obliquus* (grossissement  $\times 400$ ).

Cette espèce est bien connue pour sa capacité à accumuler des lipides qui ont déjà été caractérisés comme suit : 7,24% de lipides neutres, 2,45% de glycolipides et 1,48% de phospholipides en poids sec dans des conditions de culture contrôlées (Pignolet *et al.*, 2013). Sous certaines conditions, *T. obliquus* peut accumuler jusqu'à 55% de son poids sec en tant que lipides neutres (Di Caprio *et al.*, 2018).

Cette microalgue est couramment utilisée pour la production de biocarburants mais elle présente également une source importante de protéines et d'amidon respectivement avec un maximum de 56% et 40% en poids sec (Becker, 2007; Di Caprio *et al.*, 2018). De nombreux auteurs ont décrit *T. obliquus* comme un bon candidat pour le traitement des eaux usées et la conversion de rejets industriels en biomasse. En effet, elle peut utiliser plusieurs sources de carbone organique (glucose, acétate, glycérol, eaux usées, xylose, lactose et autres) pour satisfaire à ses besoins de croissance. En comparaison avec la culture autotrophe, la croissance mixotrophe de cette microalgue entraîne une production plus élevée de biomasse et une teneur totale en lipides plus importante (Yang *et al.*, 2014). De plus, *T. obliquus* est connue de par sa capacité à capturer le CO<sub>2</sub> des gaz de combustion générés par différentes industries. Récemment, cette espèce a été largement utilisée pour enlever le CO<sub>2</sub> du biogaz grâce à sa grande tolérance au CO<sub>2</sub> qui peut aller jusqu'à 80% (pourcentage volumétrique de CO<sub>2</sub> dans le mélange gazeux utilisé pour la culture et le barbotage) et à sa haute productivité en biomasse (Choix *et al.*, 2017). Il a été observé que la biomasse de cette microalgue augmente avec l'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> et elle atteint un maximum de 2,3 g.L<sup>-1</sup> à une concentration de 15% en CO<sub>2</sub> (Singh & Singh, 2014).

Les microalgues appartenant à cette espèce sont capables de s'adapter à diverses conditions de stress et elles ont été utilisées pour la production de caroténoïdes importants sur le plan commercial, tels que la lutéine et l'astaxanthine (Di Caprio *et al.*, 2018). La lutéine obtenue à partir de l'espèce *T. obliquus* est souvent utilisée dans l'alimentation animale, tandis que l'astaxanthine est principalement utilisée dans le domaine de l'aquaculture (Bhalamurugan *et al.*, 2018). De plus, la richesse de cette espèce en acides gras polyinsaturés et saturés a favorisé son utilisation comme complément dans les aliments des animaux et des poissons (Ishaq *et al.*, 2016). Au niveau de la nutrition humaine, il a été démontré que l'utilisation de *T. obliquus* dans le régime alimentaire des enfants et des adultes a révélé une augmentation du poids corporel et n'avait pas d'effet hématologique significatif (Bhalamurugan *et al.*, 2018).

Sur le plan physiologique, la cinétique de croissance des microalgues est significativement affectée par le pH. Chaque microalgue possède un pH optimal pour la croissance, généralement neutre à légèrement alcalin (*T. obliquus*), bien que certaines espèces puissent pousser à un pH de 1,0 (Hodaifa, Martínez, & Sánchez, 2009). Il a été démontré que la productivité de la biomasse volumétrique chez *T. obliquus* diminue avec l'augmentation du pH, cet effet étant très net dans l'intervalle de pH compris entre 5,0 et 6,0 (Hodaifa *et al.*, 2009). Le taux de croissance spécifique le plus élevé a été trouvé lorsque le milieu était maintenu à une valeur de pH constante de 7.0. Hodaifa *et al.* (2009) ont également révélé que le pH du milieu affecte la composition biochimique de la microalgue ainsi que l'apport des composés organiques.

## CHAPITRE 2

### INFLUENCE DE L'UTILISATION DU PERMÉAT DE LACTOSÉRUM DOUX SUR LA CROISSANCE DE LA MICROALGUE *TETRADESMUS OBLIQUUS* ET LA PRODUCTION DES ENZYMES DE TYPE B-GALACTOSIDASE

#### **Titre en français du premier article :**

Influence de l'utilisation du perméat de lactosérum doux sur la croissance de la microalgue *Tetradescmus obliquus* et la production des enzymes de type  $\beta$ -galactosidase.

#### **Titre original (en anglais) :**

Influence of sweet whey permeate utilization on *Tetradescmus obliquus* growth and  $\beta$ -galactosidase production.

#### **Auteurs et affiliation :**

Jihed Bentahar : Étudiant au doctorat, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

Jean-Sébastien Deschênes : Professeur, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

#### **État de l'article :**

Version finale publiée (accepté le 29 mai 2021).

#### **Revue :**

The Canadian Journal of Chemical Engineering.

#### **Référence :**

<https://doi.org/10.1002/cjce.24245>

**Contribution au document :**

Cet article étudie l'influence d'utilisation du perméat de lactosérum doux (un rejet industriel très polluant et très abondant) sur la croissance de la microalgue *T. obliquus* et sur la production de l'enzyme de type  $\beta$ -galactosidase dans une optique d'optimisation de l'utilisation de ce rejet pour une meilleure valorisation.

**Résumé en français du premier article :**

La faisabilité de la culture de microalgues en mode mixotrophe en utilisant du perméat de lactosérum doux (SWP), un sous-produit hautement périssable de la fabrication du fromage, est évaluée pour la croissance des microalgues et la production des enzymes de type  $\beta$ -galactosidase. Cette étude est menée avec la microalgue *Tetrademus obliquus*, une espèce connue pour sa capacité à s'adapter à diverses conditions avec différentes sources de carbone. L'influence du lactose pur, la principale source de carbone du SWP, est d'abord examinée. Des substitutions partielles du milieu de culture de base avec du SWP dans différentes proportions sont ensuite effectuées. Les résultats montrent que la substitution de 60% (v/v) du milieu de culture par du SWP améliore significativement la croissance de *T. obliquus* (jusqu'à 2,1 g.L<sup>-1</sup>) et la production totale d'enzymes (jusqu'à 208,5 U.L<sup>-1</sup>). De plus, une molécule présumée être un galacto-oligosaccharide (GOS) est détectée en présence de fortes proportions de SWP. Les résultats globaux suggèrent une durée de culture à court terme (environ 8 jours) pour produire l'enzyme  $\beta$ -galactosidase et une durée de culture à long terme (plus de 15 jours) pour la production de biomasse. Cependant, l'utilisation de 100% (v/v) de SWP semble être non rentable en raison du manque de certains nutriments essentiels.

# Influence of sweet whey permeate utilization on *Tetradesmus obliquus* growth and $\beta$ -galactosidase production

Jihed Bentahar<sup>1,\*</sup> . Jean-Sébastien Deschênes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Collectif de recherche appliquée aux bioprocédés et à la chimie de l'environnement (CRABE), Université du Québec à Rimouski, 300, Allée des Ursulines, Rimouski, Québec G5L 3A1, Canada.

\*Corresponding author. E-mail address: jihed.bentahar2@uqar.ca

## ABSTRACT

The practicability of culturing microalgae in mixotrophic mode using sweet whey permeate (SWP), a highly perishable by-product stream from cheese manufacturing, is evaluated for microalgal growth and  $\beta$ -galactosidase production. This study is conducted with *Tetradesmus obliquus*, species known for their ability to adapt to various conditions with different carbon sources. The influence of pure lactose, the primary carbon source of SWP, is first surveyed. Partial substitutions of the basal culture medium with SWP in various proportions are then conducted. Results show that substituting 60% (v/v) of the culture medium with SWP significantly enhances *Tetradesmus obliquus* growth (up to 2.1 g.L<sup>-1</sup>) and *total* enzyme production (up to 208.5 U.L<sup>-1</sup>). Besides, a molecule expected to be a galactooligosaccharide (GOS) is detected in the presence of high SWP proportions. Overall results suggest a short-term culture duration (around 8 days) for producing the  $\beta$ -galactosidase enzyme and a long-term culture duration (over 15 days) for biomass production. However, the use of 100% (v/v) SWP seems to be non-profitable due to a lack of some essential nutrients.

**Keywords:** biomass production, microalgae, mixotrophy, sweet whey permeate,  $\beta$ -galactosidase enzyme.

## 2.1 INTRODUCTION

Whey, a typical waste stream from the dairy industry, can be classified into two categories according to the method of casein coagulation: sweet whey, commonly known as cheese whey, and acid whey. Sweet whey is a by-product of cheese and yogurt manufacturing with a pH of 5.2-6.7 (Shon & Haque, 2007), while acid whey is a by-product of cottage cheese and Greek yogurt manufacturing with a pH of 3.8-4.6 (Lindsay *et al.*, 2018). The more significant part of whey produced in the world is sweet whey (Wessinger, O'brien, & Kurantz, 1990). According to Ghaly *et al.* (2007), sweet whey may cause a disturbance in the biological process of sewage treatment because of its high biochemical oxygen demand (BOD) value (40 000-60 000 ppm). Direct disposal of whey into watercourses (*e.g.*, rivers, streams) provokes a drop in the dissolved oxygen content, eutrophication, and toxicity problems, thus modifying the physicochemical properties of aquatic ecosystems (Arevalo, 2017). Moreover, sweet whey volume production increases with an annual growth rate of 1.64% (OECD-FAO, 2011). The legislative requirements for effluent become stringent (Farizoglu *et al.*, 2004). Thus, adequate treatment or valorization of sweet whey is necessary.

Commercial approaches using ultrafiltration or diafiltration to extract whey protein constitute the first step in most sweet whey exploitation procedures (González Siso, 1996). However, this procedure leaves a considerable volume of sweet whey permeate (SWP), a secondary liquid stream containing mainly lactose, as a waste product. SWP poses a severe disposal problem since it has nearly as high a biochemical oxygen demand (BOD) level as a complete whey fluid (Ryan & Walsh, 2016).

Besides lactose, SWP also contains minerals, a small amount of proteins, and vitamins, making it a suitable culture medium for many organisms (Wessinger *et al.*, 1990). The utilization of SWP as a growth medium for microalgal species could help decrease its

environmental effect and generate a clean and renewable energy source (Mondal *et al.*, 2016). *Tetradismus obliquus*, formerly recognized as *Scenedesmus obliquus* and reclassified as *Acutodesmus obliquus* (Wynne & Hallan, 2015), is one of the more promising species for industrial applications and commercial-scale productions (Wu *et al.*, 2014). These species can produce substantial amounts of macromolecules of interest and tolerate diverse and stressful conditions like cultivation in wastewater.<sup>[13]</sup> However, the industrial production of *T. obliquus* can only be commercially competitive if its biomass productivities are improved (Di Caprio *et al.*, 2018), and if the more valuable components of microalgae biomass are also exploited as coproducts besides biofuel production (Borowitzka, 2013).

*Tetradismus obliquus* can use several carbon sources under mixotrophic conditions, allowing them to produce 3-10 times more biomass, total lipid, and metabolic products as compared to autotrophic conditions (Yang *et al.*, 2014; Mondal *et al.*, 2016). However, the cost of specific organic carbon sources (*e.g.*, glucose) can reach about 80% of the total culture medium's cost (Abreu *et al.*, 2012). Thus, a cheap source of organic carbon is needed (Liang, Sarkany, & Cui, 2009). One such source is the SWP from the dairy industry.

In our previous work (Girard *et al.*, 2014; Suwal *et al.*, 2019), *T. obliquus* was found to utilize SWP to stimulate its growth under mixotrophic conditions. This microalga was shown to produce a commercially important enzyme ( $\beta$ -Galactosidase), allowing it to hydrolyze the permeate's lactose (Bentahar *et al.*, 2019a). Enzyme synthesis from microalgae could have several advantages over other microorganisms due to their low nutritional requirements and potential for other fine chemical products, which could be more profitable (Brasil *et al.*, 2017). According to Rosenberg (2006),  $\beta$ -galactosidases with transgalactosylation activities have been used to produce prebiotic food ingredients such as lactulose and galactooligosaccharide (GOS). This study was conducted to evaluate a better use of SWP for increasing biomass and  $\beta$ -galactosidase productions by *T. obliquus*. Therefore, the integration of SWP in different proportions in the culture medium was



investigated under mixotrophic conditions, with gaseous CO<sub>2</sub> being supplied as the inorganic carbon source.

## **2.2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.2.1 Microalgal culture and medium**

A selected strain of *Tetradesmus obliquus* from the Canadian Phycological Culture Centre in Waterloo, Ontario, Canada (CPCC 5) was used throughout the study. The microalgae were kept in a dormant state using cryopreservation at ultra-low temperatures (below -130 °C). They were thawed and kept in an active state of growth by transferring to the heat-sterilized Bold's basal medium (BBM) (all components from Sigma-Aldrich) (Stein, 1973). Cultures were preconditioned for two weeks before inoculation. The SWP powder, obtained from Agropur Dairy Cooperative (Notre-Dame-du-Bon-Conseil, Quebec, Canada), was suspended in deionized water to the desired solids concentration (60 g.L<sup>-1</sup>). The medium was cold-sterilized by passing it through a 0.2-µm flow-through filter under sterile conditions. The composition of sterile BBM and SWP solutions was characterized in Table 2.1. All manipulations were performed under sterile conditions in a laminar flow biological hood. An EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter) equipped with a 488 nm laser (15 mW output) was used to confirm axenic conditions (Tremblay *et al.*, 2009; Deschênes, Boudreau, & Tremblay, 2015).

### **2.2.2 Experimental procedure**

Two experiments were conducted under mixotrophic conditions at 21°C in 1-L Erlenmeyer flasks (300 mL working volume) in a Multitron II incubator shaker (INFORS HT, Switzerland). Temperature, orbital agitation, and light intensity were fixed at 21°C, 120 rpm, and 100 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, respectively. Seed cultures were preconditioned in their respective culture medium, maintained in an exponential growth phase, and then inoculated with an initial cellular concentration of 1 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> (day 0), using manual cell counts on a hemacytometer (LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA).

The first experiment used lactose, the main component of SWP, to test its effect on biomass and  $\beta$ -galactosidase productivities through time. The BBM medium was supplemented with three different pure D-lactose monohydrates (Sigma-Aldrich) concentrations (20, 40, and 60 g.L<sup>-1</sup>), and samples were taken at days 3, 6, 9, 12, and 15. The second experiment investigated a proportional integration of SWP in the culture media. The BBM was partially replaced with 20%, 60%, and 100 % (v/v) of BBM with SWP containing about 10, 30, and 50 g.L<sup>-1</sup> of lactose. A 40 g.L<sup>-1</sup> pure lactose-supplemented BBM was used as a control. Biomass and enzyme production kinetics were followed for 16 days, and measurements were taken every four days. The evolution of lactose, glucose, and galactose concentrations was surveyed over time. pH and nutrient content, which can affect algal growth and enzymatic activity, were also analyzed to better view the biomass and enzyme productions throughout the culture phases. For statistical reasons, all samples representing the different culture conditions were prepared in three replicates ( $n = 3$ ).

### 2.2.3 Analytical methods

*Tetrademus obliquus* cells (10 mL) were isolated aseptically and then centrifuged for 6 min at 3400 g. The obtained cell pellets were rinsed twice with deionized water to remove most of the dissolved components. The microalgal pellets were then frozen at -80°C for at least 24 h and freeze-dried using a FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer at -46°C for 72 h. The lyophilized biomass was weighed gravimetrically using an analytical balance ( $\pm 0.1$  mg) to determine its dry weight.

Microalgal cells were used to quantify the hydrolytic activities of the  $\beta$ -galactosidase enzyme as described in Bentahar et al. (2019a). The normalized enzymatic activity (*NEA*, U.g<sup>-1</sup>) was defined to express the enzyme's activity per unit of algal biomass (Equation 2.1). One unit (U) of enzyme activity is equivalent to 1 nmol *o*-nitrophenol produced per minute:

$$NEA = 1000 \times \frac{OD_{420}(\text{with ONPG}) - OD_{420}(\text{without ONPG})}{t \times v \times DW \times 0.0045} \quad (2.1)$$

where the two  $OD_{420}$  are the absorbance measurements with and without *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG),  $t$  is the time of the enzymatic reaction (min),  $v$  is the used culture volume (mL), DW is the dry weight ( $g \cdot L^{-1}$ , w/v) of the sample, and factors 0.0045 and 1000 represent the absorbance of 1 nmol of *o*-nitrophenol at 420 nm in a 10-mm light path and a volume unit conversion factor, respectively.

To grasp a better view of the enzyme production, the total or volumetric enzymatic activity ( $VEA$ ,  $U \cdot L^{-1}$ ),  $NEA$  multiplied by the dry weight, and the daily-averaged enzymatic activity ( $DEA$ ,  $U \cdot L^{-1} \cdot day^{-1}$ ),  $VEA$  divided by the age of the cultures were also measured.  $VEA$  expressed the total enzyme activity (per unit of culture volume), and the  $DEA$  provided the daily enzyme productivity.

High-performance liquid chromatography (HPLC) using an ICsep ICE-ION-300 column in an Agilent 1260 Infinity supplied with refractive index detector was used to determine lactose concentrations, glucose, and galactose in the culture media. The system needed 0.0065 N  $H_2SO_4$  as eluent at an isocratic flow rate of  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The injection volume was 15  $\mu\text{L}$  at a column temperature of  $40^\circ\text{C}$  and a running time of 45 min. The samples were diluted in the mobile phase (0.0065 N  $H_2SO_4$ ) and filtered through a  $0.2\text{-}\mu\text{m}$  nylon syringe filter (VWR) before injection. Sugars were recognized by retention time and were quantified by peak area against standard solutions of pure lactose, glucose, and galactose (all from Sigma-Aldrich).

The major ions, including  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , and  $NH_4^+$ , were analyzed using an ion chromatography system (Dionex ICS-1000, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) and AS40 automated sampler as described in the literature (Girard *et al.*, 2014; Bentahar *et al.*, 2019b). A  $0.45\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size filter was used to filter samples before injection. Samples were then eluted with 4.5 mM  $Na_2CO_3$  and 1.4 mM  $NaHCO_3$  for anions and 20 mM methyl sulfonic acid for cations at flow rates of 1.2 and  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectively. The analytes were detected and quantified against standard solutions within the concentration range of the analyzed samples.

The concentrations of trace metals (*i.e.*, Fe and Mn) were determined using microwave plasma atomic emission spectroscopy (Agilent Technologies 4200 MP-AES, Australia) supplied with a concentric nebulizer, a double-pass cyclonic spray chamber, and an easy-fit torch. Samples were diluted in nitric acid to reach an acid concentration of 2.5% (v/v) and delivered to the instrument by an Agilent ASX 520 autosampler. Nitrogen was obtained from an Agilent 4107 nitrogen generator. ICP standards of 1000 mg.L<sup>-1</sup> (SCP Science, Canada) were used to prepare the standard solutions. The analytical cycle was set to 30 s rinsing, 45 s of sample uptake (pump speed 80 rpm), and 30 s of equilibration.

Statistical analyses were systematically performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) to compare results at each time point. Microsoft Excel 2016 was used to calculate the mean values and standard deviation of the measurements. Results were presented as mean  $\pm$  SD (standard deviation), and the statistical significance was determined by calculating the *p*-values. Significant differences were considered when the *p*-value was less than 0.05 ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.1** Chemical characteristics of BBM (theoretical composition) and SWP (from analysis) solutions.

Component	Concentration	
	BBM	SWP <sup>a</sup>
pH	6.8	6.3 ± 0.0
Total solids (g.L <sup>-1</sup> )	0.7	56.4 ± 2.1
Total sugars (g.L <sup>-1</sup> )	0.0	50.6 ± 0.6
Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	0.0	50.4 ± 0.6
Glucose (g.L <sup>-1</sup> )	0.0	N.D.
Galactose (g.L <sup>-1</sup> )	0.0	0.2 ± 0.0
Total proteins (g.L <sup>-1</sup> )	0.0	0.9 ± 0.0
Organic nitrogen (g.L <sup>-1</sup> )	0.0	0.2 ± 0.0
Chloride (Cl <sup>-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	29.4	341.7 ± 1.3
Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	182.4	N.D.
Phosphate (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	163.1	804.6 ± 2.0
Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	32.8	106.3 ± 2.5
Magnesium (Mg <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	7.4	98.5 ± 2.6
Iron (Fe <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	1.0	N.D.
Manganese (Mn <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	0.5	0.04 ± 0.0
Calcium (Ca <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	6.8	276.4 ± 23.9
Sodium (Na <sup>+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	78.8	255.4 ± 23.0
Potassium (K <sup>+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	88.3	1129.8 ± 99.0

Abbreviation: N.D., not detected.

<sup>a</sup> Values are the mean of a triplicate measurements ± standard deviation.

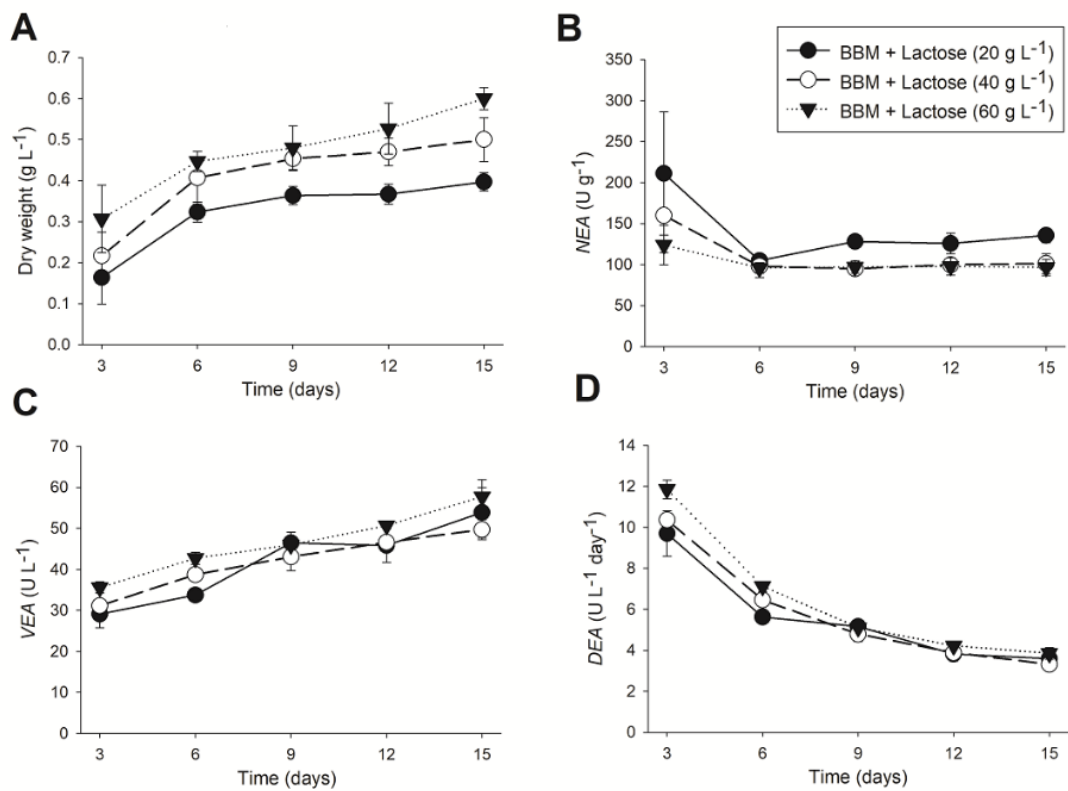
## 2.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 2.3.1 Influence of lactose concentrations

While lactose represents the main component in SWP and the main organic carbon source, the first experiment was conducted to evaluate its influence on biomass and  $\beta$ -galactosidase productivities. A variation of SWP proportions implies a variation of the lactose concentration. As shown in Figure 2.1A, increasing lactose concentrations from 20 to 40 g.L<sup>-1</sup> and then to 60 g.L<sup>-1</sup> has no significant influence on dry weight measurements except for days 12 ( $p = 0.04$ ) and 15 ( $p = 0.008$ ). However, no significant difference was shown for all days when using 40 and 60 g L<sup>-1</sup> of lactose. Moreover, the three systems seemed to reach a stationary growth phase after day 6 of culture, as no significant

difference in the biomass concentration was shown from day 6-15 ( $p > 0.05$ ). An average dry weight of 0.36, 0.46, and 0.51 g L<sup>-1</sup> was obtained in the stationary phase for the 20, 40, and 60 g L<sup>-1</sup> pure lactose-supplemented BBM, respectively.

The normalized enzymatic activity (Figure 2.1B) tended to decrease from day 3-6, after which no significant evolution was shown for the three culture systems ( $p = 0.65$ ,  $p = 0.76$ , and  $p = 0.99$  during the stationary growth phase [days 9-15] when using 20, 40, and 60 g L<sup>-1</sup> of pure lactose, respectively). This enzyme has been reported to be inducible by the presence of lactose in many microorganisms, such as *Escherichia coli* bacterium, *Kluyveromyces lactis* yeast, and *Penicillium chrysogenum* fungus (Nagy *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2002). However, lactose was found to reduce the normalized enzyme production in *T. obliquus* species compared to the photoautotrophic conditions (Bentahar *et al.*, 2019a), which might explain the slight decrease of *NEA* while increasing lactose concentration. In contrast, the evolution of the total enzymatic activity (Figure 2.1C) was similar to that of the dry weight since all systems showed a steady growth phase followed by a quasi-stationary phase. The *VEA* seemed not to be influenced by the increase of lactose concentrations ( $p > 0.05$ ), except for day 6 ( $p = 0.004$ ), and reached its highest levels in the stationary growth phase (around 50 U.L<sup>-1</sup> culture). The low biomass production (around 0.5 g.L<sup>-1</sup> after 15 days) due to the presence of a limiting nutrient (other than lactose) might explain this occurrence. On the other hand,  $\beta$ -galactosidase productivity (Figure 2.1D) was similar for the three lactose concentrations. It continuously decreased through time, suggesting a maximum of 9.7, 10.4, and 11.8 U.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, during the exponential growth phase (day 3), for the 20, 40, and 60 g L<sup>-1</sup> pure lactose-supplemented BBM, respectively. These results agree with our recent work (Bentahar *et al.*, 2019a), suggesting the  $\beta$ -galactosidase production is related to the growth phase. Other studies carried on *Kluyveromyces lactis* yeast showed that  $\beta$ -galactosidase levels remained high if the growth was maintained and significantly dropped if cells entered the stationary phase (Dickson & Markin, 1980).



**Figure 2.1** (A) Dry weights and (B-D) enzymatic activities of *T. obliquus* cultures grown on Bold's basal medium (BBM) supplemented with various pure lactose concentrations under mixotrophic conditions. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ). (Light intensity =  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\text{CO}_2$  aeration = ambient air; working volume = 300 mL).

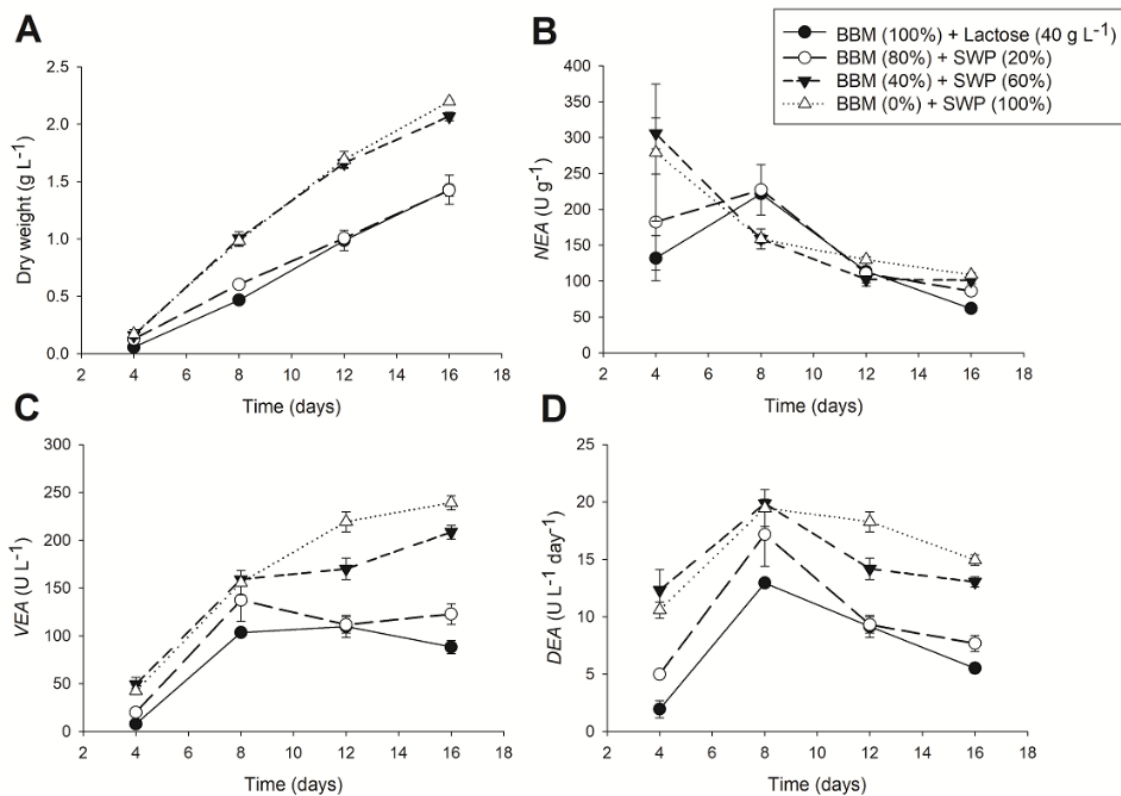
### 2.3.2 Influence of SWP use

As shown in Figure 2.2A, the use of 60% (v/v) and 100% (v/v) SWP led to a significant increase (more than 1.5-fold) in the dry weight measurements at the end of the experiment. Statistical analysis showed no significant difference in biomass production ( $p > 0.1$ ) between the control and 20% as well as between 60% and 100% (v/v) SWP. Contrary to the first experiment, the stationary phase did not seem to be attained after 16 days for any culture condition, which could be due to a carbon source availability after using 1%  $\text{CO}_2$ . Control cultures exhibited a 3-fold increase in dry weight measurements when 1% of  $\text{CO}_2$  was used instead of ambient air (Figures 2.1A, 2.2A). The organic carbon obtained

from lactose hydrolysis seemed not to be sufficient for microalgal growth. In addition, culture supplied only by air that contains 0.033% CO<sub>2</sub> might encounter growth limitation (Zhu, 2015). Our results showed biomass yields of about 1.43, 1.42, 2.07, and 2.19 g.L<sup>-1</sup>, respectively, for 0% (control), 20%, 60%, and 100% (v/v) SWP cultures at the end of the experiment.

The evolution of the normalized and total enzymatic activities through time exhibited two different patterns (Figures 2.2B-C). The use of 60% or 100% (v/v) of SWP resulted in a seemingly continuously decreasing *NEA* and increasing *VEA* through time while the two enzymatic activities reached a maximum around day 8 when 0% and 20% (v/v) of SWP was used. Statistical analysis showed that the phase of culture influenced *NEA*, *VEA*, and *DEA* ( $p < 0.001$ ), while the SWP proportions influenced only the *VEA* ( $p < 0.001$ ). Daily-averaged enzyme productivities showed a maximum at day 8, whatever the culture conditions, suggesting this as a better period for the enzyme production (Figure 2.2D). Regarding enzyme activities, day 8 of cultures seemed to be critical since enzyme production was slowed down or reduced after this day. Increasing SWP proportions from 0% to 60% (v/v) was observed to significantly increase the maximum *DEAs* (12.9 U.L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> vs. 19.8 U.L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> at day 8). However, no significant difference ( $p = 0.76$ ) was shown between 60% and 100% (v/v) SWP.

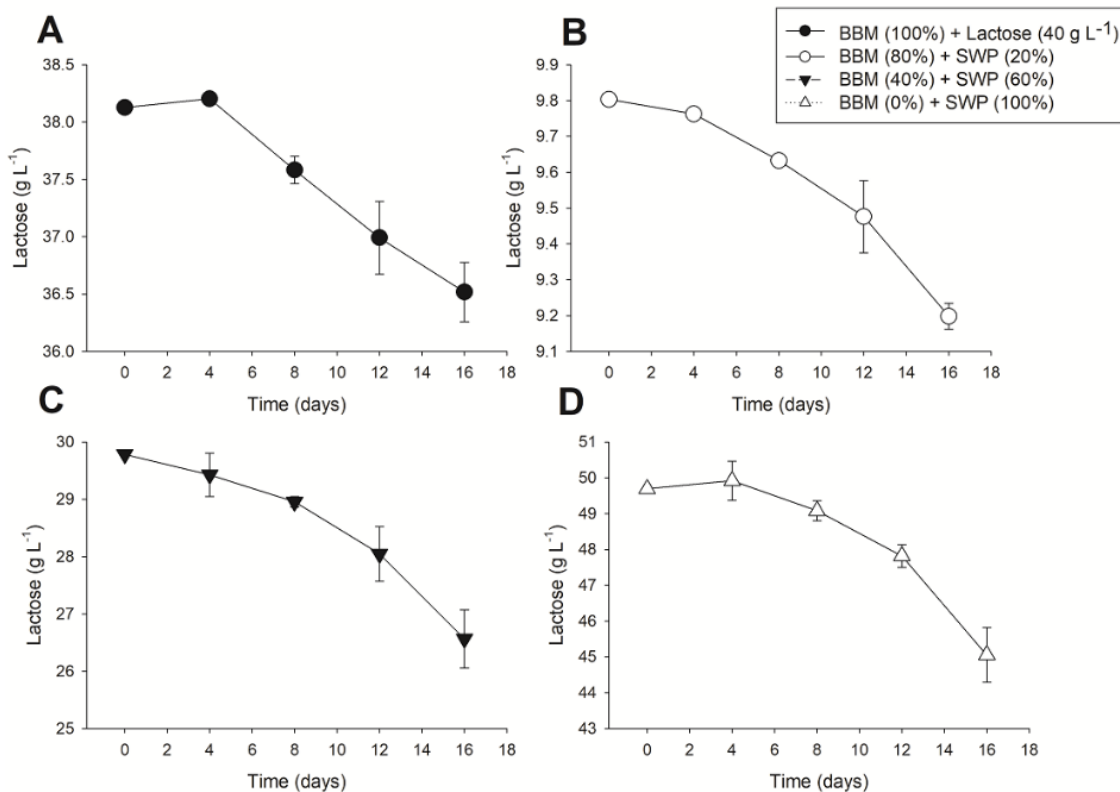




**Figure 2.2** (A) Dry weights and (B-D) enzymatic activities of *T. obliquus* cultures grown on different sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions under mixotrophic conditions; 40 g.L<sup>-1</sup> pure lactose-supplemented BBM is used as a control. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ). (Light intensity = 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; CO<sub>2</sub> aeration = 1%; working volume = 300 mL).

Lactose hydrolysis profiles were surveyed through time to grasp a better view of the biomass and  $\beta$ -galactosidase production under the different SWP proportions. All culture conditions exhibited a gradual decrease in lactose concentration (Figure 2.3A-D). *Tetrademus obliquus* was found to hydrolyze much more lactose for the culture grown on 60% and 100% (v/v) SWP. This could be due to higher  $\beta$ -galactosidase productivity since 60% and 100% (v/v) SWP led to 2-3 times higher *VEA* and *DEA* compared to 0% and 20% (v/v) SWP. The decrease in lactose concentrations was equivalent to a decrease of 1.73, 0.60, 3.42, and 5.33 g.L<sup>-1</sup>, respectively, for 0%, 20%, 60%, and 100% (v/v) SWP. However, only 5-10% of the lactose was hydrolyzed by the end of the experiment (day 16) for all culture conditions. Lactose hydrolysis profiles were comparable to our previous study

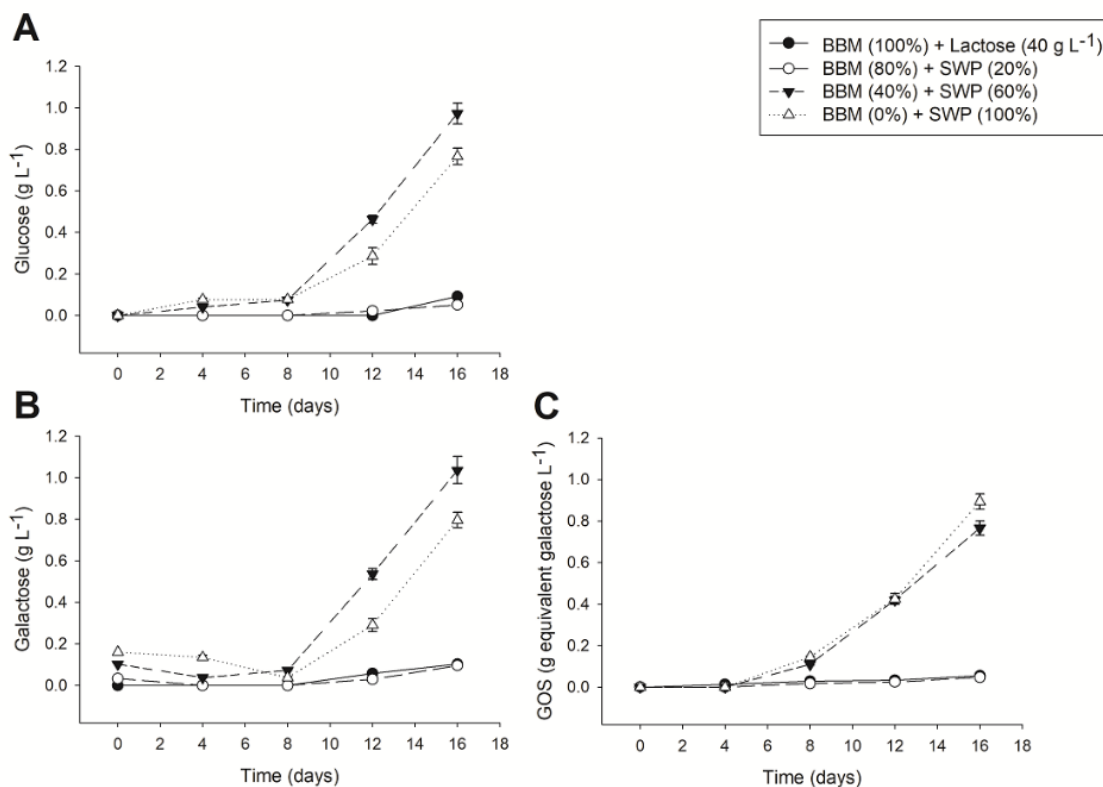
(Suwal *et al.*, 2019). In that study, about 7% of the lactose amount was hydrolyzed after 14 days of culture when 100% (v/v) SWP was used. The rate of lactose hydrolysis was faster after day 14, reaching about 21% on day 21. The accumulation of the enzyme over time could explain this occurrence. These results propose long-term cultures (over 15 days) to better hydrolyze the lactose and short-term cultures (around 8 days) to produce the enzyme.



**Figure 2.3** Changes in lactose concentration during mixotrophic cultivation of *T. obliquus* under various sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

The concentration of glucose and galactose, the main products of lactose hydrolysis, were also measured in the culture medium during the experiment (Figures 2.4A,B). The amount of the two monosaccharides was low ( $< 0.2 \text{ g.L}^{-1}$ ) until day 8 whenever the culture condition. Their instant consumption by microalgal cells may explain this phenomenon. After this day, glucose and galactose concentrations in the media significantly increased for the cultures grown on 60% and 100% (v/v) SWP, but not for 0% and 20% (v/v) SWP. The

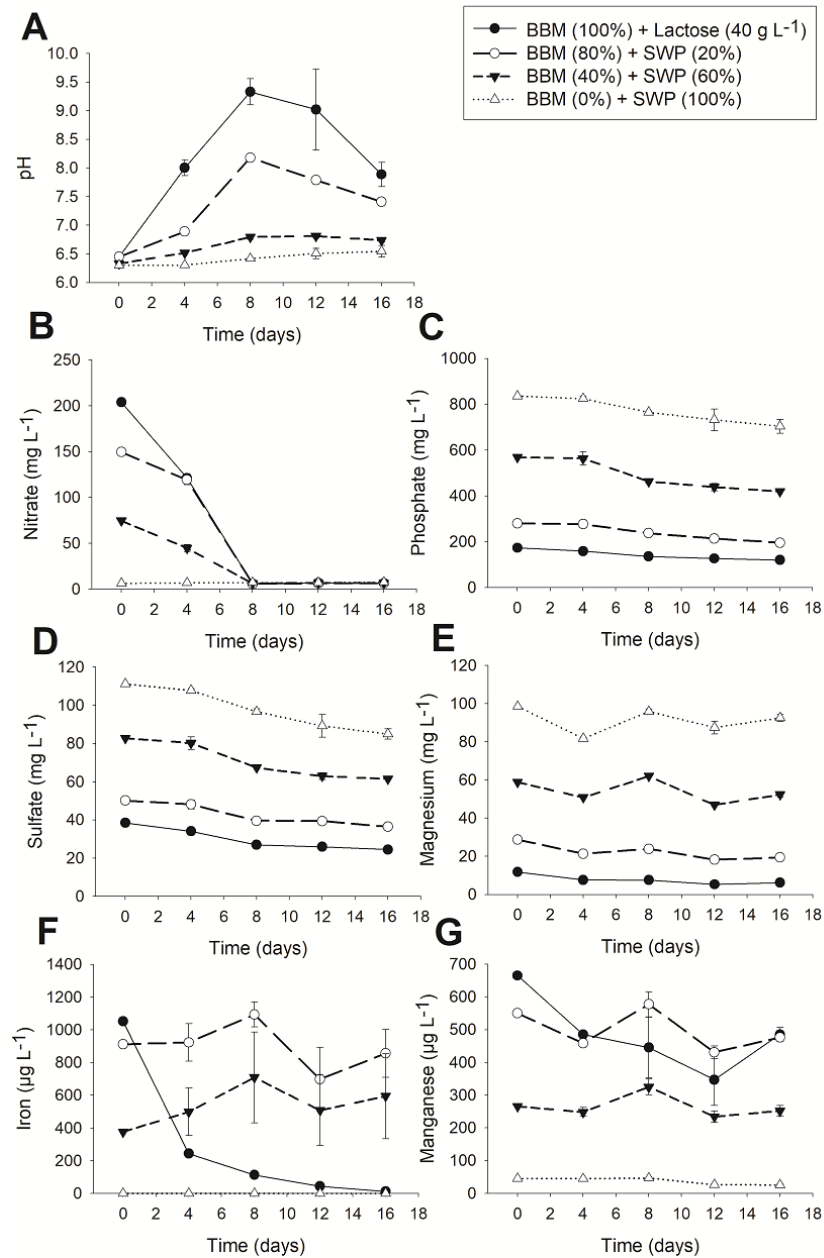
highest amounts were observed at the end of the experiment (day 16) for all culture conditions. A possible explanation for this accumulation is the limitation of microalgal growth, while lactose hydrolysis still occurs. Cultures grown on 60% (v/v) SWP exhibited the highest accumulation of glucose and galactose at the end of the experiment (up to 1 g.L<sup>-1</sup> for both sugars). Interestingly, another carbohydrate molecule was released in the 60% and 100% (v/v) SWP culture media. In our previous study (Suwal *et al.*, 2019), this molecule was expected to be a GOS. However, its exact structure should be investigated. The concentration of the molecule was calculated as grams equivalent to galactose (Figure 2.4C). It gradually increased to reach a maximum of about 0.77 and 0.89 g.L<sup>-1</sup> for the cultures grown on 60% and 100% (v/v) SWP. However, the molecule was almost not detected for the cultures grown on pure lactose and 20% (v/v) SWP.



**Figure 2.4** Changes in (A) glucose, (B) galactose, and (C) galactooligosaccharide (GOS) concentrations during mixotrophic cultivation of *T. obliquus* under various sweet whey

permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

The medium's pH and main ionic and trace metals contents (Figure 2.5) were also surveyed through time to better understand *T. obliquus*'s growth and  $\beta$ -galactosidase activities under the different culture conditions. Plots of the changes in the pH values are shown in Figure 2.5A. The pH variations seemed to be inversely proportional to the use of SWP. This could be explained by the difference in the initial nitrate concentrations since nitrate assimilation by denitrification is known to produce alkalinity and increase pH levels (Fernández-Nava *et al.*, 2008). A rapid increase in pH was shown for control and 20% (v/v) SWP cultures to reach a maximum of about 9.33 and 8.28, after which it decreased steadily. On the other hand, cultures grown on a 60% and 100% (v/v) SWP exhibited a small pH increase with a maximum of about 6.79 and 6.42, respectively. Variation in the culture's pH is one of the vital factors that affects the biomass yield and the enzyme activities, because it determines the solubility and availability of nutrients in the culture medium and influences the metabolism of the microalgae (Hodaifa *et al.*, 2009). Therefore, each microalga has an optimal pH for growth and enzyme activities. From the literature (Hodaifa *et al.*, 2009), *T. obliquus* showed higher biomass productivity when the pH was maintained at 7.0. This productivity declined with the rise in pH, which could explain the higher dry weight measurements for the cultures grown on 60% and 100% (v/v) compared to 0% and 20% (v/v) SWP. However, the optimal pH for a higher microalgal  $\beta$ -galactosidase activity is not known. The variation in pH measurements from 6.5 to 9.0 seemed not to influence the normalized  $\beta$ -galactosidase activity (*NEA*) of *T. obliquus* species since no significant difference was found between cultures with different pH levels. The differences in *VEA* and *DEA* were only due to the dry mass differences.



**Figure 2.5** (A) Changes in pH and (B-G) main ionic and trace metals concentrations during mixotrophic cultivation of *T. obliquus* under various sweet whey permeate (SWP) and Bold's basal medium (BBM) proportions. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ )

Ionic measurements showed complete exhaustion of nitrate between days 4-8 (Figure 2.5B) (except for the 100% [v/v] SWP media, which does not contain nitrate). The

difference between initial nitrate concentrations suggests different rates of nitrate uptake. Exhaustion of nitrate coincided with a drop in pH levels for all cultures; such evidence suggested nitrate to be the limiting factor. The algal population kept increasing after total nitrate consumption (day 8). The ability of *T. obliquus* to store nitrogen in the form of an intracellular quota and use it from this form could explain this occurrence (Deschênes *et al.*, 2015). Regarding other nutrient content, both phosphate and sulfate ions concentrations slightly decreased over time while staying non-limiting for all culture conditions (Figures 2.5C-D). However, magnesium, iron, and manganese showed quasi-stable levels except for the control, where trace metals (*i.e.*, Fe and Mn) were totally or partially consumed over time (Figures 2.5E-G). Nitrogen limitation in the different culture media could explain these results, and adding nitrates would probably improve the other nutrient intakes. Reduced metal uptake (*i.e.*, Fe and Mn) in the presence of SWP could be attributed to precipitation (or complexation) by Ca and/or Mg (Mehta & Gaur, 2005), since their concentrations are significantly higher in whey permeate as compared to BBM. Moreover, the presence of certain ions as cofactors was shown to affect the  $\beta$ -galactosidase activity of various microorganisms. In general, sodium, potassium, and magnesium act as activators, while calcium reduces enzyme activity (Vera *et al.*, 2012). The concentration of these minerals was significantly greater in SWP than in BBM (Table 2.1). However, since no significant difference was found between the *NEAs* regardless of the initial mineral concentration, their activation-inhibition role in the  $\beta$ -galactosidase activity is still verified in future work.

From another perspective, SWP was particularly limited in nitrate and iron, suggesting that the use of 100% (v/v) SWP is non-profitable. The presence of other inorganic and organic nitrogen sources like ammonium and peptides seems not to be sufficient to cover the nitrogen needs of *T. obliquus*. This could be due to insufficient amounts or microalgal preferences of nitrogen sources (Kim, Mujtaba, & Lee, 2016). Compared to our previous study (Bentahar *et al.*, 2019b), acid whey permeate (AWP) seems to be a better culture medium for *Tetradesmus obliquus* growth and  $\beta$ -galactosidase production since it provided higher biomass and total enzymatic yields. A possible

explanation is that AWP had higher ammonium ( $127 \text{ mg.L}^{-1}$  vs.  $9.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and organic nitrogen ( $0.4 \text{ g.L}^{-1}$  vs.  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$ ) contents than SWP, despite its lower lactose concentration ( $19.7 \text{ g.L}^{-1}$  vs.  $50.4 \text{ g.L}^{-1}$ ).

For industrial utilization, SWP needs to be transformed into powder to make it transportable and storable (Musatti *et al.*, 2020). Due to the drying process cost, the current market price for SWP powder is  $0.7 \text{ €.kg}^{-1}$ , while it is  $0.1 \text{ €.L}^{-1}$  for the unprocessed liquid SWP (Musatti *et al.*, 2020). For small plants processing less than 100 000 kg of milk per day, however, the investment for water removal equipment cannot be economically justified (Peters, 2005). Handling the increasing volumes of whey permeate is also a critical issue that dairy plants worldwide are currently facing (Parashar *et al.*, 2016). Installing an on-site unit for microalgal bioconversion could thus be economically attractive in a scaled-up production.

Current production costs for mixotrophic microalgae culture are rather expensive when using pure components; for example, the price of pure glucose (Sigma-Aldrich) and pure lactose (Sigma-Aldrich) is around  $35 \text{ €.kg}^{-1}$ . Thus, a partial substitution of the lactose-supplemented BBM with SWP (containing mainly lactose) could considerably reduce the cost of the culture medium. Global economic feasibility of this approach, however, strongly depends on the bioproduct value extracted from the microalgae. Further investigation is needed to this end by characterizing the  $\beta$ -galactosidase enzyme and the possible GOS molecule produced by *T. obliquus*.

## 2.4 CONCLUSIONS

This paper investigated the influence of SWP utilization on microalgal growth and  $\beta$ -galactosidase production. Substituting 60% (v/v) of the BBM with SWP was found to significantly enhance cell dry weights and total enzyme activity. The use of 100% (v/v) SWP was not found to be a better option since the lack of some essential nutrients such as nitrate and iron directly affected biomass growth, enzyme production, and nutrient uptakes. This suggests the need for supplementing SWP coproduct before utilization. A short-term

cultural duration (around 8 days) seemed to be a better trade-off for producing the  $\beta$ -galactosidase enzyme and a long-term cultural duration (over 15 days) for biomass production. Furthermore, an unknown carbohydrate molecule (*i.e.*, GOS) was detected in the presence of high SWP proportions. Future work is necessary to identify and characterize the GOS molecule.

## **2.5 ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to acknowledge Véronique Richard for helping in the analysis of sugar in the culture media. This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC: grant number RGPIN-2017- 06202) and the Institute for Nutrition and Functional Foods (INAF: grant number FRQNT-203315).



**CHAPITRE 3**  
**CONCEPTION D'UNE DÉMARCHE D'OPTIMISATION DES MILIEUX DE**  
**CULTURE POUR MAXIMISER LA PRODUCTION DE BIOMASSE DE LA**  
**MICROALGUE *TETRADESMUS OBLIQUUS* EN CONDITIONS**  
**MIXOTROPHES**

**Titre en français du deuxième article :**

Conception d'une démarche d'optimisation des milieux de culture pour maximiser la production de biomasse de la microalgue *Tetradescmus obliquus* en conditions mixotrophes.

**Titre original (en anglais) :**

Media optimization design towards maximizing biomass growth of *Tetradescmus obliquus* under mixotrophic conditions.

**Auteurs et affiliation :**

Jihed Bentahar : Étudiant au doctorat, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

Jean-Sébastien Deschênes : Professeur, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

**État de l'article :**

Version finale publiée (accepté le 15 novembre 2021).

**Revue :**

Bioresource Technology Reports.

**Référence :**

<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100885>

**Contribution au document :**

Cet article utilise un plan d'expériences (méthode de Taguchi) suivi par des analyses statistiques afin de trouver un optimum approximatif quant à la composition d'un milieu de culture idéal pour maximiser la production de biomasse de la microalgue *T. obliquus*, ayant plusieurs utilisations dans différents domaines.

**Résumé en français du deuxième article :**

Maximiser la production de biomasse est un facteur clé dans le développement de la culture de microalgues à grande échelle. Un aspect majeur à prendre en compte est la composition du milieu de culture en fonction de l'objectif du processus. Dans cette étude, l'effet de huit nutriments/facteurs importants (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnésium, fer, manganèse et calcium) et de leurs interactions ont été étudiés sur la production de biomasse de la microalgue *Tetradismus obliquus* en conditions mixotrophes. La méthode de Taguchi, un outil robuste pour l'optimisation de la conception expérimentale, a été utilisée pour trouver la composition optimale du milieu de culture pour la production de biomasse, avec seulement quelques ensembles expérimentaux bien définis. L'utilisation de matrice orthogonale L18 de Taguchi a permis de multiplier par 4 les rendements en biomasse, avec un maximum d'environ 7,98 g.L<sup>-1</sup>. Le nitrate a présenté l'effet le plus significatif. Le fer et le phosphate ont montré une forte influence sur les cultures à court terme (6 à 9 jours), tandis que le glucose et le calcium ont eu plus d'impact sur les cultures à long terme (15 jours). Les conditions expérimentales optimales globales ont été fournies.

# Media optimization design towards maximizing biomass production of *Tetradesmus obliquus* under mixotrophic conditions

Jihed Bentahar<sup>1,\*</sup> . Jean-Sébastien Deschênes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Collectif de recherche appliquée aux bioprocédés et à la chimie de l'environnement (CRABE), Université du Québec à Rimouski, 300, Allée des Ursulines, Rimouski, Québec G5L 3A1, Canada.

\*Corresponding author. E-mail address: jihed.bentahar2@uqar.ca

## ABSTRACT

Maximizing biomass production is a key factor in developing large-scale microalgae cultivation. One major aspect to address is the cultivation medium composition in regards to the process objective. In this study, the effect of eight important nutrients/factors (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnesium, iron, manganese, and calcium) and their interactions were investigated on the biomass production of the microalgae *Tetradesmus obliquus* under mixotrophic conditions. The Taguchi method, a robust tool for experimental design optimization, was used to find the optimum media composition for biomass production, with only a few well-defined experimental sets. Using Taguchi's L18 orthogonal array resulted to a 4-fold enhancement in biomass yields, with a maximum of about 7.98 g.L<sup>-1</sup>. Nitrate exhibited the most significant effect. Iron and phosphate showed a strong influence on short-term cultivations (6 to 9 days), while glucose and calcium had more impact on long-term cultivations (15 days). The overall optimum experimental conditions were provided.

**Keywords:** Microalgae; Biomass production; Taguchi method; Medium composition optimization; Mixotrophic production.

### 3.1 INTRODUCTION

The green microalga *Tetradesmus obliquus* is one of the most intensively studied species due to its rapid growth rate and ability to accumulate substantial amounts of macromolecules of interest (Rajabi Islami & Assareh, 2019). This species has been considered as a promising candidate for renewable biodiesel production and has been used to produce commercially relevant bioproducts such as carotenoids (Yang *et al.*, 2014; Di Caprio *et al.*, 2018). Additionally, its ability to adapt to stressful conditions and to use several sources of inorganic and organic carbon is attracting attention for its utilization in bioremediation and wastewater treatment. However, improving biomass production of *T. obliquus* is a major challenge in order to achieve its large-scale industrial production. The complexity of the phenomena related to microalgal growth makes the achievement of high biomass yields a difficult task (Barbera, Sforza, & Bertucco, 2015).

According to Çelekli *et al.* (2008), modifying the culture medium composition is a fundamental factor in enhancing biomass production and accumulating desired products. However, appropriate ratios, adequate quantities, and bioavailable chemical forms are needed for all the essential elements to have maximum growth (Markou *et al.*, 2014). In addition, the possibility of using organic carbon sources and light simultaneously in mixotrophic cultivation is a promising strategy for ultrahigh biomass production (Oliveira *et al.*, 2021). Furthermore, adapting the cultivation medium to the requirements of the microalgal growth is extremely important to improve the feasibility of large-scale cultivation of microalgae (Markou *et al.*, 2014).

The objective of this paper is to optimize the composition of an ideal culture medium in order to maximize the biomass production of *T. obliquus* species under mixotrophic conditions. Therefore, the design of experiment (DOE) methodology by Taguchi orthogonal array (OA) was applied. This factorial-based approach uses OAs to investigate

the effect of various nutrients (factors) over a specific region of interest (levels) on a response (Venkata Mohan *et al.*, 2007). This approach combines statistical and engineering techniques to identify optimum levels of factors by using analysis of variance (ANOVA) as a statistical tool while reducing the number of experimental configurations (Chiranjeevi & Mohan, 2016). Not only can it considerably save time and costs, but it also provides systematic, simple and efficient results (Venkata Mohan *et al.*, 2007). However, so far there have been no reports on its utilization for maximizing the biomass growth of *T. obliquus* under mixotrophic conditions.

The impact of eight important nutrients on biomass production was explored under mixotrophic conditions. The L18 ( $2^1 \times 3^7$ ) array carrying out 18 experiments was used to investigate one two-level factor and seven three-level factors. The experimental data was finally processed using Minitab software to evaluate the influence of individual nutrients and their interactions on biomass production and to determine the optimal concentrations of the medium components.

## **3.2 MATERIAL AND METHODS**

### **3.2.1 Microalgal strain**

*T. obliquus* was obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Ontario, Canada (CPCC). Seed cultures were maintained in an active growth phase under mixotrophic conditions in a 6 g.L<sup>-1</sup> pure glucose-supplemented Bold's basal medium (BBM), which consisted of (mg.L<sup>-1</sup>): 182.40, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate); 163.05, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (phosphate); 32.64, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (sulfate); 34.33, Cl<sup>-</sup> (chloride); 10.38, BO<sub>3</sub><sup>3-</sup> (borate); 0.26, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (molybdate); 82.89, Na<sup>+</sup> (sodium); 88.27, K<sup>+</sup> (potassium); 7.41, Mg<sup>2+</sup> (magnesium); 6.82, Ca<sup>2+</sup> (calcium); 1.00, Fe<sup>2+</sup> (iron); 0.50, Mn<sup>2+</sup> (manganese); 0.050, Zn<sup>2+</sup> (zinc); 0.02, Cu<sup>2+</sup> (copper) and 0.01, Co<sup>2+</sup> (cobalt), at pH of 6.8 (Stein, 1973).

### 3.2.2 Culture conditions

Optimization of *T. obliquus* biomass production was performed in 250 mL Erlenmeyer flasks (150 mL working volume) in a Multitron II incubator shaker (INFORS HT, Switzerland). Culture media and flasks were autoclaved (121 °C, 15 min, 1-2 bar), and all manipulations were done in a laminar flow biological hood to preserve aseptic conditions. Growth was conducted under mixotrophic conditions, with glucose and gaseous CO<sub>2</sub> being supplied as organic and inorganic carbon sources, respectively. Temperature, light intensity, orbital agitation, and CO<sub>2</sub> concentration were fixed at 21 °C, 100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, 120 rpm, and 1% (v/v), respectively. The pH was controlled using 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2). Experiments were carried out in triplicates (n = 3) over a duration of 15 days with an initial cellular concentration of 1 × 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> (day 0).

### 3.2.3 Taguchi's statistical design

The application of the DOE methodology using the Taguchi approach facilitates the study of an entire parameter space with a small number of experiments. This approach generally includes four phases (with various steps) as follows: planning, conducting, analysis and validation (Venkata Mohan *et al.*, 2007). Each phase has a specific objective, and their combination is required to achieve the optimal design parameters. Screening experiments combined with literature findings (Andersen, 2005) were used to identify the important nutrients (parameters) which variation was expected to have a significant effect on microalgal growth. Eight nutrients were selected (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnesium, iron, manganese, and calcium) to that end.

The L18 Taguchi orthogonal array was considered to design the experimental matrix with a layout of 2<sup>1</sup> × 3<sup>7</sup> and an experimental size of 18 trails. The designed OA was operated according to the factors and levels displayed in Table 3.1. All factors were set at three levels, with equivalent concentrations of 1×, 5×, and 10× BBM, except glucose (2<sup>1</sup>). The experimental matrix is shown in Table 3.2. Each column stands for an independent

factor (nutrient), and experimental condition changes according to the levels assigned to each factor. The mean  $\pm$  standard deviation (SD) values and signal to noise (S/N) ratios of the algal biomass production were taken as response variables.

Biomass measurements were taken at days 6 (growth phase), 9 (early-stationary phase) and 15 (late-stationary phase). The effect of the different factors throughout the culture stages was studied to better understand the optimal medium composition when targeting short-term and long-term cultures.

The statistical analysis was performed using Minitab® 17.3.1 for Microsoft Windows. The graph effects and ANOVA tables were analyzed, and the S/N ratio was calculated for larger-is-better response using the Equation 3.1:

$$S/N = -10 \log \frac{1}{n} \sum \left( \frac{1}{Y_i^2} \right) \quad (3.1)$$

where  $Y_i$  is the response for the given factor level combination and  $n$  is the number of responses.

Taguchi recommends the use of the S/N ratio to determine which settings of the controllable factors result in a closer mean to the desired target and a minimum variability transmitted from the noise variables (Yang & Tarn, 1998; Montgomery, 2013). The significance of all terms was judged statistically when the  $p$  value was less than 0.05 ( $p < 0.05$ ).

#### **3.2.4 Biomass determination**

The initial cell growth was monitored using manual cell counts on a haemocytometer (LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA). A precise volume (10 mL) of *T. obliquus* culture was then taken aseptically for each sampling day. Samples were centrifuged for 6 min at 3400 g and washed twice with deionized water to remove excess components that could influence the biomass measurements. Cell pellets were frozen at -80 °C for at least 24 hours and then freeze-dried using a FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer at -46 °C

over a period of 72 hours. Biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ ) was obtained by precisely weighing the lyophilized cells using a VWR analytical balance ( $\pm 0.1 \text{ mg}$ ).

**Table 3.1** Selected factors and their respective coding levels.

Code	Factor	Level		
		1	2	3
A	Glucose ( $\text{g/L}$ )	6	12	-
B	Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ( $\text{mg/L}$ )	182.4	912.0	1824.0
C	Phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ( $\text{mg/L}$ )	163.05	815.25	1630.50
D	Sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ( $\text{mg/L}$ )	32.64	163.20	326.40
E	Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ( $\text{mg/L}$ )	7.41	37.05	74.10
F	Iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ( $\text{mg/L}$ )	1.00	5.00	10.00
G	Manganese ( $\text{Mn}^{2+}$ ) ( $\text{mg/L}$ )	0.502	2.51	5.02
H	Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ( $\text{mg/L}$ )	6.82	34.10	68.20



**Table 3.2** Experimental matrix using an L18 ( $2^1 \times 3^7$ ) orthogonal array.

Experiment	Independent factor (nutrient)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

Where A = Glucose, B = Nitrate, C = Phosphate, D = Sulfate, E = Magnesium, F = Iron, G = Manganese and H = Calcium.

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.1 Effect of factors on biomass production

The designed experiments and the selected conditions showed a wide variation in microalgal biomass production. This variation revealed the importance of optimization to achieve higher cell density. Table 3.3 represents the response table for means  $\pm$  SD and S/N

ratios. The average biomass production values ranged from 1.74, 1.78, and 1.89 g.L<sup>-1</sup> to 7.19, 7.89, and 7.98 g.L<sup>-1</sup> at days 6, 9, and 15 of culture, respectively (Figure 3.1A-C). An overall 4-fold enhancement in biomass production was attained due to the optimization. Experiment 14 yielded the highest biomass concentration average (7.98 g.L<sup>-1</sup>) after 15 days of culture. To the best of our knowledge, this biomass concentration has never been achieved before with *Tetradesmus obliquus*. The use of Taguchi's experimental approach (8 factors in 3 levels with 18 runs) to enhance the biomass productivity of microalgal cultures led to a maximum biomass growth of 5.26 g.L<sup>-1</sup> (Chiranjeevi & Mohan, 2016). However, maximal biomass yields of about 3.56 g.L<sup>-1</sup> were obtained for the green microalgae *Chlorella vulgaris* when the effect of 5 factors in 4 levels with 16 runs was investigated (Barghbani, Rezaei, & Javanshir, 2012).

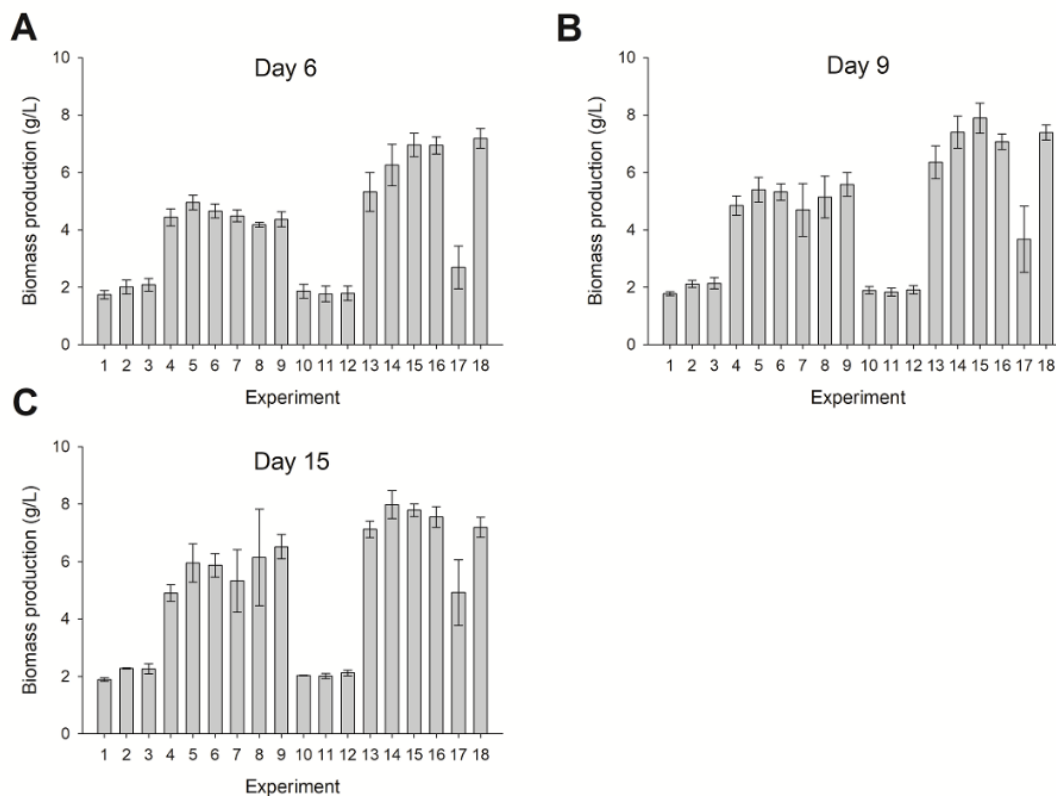
The employed conditions for this experiment were: glucose at 12 g.L<sup>-1</sup>, nitrate at 912 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 5×), phosphate at 815.25 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 5×), sulfate at 326.4 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 10×), magnesium at 7.41 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 1×), iron at 5 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 5×), manganese at 0.502 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 1×) and calcium at 68.2 mg.L<sup>-1</sup> (BBM 10×). However, no significant difference was observed between the experiments 14, 15, 16 and 18 at day 6 ( $F = 2.19, p = 0.17$ ), 9 ( $F = 1.86, p = 0.22$ ) and 15 ( $F = 2.54, p = 0.13$ ).

In our previous work (Bentahar *et al.*, 2019b; Bentahar & Deschênes, 2022b), the use of sweet and acid whey permeates as carbon sources for the culture of *T. obliquus* under mixotrophic conditions led after 16 days to maximal biomass yields of about 2.19 and 5 g.L<sup>-1</sup>, respectively. On the other hand, a maximum of about 2.2 g.L<sup>-1</sup> was obtained when a basal BG11 medium supplemented with glucose and xylose was used for the mixotrophic growth of *T. obliquus* (Yang *et al.*, 2014).

**Table 3.3** Response table for Means  $\pm$  SD and S/N ratios.

Experiment	Biomass production (g/L)								
	Day 6			Day 9			Day 15		
	Mean	SD	S/N	Mean	SD	S/N	Mean	SD	S/N
1	1.74	0.15	4.76	1.78	0.07	4.98	1.89	0.06	5.52
2	2.01	0.24	5.92	2.11	0.12	6.45	2.28	0.02	7.17
3	2.09	0.22	6.29	2.14	0.20	6.53	2.26	0.18	7.03
4	4.43	0.30	12.89	4.85	0.34	13.67	4.90	0.29	13.78
5	4.95	0.25	13.88	5.40	0.43	14.59	5.95	0.67	15.38
6	4.66	0.24	13.34	5.31	0.28	14.48	5.87	0.41	15.32
7	4.49	0.21	13.03	4.70	0.92	13.05	5.33	1.09	14.15
8	4.17	0.09	12.41	5.14	0.73	14.07	6.14	1.68	15.22
9	4.36	0.27	12.76	5.58	0.41	14.89	6.52	0.42	16.25
10	1.86	0.24	5.23	1.89	0.13	5.49	2.04	0.01	6.18
11	1.77	0.27	4.71	1.83	0.14	5.18	2.01	0.09	6.06
12	1.79	0.26	4.86	1.91	0.15	5.59	2.12	0.10	6.51
13	5.32	0.68	14.39	6.36	0.57	16.00	7.12	0.29	17.04
14	6.25	0.72	15.80	7.40	0.56	17.33	<b>7.98</b>	0.49	18.01
15	6.96	0.41	16.82	<b>7.89</b>	0.53	17.90	7.79	0.22	17.82
16	6.94	0.30	16.81	7.07	0.27	16.98	7.56	0.36	17.55
17	2.69	0.75	7.89	3.67	1.15	10.46	4.92	1.15	13.38
18	<b>7.19</b>	0.34	17.11	7.39	0.26	17.36	7.20	0.35	17.12

Values are presented for repeated conditions ( $n = 3$ ). The bold values represent the maximum values of the average biomass production of all the experiments.



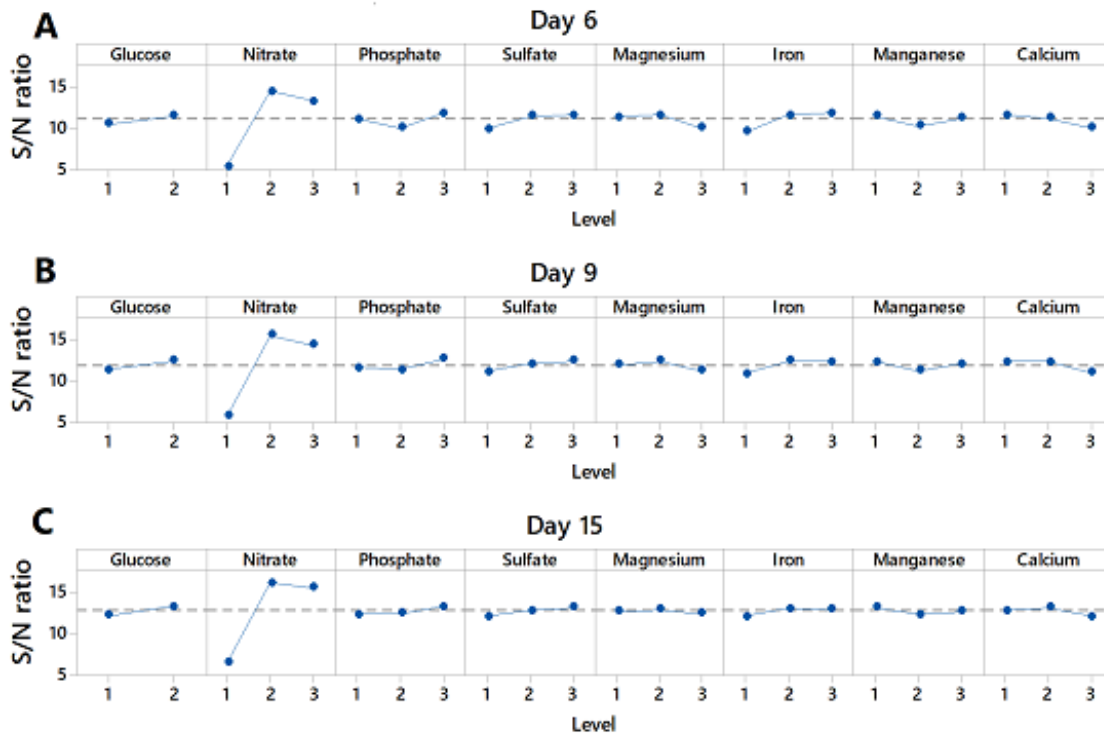
**Figure 3.1** Biomass production for all the eighteen experimental trails/variations at days 6 (A), 9 (B), and 15 (C) of culture. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

### 3.3.2 Effect of individual factors

The S/N graphical analysis in relation to the eight factors' effect on biomass production is presented in Figure 3.2A-C. The larger the difference is between the levels of a particular factor, the stronger is its influence. Ranking and delta values were also given to classify the eight factors (Table 3.4). Delta values indicate the size of the effect by calculating the difference between the highest and the lowest S/N ratios of a factor. Based on those values, the ranking was assigned from the greatest to the least effect. The order in which the individual factors influence biomass production is as follows:

Nitrate > Iron > Phosphate > Sulfate > Calcium > Magnesium > Manganese > Glucose for days 6 and 9 of culture.

Nitrate > Glucose > Calcium > Sulfate > Phosphate > Iron > Manganese > Magnesium for day 15 of culture.



**Figure 3.2** Effect of individual factors at different levels on the biomass production for the signal to noise (S/N) ratio at days 6 (A), 9 (B), and 15 (C) of culture.

**Table 3.4** Classification of factors according to their effect on the biomass production for the signal to noise (S/N) ratio.

Factor	Day 6		Day 9		Day 15	
	Delta	Rank	Delta	Rank	Delta	Rank
Glucose	0.927	8	1.064	8	1.094	2
Nitrate	9.223	1	9.958	1	9.815	1
Phosphate	1.762	3	1.446	3	0.971	5
Sulfate	1.675	4	1.299	4	1.083	4
Magnesium	1.546	6	1.119	6	0.466	8
Iron	2.314	2	1.603	2	0.921	6
Manganese	1.108	7	1.085	7	0.865	7
Calcium	1.575	5	1.294	5	1.088	3

Factors were classified from the greatest effect (Rank 1) to the least effect (Rank 8).

Among the selected factors, nitrate exhibited the strongest effect independently of the culture time (day 6, 9, or 15). Nitrogen is a key component for growth since it is an important constituent in all structural and functional biomolecules, including peptides, enzymes, chlorophylls, genetic material, and energy transfer molecules (Kim *et al.*, 2016). In addition, inorganic nitrogen sources such as nitrate are directly assimilated in algal metabolic activity (Chiranjeevi & Mohan, 2016). This can explain nitrate's high influence on biomass production. However, the relative impact of the other factors seemed to be different between short-term (day 6 and 9) and long-term (day 15) cultures.

Following nitrate, iron showed a strong effect on *T. obliquus* growth. This micronutrient is needed for the growth of all microalgae, and it plays a critical role in many essential metabolic functions (Andersen, 2005). However, its influence on growth tended to decrease over time as compared to the other factors. This could be due to nitrate consumption since the enzyme responsible for nitrogen fixation (nitrogenase) requires substantial amounts of iron (Larson *et al.*, 2018).

Phosphate salt was the sole source of phosphorus used in the cellular processes related to energy transfer and nucleic-acid synthesis (Martínez *et al.*, 1999). This factor was the third important factor for short-term cultures and its influence also decreased over time. A possible explanation is that, under nutrient deficiency, phosphorus doesn't contribute directly to the increase of biomass and is instead stored intracellularly in the form of polyphosphate (Tramontin *et al.*, 2018).

On the other hand, the influence of glucose raised from the least to the second most important factor at the end of the experiment. Glucose is an essential macronutrient needed for cell division and for conducting the cell's physiological activities (Chiranjeevi & Mohan, 2016). The increase in its concentration augments the biomass as the glucose assimilation provides more energy in the form of ATP and NADPH (Chiranjeevi & Mohan, 2016). However, doubling the glucose concentration (from 6 to 12 g.L<sup>-1</sup>) seemed to only

slightly influence the biomass production, which could be due to the carbon source excess. The consumption of glucose over time raised the gap for the carbon source availability between the two levels resulting in an increase of its effect (delta values of 0.927 and 1.094 at days 6 and 15, respectively).

The delta values of major ions (calcium and sulfate) decreased over time, indicating a drop in their effect on biomass production. Yet, they continued to play important roles compared to the other factors (ranks 3 and 4, respectively at day 15). Calcium is essential for cell wall and membrane structure, and it contributes to cell growth by modulating several enzymatic activities in photosynthesis (Esakkimuthu *et al.*, 2016). Sulfate is consumed by cells as a sulfur source. Sulfur is needed for photosynthesis and synthesis of amino acids, oligopeptides, vitamins, cofactors, and other secondary products (Mohammadi *et al.*, 2018).

Magnesium and manganese are also involved in photosynthesis (Andersen, 2005; Esakkimuthu *et al.*, 2016). However, their requirement for growth appeared to be much less than that of iron, calcium, and sulfate.

### **3.3.3 Analysis of variance (ANOVA)**

The contribution of each factor is the key to biomass production enhancement. In this approach, ANOVA was conducted to analyze the OA experiment and to determine which factors significantly affect the growth of *T. obliquus* during the growth phase (day 6), the early-stationary phase (day 9), and the late-stationary phase (day 15) as shown in Table 3.5. The *p* values suggested that only nitrate had a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) independently of the cultivation phase. The change in the concentrations of the seven remaining factors in the range given in Table 3.1 had no significant influence on biomass production, which could be due to their availability in excess. However, the smaller magnitude of the *p* value is, the more significant its corresponding factor becomes. Statistical results showed that glucose was the only nutrient which influence significantly increased over time. A possible explanation is the contribution of glucose in enhancing the

lipid content inside the cells, resulting in a higher dry weight concentration (Chandra *et al.*, 2014). When the nitrogen source (*i.e.*, nitrate) gets depleted, the metabolic activity of the cell is directed towards lipid synthesis and requires an excess of organic carbon (*i.e.* glucose) (Chandra *et al.*, 2014).

The optimal levels of factors to achieve the highest biomass production were almost the same for all culture phases: 12 g.L<sup>-1</sup> glucose (level 2), 912 mg.L<sup>-1</sup> nitrate (level 2), 1630.5 mg.L<sup>-1</sup> phosphate (level 3), 326.4 mg.L<sup>-1</sup> sulfate (level 3), 37.05 mg.L<sup>-1</sup> magnesium (level 2) and 0.502 mg.L<sup>-1</sup> manganese (level 1). However, the optimal iron and calcium concentrations seemed to be influenced by the cultivation phase. Level 3 (10 mg.L<sup>-1</sup>) of iron was better during the growth phase (day 6), while level 2 (5 mg.L<sup>-1</sup>) displayed better results during the stationary phase (days 9 and 15). The iron ions can be harmful to the cells when their intake exceeds the needed amount (Wang *et al.*, 2015). This can explain the difference in iron preferences between the two phases. On the other hand, level 1 (6.82 mg.L<sup>-1</sup>) of calcium contributed to the highest biomass production for short-term cultures (day 6 and 9), while level 2 (34.1 mg.L<sup>-1</sup>) was better for long-term cultures (day 15). A possible explanation is that, under stressful conditions caused by nutrient depletion over time, calcium becomes more important for regulating cell growth and metabolite synthesis in microalgae (Cui *et al.*, 2020).



**Table 3.5** Results of the analysis of variance (ANOVA) for the biomass production after 6, 9, and 15 days of culture.

Parameter	DF	SS			F value			P value		
		Day 6	Day 9	Day 15	Day 6	Day 9	Day 15	Day 6	Day 9	Day 15
Glucose	1	3.87	5.09	5.39	1.1	1.17	1.44	0.40	0.39	0.35
Nitrate	2	302.19	354.85	362.67	42.97	40.74	48.47	0.02	0.02	0.02
Phosphate	2	9.48	6.84	3.24	1.35	0.78	0.43	0.43	0.56	0.70
Sulfate	2	10.50	5.54	3.71	1.49	0.64	0.50	0.40	0.61	0.67
Magnesium	2	8.67	3.89	0.67	1.23	0.45	0.09	0.45	0.69	0.92
Iron	2	19.00	9.36	3.10	2.70	1.07	0.41	0.27	0.48	0.71
Manganese	2	4.24	3.85	2.26	0.60	0.44	0.30	0.62	0.69	0.77
Calcium	2	8.11	6.37	3.69	1.15	0.73	0.49	0.46	0.58	0.67
Residual error	2	7.03	8.71	7.48						
Total	17	373.09	404.51	392.22						

Where DF = Degree of freedom, SS = Sum of squares.

### 3.3.4 Factors interactions

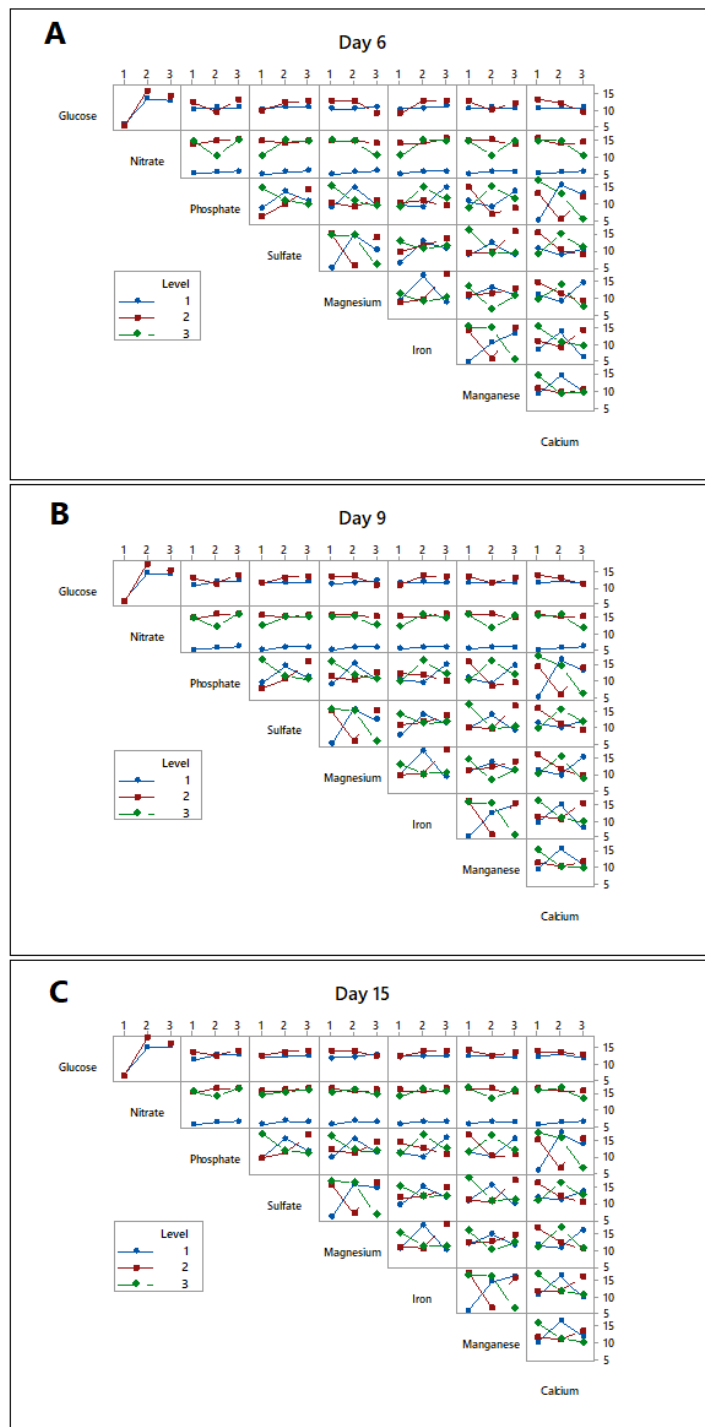
The optimization of a complex process such as biomass production requires an understanding of not only the individual influence of each factor but also of the various interactions between these factors. From that perspective, the interaction between every two factors was evaluated, and the interaction plots were presented for days 6, 9, and 15 (Figure 3.3A-C). The *x*-axis represented the levels of the first factor, and the lines showed the levels of the second one. In addition, the *y*-axis illustrated the results for the S/N ratios. Non-parallel plot lines usually demonstrate an interaction between two factors, while parallel lines correspond to the absence of any interactions (Rashad *et al.*, 2023).

The interaction between the eight factors seemed to have similar patterns regardless of the time condition (day 6, 9, and 15). Glucose and nitrate exhibited little intersection with all other factors, indicating no relationship between each pair of factors that includes glucose or nitrate (Figure 3.3). On the other hand, the results confirmed the interactions

between phosphate, sulfate, magnesium, iron, manganese, and calcium. The more non-parallel lines, the more effective the interaction is in terms of biomass production.

Among all selected factors, the three interaction-factors: phosphate  $\times$  calcium, sulfate  $\times$  magnesium, and iron  $\times$  manganese exhibited the most significant interaction that influence cell growth ( $p < 0.05$ ). Inorganic phosphates are known to build complexes, chelates and insoluble salts with several metal ions (Cloot & Roos, 1996). Phosphate absorption can be improved in the presence of calcium (DvOřáková-Hladká, 1976). However, phosphates can also precipitate as calcium phosphate when pH and calcium concentrations are high (Muylaert *et al.*, 2015). The interaction between sulfate and magnesium could be due to their complementary effect on protein synthesis. Sulfur is a constituent of almost all proteins, while many biological processes associated with protein synthesis require the presence of magnesium (Van Dam *et al.*, 2010). From another perspective, iron had a competitive effect on manganese absorption by microalgae, while manganese had less impact on iron assimilation (Liu *et al.*, 2018). The requirement of manganese is predicted to be much less than that of iron for microalgal growth (Andersen, 2005). However, manganese can take the place of iron and reduce the effect of iron limitation (Liu *et al.*, 2018).

During culture operation, all eight factors go through constant changes and affect the microalgal biomass growth process simultaneously. These results suggest a promising avenue for developing mathematical models in which the influence of every change can be examined without the necessity to experimentally test the effects separately (Darvehei *et al.*, 2018). Such models can be integrated into automatic control and real-time optimization strategies for large-scale cultivation systems.



**Figure 3.3** Interaction effects plot on the biomass production for the signal to noise (S/N) ratio at days 6 (A), 9 (B), and 15 (C) of culture.

### **3.4 CONCLUSIONS**

This paper revealed that the application of DOE using Taguchi method facilitated the optimization of microalgal biomass production. The L18 orthogonal array, the S/N ratio, and the analysis of variance were employed to investigate the specific role of eight important factors involved in the growth of *T. obliquus* species under mixotrophic conditions. Our findings showed that biomass production can be improved significantly. Interestingly, a maximum biomass yield of about 7.98 g.L<sup>-1</sup> was achieved. Further studies to develop detailed mathematical models for the growth of *T. obliquus*, based on the real-time nutrient availability, will be needed for use in large-scale productions.

### **3.5 ACKNOWLEDGMENTS**

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada under grant number RGPIN-2017-06202 and the Institute for Nutrition and Functional Foods under grant number FRQNT-203315 is acknowledged with gratitude.

## CHAPITRE 4

### UN MODÈLE FIABLE A PLUSIEURS FACTEURS/NUTRIMENTS POUR LA PRODUCTION RAPIDE DE BIOMASSE MICROALGALE À HAUTE DENSITE SUR UN LARGE SPECTRE DE CONDITIONS MIXOTROPHES

#### **Titre en français du troisième article :**

Un modèle fiable à plusieurs facteurs/nutriments pour la production rapide de biomasse microalgale à haute densité sur un large spectre de conditions mixotrophes.

#### **Titre original (en anglais) :**

A reliable multi-nutrient model for the rapid production of high-density microalgal biomass over a broad spectrum of mixotrophic conditions.

#### **Auteurs et affiliation :**

Jihed Bentahar : Étudiant au doctorat, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

Jean-Sébastien Deschênes : Professeur, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

#### **État de l'article :**

Version finale publiée (accepté le 8 mai 2023).

#### **Revue :**

Bioresource Technology.

#### **Référence :**

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129162>

### **Contribution au document :**

Cet article présente, pour la première fois, l'utilisation de l'approche expérimentale de Taguchi pour concevoir un ensemble de données efficace dans le but de développer un modèle mathématique réaliste (à plusieurs facteurs/nutriments) et d'améliorer la production de biomasse des microalgues cultivées dans des conditions mixotrophes, en mettant l'accent sur les concentrations de nutriments dans la composition du milieu.

### **Résumé en français du troisième article :**

Les avantages de la production de biomasse microalgale en conditions mixotrophes sont bien établis, mais pour en tirer le plein potentiel, il est nécessaire de déterminer et d'exploiter avec succès les conditions optimales de production de biomasse et d'utilisation des ressources tout au long du processus. Les modèles mathématiques détaillés se sont souvent révélés être les outils les plus efficaces pour prédire le comportement du processus et déterminer son fonctionnement global. Dans cette étude, un modèle hautement fiable a été développé pour la production mixotrophe de microalgues en couvrant un large éventail de conditions nutritionnelles (10 fois la plage de concentration du milieu basal BBM) et des rendements de biomasse allant jusqu'à 6,68 g.L<sup>-1</sup> après seulement 6 jours. Le modèle final comprend un total de cinq variables d'état et neuf paramètres : la calibration du modèle a entraîné de très petits intervalles de confiance à 95 % et des erreurs relatives inférieures à 5% pour tous les paramètres. La validation du modèle a montré une grande fiabilité avec des valeurs de corrélation R<sup>2</sup> comprises entre 0,77 et 0,99.

# A reliable multi-nutrient model for the rapid production of high-density microalgal biomass over a broad spectrum of mixotrophic conditions

**Jihed Bentahar**<sup>1,2,\*</sup> . **Jean-Sébastien Deschênes**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Collectif de recherche appliquée aux bioprocédés et à la chimie de l'environnement (CRABE), Université du Québec à Rimouski, 300, Allée des Ursulines, Rimouski, Québec G5L 3A1, Canada.

<sup>2</sup> Département des sciences des aliments, Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425, rue de l'Agriculture, Québec, Québec G1V 0A6, Canada.

\* Corresponding author. E-mail address: jihed.bentahar2@uqar.ca

## **ABSTRACT**

The superior microalgal biomass productivities obtained under mixotrophic conditions have been widely demonstrated. However, to attain the full potential of the method, optimal conditions for biomass production and resource utilization need to be determined and successfully exploited throughout the process operation. Detailed kinetic mathematical models have often proved most efficient tools for predicting process behavior and governing its overall operation. This paper presents an extensive study for obtaining a highly reliable model for mixotrophic production of microalgae covering a wide set and range of nutritional conditions (10-fold the concentration range of Bold's Basal Medium) and biomass yields up to 6.68 g.L<sup>-1</sup> after only 6 days. The final reduced model includes a total of five state variables and nine parameters: model calibration resulted in very small

95% confidence intervals and relative errors below 5% for all parameters. Model validation showed high reliability with  $R^2$  correlation values between 0.77 and 0.99.

**Keywords:** Microalgae; Mixotrophic conditions; Multi-nutrient kinetic model; Biomass production; Model validation.

## 4.1 INTRODUCTION

Mixotrophic cultivation is currently a trending method for producing microalgal biomass, as its superior yields and productivities were recently widely demonstrated (Pang *et al.*, 2019; Patel *et al.*, 2021; Dragone, 2022; Yu *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; Arun *et al.*, 2022). This nutrition mode combines the metabolic pathways of both photosynthesis and organic carbon uptake in a synergistic fashion (Pang *et al.*, 2019; Arun *et al.*, 2022), to such an extent that it has even been described as a “growth-boosting” mechanism (Liu *et al.*, 2022). Its advantages over standard photoautotrophic or heterotrophic cultivation comprise a higher photosynthesis performance, enhanced protection against light damage, lower photorespiration rates, shorter duration of the growth cycle, increased growth rates and metabolite production rates, and better independence between biomass yields and incident light intensity (Salati *et al.*, 2017; Manhaeghe *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022). Achieving high yields and productivities is a main challenge to overcome for the successful commercialization of various microalgal bioproducts, and mixotrophic processes have been identified as a feasible avenue to further and prioritize in the upcoming efforts on the matter (Pang *et al.*, 2019; Patel *et al.*, 2021; Dragone, 2022).

Mixotrophic growth involves a complex set of metabolic reactions, which are influenced by many factors in the culture environment. To ensure optimal results from this approach, a keen understanding of the process intricacies is most essential. To this end, mathematical modelling is a recognized and robust engineering tool for optimizing microalgae cultivation, allowing prediction of process behavior through complex interactions of factors and design its overall operation accordingly (Darvehei *et al.*, 2018; Bekirogullari *et al.*, 2020). Obtaining a good mathematical model can be a challenging task,



however, and this is especially the case for mixotrophic phenomena where the complex interrelation of multiple factors may be difficult to capture experimentally: adequate parameter identification may require the availability of experimental data that is hard or tricky to obtain (Lee *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2021).

In this paper, an extensive study for obtaining a mathematical model describing the multi-nutrient kinetics of microalgal growth in mixotrophic conditions is presented. This work is a subsequent contribution of the results presented in Bentahar & Deschênes (2022a), where the influence of the eight main nutrients (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnesium, iron, manganese, and calcium) in the culture medium was evaluated on the production of biomass by the green microalga *Tetradismus obliquus* at different moments in time (6, 9 and 12 days). The most influential variables, namely glucose, nitrate, phosphate and iron, are used to formulate an experimental plan covering a very large span of concentrations for those nutrients in order to build the model: glucose thus varies up to 10 g.L<sup>-1</sup>, while nitrate, phosphate and iron attain up to 10-fold their prescribed amount in the original Bold's Basal Medium (BBM) composition. All other aforementioned nutrients are set at near-optimal conditions based on previous results (Bentahar & Deschênes, 2022a). The experimental plan, based on the Taguchi method, is an L16 (4<sup>3</sup>) orthogonal array involving 16 experiments with three variables (factors) being varied at four different (initial) levels each. Experiments were each conducted over 12 days, with frequently sampled data over this duration. Parameter estimation was carried out by minimizing a weighted least squares criterion between model prediction and experimental data. An absolute minimum search approach (Nelder-Mead) followed by parameter covariance matrix estimation (Levenberg-Marquardt) was performed using most (12 out of 16) experimental sets of data. The remaining datasets were used exclusively for model validation.

This paper represents a significant advancement in the understanding of multi-nutrient kinetics in mixotrophic conditions, as it constitutes one the most extensive investigation conducted to date. The paper is organized as follows: first, a detailed

description of the culture conditions is provided, followed by an outline of the experimental setup utilizing Taguchi's experimental design. The analytical methods necessary for acquiring the experimental data are then presented. Subsequently, the kinetic model equations and parameter identification principles are introduced. The model parameters are inferred from the collected data, and the calibration results are provided. To validate the model, the predictive capabilities and the reliability of its parameters are investigated. Possible extensions and anticipated challenges in improving the model are also discussed.

## 4.2 MATERIAL AND METHODS

### 4.2.1 Microalgae and culture medium

The *T. obliquus* strain was obtained from the Canadian Phycological Culture Center (CPCC) at the University of Waterloo (Ontario, Canada). Cells grew under mixotrophic conditions in batch culture using Bold's Basal Medium (BBM), composed of (mg.L<sup>-1</sup>): 182.40, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate); 163.05, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (phosphate); 32.64, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (sulfate); 34.33, Cl<sup>-</sup> (chloride); 10.38, BO<sub>3</sub><sup>3-</sup> (borate); 0.26, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (molybdate); 82.89, Na<sup>+</sup> (sodium); 88.27, K<sup>+</sup> (potassium); 7.41, Mg<sup>2+</sup> (magnesium); 6.82, Ca<sup>2+</sup> (calcium); 1.00, Fe<sup>2+</sup> (iron); 0.50, Mn<sup>2+</sup> (manganese); 0.050, Zn<sup>2+</sup> (zinc); 0.02, Cu<sup>2+</sup> (copper); and 0.01, Co<sup>2+</sup> (cobalt) (Stein, 1973). The medium was supplemented with 10 g.L<sup>-1</sup> pure glucose (Sigma-Aldrich) as the sole organic carbon source. All media were sterilized at 121°C for 20 min before use. The initial pH was adjusted to 6.8. Biomass for inoculum was prepared by growing axenic algal cultures to the exponential growth phase in 250 mL Erlenmeyer flasks (130 mL working volume) at the same culture conditions used to conduct the experiments.

### 4.2.2 Culture conditions

Batches were cultivated in 1 L Erlenmeyer flasks (600 mL working volume) in a Multitron II incubator shaker (INFORS HT, Switzerland). The culture temperature was 21°C. Cool white fluorescent tubes at a constant light intensity of 100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (no dark

cycle) supplied light irradiance. Orbital agitation was 120 rpm. An input CO<sub>2</sub> concentration of 1% aerated all experiments. Each Erlenmeyer flask was inoculated at 1×10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> (day 0), and the pH of the samples maintained at 7.20 using a 50 mM Tris-HCl buffer. All samples were prepared in a laminar flow biological hood to preserve aseptic conditions. The algae were mixotrophically grown in BBM medium supplemented with pure glucose. The glucose concentration in the medium at the beginning of cultivation was 10 g.L<sup>-1</sup>. The BBM composition was modified using Taguchi's experimental design methodology.

#### 4.2.3 Taguchi's experimental design

Taguchi's DOE approach was applied to design the experiments. The primary step was to identify the important nutrients/factors whose variation has a critical effect on biomass growth. In a previous work (Bentahar & Deschênes, 2022a), a total of eight factors (glucose, nitrate, phosphate, sulfate, magnesium, iron, manganese, and calcium) were chosen for optimization purposes. The experimental results revealed that nitrate, iron, and phosphate exerted a significant influence on the short-term (6 to 9 days) cultivations of *T. obliquus* microalgae. As a result, these three factors were selected for further investigation using an L16 (4<sup>3</sup>) experimental matrix consisting of 16 variations. Each nutrient was subjected to four levels of operation, corresponding to 1×, 2×, 5×, and 10× concentrations of BBM, as presented in Table 4.1. The culture medium, a 10 g.L<sup>-1</sup> glucose-supplemented BBM, included the following component concentrations (mg.L<sup>-1</sup>) as suggested by Bentahar & Deschênes (2022a): 309.89, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (sulfate); 122.40, Cl<sup>-</sup> (chloride); 37.06, Mg<sup>2+</sup> (magnesium); 6.82, Ca<sup>2+</sup> (calcium); 10.38, BO<sub>3</sub><sup>3-</sup> (borate); 0.50, Mn<sup>2+</sup> (manganese); 0.050, Zn<sup>2+</sup> (zinc); 0.26, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (molybdate); 0.02, Cu<sup>2+</sup> (copper) and 0.01, Co<sup>2+</sup> (cobalt).

Culture samples were taken daily (twice a day during the growth phase) over 12 days. The measurements of biomass production, internal nitrogen cell quota, glucose, nitrate, and phosphate concentrations were considered response variables to develop the model.

**Table 4.1** Various experimental conditions using Taguchi's L16 ( $4^3$ ) orthogonal array.

Experiment	Factors (nutrients)		
	Nitrate (mg.L <sup>-1</sup> )	Phosphate (mg.L <sup>-1</sup> )	Iron (mg.L <sup>-1</sup> )
1	182.40	163.05	1.00
2*	182.40	326.10	2.00
3	182.40	815.25	5.00
4	182.40	1630.50	10.00
5	364.80	163.05	2.00
6	364.80	326.10	1.00
7*	364.80	815.25	10.00
8	364.80	1630.50	5.00
9	912.00	163.05	5.00
10	912.00	326.10	10.00
11*	912.00	815.25	1.00
12	912.00	1630.50	2.00
13	1824.00	163.05	10.00
14*	1824.00	326.10	5.00
15	1824.00	815.25	2.00
16	1824.00	1630.50	1.00

\* Experiments used for model validation.

#### 4.2.4 Biomass production

Cells were manually counted for initial inoculation using a hemacytometer (LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA). Culture samples with a precise volume of 20 mL provided the dry weight measurements. The tubes were centrifuged for 6 min at 3400 g to separate the biomass from the supernatant. Cell pellets were washed twice with deionized

water to remove excess salts that could affect the biomass measurements, then were frozen at -80 °C for at least 24 hours. A FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer was used to lyophilize cells, and the biomass concentration ( $\text{g cells.L}^{-1}$ ) was determined by taking the result of two precisely weighted ( $\pm 0.1 \text{ mg}$ ) centrifuge tubes before the sampling and after the freeze-drying. The supernatant was maintained at -80 °C for later HPLC and ionic analyses.

#### **4.2.5 HPLC analyses**

An Agilent 1100 Infinity high-performance liquid chromatography instrument (HPLC) determined glucose concentrations in the supernatants. The HPLC was equipped with a Waters Sugar-Pak column ( $6.5 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ ) connected to RID detectors (1260 refractive index detector). The system maintained the column temperature at 90 °C for a 30 min run time, and the mobile phase was 50 ppm EDTA (in Milli-Q water) with a flow rate of  $0.5 \text{ mL.min}^{-1}$ . Before injection, the samples were filtered through  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  nylon syringe filters.

#### **4.2.6 Ionic analyses**

An HPLC instrument (Waters) with an IC-Pack anion column determined nitrate ion concentration ( $\text{NO}_3^-$ ). The column temperature was set at 30 °C and an isocratic sodium borate-gluconate at a flow rate of  $1.2 \text{ mL.min}^{-1}$  eluted the samples. The injection volume was  $40 \text{ }\mu\text{L}$ . A UV-visible diode array detector (WATERS 996 PDA) detected nitrate ions at 210 nm.

The phosphate ion concentration ( $\text{PO}_4^-$ ) measurements were conducted using the method of Murphy and Riley (1962) based on colorimetric detection of a blue-purple compound produced in the reaction between ammonium molybdate and free phosphate. Spectrophotometric detection of the colored compound was performed at 960 nm using a colorimetric microplate spectrophotometer (BioTek, Epoch 2).

#### 4.2.7 Chemical analyses

The lyophilized cells were weighed on an XP6 microbalance (Mettler Toledo) and encapsulated whole in pressed tin capsules ( $5 \times 9$  mm; Costech Analytical Technology). A CHN elemental analyzer (COSTECH ECS 4010; Costech Analytical Technology) coupled with a zero blank autosampler and reactor that converted the sample C and N to  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2$ , respectively, via combustion and reduction measured the internal nitrogen cell quotas. Acetanilide served as a standard compound for calibration. Certified reference material (CRM), secondary standards, and procedural blanks were processed every ten samples to ensure the accuracy of the analysis and to validate instrument performance.

#### 4.2.8 Mathematical modeling

A multi-factor dynamic model was developed to predict *T. obliquus* growth and nutrient consumption (nitrate, phosphate, and glucose) under mixotrophic conditions. This model consists of coupling three submodels for nitrogen, phosphorus, and organic carbon consumption. The literature provides five methods for combining submodels (Darvehei *et al.*, 2018). The multiplication method was chosen assuming all nutrients equally contribute to microalgae growth. To simplify parameter identification and mitigate potential complexities arising from interactions between multiple substrates and microalgae, iron was excluded as a state variable in the modeling process. Instead, the impact of iron was indirectly evaluated by manipulating initial iron concentrations using the Taguchi method. This enabled a robust assessment of iron's effect across four distinct levels while minimizing model complexity. The results of this approach provided insightful understanding of the role of iron in the system.

The Droop model (Droop, 1968), was used for nitrate consumption since *T. obliquus* stores the nitrogen source  $S_N$  (mg nitrate. $\text{L}^{-1}$ ) in the form of an internal quota  $q$  (gN.gC $^{-1}$ ) before effectively using it for growth (Deschênes, 2016). The nitrogen uptake rate  $\rho(S_N, q)$  was expressed in terms of Michaelis-Menten kinetics (nitrogen availability in the medium)

adapted to the maximum level of the internal nitrogen quota (Bernard, 2011). Equation 4.1 presents the nitrogen uptake rate.

$$\rho(S_N, q) = \rho_{max} \frac{S_N}{K_N + S_N} \left(1 - \frac{q}{Q_{max}}\right) \quad (4.1)$$

The Monod model was used to describe the effect of phosphate and glucose concentrations on *T. obliquus*'s growth. It is a simple and widely used model relating the growth rate and substrate concentration (Ross & Pott, 2022). The interaction between Monod and Droop kinetics using the multiplication method (Equation 4.2) represents the mixotrophic growth rate.

$$\mu(q, S_P, S_G) = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_{min}}{q}\right) \left(\frac{S_P}{K_P + S_P}\right) \left(\frac{S_G}{K_G + S_G}\right) \quad (4.2)$$

In these equations,  $S_N$  (mg nitrate.L<sup>-1</sup>),  $S_P$  (mg phosphate.L<sup>-1</sup>), and  $S_G$  (g glucose.L<sup>-1</sup>) are the nitrate (nitrogen source), phosphate (phosphorus source), and glucose (organic carbon source) concentrations, respectively;  $Q_{min}$  (gN.gC<sup>-1</sup>) and  $Q_{max}$  (gN.gC<sup>-1</sup>) are the minimum (below which the growth doesn't occur) and the maximum (above which nitrogen uptake stops) nitrogen quotas, respectively;  $\rho_{max}$  (gN.gC<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>) is the maximum nitrogen uptake rate;  $\mu_{max}$  (day<sup>-1</sup>) is the maximum mixotrophic growth rate; and  $K_N$  (mg nitrate.L<sup>-1</sup>),  $K_P$  (mg phosphate.L<sup>-1</sup>) and  $K_G$  (g glucose.L<sup>-1</sup>) are the half-saturation constants for nitrate, phosphate, and glucose uptakes, respectively.

The entire model includes five state variables: biomass ( $x$ , g cells.L<sup>-1</sup>), internal nitrogen quota ( $q$ , gN.gC<sup>-1</sup>), nitrate ( $S_N$ , mg nitrate.L<sup>-1</sup>), phosphate ( $S_P$ , mg phosphate.L<sup>-1</sup>), and glucose ( $S_G$ , g glucose.L<sup>-1</sup>) as follows (Equation 4.3):

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{x} = \mu(q, S_P, S_G, \theta)x \\ \dot{q} = \rho(S_N, q) - \mu(q, S_P, S_G, \theta)q \\ \dot{S}_N = -\rho(S_N, q)x \\ \dot{S}_P = -\frac{1}{Y_{X/P}}\mu(q, S_P, S_G, \theta)x \\ \dot{S}_G = -\frac{1}{Y_{X/G}}\mu(q, S_P, S_G, \theta)x \end{array} \right. \quad (4.3)$$

where  $\theta$  denotes the vector of model parameters.  $Y_{X/P}$  (gC.g phosphate<sup>-1</sup>) and  $Y_{X/G}$  (gC.g glucose<sup>-1</sup>) represent the yield coefficients of the substrate (phosphate and glucose, respectively) to biomass. These growth yield coefficients are equal to the amount of cell mass produced divided by the amount of substrate utilized.

For simplicity, biological factors (light, CO<sub>2</sub>, temperature, and pH) were considered non-limiting and kept constant throughout the culture. Twelve experiments from Taguchi's L16 orthogonal array were used to calibrate the model and identify its parameters. The model was validated by the data from the remaining four experiments (marked by a \* in Table 4.1).

#### 4.2.9 Parameter identification

A combined procedure with Nelder-Mead and Levenberg-Marquardt methods were applied to find the optimal value of the parameters that minimize the gap between the predicted and measured outputs. MATLAB® 2019a was used for model integration and parameter identification. The non-linear model equations (Equation 4.3) were solved using an ODE45 differential equation solver from Matlab, which depends on the parameter set  $\theta$ .

The *fminsearch* and *fmincon* functions of the Matlab optimization Toolbox were first used. These functions utilized a zero-order Nelder-Mead minimization method (Nelder & Mead, 1965). It is a local and efficient method when solving non-linear problems with noisy cost functions (Deschênes & Vande Wouwer, 2016). The coefficient of determination



(or correlation coefficient), denoted  $R^2$ , was considered to evaluate how well the dynamic model fits the data. It represents the ratio of the sum of squares due to regression ( $SSR$ ) to the total sum of squares ( $TSS$ ) (Equation 4.4).

$$R^2 = \frac{SSR}{TSS} = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4.4)$$

where  $y_i$  is the measured output,  $\hat{y}_i$  is the model predicted output,  $\bar{y}$  is the average of  $y_i$ , and  $n$  is the number of measurement points.

According to Zhang et al. (2018),  $R^2$  can also be written as follows (Equation 4.5):

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{TSS} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4.5)$$

where  $SSE$  denotes the sum of squares due to the error.

The ratio of  $SSE$  to  $TSS$  served as the objective function ( $F_{obj}$ ) for the Nelder-Mead method to maximize the coefficient of determination. A multi-start strategy reduced the local risk and evaluated the global one.

The Levenberg-Marquardt method (Levenberg, 1944; Marquardt, 1963), as implemented in the *lsqnonlin* Matlab function, was used to estimate the vector of model parameters ( $\theta$ ) with respect to the results of the Nelder-Mead method. The Levenberg-Marquardt method mixes Gauss-Newton and gradient iterations for a non-linear minimization algorithm (Hu, Meng, & Mandal, 2005). The weighted least squares ( $WLS$ ) approach minimized the cost function  $J(\theta)$  (Equation 4.6).

$$J(\theta) = \sum_{i=1}^n \left[ (y_i - \hat{y}_i(\theta))^T W^{-1} (y_i - \hat{y}_i(\theta)) \right] \quad (4.6)$$

where  $y_i$  is the measured output,  $\hat{y}_i$  is the model predicted output,  $\theta$  is the parameter vector,  $n$  is the number of measurement points, and  $W$  is the error-weighting matrix.

Under the assumptions of Gaussian noise on the measurements, the Fisher Information Matrix (*FIM*) is determined as follows (Equation 4.7):

$$FIM = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial \hat{y}_i}{\partial \theta} \right)^T \hat{\Sigma}^{-1} \left( \frac{\partial \hat{y}_i}{\partial \theta} \right) \quad (4.7)$$

where  $\hat{\Sigma}$  represents the covariance matrix of the measurement noise, and  $\left( \frac{\partial \hat{y}_i}{\partial \theta} \right)$  are the sensitivity matrices obtained from the computation of the Levenberg-Marquardt algorithm.

In practice, the inverse of the Fisher Information matrix approximates the covariance matrix of the parameter set  $\theta$  (Benavides *et al.*, 2015). The standard deviation of the estimated parameters'  $\hat{\theta}_i$  is given by (Equation 4.8):

$$\sigma(\hat{\theta}_i) = \sqrt{FIM^{-1}_{ii}} \quad (4.8)$$

In this work, the confidence intervals of the estimated parameters were calculated using the inverse of the *FIM*. The correlation coefficient ( $R^2$ ), the confidence intervals at a 95% confidence level, and the relative error (or the coefficient of variation  $c_v$ ) were considered to evaluate the results.

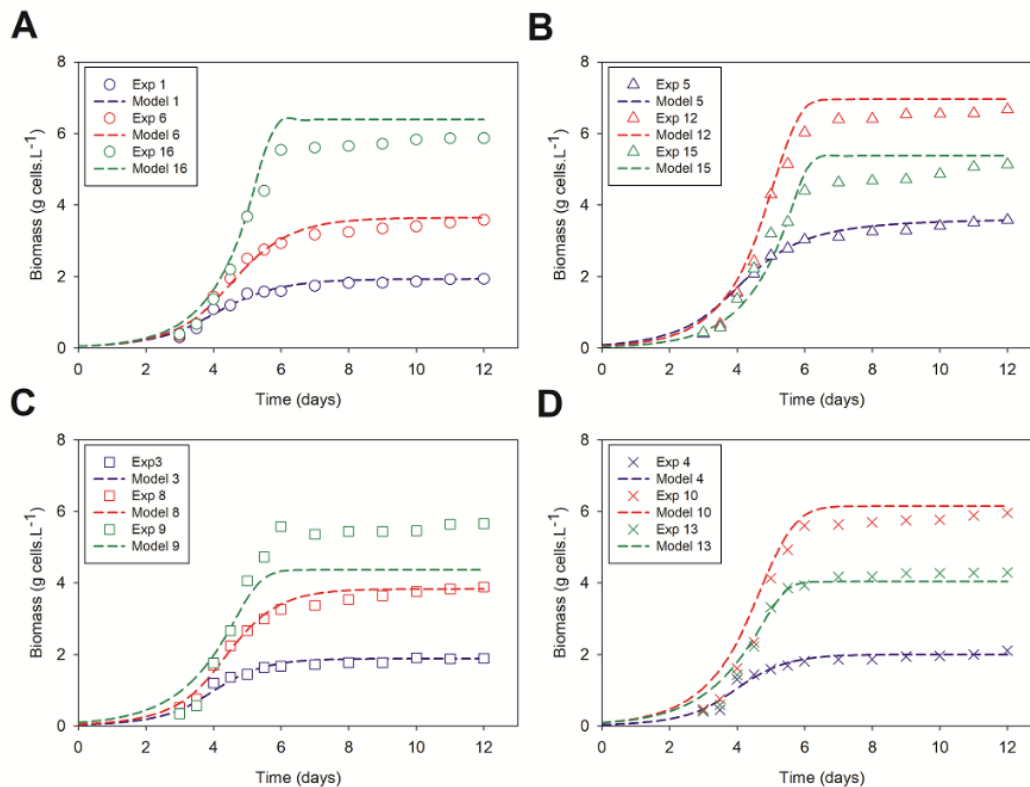
## 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 4.3.1 Experimental results and parameters estimation

The current study involved the estimation of model parameters by fitting simulated mathematical models of growth and substrate consumption rates on experimental data obtained from 12 different batch experiments, designed using Taguchi's L16 design, with varying initial nitrate, phosphate, and iron supplies. Model validation was conducted on the four remaining experiments (as detailed in Table 4.1). To keep the model as simple as possible (*i.e.* with the fewest explanatory variables and parameters as possible), iron was finally excluded as a state variable. The final proposed model (Equation 4.3) comprises a set of nine (9) model parameters and five (5) system equations describing the dynamic

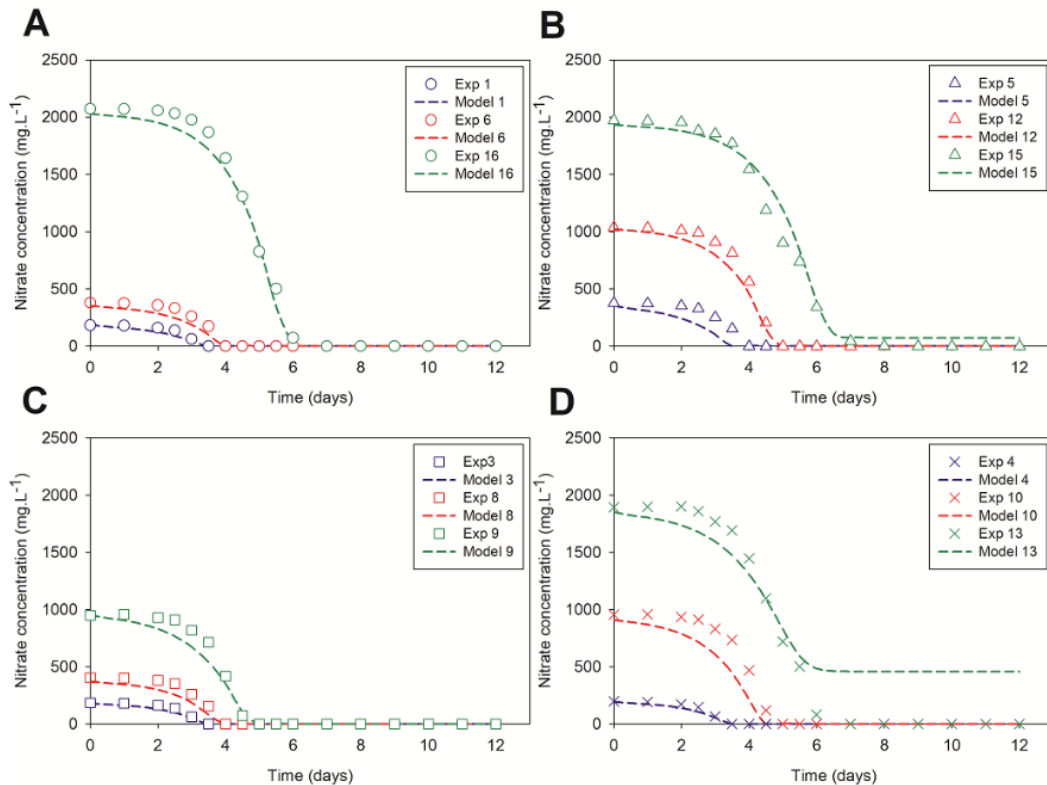
changes in the biomass, nitrogen internal quota, nitrate, phosphate, and glucose concentrations. The final parameters were determined through optimal fitting of the model to experimental data, resulting in a high degree of agreement. Simulation results in the utmost agreement with the experimental data are presented in Figures 4.1-4.5.

This investigation resulted in a notable three-fold increase in biomass concentrations, between a minimum value of approximately  $1.89 \text{ g.L}^{-1}$  (Figure 4.1C: experiment 3) and a maximum of around  $6.68 \text{ g.L}^{-1}$  (Figure 4.1B: experiment 12) observed at the end of the growth phase. This substantial variation allowed the proposed model, with its estimated parameter set  $\theta$ , to accurately capture the dynamics of cell density across a wide range of growth conditions. To the best of our knowledge, this study represents the first instance of utilizing the Taguchi experimental design approach to construct an efficient data set encompassing a broad spectrum of factors for mathematical modeling while using only a limited number of experiments. The relatively high coefficient of determination ( $R^2 > 0.90$ , except for experiment 9) indicates a robust fit between the proposed model and the experimental data, thereby demonstrating the capacity of the model to effectively describe the mixotrophic growth of *T. obliquus* within the scope of this investigation.



**Figure 4.1** Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for *T. obliquus*'s growth under mixotrophic conditions. Experimental results are represented by circles, triangles, squares, or thin X symbols. The dashed lines represent the fitted model equations proposed in this study. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial iron concentrations of 1, 2, 5, and 10 mg.L<sup>-1</sup>, respectively.

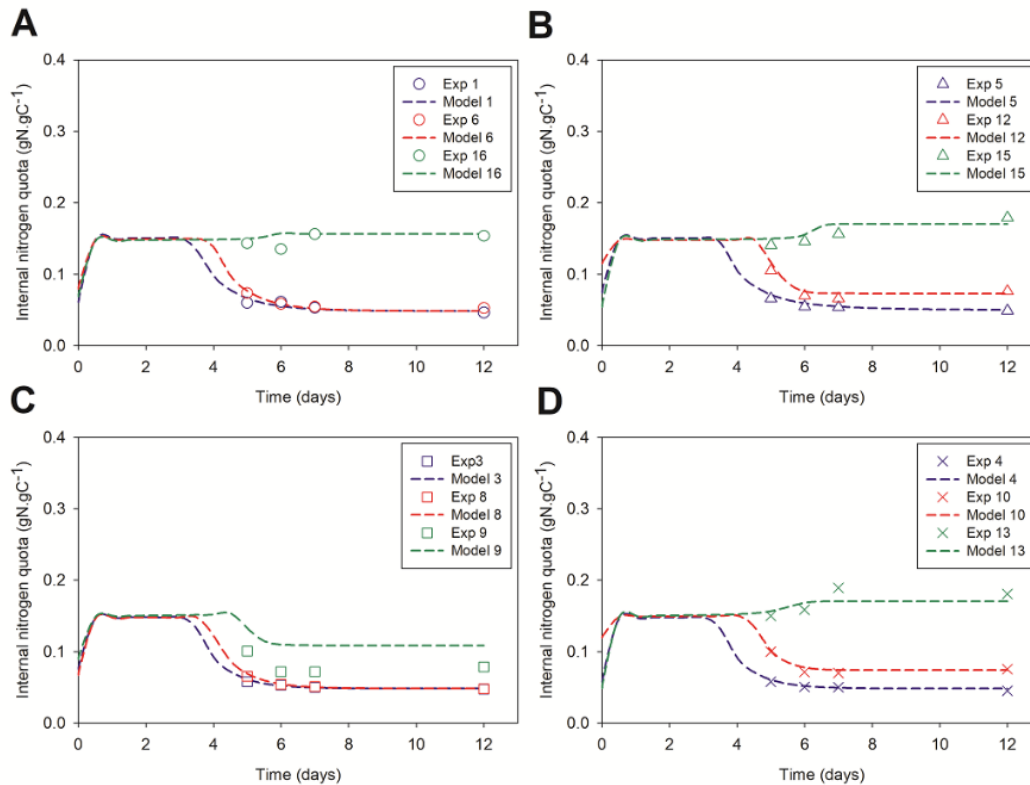
The simulated time course for the nitrate consumption demonstrated a high degree of agreement with the experimental data (Figure 4.2A-D) for almost all cases. The initial iron concentration increase seemed to slightly increase nitrate depletion from the culture medium. This phenomenon may be attributed to the high energetic cost and iron demand associated with nitrogen fixation (Larson *et al.*, 2018). On the other hand, microalgae continued to grow after nitrate exhaustion from the culture medium (Figure 4.1A-D), indicating a significant inner cell accumulation of nitrogen. Thus, the Droop model yields good trajectories ( $0.78 < R^2 < 0.99$ ) to describe the effect of nitrate on the mixotrophic growth of *T. obliquus*.



**Figure 4.2** Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for *T. obliquus*'s nitrate consumption under mixotrophic conditions. Experimental results are represented by circles, triangles, squares, or thin X symbols. The dashed lines represent the fitted model equations proposed in this study. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial iron concentrations of 1, 2, 5, and 10 mg.L<sup>-1</sup>, respectively.

Figure 4.3A-D showed a limitation in the proposed model's ability to accurately represent the internal nitrogen quota for some experimental datasets ( $R^2 < 0.45$  for experiments 1, 9, 13, and 16), possibly due to the high number of model parameters (9) in comparison to limited experimental data (4-point data per experiment) and challenges associated with measuring internal nitrogen quota (Deschênes & Vande Wouwer, 2016). A species' capacity to store internal nitrogen is the main determinant of the rate at which cells grow and is a key factor regarding nutrient competition outcomes (Malerba, Connolly, & Heimann, 2016). The cell nitrogen quota increases as nitrate is absorbed and decreases as nitrogen contributes to population growth (Malerba, Connolly, & Heimann, 2012). Our results reveal that nitrate with equivalent initial concentrations of 10× BBM (Figure 4.3:

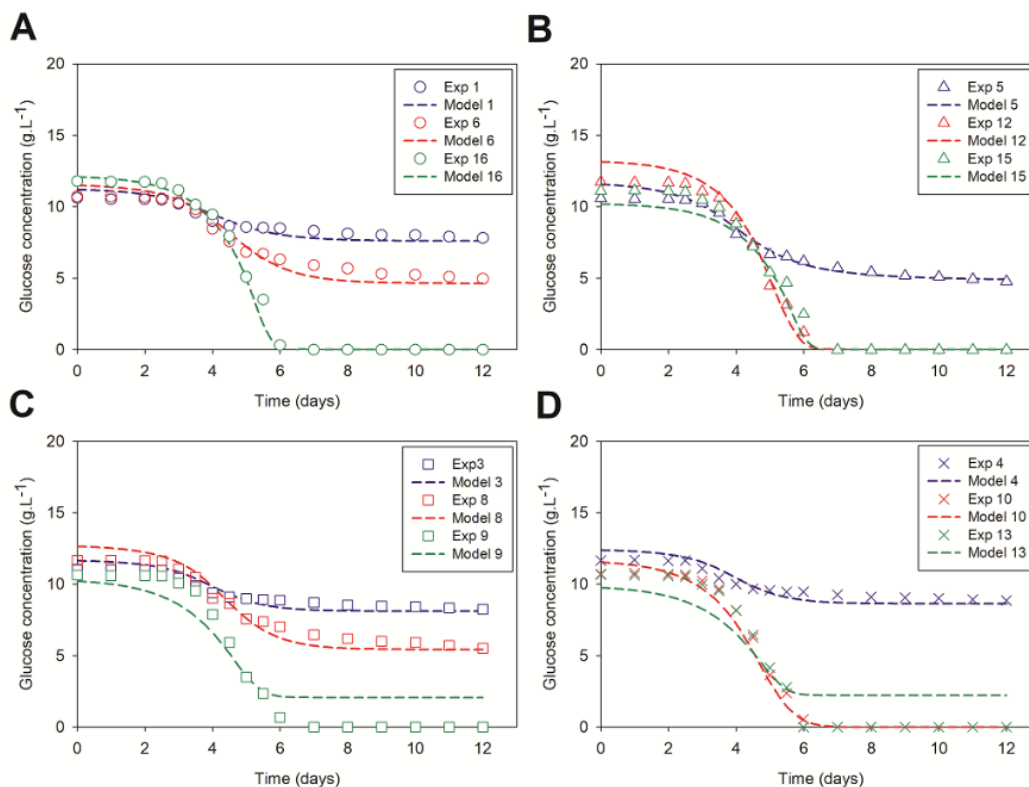
experiments 13, 15, and 16) was not fully depleted for microalgal growth, suggesting the presence of other limiting factors that prevent cells from uptaking the internal nitrogen for growth purposes.



**Figure 4.3** Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for *T. obliquus*'s internal nitrogen quota under mixotrophic conditions. Experimental results are represented by circles, triangles, squares, or thin X symbols. The dashed lines represent the fitted model equations proposed in this study. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial iron concentrations of 1, 2, 5, and 10 mg.L<sup>-1</sup>, respectively.

Regarding glucose consumption (Figure 4.4A-D), the proposed model agreed with the experimental data ( $0.82 < R^2 < 0.99$ ). The primary nutrients contributing to microalgae biomass production are carbon, nitrogen, and phosphorus, with an optimum balance close to the Redfield ratio (106:16:1) (Arbib *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2019). A culture medium with a C/N ratio of about 6.6 would provide optimal growth. The high C/N ratio (about 16.2 and 8.1 for initial nitrate concentration of 1× and 2× BBM, respectively) suggested a potential N limitation, which could explain why glucose was not totally

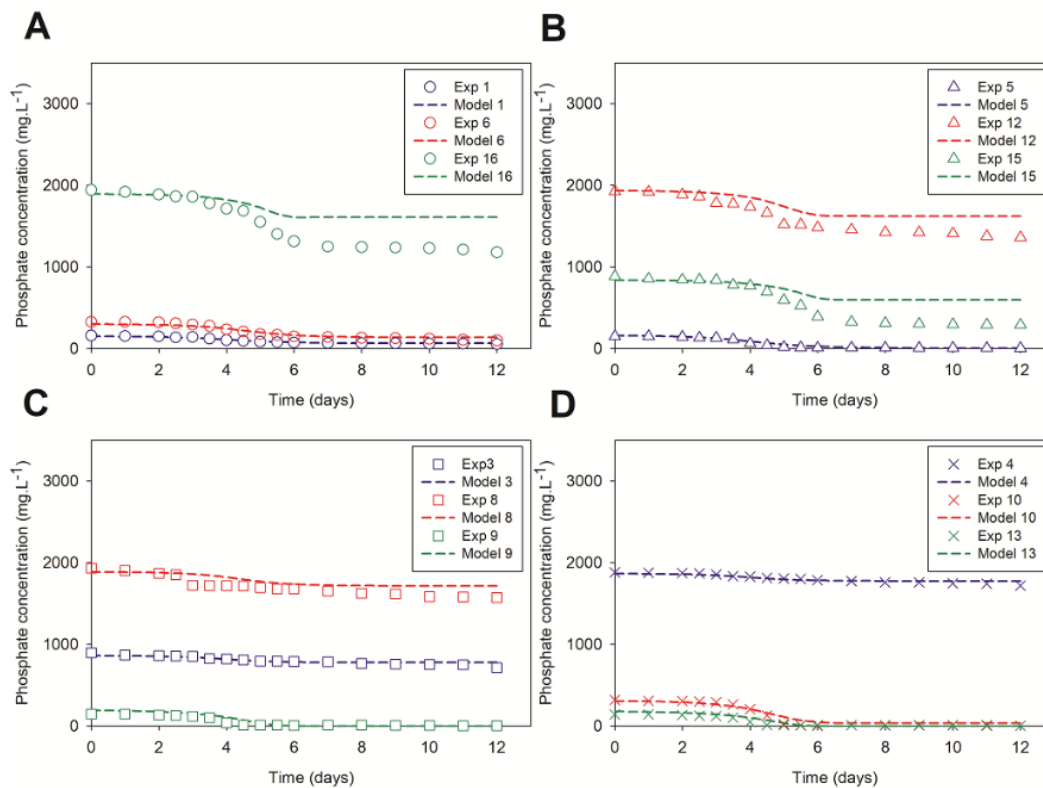
consumed in some cases (Figure 4.4: experiments 1, 3, 4, 5, 6 and 8). On the other hand, the low C/N ratio of about 1.6 (initial nitrate concentration of  $10\times$  BBM) indicated a potential C limitation (Figure 4.3: experiments 13, 15, and 16).



**Figure 4.4** Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for *T. obliquus*'s glucose consumption under mixotrophic conditions. Experimental results are represented by circles, triangles, squares, or thin X symbols. The dashed lines represent the fitted model equations proposed in this study. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial iron concentrations of 1, 2, 5, and 10 mg.L<sup>-1</sup>, respectively.

The model output accurately correlated with the experimental data describing phosphate consumption kinetics (Figure 4.5A-D) when using lower initial phosphate concentrations ( $1\times$  and  $2\times$  BBM). In these cases, correlation coefficients ( $R^2$ ) for the model fits were between 0.81 and 0.97. For higher initial phosphate concentrations ( $5\times$  and  $10\times$  BBM), a two- to three-fold enhancement in phosphate consumption per unit of biomass production (mgPO<sub>4</sub>.gX<sup>-1</sup>) was observed at the end of the experiment, which could be related to the “luxury” or storage uptake mechanism. This phenomenon occurs when

phosphorus uptake is faster than what is required for immediate growth, thereby decoupling growth rate from P uptake (Singh, Nedbal, & Ebenhöf, 2018). Intracellularly stored polyphosphate, which can be used later, is produced as a result of the excess accumulated P (Tramontin *et al.*, 2018). *T. obliquus*, like other microalgae, can grow at the expense of its internal P reserves (Martínez *et al.*, 1999). Polyphosphate accumulation also increases according to increasing phosphate concentration (Powell *et al.*, 2009). The Monod equation's inability to adequately describe this phenomenon could explain the model's limitation in yielding good fit data for phosphate uptake ( $R^2 < 0.5$ ) under high initial phosphate conditions (experiments 12, 15, and 16). The Droop equation could be more suitable to describe the relationship between the growth rate and the intracellular phosphorus content.



**Figure 4.5** Data fit by the mathematical model and comparison with experimental data for *T. obliquus*'s phosphate consumption under mixotrophic conditions. Experimental results are represented by circles, triangles, squares, or thin X symbols. The dashed lines represent



the fitted model equations proposed in this study. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial iron concentrations of 1, 2, 5, and 10 mg.L<sup>-1</sup>, respectively.

Table 4.2 presented the parameter estimation results for all nine (9) model parameters with their respective confidence intervals (95% CI) and relative errors (or the coefficient of variation  $c_v$ ). Interestingly, the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) of *T. obliquus* under mixotrophic conditions was determined to be 1.45 day<sup>-1</sup>, demonstrating a similarity to the specific growth rates reported for this species under photoautotrophic (1.47 day<sup>-1</sup>) and heterotrophic (1.8 day<sup>-1</sup>) cultivation conditions (Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Di Caprio *et al.*, 2019). The precision of the parameter estimators was quantified by interpreting the parameter values' precision as the range in which the estimated values of the parameters are likely to lie in the confidence interval 95 times out of 100. A sizeable confidence interval compared to the approximated values suggests an identifiability or ill-conditioning problem, while a low confidence interval indicates minimal effects of the parameter estimation errors on the model outputs and consequent greater model credibility (Sin & Gernaey, 2016). The represented confidence intervals showed relatively low values, implying a reliable estimation of the proposed parameters. The parameter values (Table 4.2) were within the range reported in the literature (Arbib *et al.*, 2013; Deschênes, 2016; Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Di Caprio *et al.*, 2019). Another tool regarding the estimated parameters' accuracy is determining their relative error,  $c_v$  (the ratio of standard deviation to the optimal parameter value). A relative error higher than 50% is usually an indicator of poor estimation quality, while a relative error below 10% represents good parameter estimation quality (Sin & Gernaey, 2016). The findings demonstrate precise estimates of *T. obliquus*'s growth under mixotrophic conditions, with relative errors of less than 5% for all nine parameters. Importantly, the estimated parameters were found to be highly consistent across different cultivation conditions, indicating the model's broad applicability. These results provide robust evidence of the accuracy and reliability of the model.

**Table 4.2** Results of the proposed model’s parameter estimation and quantification of the uncertainty associated with the parameter estimators. 95% confidence interval, coefficient of variation.

Parameter	Units	Estimate	95% CI	$c_v$ (%)
$\mu_{max}$	day <sup>-1</sup>	1.451	0.028	0.981
$\rho_{max}$	gN.gC <sup>-1</sup> .day <sup>-1</sup>	0.994	0.018	0.909
$Q_{max}$	gN.gC <sup>-1</sup>	0.170	0.005	1.512
$Q_{min}$	gN.gC <sup>-1</sup>	0.048	0.001	1.279
$K_N$	mg nitrate.L <sup>-1</sup>	0.681	0.052	3.914
$K_P$	mg phosphate.L <sup>-1</sup>	25.408	1.162	2.333
$\frac{1}{Y_{X/P}}$	g phosphate.gC <sup>-1</sup>	0.098	0.007	3.703
$K_G$	g glucose.L <sup>-1</sup>	1.049	0.012	0.584
$\frac{1}{Y_{X/G}}$	g glucose.gC <sup>-1</sup>	4.142	0.010	0.127

### 4.3.2 Model validation

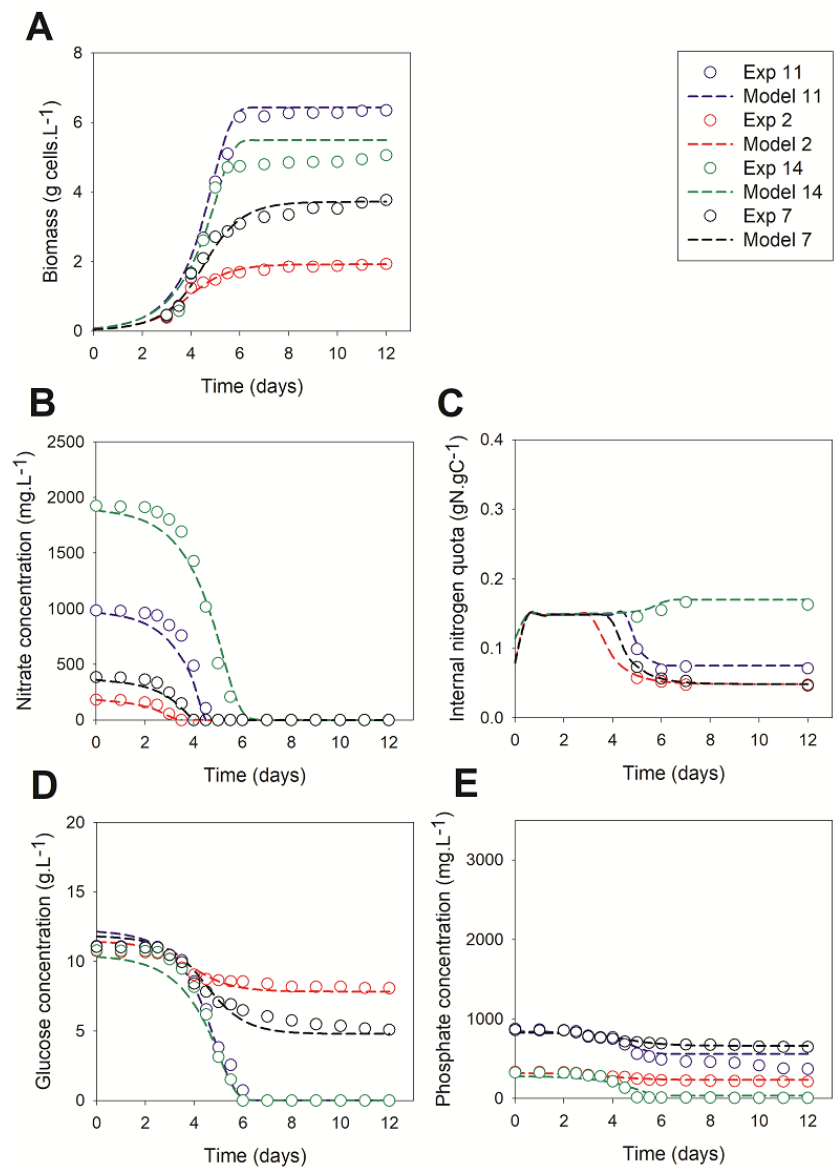
As mentioned in section 4.3.1, the data from the 2<sup>nd</sup>, 7<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> Taguchi experiments were excluded from model training and parameter estimation and were instead reserved for model validation. These experiments featured varied initial nutrient conditions, including different combinations of nitrate, phosphate, and iron. By using experimental datasets that covered all four nutrient concentration levels, the estimated parameter set (Table 4.2) was validated, thus demonstrating the model’s ability to reproduce other experiments. The high correlation coefficients ( $0.85 < R^2 < 0.99$ ) between the predicted and experimental data (Table 4.3) validate the model’s performance. Additionally, Figure 4.6A-E depicts the model’s predictive ability, demonstrating good agreement between model predictions and experimental results in most cases. The choice of objective functions and constraints determine the prediction accuracy of such a model (Ryu *et al.*, 2018).

However, the  $R^2$  values for the prediction of the internal nitrogen quota (Figure 4.6C) were relatively low, potentially due to the limited information on internal nitrogen accumulation in the training data or the potential for human error in the experimental steps needed to obtain the data. On the other hand, predictions on phosphate uptake (Figure 4.6E) exhibited relatively high correlation coefficients ( $0.77 < R^2 < 0.92$ ).

In general, the validation results indicate that the proposed model is capable of accurately describing the relationship between estimated parameters and state variables within the range of variables reported in Tables 4.1 and 4.2. Therefore, the proposed model equations are deemed suitable for model-based control strategies. The findings suggest that increasing the initial iron concentration should be inconsequential to the parameters.

**Table 4.3** Correlation coefficient ( $R^2$ ) between the predicted data from the proposed model and the experimental data used for validation.

Validation experiment	Correlation coefficient ( $R^2$ )				
	Biomass	Nitrate	Internal quota	Glucose	Phosphate
2	0.97	0.96	0.81	0.99	0.77
7	0.97	0.94	0.72	0.85	0.90
11	0.90	0.98	0.08	0.97	0.89
14	0.96	0.96	0.97	0.94	0.92



**Figure 4.6** Comparison of model prediction (dashed lines) with validation experiments (circles). (A), (B), (C), (D), and (E) correspond to *T. obliquus*'s growth, nitrate consumption, internal nitrogen quota, glucose consumption, and phosphate consumption, respectively, under mixotrophic conditions.

### 4.3.3 Challenges and possible extensions

The present study proposes a multiplicative model that considers three essential factors, namely nitrate, phosphate, and glucose, to describe the growth of *T. obliquus* under

mixotrophic conditions. Taguchi's experimental approach was also used to account for the effect of a fourth factor, iron, which was shown to have little effect within the experimental conditions tested. Further research could be done to incorporate the effect of other critical factors. Notably, integrating light is significant and challenging due to its direct impact on the mass cultivation of microalgae (Lee *et al.*, 2015). Numerous models (Bernard, Masci, & Sciandra, 2009; Quinn, de Winter, & Bradley, 2011; Yuan *et al.*, 2014; Deschênes & Vande Wouwer, 2016), described the influence of light attenuation in dense cultures due to self-shading and pigment absorption. Model extensions, manifested by parameters including light distribution, may be necessary to describe this phenomenon.

On the other hand, adding more factors can be challenging due to the difficulty of simulating co-limitation conditions for multi-factor models. Overfitting is a common problem when developing such models as many parameters require fitting with experimental data (Lee *et al.*, 2015). As a result, these models can be too specific or sensitive to the dataset applied during their development, and their predictive power is often questionable (Lee *et al.*, 2015).

Another aspect of modeling the nutrients' effects is quantifying the energy required for maintenance. Besides their utilization in biomass production (growth-associated maintenance), some nutrients may instead divert towards maintaining microalgal cells (non-growth-associated maintenance), representing the energy involved in respiration, cell turnover and repair, and homeostatic maintenance (Barbera *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019). It is possible to modify substrate uptake kinetics to include a maintenance coefficient term in the model to consider this additional role. This coefficient, incorporated in the differential equations of nitrate (Singh *et al.*, 2019), and glucose (Palabhanvi *et al.*, 2014), predicts *T. obliquus* and *Chlorella* species' growths, respectively. The literature reports that *T. obliquus* possesses one of the lowest maintenance energy rates for microalgae (León-Saiki *et al.*, 2018). However, the required maintenance energy depends on the biomass concentration and tends to increase accordingly (Janssen *et al.*, 2018).

Alternatively, it may be feasible to refine this model for a more precise prediction of phosphate consumption rate by incorporating a Droop model to characterize the kinetics of phosphate uptake. In comparison to the Monod model, the Droop model has been shown to offer superior outcomes concerning the association between the phosphorus cell quota and growth rate of *Scenedesmus* and *Chlorella* species under continuous cultures (Grover, 1991). However, a Droop model could result in additional complexity, necessitating the inclusion of additional parameters and experimental challenges for obtaining an adequate measure of the phosphorus quota, could render the model parameter estimation process more difficult (Lee *et al.*, 2015).

#### **4.4 CONCLUSIONS**

A multi-nutrient mathematical model describing the growth kinetics of *T. obliquus* microalgae under mixotrophic conditions was developed using experimental data from Taguchi's L16 orthogonal array. Results showed a good fit to the experimental data, with relatively high  $R^2$  values. The low confidence interval and relative error values suggest the estimated parameters' reliability. Agreement between model validation results and the measured data suggests that the proposed model may eventually serve a purpose in process control. Future work can extend the model by considering Droop's cell quota equation for phosphate uptake, effect of light attenuation in dense cultures, and required maintenance energy.

#### **4.5 ACKNOWLEDGMENTS**

This work received financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada under grant number RGPIN-2017-06202 and the Institute for Nutrition and Functional Foods under grant number FRQNT-203315, which the authors gratefully acknowledge.

**CHAPITRE 5**  
**UN MODÈLE CINÉTIQUE ROBUSTE À PLUSIEURS**  
**FACTEURS/NUTRIMENTS POUR AMÉLIORER LES RENDEMENTS EN**  
**LUTÉINE ET EN BIOMASSE LORS DE LA CULTURE MIXOTROPHE DE**  
**MICROALGUES - UNE ÉTAPE VERS DES PRODUCTIONS RÉUSSIES À**  
**GRANDE ÉCHELLE**

**Titre en français du quatrième article :**

Un modèle cinétique robuste à plusieurs facteurs/nutriments pour améliorer les rendements en lutéine et en biomasse lors de la culture mixotrophe de microalgues - Une étape vers des productions réussies à grande échelle.

**Titre original (en anglais) :**

A robust multi-nutrient kinetic model for enhanced lutein and biomass yields in mixotrophic microalgae cultivation – A step towards successful large-scale productions.

**Auteurs et affiliation :**

Jihed Bentahar : Étudiant au doctorat, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

Jean-Sébastien Deschênes : Professeur, Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada.

**État de l'article :**

Version finale soumise le 2 octobre 2023 (en cours de révision).

**Revue :**

Biotechnology and Bioengineering.

**Contribution au document :**

Cet article présente les résultats du développement d'un modèle cinétique multifactoriel assez complexe qui caractérise l'impact de 3 nutriments critiques (nitrate, phosphate et glucose) sur la croissance et la production de lutéine des microalgues *T. obliquus* en flacons agités. Les résultats peuvent servir de guide pour d'autres espèces de microalgues, ainsi que pour développer des stratégies d'opération en temps réel pour les photobioréacteurs grâce à des simulations et des validations expérimentales.

**Résumé en français du quatrième article :**

La culture mixotrophe présente un grand potentiel pour la production accrue de biomasse et la synthèse de métabolites précieux à partir de microalgues. Cette étude introduit un modèle cinétique polyvalent englobant les facteurs les plus influents, en mettant l'accent sur la production de lutéine, un bioproduit très recherché. Cette étude, la plus approfondie à ce jour, intègre un modèle cinétique robuste à plusieurs facteurs/nutriments pour la microalgue *Tetrademus obliquus* en régime mixotrophe, couvrant diverses conditions nutritionnelles. Les nutriments cruciaux régissant le modèle comprennent le nitrate, le phosphate et le glucose. En utilisant 7 variables d'état et 13 paramètres inconnus, la précision du modèle a été assurée grâce à une configuration expérimentale bien conçue à 2 facteurs et 4 niveaux, fournissant amplement des données pour une calibration et une validation fiables. Les résultats montrent une grande précision dans la prédiction des profils de concentration dynamiques pour toutes les expériences de validation, révélant une applicabilité étendue. L'optimisation de la disponibilité en azote a conduit à des augmentations significatives des productions de biomasse (jusqu'à 4 fois) et de lutéine (jusqu'à 12 fois), avec des concentrations maximales respectivement de 6,80 g.L<sup>-1</sup> et de 25,58 mg.L<sup>-1</sup>. Il convient de noter que le modèle présente un taux de croissance spécifique maximal de 4,03 jour<sup>-1</sup>, dépassant les valeurs rapportées pour les conditions photoautotrophes et hétérotrophes, suggérant des effets synergiques. Le modèle développé est applicable à diverses espèces de



microalgues et les résultats sont prêts pour une production à grande échelle. Des travaux futurs se concentreront sur l'exploitation de ces résultats pour développer des stratégies de fonctionnement des photobioréacteurs en temps réel.

# A robust multi-nutrient kinetic model for enhanced lutein and biomass yield in mixotrophic microalgae cultivation – A step towards successful large-scale productions

**Jihed Bentahar**<sup>1,2,\*</sup> . **Jean-Sébastien Deschênes**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Département de mathématiques, d'informatique et de génie, Collectif de recherche appliquée aux bioprocédés et à la chimie de l'environnement (CRABE), Université du Québec à Rimouski, 300, Allée des Ursulines, Rimouski, Québec G5L 3A1, Canada.

<sup>2</sup> Département des sciences des aliments, Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425, rue de l'Agriculture, Québec, Québec G1V 0A6, Canada.

\* Corresponding author. E-mail address: jihed.bentahar2@uqar.ca

## ABSTRACT

Mixotrophic cultivation holds great promise for enhanced biomass production and valuable metabolite synthesis from microalgae. This study introduces a versatile kinetic model encompassing the most influential factors, while emphasizing on lutein production, a highly sought-after bioproduct. This most extensive study to date incorporates multi-nutrient kinetics for *Tetrademus obliquus* in mixotrophic regime, covering various nutritional conditions. Crucial nutrients governing the model include nitrate, phosphate, and glucose. Using 7 state variables and 13 unknown parameters, the model's accuracy was ensured through a well-designed 2-factor, 4-level experimental setup, providing ample data for reliable calibration and validation. Results show high accuracy in predicting dynamic concentration profiles for all validation experiments, revealing wide applicability.

Optimizing nitrogen availability led to significant increases in biomass (up to 4-fold) and lutein production (up to 12-fold), with observed maximum biomass concentration of 6.80 g.L<sup>-1</sup> and lutein reaching 25.58 mg.L<sup>-1</sup>. Noticeably, the model exhibits a maximum specific growth rate of 4.03 day<sup>-1</sup>, surpassing reported values for photoautotrophic and heterotrophic conditions, suggesting synergistic effects. Valuable guidance is provided for applying the method to various microalgal species and results are large-scale production-ready. Future work will focus on exploiting these results for developing real-time photobioreactor operation strategies.

**Keywords:** Microalgae, Multi-nutrient kinetic model, Mixotrophic conditions, Lutein production, Biomass production.

## 5.1 INTRODUCTION

Unlocking the potential of microalgae as a revolutionary source of lutein (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>), a highly coveted carotenoid compound, has recently garnered significant attention due to their remarkable lutein content, surpassing actual commercial sources (*e.g.* marigold flowers), and offering unique advantages, including year-round availability, reduced land and water requirements, and simplified extraction and purification processes (Guedes, Amaro, & Malcata, 2011; Chen *et al.*, 2019a). The rising interest in this avenue stems from the versatile industrial applications of lutein as a natural colorant (E161b) in various sectors, including food, animal tissues, drugs, and cosmetics (del Rio-Chanona *et al.*, 2017). Furthermore, lutein's appeal is enhanced by its well-documented antioxidant and anti-inflammatory properties, establishing it as a valuable bioproduct with a high market demand. Notably, the lutein market in the United States was valued at USD 135 million in 2015 and is projected to grow by 6% until 2024, while the European Union's market is forecasted to nearly double from EUR 255 million in 2020 to EUR 409 million by 2027 (Chen *et al.*, 2019a; Saha, Ermis, & Murray, 2020).

The primary challenge in harnessing microalgae for lutein production lies in the yet limited biomass and lutein yields. Despite successful commercial production of other

valuable carotenoids from certain microalgal species, microalgal lutein production remains largely untapped (Saha *et al.*, 2020). Overcoming this challenge thus becomes imperative for achieving commercial viability. A recent review by Zheng *et al.* (2022), emphasizes the urgent need to identify high-yielding microalgal strains, characterized by a minimum lutein content of 5-10 g.kg<sup>-1</sup>, while simultaneously achieving remarkable biomass productivity. Therefore, optimizing cultivation conditions to enhance the co-production of biomass and lutein emerges as an indispensable step towards economic feasibility and the establishment of a commercially viable process.

This study proposes a promising solution that relies on a dual-pronged approach, combining mixotrophic cultivation and mathematical modeling to optimize cultivation conditions and enhance the co-production of biomass and lutein. Mixotrophic cultivation, which utilizes both light and organic carbon as energy sources, has demonstrated its superiority over traditional photoautotrophic and heterotrophic methods, resulting in higher biomass productivities, growth rates, and cell densities (Yang *et al.*, 2014). Additionally, mixotrophic conditions have been associated with highest lutein production, as its synthesis positively correlates with growth (Zheng *et al.*, 2022). On the other hand, mathematical modeling offers a robust engineering solution to comprehend the intricate responses of microalgae to their growing environment, ultimately increasing the economic viability and sustainability of microalgal systems (Bekirogullari *et al.*, 2020).

The freshwater microalga *Tetradesmus obliquus* stands out as a compelling candidate for this study due to its proficient adaptability to mixotrophic conditions and its high lutein content (Oliveira *et al.*, 2021). However, realizing the full potential of mixotrophic cultivation for optimal biomass and lutein production requires precise control of cultivation factors such as nutrient availability, which entails the development of a robust multifactorial kinetic model. In a previous study (Bentahar & Deschênes, 2022a), significant progress was achieved in optimizing key nutrients, resulting in a notable increase in *T. obliquus* biomass, reaching levels of up to 8 g.L<sup>-1</sup> within a 6-day period. Following this, a reliable multi-nutrient model ( $0.77 < R^2 < 0.99$ ), tailored for high-yield biomass production of *T. obliquus* under mixotrophic conditions was successfully

developed (Bentahar & Deschênes, 2023). The current study aims to further refine this model by incorporating lutein, a valuable bioproduct derived from this microalga. This research represents an important step forward, seeking to create a robust multi-nutrient kinetic model that comprehensively accounts for both biomass and lutein production in the microalgal cultivation process. By integrating these components, the goal is to enhance predictive capabilities and optimize productivity across a wide range of conditions.

The paper is organized as follows: first, a mathematical model was constructed for the growth kinetics and lutein production of *T. obliquus* under mixotrophic conditions by combining the Monod, Droop and Luedeking-Piret kinetic equations. The entire model includes 7 state variables and 13 unknown parameters to be estimated. Secondly, a unique experimental design, utilizing a 2-factor, 4-level design of experiments ( $4^2$ ) with 16 trials and a 10-fold variation in nitrate and phosphate concentrations, was employed to gather a comprehensive dataset for model calibration and validation. This experimental design provides a thorough understanding of the effects of nutrient variations on the growth and lutein production. Thirdly, the model's parameters were accurately estimated using a combination of Nelder-Mead and Levenberg-Marquardt methods, ensuring the model's reliability. Finally, the model's ability to predict and reproduce experimental data under various nutrient regimes was validated, confirming its utility as a powerful tool for optimizing and predicting mixotrophic microalgal cultivation of *T. obliquus* and potentially other microalgae species.

## **5.2 MATERIAL AND METHODS**

### **5.2.1 Microalgae, media and cultivation conditions**

The microalga *T. obliquus* strain was obtained from the Canadian Phycological Culture Center (CPCC) at the University of Waterloo (Ontario, Canada). The medium used for cultivation was a modified version of Bold's Basal Medium (BBM), adjusted to an initial pH of 6.8 (Stein, 1973). In the mixotrophic mode, the medium was supplemented with pure glucose at a concentration of  $10 \text{ g.L}^{-1}$  as the sole organic carbon source. The experimental

design involved the variation of concentrations for two key components of BBM (*i.e.* nitrate and phosphate). The other BBM components (Table 5.1) were initially set at their optimum concentrations as proposed by Bentahar & Deschênes (2022a). All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, USA and culture media were sterilized at 121°C for 20 min prior to use.

**Table 5.1** Composition of modified Bold’s Basal Medium (BBM) used for *Tetradesmus obliquus* mixotrophic growth, omitting nitrate and phosphate.

Nutrients	Concentrations	BBM’s equivalent concentrations
Glucose (g.L <sup>-1</sup> )	10.00	-
Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	309.89	10×
Chloride (Cl <sup>-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	122.40	5×
Magnesium (Mg <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	37.06	5×
Calcium (Ca <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	6.82	1×
Iron (Fe <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	10.00	10×
Boron (BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	10.38	1×
Manganese (Mn <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	0.50	1×
Zinc (Zn <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	0.05	1×
Molybdate (MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	0.26	1×
Copper (Cu <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	0.02	1×
Cobalt (Co <sup>2+</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	0.01	1×

Batch mixotrophic cultivations were performed in 1 L Erlenmeyer flasks containing 600 mL of medium (working volume) in a Multitron II incubator shaker (INFORS HT, Switzerland). All manipulations were conducted under sterile conditions in a laminar flow biological hood. The cultivation conditions were maintained as follows: inoculation at 1×10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> (day 0), temperature of 21 °C, pH maintained at 7.20 using a 50 mM Tris-HCl buffer, continuous orbital agitation of 120 rpm, constant light intensity of 100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> and input CO<sub>2</sub> concentration of 1%. An overview of the systems is given in Figure 5.1.



**Figure 5.1** Batch cultivation experiments of *Tetradismus obliquus* microalgae under mixotrophic conditions.

### 5.2.2 Experimental design

The experimental design for this study aimed to investigate the effects of varying nitrate and phosphate concentrations on the biomass and lutein production of the microalga *T. obliquus* under mixotrophic conditions. A 16-run experimental design utilizing a two-factor, four-level design ( $2^4$ ) was applied, with nitrate and phosphate concentrations set at four levels each, equivalent to 1×, 2×, 5×, and 10× BBM as shown in Table 5.2 and Table 5.3. This resulted in 16 unique combinations of culture media, enabling an examination of the impact of a 10-fold change in these two factors on the model parameters. While glucose was not varied as a factor in the experimental design, it was later incorporated as a state variable along with nitrate and phosphate to develop the mathematical model of biomass and lutein production. Each case was conducted in duplicate ( $n = 2$ ) to ensure the accuracy of the experimental data. Cultures were sampled twice a day during the growth phase and daily during the other phases over a period of 12 days, and analyzed using a variety of techniques, including ionic analysis, high-performance liquid chromatography (HPLC), and

elemental analysis (C:H:N) to acquire the necessary data for model development and validation. Culture samples were centrifuged for 6 min at 3400 g to separate the cells from the supernatant, with the cell pellets used to determine biomass concentration, internal nitrogen and phosphorus cell quotas, and lutein content, while the supernatant was kept for the measurement of glucose, nitrate, and phosphate concentrations.

**Table 5.2** Selected factors and their corresponding level settings.

<b>Factor/Nutrient</b>	<b>Level 1</b>	<b>Level 2</b>	<b>Level 3</b>	<b>Level 4</b>
Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	182.4	364.8	912	1824
Phosphate (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	163.05	326.1	815.25	1630.5

the four levels correspond to equivalent concentrations of 1×, 2×, 5×, and 10× BBM, respectively for each selected factor.



**Table 5.3** Two-factor, four-level design of experiments ( $2^4$ ) with 16 trials,  $n = 2$ .

Experimental runs	Level of factors (nutrients)	
	Nitrate	Phosphate
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4*	1	4
5	2	1
6*	2	2
7	2	3
8	2	4
9*	3	1
10	3	2
11	3	3
12	3	4
13	4	1
14	4	2
15*	4	3
16	4	4

\* denotes the experiments utilized for model validation.

### 5.2.3 Analytical methods

In order to determine the biomass concentration, samples were washed twice with deionized water to remove excess salts, frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 24 hours, and lyophilized over 72 hours at  $-46^{\circ}\text{C}$  using a FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer. The dried cell weight was then measured using a VWR analytical balance ( $\pm 0.1\text{ mg}$ ) to obtain the biomass concentration ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The initial inoculation of cells (day 0) was manually counted using a hemacytometer (LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA).

The internal nitrogen quota of the lyophilized cells was quantitatively determined using a CHN elemental analyzer (COSTECH ECS 4010; Costech Analytical Technology)

in conjunction with a zero blank autosampler and a reactor that converts the sample C and N to CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>, respectively. A standard calibration was established using acetanilide as a reference compound. The internal phosphorus quota of the algal cells was not measured directly, but rather inferred based on the increment of algal biomass dry weight and the consumption of phosphate. In accordance with mass balance principles in the cultivation system, the intracellular phosphorus content of algal cells was calculated as the ratio of phosphate uptake to the increment of algal biomass dry weight (Wu *et al.*, 2013).

The algal pigments were extracted in 95% methanol, lysed by sonication (QSonica, Model Q125, 100W) for 4 × 5 s on ice and centrifuged in an Eppendorf centrifuge (5430R, Eppendorf, USA) at 6500 rpm for 5 min at 4°C. Extracts were filtered through a 0.2 µm polytetrafluoroethylene syringe filter and poured in an autosampler vial which was gently sparged with argon to limit oxidation. An Agilent 1200 series HPLC unit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with a TSP UV 6000 LP diode-array absorbance detector (400 to 700 nm) and a Symmetry C8 column (150 × 4.6 mm, 3.5 µm particle size; Waters Corporation) was used for pigment separation as described in Zapata *et al.* (2000). Lutein was detected and quantified based on retention time and spectral properties of external pigment standards.

Measurement of the main anions (nitrate and phosphate) were determined by ion chromatography (Dionex Integrion RFIC, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) equipped with an automated sampler (Dionex AS-AP Autosampler, Thermo Scientific). Separation and quantification were carried out using a Dionex IonPac AG18 (4 × 50 mm) guard column with a Dionex IonPac AS18 (4 × 250 mm) analytical column and a DRS Dionex ADRS 600 (4 mm) suppressor. The elution was obtained by isocratic method at 30 mmol.L<sup>-1</sup> of KOH for 17 min. The flow rate was 1 mL.min<sup>-1</sup>, the sample injection volume was fixed at 12.5 µL and Chromeleon 7.2 SR5 software was used for data acquisition. The calibration was performed on standard solutions (all from Sigma-Aldrich) prepared in the concentration range of the samples to be analyzed.

The glucose concentrations in the supernatants were measured with an Agilent 1100 Infinity HPLC instrument. The HPLC was equipped with a Waters Sugar-Pak column (6.5 mm x 300 mm) and a refractive index detector (RID) was used. The column was maintained at a temperature of 90 °C and the mobile phase consisted of 50 ppm EDTA (in Milli-Q water) with a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. Samples were filtered through 0.45 µm nylon syringe filters prior to injection and the run time was 30 minutes. The calibration was performed using a range of standard solutions (from Sigma-Aldrich).

#### **5.2.4 Model construction methodology**

In constructing the kinetic model for simulating the performance of green algal lutein production, it was essential to consider the underlying biochemical kinetics of the system. Multiple-substrate models are preferred over single-substrate models for modeling growth processes as they provide a better understanding of the simultaneous limiting effects of various substrates and are applicable for a wide range of media compositions and environmental conditions (Lee *et al.*, 2015). Our previous research (Bentahar & Deschênes, 2022a, 2023), has identified culture nitrate, glucose, and phosphate concentrations as the key factors influencing biomass synthesis. Lutein productivity is closely correlated with biomass productivity (Henríquez *et al.*, 2016), and thus, the availability of these three nutrients was incorporated into the model. The multiplicative method, which postulates that all nutrients contribute equally to biomass and lutein production, was employed in developing the multifactorial model for mixotrophic *T. obliquus*. However, multifactorial models can present challenges in terms of parameter identification and estimation, as highlighted in previous studies (Zhang, Shi, & Chen, 1999a; Darvehei *et al.*, 2018). Despite these difficulties, this study aimed to provide valuable insights for optimizing and controlling biomass and lutein production by *T. obliquus*.

In this regard, the Droop model (Droop, 1968) was employed to describe the storage of nitrogen and phosphorus in the form of internal quotas before their effective use for growth. This approach was supported by previous research (Wu *et al.*, 2013; Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Bentahar & Deschênes, 2023) which found that *T. obliquus*

microalgal cells can still grow using intracellular nitrogen and phosphorus when external sources are exhausted. The nitrogen and phosphorus uptake rates, denoted as  $\rho(N, q_N)$  and  $\rho(P, q_P)$  respectively, were expressed using Michaelis-Menten kinetics adapted to the maximum level of the intracellular content as shown in Bernard (2011). The equations, presented in Equation 5.1 and Equation 5.2 respectively, consider the availability of the medium and the internal quotas, providing a comprehensive approach for modeling the growth of *T. obliquus* under mixotrophic conditions.

$$\rho(N, q_N) = \rho_{Nmax} \frac{N}{K_{sN} + N} \left(1 - \frac{q_N}{Q_{Nmax}}\right) \quad (5.1)$$

$$\rho(P, q_P) = \rho_{Pmax} \frac{P}{K_{sP} + P} \left(1 - \frac{q_P}{Q_{Pmax}}\right) \quad (5.2)$$

where  $N$  (mg nitrate.L<sup>-1</sup>) and  $P$  (mg phosphate.L<sup>-1</sup>) are the nitrate and phosphate concentrations in the medium as the sole nitrogen and phosphorus sources, respectively;  $q_N$  (gN.gC<sup>-1</sup>) and  $q_P$  (gP.gC<sup>-1</sup>) are the internal nitrogen and phosphorus quotas.  $\rho_{Nmax}$  (gN.gC<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>) and  $\rho_{Pmax}$  (gP.gC<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>) represent the maximum nitrogen uptake rates;  $Q_{Nmax}$  (gN.gC<sup>-1</sup>) and  $Q_{Pmax}$  (gP.gC<sup>-1</sup>) are the maximum quotas for nitrogen and phosphorus, above which nutrient uptake stops; and  $K_{sN}$  (mg nitrate.L<sup>-1</sup>) and  $K_{sP}$  (mg phosphate.L<sup>-1</sup>) represent the half-saturation constants for nitrate and phosphate, respectively.

In addition to the Droop model, the classical Monod model (Monod, 1949) was employed to describe the effect of glucose on *T. obliquus* growth. This model, which relates the growth rate to substrate concentration, is a simple and widely used approach in the literature (Ross & Pott, 2022). The yield coefficient of glucose on cells, represented by  $K_G$  (g glucose.gC<sup>-1</sup>), was used to construct the model. The interaction between the Monod and Droop kinetics, using the multiplication method, represents the mixotrophic growth rate of *T. obliquus* (Equation 5.3).

$$\mu(q_N, q_P, G) = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_{Nmin}}{q_N}\right) \left(1 - \frac{Q_{Pmin}}{q_P}\right) \left(\frac{G}{K_{sG} + G}\right) \quad (5.3)$$

In this equation, the maximum mixotrophic growth rate is represented by  $\mu_{max}$  ( $\text{day}^{-1}$ ). The variables  $G$  ( $\text{g glucose.L}^{-1}$ ) and  $K_{sG}$  ( $\text{g glucose.L}^{-1}$ ) represent the concentration of glucose, the sole organic carbon source, and the half-saturation constant for glucose uptake respectively. The minimum quotas of nitrogen and phosphorus, below which growth cannot occur, are represented by  $Q_{Nmin}$  ( $\text{gN.gC}^{-1}$ ) and  $Q_{Pmin}$  ( $\text{gP.gC}^{-1}$ ).

In order to account for lutein production, a separate state variable was incorporated into the model. This approach is consistent with previous studies (Zhang *et al.*, 1999a; Wu, Shi, & Shi, 2007), which used the Luedeking-Piret kinetic model (Luedeking & Piret, 1959) to describe substrate consumption by microalgae under heterotrophic conditions. This model describes the lutein formation rate of cells as a combination of a growth-associated constant  $\alpha$  ( $\text{mg lutein.g cells}^{-1}$ ) and a non-growth associated constant  $\beta$  ( $\text{mg lutein.g cells}^{-1}.\text{day}^{-1}$ ).  $\alpha$  represents the instantaneous yield of lutein formation due to cell growth, while  $\beta$  represents the specific rate of product formation. By using this model in conjunction with the Droop and Monod models, the mixotrophic growth and lutein production were accurately simulated.

The entire model integrates seven state variables: biomass ( $X$ ,  $\text{g cells.L}^{-1}$ ), internal nitrogen quota ( $q_N$ ,  $\text{gN.gC}^{-1}$ ), internal phosphorus quota ( $q_P$ ,  $\text{gP.gC}^{-1}$ ), nitrate ( $N$ ,  $\text{mg nitrate.L}^{-1}$ ), phosphate ( $P$ ,  $\text{mg phosphate.L}^{-1}$ ), glucose ( $G$ ,  $\text{g glucose.L}^{-1}$ ) and lutein ( $L$ ,  $\text{mg lutein.L}^{-1}$ ) as follows (Equation 5.4):

$$\left\{ \begin{array}{l}
\frac{dX}{dt} = \mu(q_N, q_P, G)X \\
\frac{dq_N}{dt} = \rho(N, q_N) - \mu(q_N, q_P, G)q_N \\
\frac{dN}{dt} = -\rho(N, q_N)X \\
\frac{dq_P}{dt} = \rho(P, q_P) - \mu(q_N, q_P, G)q_P \\
\frac{dP}{dt} = -\rho(P, q_P)X \\
\frac{dG}{dt} = -K_G \mu(q_N, q_P, G)X \\
\frac{dL}{dt} = \alpha \mu(q_N, q_P, G)X + \beta X
\end{array} \right. \quad (5.4)$$

### 5.2.5 Parameter estimation methodology

The parameter estimation process is essential for ensuring the accuracy and reliability of multiple-substrate models (Bekirogullari *et al.*, 2020). To achieve this, the optimal parameter values that minimized the difference between experimental data and the model's predictions were determined, as represented by a cost function  $J$ . Inaccurate parameter estimates can restrict the applicability of the model for evaluation and design purposes (del Rio-Chanona *et al.*, 2017).

A nonlinear least-squares optimization procedure was employed to estimate the parameters. The optimization process was performed using a combination of the Nelder-Mead and Levenberg-Marquardt methods. These techniques have been previously validated in our research (Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Bentahar & Deschênes, 2023) as effective methods for solving non-linear problems with noisy cost functions. The Nelder-Mead method (Nelder & Mead, 1965) is a zero-order optimization technique that searches for the absolute minimum over a predetermined range of operation conditions. The Levenberg-Marquardt method (Levenberg, 1944; Marquardt, 1963) is a gradient-based

optimization technique that estimates the parameter covariance matrix. The successful combination of these techniques allows for accurate parameter estimates and a robust model. The optimal parameters of the underlying model were determined by solving the non-linear equations (Equation 5.4) using a numerical differential equation solver.

This work was done using MATLAB® 2019a for model integration and parameter identification using the *fminsearch*, *fmincon*, and *lsqnonlin* routines, and for solving the differential equations with its *ode45* solver. The weighted least squares (*WLS*) approach was used to minimize the cost function  $J$  with respect to the parameters  $\theta$  (Equation 5.5) and a multi-start strategy was employed to identify the global minimum and improve the robustness of the optimization procedure.

$$J(\theta) = \sum_{i=1}^n \left[ (y_i - \hat{y}_i(\theta))^T W^{-1} (y_i - \hat{y}_i(\theta)) \right] \quad (5.5)$$

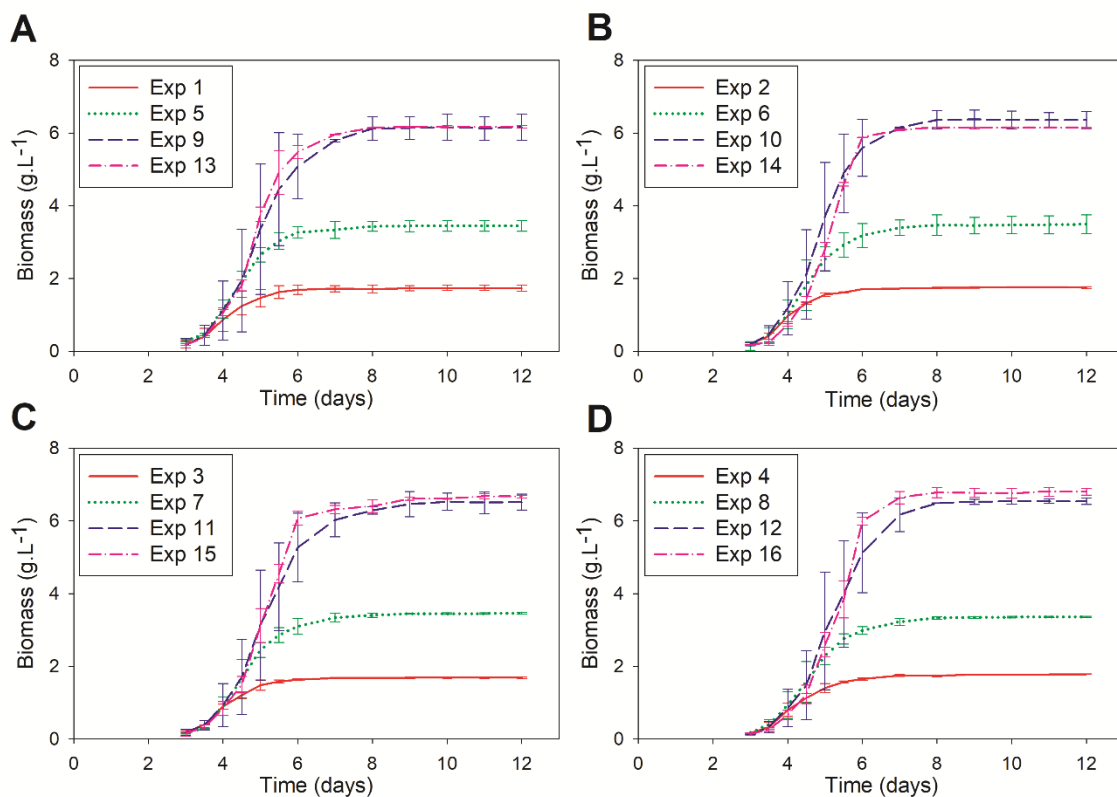
where  $y_i$  is the measured output,  $\hat{y}_i$  is the model predicted output,  $\theta$  is the parameter vector,  $n$  is the number of measurement points, and  $W$  is the error-weighting matrix.

### 5.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 5.3.1 Effects of various concentrations of nitrate and phosphate on biomass production

In this study, a run of 16 batch cultures was conducted to investigate the impacts of nitrate and phosphate concentrations on *T. obliquus* biomass growth and lutein production under mixotrophic conditions. The experiments were performed in duplicate using both low and high nitrate and phosphate concentrations. The progress of cell growth over a 12-day period is displayed in Figure 5.2A-D. Results showed that the biomass concentration significantly increased ( $p < 0.0001$ ) with the increase in initial nitrate concentration up to 912 mg.L<sup>-1</sup> (equivalent to 5× BBM), with a 4-fold increase in biomass concentration, ranging from a minimum of 1.69 g.L<sup>-1</sup> to a maximum of 6.80 g.L<sup>-1</sup>. These results are

consistent with the literature (Chen *et al.*, 2019b), who reported that maximal biomass production increased dramatically with increasing calcium nitrate concentrations. They found the highest biomass production ( $12.73 \text{ g.L}^{-1}$ ) with a nitrate concentration of  $2362.9 \text{ mg.L}^{-1}$ . These findings support the positive impact of nitrate concentration on biomass growth and highlight the potential for increased biomass production with higher nitrate concentrations. However, an ANOVA test showed no significant difference ( $p = 0.59$ ) when nitrate concentration was increased from  $912 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $1824 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $5\times$  BBM to  $10\times$  BBM equivalent). This observation suggests the presence of an additional limiting factor (*i.e.* glucose) being depleted from the medium. On the other hand, no significant difference ( $p > 0.05$ ) in biomass production was found with the increase in phosphate concentration from  $163 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $1630 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $1\times$  BBM to  $10\times$  BBM equivalent), except when using a nitrate concentration equivalent to  $10\times$  BBM ( $p < 0.001$ ).



**Figure 5.2** Changes in biomass concentration across 16 experimental variations. Solid, dotted, dashed, and dotted-dashed lines with circle, diamond, triangle, and square symbols



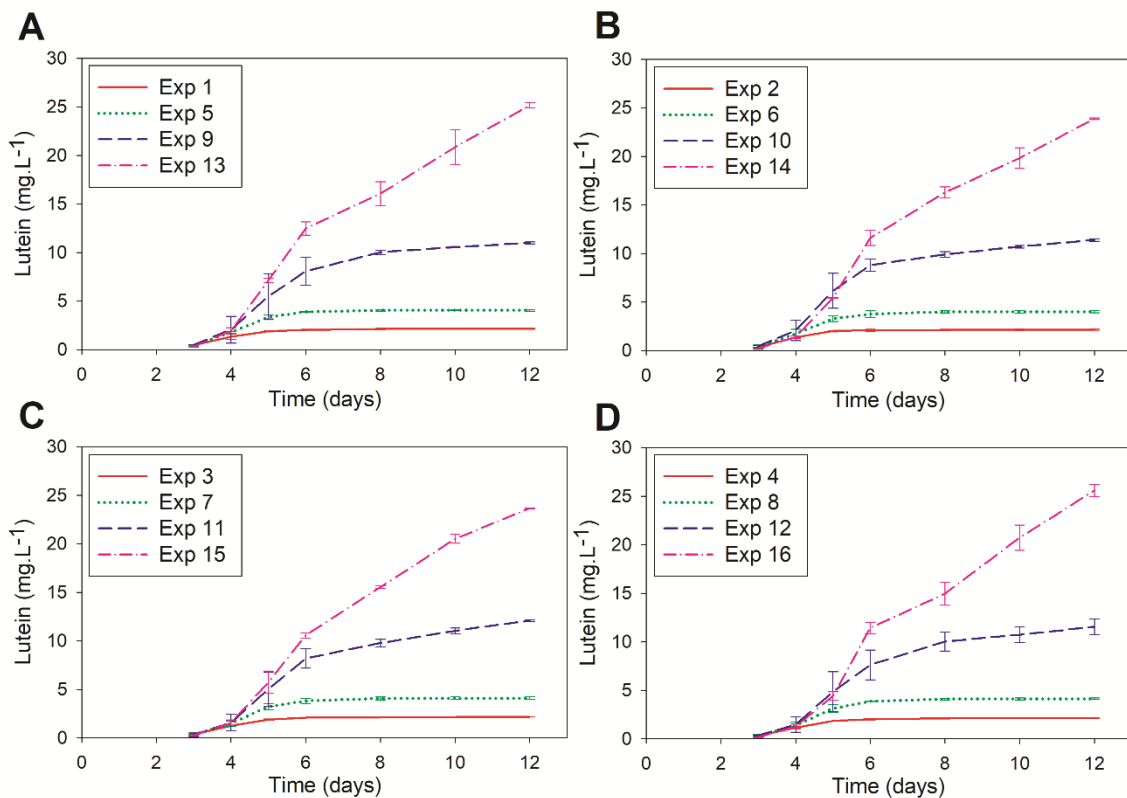
represent the four initial nitrate concentrations equivalent to 1x, 2x, 5x, and 10x BBM, respectively. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial phosphate concentrations equivalent to 1x, 2x, 5x, and 10x BBM, respectively. Mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$ ) is shown.

The importance of nitrogen (N) concentration in the culture medium for *T. obliquus* growth is well established (Bentahar & Deschênes, 2022a). However, phosphorus (P) is also essential for microalgal growth and is a key constituent in the synthesis of cellular components such as the cell membrane, DNA, RNA, and ATP (Atiku *et al.*, 2016). Previous studies have shown that P deficiency in the culture medium reduces *T. obliquus* growth (Xin *et al.*, 2010; Akgul & Akgul, 2022). N-P coupling has also been found to have a significant effect on nutrient uptake, dry mass, and pigments (Huang *et al.*, 2021). Beuckels *et al.* (2015) reported that *T. obliquus* adjusts its N and P concentrations based on the supply in the medium, with high N concentrations being crucial for effective P uptake. This study complements these findings by highlighting the dynamics of biomass production under a broad spectrum of growth conditions and providing a mathematical kinetic model to describe this process. The results suggest that while N concentration has a significant impact on biomass production, P concentration may not have a direct impact under mixotrophic conditions. However, the combination of N and P concentrations may still have a significant impact on *T. obliquus* growth, and further investigation is required to explore this interaction. Additionally, the findings suggest that higher nitrate concentrations could be used to increase *T. obliquus* biomass production, but this must be balanced against the cost of the added nutrients.

### **5.3.2 Effects of various concentrations of nitrate and phosphate on lutein production**

The dynamic changes in lutein concentration were studied under varying nitrate and phosphate conditions, as displayed in Figure 5.3A-D. Results indicated a significant increase in lutein concentration as the initial nitrate concentration was raised from 182.4 to 1824 mg.L<sup>-1</sup> ( $p < 0.0001$ ), resulting in a 12-fold increase in final lutein concentration from 2.13 mg.L<sup>-1</sup> (experiment 1) to 25.58 mg.L<sup>-1</sup> (experiment 16). However, no significant

correlation was observed between changes in phosphate concentration and lutein production ( $0.055 < p < 0.76$ ), except when using a nitrate concentration equivalent to 10× BBM ( $p = 0.007$ ). This suggests that phosphate supplementation alone has a limited impact on lutein production, while elevated nitrate concentration has a significant effect. Notably, this study demonstrated higher lutein concentrations than previous studies in *T. obliquus* under mixotrophic and autotrophic conditions, with a maximum lutein concentration of 8.2 mg.L<sup>-1</sup> and 5.6 mg.L<sup>-1</sup>, respectively (Yen, Sun, & Ma, 2011; Chen *et al.*, 2019b). This might be due to the effect of nitrogen availability, as nitrogen is critical in maximizing lutein accumulation in microalgae (Henríquez *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019b). Increasing the nitrogen concentration can improve lutein synthesis under optimal light supply, even though lutein does not require nitrogen for synthesis (Zheng *et al.*, 2022).



**Figure 5.3** Lutein concentration trends for 16 experimental variations. Solid, dotted, dashed, and dotted-dashed lines with circle, diamond, triangle, and square symbols represent the four initial nitrate concentrations equivalent to 1x, 2x, 5x, and 10x BBM, respectively. (A), (B), (C), and (D) correspond to the four initial phosphate concentrations

equivalent to 1×, 2×, 5×, and 10× BBM, respectively. Mean ± standard deviation ( $n = 2$ ) is shown.

Regarding lutein yields and productivities, results showed a range of lutein yield from 1.17 to 4.08 mg.g<sup>-1</sup> and lutein productivity from 0.18 to 2.13 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, which compare favorably with previous studies. For instance, lutein content of 1.5 mg.g<sup>-1</sup> and yield of 3.06 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> were achieved in mixotrophic cultivation of *T. obliquus* with 2% glucose and 4.5 g.L<sup>-1</sup> calcium nitrate (Chen *et al.*, 2019b). Additionally, under mixotrophic conditions using 6 g.L<sup>-1</sup> crude glycerol and a 20:1 N/P ratio, a maximum lutein productivity of 3.59 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> was reported (Rajendran, Nagarajan, & Karuppan, 2020). Other factors, such as mode of nutrition and light source and intensity, have also been investigated for their impact on lutein production in microalgae. Autotrophic cultivation was found to be more favorable for lutein production in *T. obliquus*, yielding a higher lutein productivity of 0.44 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> compared to mixotrophic cultivation with 3 g.L<sup>-1</sup> glycerol supplementation (0.36 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>) after 7 days of cultivation (Yen *et al.*, 2011). Furthermore, Ho *et al.*, (2014) reported that optimizing the light source and intensity improved lutein productivity in *T. obliquus* by three times, from 1.39 to 4.15 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. White light at an intensity of 300 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> was found to be the most favorable for lutein production, with the highest content (4.52 mg.g<sup>-1</sup>) and productivity (4.15 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>). In contrast, red light had the lowest lutein accumulation, with 3-4 mg.g<sup>-1</sup> compared to blue, green, and white lights. Overall, the findings of this study suggest that the optimization of nitrogen availability is crucial for maximizing lutein accumulation in *T. obliquus* and can contribute to the development of efficient strategies for the commercial production of this valuable pigment from microalgae.

### **5.3.3 Results of model construction and parameters estimation**

To thoroughly investigate the impact of nitrate concentration on the parameters of this model, the experimental data were categorized into four groups based on initial nitrate levels (1×, 2×, 5×, and 10× BBM). The model consisted of 16 batch experiments (run in duplicate), with each nitrate level category having 3 duplicated experiments for calibration

and one duplicated experiment for validation (Table 5.3). This resulted in a total of 12 experiments used for calibration and 4 experiments kept for validation, both run twice. The proposed model (Equation 5.4) was calibrated for each group to estimate 13 parameters that describe changes in biomass, internal nitrogen quota, internal phosphorus quota, nitrate, phosphate, glucose, and lutein. The estimated values of each kinetic parameter were determined using a nonlinear least-squares optimization procedure as described in Section 2.5. The results (Table 5.4) showed that the estimated parameter values were largely consistent across the four nitrate level categories, with the exception of the non-growth associated parameter  $\beta$ , which increased substantially under higher initial nitrate concentrations. Specifically, the value of  $\beta$  increased from 0.0001 at 1 $\times$  and 2 $\times$  BBM to 0.06 at 5 $\times$  BBM and further increased to 0.35 at 10 $\times$  BBM. This increase could be due to lutein synthesis being influenced by other factors such as light and environmental conditions, rather than strictly controlled by the cellular growth rate. However, values for  $\beta$  were much smaller than  $\alpha$ , indicating that lutein was primarily associated with growth, in contrast to other algal species such as *Chlorella minutissima*, where lutein was non-growth associated (De Bhowmick, Sen, & Sarmah, 2019).

On the other hand, the maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of *T. obliquus* was determined to be 4.03 day<sup>-1</sup>, which exceeds the combined values previously reported for photoautotrophic (1.47 day<sup>-1</sup>) and heterotrophic (1.8 day<sup>-1</sup>) cultivation conditions (Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Di Caprio *et al.*, 2019). These findings support the hypothesis that the specific growth rate in mixotrophic conditions is not simply a sum of those in photoautotrophic and heterotrophic modes, but rather involves synergistic effects of both metabolic processes (Acién Fernández *et al.*, 2013; Salati *et al.*, 2017). Additionally, the microalgae exhibited a higher demand for nitrogen than phosphorus, as reflected by their higher nitrogen uptake rates and higher minimum and maximum internal nitrogen quotas. This preference indicates that the microalgae may not reach their maximum potential growth rate due to a nitrogen limitation, highlighting the importance of maintaining a balance between both nitrogen and phosphorus to ensure optimal microalgal growth and productivity. Moreover, glucose availability could be another limiting factor for

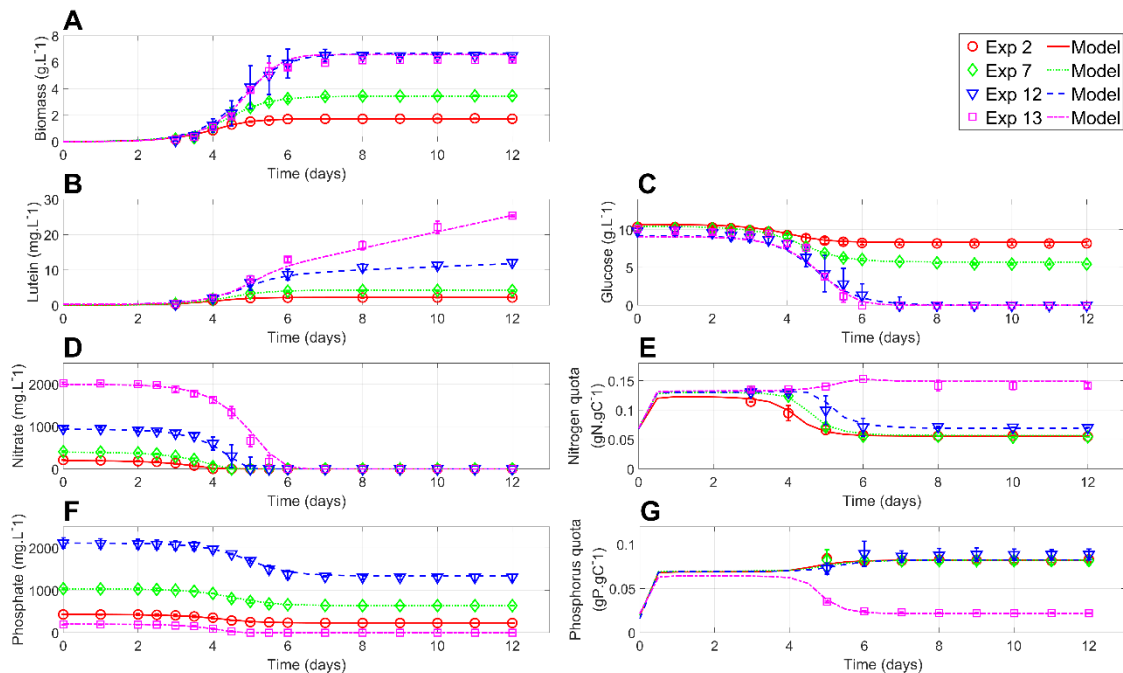
the microalgae's growth rate, as the half-saturation constant for glucose uptake ( $K_{SG}$ ) was found to be higher than that for nitrate uptake ( $K_{SN}$ ). Maintaining an appropriate balance between nitrogen and phosphorus availability while ensuring sufficient glucose concentration could contribute to achieving optimal growth conditions and enhance microalgal productivity.

**Table 5.4** Estimated parameter values from model calibration for four initial nitrate concentrations.

Model parameter	Units	Initial nitrate concentration (mg.L <sup>-1</sup> )			
		182.4 (BBM 1×)	364.8 (BBM 2×)	912 (BBM 5×)	1824 (BBM 10×)
$\mu_{max}$	day <sup>-1</sup>	4.0377	4.0316	4.0712	4.0822
$\rho_{Nmax}$	gN.gC <sup>-1</sup> .day <sup>-1</sup>	0.9798	0.9805	0.9765	0.9811
$\rho_{Pmax}$	gP.gC <sup>-1</sup> .day <sup>-1</sup>	0.6000	0.6007	0.6000	0.6000
$Q_{Nmax}$	gN.gC <sup>-1</sup>	0.1652	0.1659	0.1648	0.1669
$Q_{Nmin}$	gN.gC <sup>-1</sup>	0.0560	0.0567	0.0484	0.0432
$Q_{Pmax}$	gP.gC <sup>-1</sup>	0.0820	0.0820	0.0825	0.0820
$Q_{Pmin}$	gP.gC <sup>-1</sup>	0.0028	0.0029	0.0023	0.0035
$K_{SN}$	mg nitrate.L <sup>-1</sup>	134.9700	134.6600	135.1500	135.0200
$K_{SP}$	mg phosphate.L <sup>-1</sup>	81.1310	81.1920	81.7280	81.9980
$K_{SG}$	g glucose.L <sup>-1</sup>	8.2684	8.3573	7.5194	7.3911
$K_G$	g glucose.gC <sup>-1</sup>	2.9963	2.9973	2.9999	3.0000
$\alpha$	mg lutein.g cells <sup>-1</sup>	1.2525	1.2525	1.2525	1.2525
$\beta$	mg lutein.g cells <sup>-1</sup> .day <sup>-1</sup>	0.0001	0.0001	0.0649	0.3538

Figure 5.4A-G shows the results of fitting the model to data for different initial nitrate levels (runs #2, 7, 12, and 13), which are representative of the overall dataset. While only a

subset of results was presented due to space limitations, all other fits are similar (see Figure S1 available in Annexe A for details). The good correlation observed between the model output and experimental data for all seven state variables (Figure 5.4A-G) suggests the accuracy of the used methodology for parameter estimation. Estimating parameters in complex, multifactorial models is known to be challenging (Zhang *et al.*, 1999a; Benavides *et al.*, 2015; Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Darvehei *et al.*, 2018; Bekirogullari *et al.*, 2020), as the accuracy of such models depends critically on the choice of objective functions and constraints (Ryu *et al.*, 2018). To overcome this challenge, a combination of nonlinear least-squares optimization techniques was employed, carefully chosen objective functions, and constraints, which enabled us to obtain accurate and consistent parameter estimates across a 10-fold variation in nitrate and phosphate concentrations. In addition, the relatively high volume of experimental data, consisting of 86-point duplicated results for each condition, enhances the reliability of the parameter values, given the number of model parameters (13). Overall, the consistency of the estimated parameter values suggests that this model can be applied under a broad range of growth and lutein production conditions, providing valuable reference data and supplementing existing literature. The next section discusses the validation of the model.

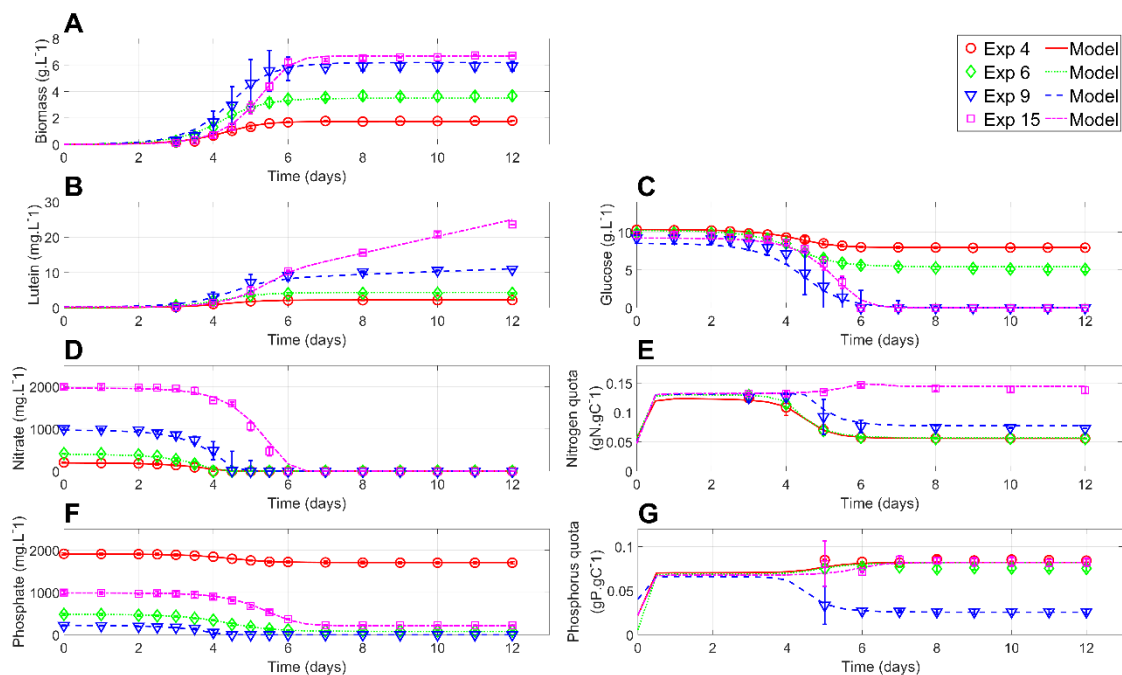


**Figure 5.4** Calibration results of proposed model compared to experimental data for cell growth (A), lutein production (B), consumption of glucose (C), nitrate (D) and phosphate (F) and internal nitrogen (E) and phosphorus (G) quotas. Model simulations for 4 initial nitrate levels (1×, 2×, 5×, and 10× BBM) are shown as solid, dotted, dashed, and dotted-dashed lines and correspond to the experimental results symbolized by circles, diamonds, triangles, and squares. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$ ). Only 4 representative experiments per nitrate level are shown (2, 7, 12 and 13), while all duplicates can be found in Annexe A - Figure S1.

### 5.3.4 Validation of kinetic model predictability

To validate the model, a separate set of experimental data was used, distinct from the data utilized to estimate the unknown parameters for each initial nitrate concentration, as described in section 3.3. Specifically, the data obtained from duplicate batch experiments in runs #4, 6, 9, and 15 (1×, 2×, 5×, and 10× BBM equivalent, respectively) were reserved for model validation, rather than calibration. Figure 5.5A-G illustrates the model's predictive capabilities for each state variable, with one representative example per experimental condition shown, and all duplicates simulated individually (see Figure S2 available in Annexe A for details). In these tests, the previously identified model parameters were used,

while initial conditions for the model states were estimated from the new experimental data. As expected, the model was able to accurately predict the dynamic concentration profiles for all validation experiments across various nitrate and phosphate concentration regimes.



**Figure 5.5** Comparison of model prediction with validation experiments (4, 6, 9 and 15) for cell growth (A), lutein production (B), consumption of glucose (C), nitrate (D) and phosphate (F) and internal nitrogen (E) and phosphorus (G) quotas. Model simulations for 4 initial nitrate levels (1×, 2×, 5×, and 10× BBM) are shown as solid, dotted, dashed, and dotted-dashed lines and correspond to the experimental results symbolized by circles, diamonds, triangles, and squares. Results are presented as mean ± standard deviation (n = 2). Only one of the duplicates per experimental condition is represented here, but the simulation of all duplicates is available in Annexe A - Figure S2.

The data analysis from model calibration and validation profiles (Figure 5.4A, B and Figure 5.5A, B) demonstrates that nitrogen concentration has a significant impact on both cell growth and lutein formation, which is consistent with previous studies (Akgul & Akgul, 2022; Bentahar & Deschênes, 2022a). Nitrogen plays a crucial role in algal growth, as it is a fundamental component of various biomolecules that are essential for cellular processes, including enzymes, chlorophylls, genetic material, and energy transfer molecules



(Kim *et al.*, 2016). This study also found that increasing the initial nitrate concentration leads to higher cell density, which, in turn, causes self-shading and limits light availability during the later stages of growth. This effect, in turn, enhances lutein production, as lutein is required for maintaining the structural integrity of light harvesting complexes (LHCs) that promote photosynthesis under low light conditions (Zheng *et al.*, 2022). The increase in lutein content due to nitrogen enrichment is consistent with previous studies on other microalgal strains (Cordero *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019b).

In addition, the model accurately predicted substrate consumption yields for glucose, nitrate, and phosphate concentrations, indicating that the multiplicative method utilizing Monod and Droop-based expressions is a suitable approach for describing substrate uptake dynamics. The consumption of glucose follows a similar trend as the growth of microalgae, supporting the use of the Monod equation to describe the effect of glucose on the mixotrophic growth of *T. obliquus* (Figure 5.4C and Figure 5.5C). The lower glucose consumption yields observed in cultures grown under low nitrate concentrations might be related to an unbalance in the C/N ratio, which is known to be close to the Redfield ratio (around 6.6) (Islam *et al.*, 2019). The high C/N ratio in the low-nitrate cultures (about 16.2 and 8.1 for initial nitrate concentrations of 1× and 2× BBM, respectively) suggests a potential N limitation, which could explain why glucose was not fully consumed. Conversely, the low C/N ratio in the high-nitrate cultures (about 3.2 and 1.6 for initial nitrate concentrations of 5× and 10× BBM, respectively) suggests a potential C limitation. On the other hand, the simulated nitrate consumption profile agrees with experimental data (Figure 5.4D and Figure 5.5D). Under low initial nitrate concentrations (1× and 2× BBM equivalent), microalgae growth persisted after nitrate exhaustion, suggesting significant intracellular nitrogen accumulation. A similar phenomenon was observed after phosphate exhaustion at a concentration equivalent to 1× BBM (Figure 5.4F and Figure 5.5F). These results are in line with previous studies indicating that *T. obliquus* cells can utilize intracellular nitrogen and phosphorus after external nutrient exhaustion (Wu *et al.*, 2013; Deschênes & Vande Wouwer, 2016). Thus, the Droop model, which allows to capture the

observed ability of microalgae to grow even after complete exhaustion of a limiting nutrient (Figueroa-Torres, Pittman, & Theodoropoulos, 2017), yields good trajectories to describe the effect of nitrate and phosphate on the mixotrophic growth of this microalga.

However, small disagreements between predictions and experimental data can be seen for internal nitrogen and phosphorus quotas dynamics (Figure 5.5E, G). This observation could result from limited experimental data, as only 7 and 8-point data for each experimental run were used, while 13 model parameters were considered. In addition, the measurement of internal quotas is challenging, with potential sources of error such as the numerous experimental steps required for nitrogen quota measurements and the reliance on biomass estimation for phosphorus quota measurements (Wu *et al.*, 2013; Deschênes & Vande Wouwer, 2016; Bentahar & Deschênes, 2023). According to Bougaran *et al.* (2010), the internal quota of a nutrient is at a minimum level when it limits cellular growth. However, when the same nutrient becomes abundant and another nutrient becomes limiting, the cell accumulates the previously non-limiting nutrient up to a maximal quota. The observed disagreements between predictions and experimental data might reflect the complex nature of the internal nutrient storage system.

In general, the validation results indicated that the model was able to describe the relationship between estimated parameters and state variables within the range of variables reported in Table 5.2, confirming its potential for practical implementation in future applications.

## **5.4 CONCLUSIONS**

The multi-nutrient kinetic model presented in this study offers valuable insights into the interplay of nitrate, phosphate, and glucose in regulating the growth and lutein production of *T. obliquus* species. The model was designed to integrate seven state variables and thirteen unknown parameters, which were estimated using a distinctive experimental design that involved a 10-fold variation in nitrate and phosphate concentrations. The parameter estimation was carried out through a combination of

nonlinear least-squares optimization techniques, objective functions, and constraints, leading to consistent and robust parameter values.

The investigation revealed significant findings regarding the impact of nitrate and phosphate on the microalgal growth and lutein production. Notably, increasing the initial nitrate concentration resulted in a remarkable boost in both biomass and lutein production, achieving up to 4-fold and 12-fold increases, respectively. In contrast, phosphate supplementation exhibited a limited influence on microalgal growth and lutein production. Furthermore, the study emphasized the critical role of maintaining a balanced nitrogen-phosphorus ratio, while ensuring adequate glucose concentration to optimize microalgal productivities.

The model's validation results demonstrated its accuracy in predicting dynamic concentration profiles for all validation experiments under different nitrate and phosphate concentration regimes, thus indicating the model's wide applicability. This research holds significant potential for advancing microalgal cultivation techniques and serving as a valuable guideline for similar microalgal cultivation systems, while also contributing to an eventual commercial-scale production of lutein and other valuable microalgal products. Future work will focus on developing real-time operation strategies for photobioreactors, including precise real-time automatic control and optimization for large-scale cultivation processes.

## **5.5 ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada under grant number RGPIN-2017-06202 and the Institute for Nutrition and Functional Foods under grant number FRQNT-203315, which the authors gratefully acknowledge.

## **CHAPITRE 6**

### **SIMULATIONS PRÉDICTIVES EN MODE CONTINU POUR DES PRODUCTIVITÉS MAXIMALES EN BIOMASSE ET EN PIGMENTS**

#### **6.1 INTRODUCTION**

La modélisation d'un procédé de culture des microalgues consiste à décrire le comportement du processus de culture et à donner une base quantitative pour son optimisation en utilisant des équations mathématiques. Afin d'assurer la rentabilité du procédé, il est important d'atteindre une densité cellulaire et une productivité élevées. Les photobioréacteurs en continu sont les seuls à pouvoir répondre à cette exigence (Banerjee *et al.*, 2002). Cependant, une recherche plus approfondie est nécessaire pour proposer un procédé efficace et fiable pour la production de biomasse microalgale et de pigments.

Ce chapitre s'est consacré à la conceptualisation d'approches de contrôle automatique pour maximiser la production de biomasse microalgale et de pigments (lutéine) à l'aide de modèles mathématiques adaptés au mode continu de culture. Ce mode a été choisi pour valider le bon fonctionnement du modèle pour les photobioréacteurs à travers des simulations et une validation en temps réel. Une validation expérimentale a été tentée dans un photobioréacteur Applikon de 5 L à double paroi sous des conditions contrôlées de pH, température et agitation, mais a été interrompue prématurément en raison d'une contamination. Par conséquent, des simulations ont été utilisées pour vérifier le potentiel de productivité en biomasse et en lutéine en mode mixotrophe en utilisant Simulink-MATLAB. Les équations du modèle dynamique du système adaptées au mode continu ont été présentées. Ensuite, des simulations numériques en régimes stationnaire et permanent ont été utilisées pour maximiser la production de biomasse et de lutéine et démontrer l'efficacité des différentes approches proposées.

## 6.2 MODELE RETENU

Le modèle mathématique développé dans le chapitre 5 (Équation 5.4) repose sur les hypothèses suivantes :

- i. La croissance de *T. obliquus* est limitée uniquement par les trois substrats suivants : la source d'azote (nitrate), la source de carbone organique (glucose) et la source de phosphore (phosphate) ;
- ii. Le substrat carboné organique (glucose) influence directement le taux de croissance selon le modèle de Monod (1948), tandis que les sources d'azote et de phosphore (nitrate et phosphate) agissent indirectement sur le taux de croissance en utilisant des quotas de stockage interne selon le modèle de Droop (1968) ;
- iii. La co-limitation des trois substrats est indépendante et leurs interactions n'affectent pas la croissance de *T. obliquus* ;
- iv. Le modèle est multiplicatif et les trois substrats contribuent de manière égale à la croissance de *T. obliquus* ;
- v. La production de lutéine est intégrée en tant que variable d'état distincte selon le modèle de Luedeking-Piret (1959) ;
- vi. Tous les autres nutriments sont en excès dans le milieu et n'ont aucune influence sur la croissance de *T. obliquus* ;
- vii. L'effet de la lumière sur la croissance de *T. obliquus* (photoinhibition) est négligé ;
- viii. L'effet de la respiration des microalgues est également négligé ;
- ix. Tous les autres facteurs (pH, température, agitation, etc.) sont maintenus constants à leurs valeurs optimales de croissance.

Les hypothèses énumérées ci-dessus ont été établies afin de simplifier le modèle et de permettre une analyse mathématique plus précise. Les équations de dynamique de système, adaptées à un photobioréacteur opéré en mode continu (chémostat) parfaitement mélangé, peuvent être exprimées à partir des considérations de bilan massique comme suit (Équation 6.1) :

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{dX}{dt} &= \mu(q_N, q_P, G)X - DX \\
 \frac{dq_N}{dt} &= \rho(N, q_N) - \mu(q_N, q_P, G)q_N \\
 \frac{dN}{dt} &= -\rho(N, q_N)X + D(N_{in} - N) \\
 \frac{dq_P}{dt} &= \rho(P, q_P) - \mu(q_N, q_P, G)q_P \\
 \frac{dP}{dt} &= -\rho(P, q_P)X + D(P_{in} - P) \\
 \frac{dG}{dt} &= -K_G \mu(q_N, q_P, G)X + D(G_{in} - G) \\
 \frac{dL}{dt} &= \alpha \mu(q_N, q_P, G)X + \beta X - DL
 \end{aligned} \right\} \quad (6.1)$$

où  $D$  (jour<sup>-1</sup> ou j<sup>-1</sup>) est le taux de dilution (ratio du débit traversant le système à son volume d'opération),  $N_{in}$  (mg nitrate.L<sup>-1</sup>),  $P_{in}$  (mg phosphate.L<sup>-1</sup>) et  $G_{in}$  (mg glucose.L<sup>-1</sup>) sont les concentrations de nitrate, phosphate et glucose respectivement dans le flux d'entrée (stérilisé).

### 6.3 STRATEGIE DE CONTROLE

Le choix du mode de culture continu a été déterminé par la volonté d'évaluer les capacités maximales du système en termes de production, sur une durée indéterminée, par une éventuelle stratégie de contrôle automatique du photobioréacteur. Les éléments clés du système incluent : i) le photobioréacteur, modélisé à l'aide de Simulink, qui constitue l'objet de contrôle; ii) les variables de sortie mesurées, à savoir la productivité en biomasse

( $P_B$ , g.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) et la productivité en lutéine ( $P_L$ , mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>); et iii) la variable d'entrée ou de contrôle, représentée par le taux de dilution ( $D$ , j<sup>-1</sup>), dont la manipulation influence les variables de sortie et permet leur maximisation.

Pour des raisons de simplification, le taux de dilution est considéré comme étant contrôlé par un seul débit d'alimentation du milieu de culture ( $F$ , L.j<sup>-1</sup>), comprenant simultanément les trois substrats concentrés, et le volume du chémostat ( $V$ , L) est maintenu constant (Équation 6.2). Les concentrations de nitrate ( $N_{in}$ , mg.L<sup>-1</sup>), de phosphate ( $P_{in}$ , mg.L<sup>-1</sup>) et de glucose ( $G_{in}$ , g.L<sup>-1</sup>) dans le flux d'entrée sont déterminées en fonction de leur situation correspondante au plan d'expériences (chapitre 5, résumé au Tableau 6.1).

$$D = \frac{F}{V} \quad (6.2)$$

**Tableau 6.1** Concentrations des substrats du flux d'entrée en mode continu selon les niveaux de nitrate.

Flux d'entrée	Unité	Niveau de nitrate (mg.L <sup>-1</sup> )			
		182.4 (BBM 1×)	364.8 (BBM 2×)	912 (BBM 5×)	1824 (BBM 10×)
$N_{in}$	mg nitrate.L <sup>-1</sup>	182.4	364.8	912	1824
$P_{in}$	mg phosphate.L <sup>-1</sup>	163.05	326.1	815.25	815.25
$G_{in}$	g glucose.L <sup>-1</sup>	10	10	10	10

L'objectif du système de contrôle est de maximiser les productivités en biomasse et en lutéine grâce à la manipulation du taux de dilution ( $D$ ), qui équivaut à la manipulation du débit d'alimentation ( $F$ ) étant donné que le volume ( $V$ ) est fixe, et de maintenir ces valeurs maximales. La première étape consiste à déterminer les productivités maximales en biomasse et en lutéine que l'on peut atteindre en utilisant les paramètres du modèle obtenu dans le chapitre 5. Pour ce faire, il est nécessaire de résoudre les équations du modèle dans un régime stationnaire avant de les appliquer dans un régime permanent.

#### 6.4 PRODUCTIVITES EN REGIME STATIONNAIRE

Les productivités en biomasse ( $P_B$ ,  $\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) et en lutéine ( $P_L$ ,  $\text{mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) peuvent être définies respectivement comme le produit de la concentration de biomasse ( $X$ ,  $\text{g.L}^{-1}$ ) ou de lutéine ( $L$ ,  $\text{mg.L}^{-1}$ ) et du taux de dilution ( $D$ ,  $\text{j}^{-1}$ ) (Deschênes & Vande Wouwer, 2015). Ces expressions permettent de quantifier la production de biomasse et de lutéine par unité de temps et de volume de culture. Les productivités en biomasse et en lutéine peuvent être formulées en utilisant l'Équation 6.3.

$$\left\{ \begin{array}{l} P_B = XD \\ P_L = LD \end{array} \right. \quad (6.3)$$

Dans cette étude, seul le mode de culture continu a été considéré. Dans ce cas, le photobioréacteur opère autour d'un point de fonctionnement, caractérisé par des concentrations constantes en biomasse et en lutéine (valeurs maximales). Ainsi, le comportement du système dans un état d'équilibre (stationnaire) peut être décrite à partir de l'équation 6.4, lorsque les taux de variation des différentes quantités sont nuls :

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu(q_N, q_P, G) - D = 0 \\ \rho(N, q_N) - \mu(q_N, q_P, G)q_N = 0 \\ -\rho(N, q_N)X + D(N_{in} - N) = 0 \\ \rho(P, q_P) - \mu(q_N, q_P, G)q_P = 0 \\ -\rho(P, q_P)X + D(P_{in} - P) = 0 \\ -K_G \mu(q_N, q_P, G)X + D(G_{in} - G) = 0 \\ \alpha \mu(q_N, q_P, G)X + \beta X - DL = 0 \end{array} \right. \quad (6.4)$$

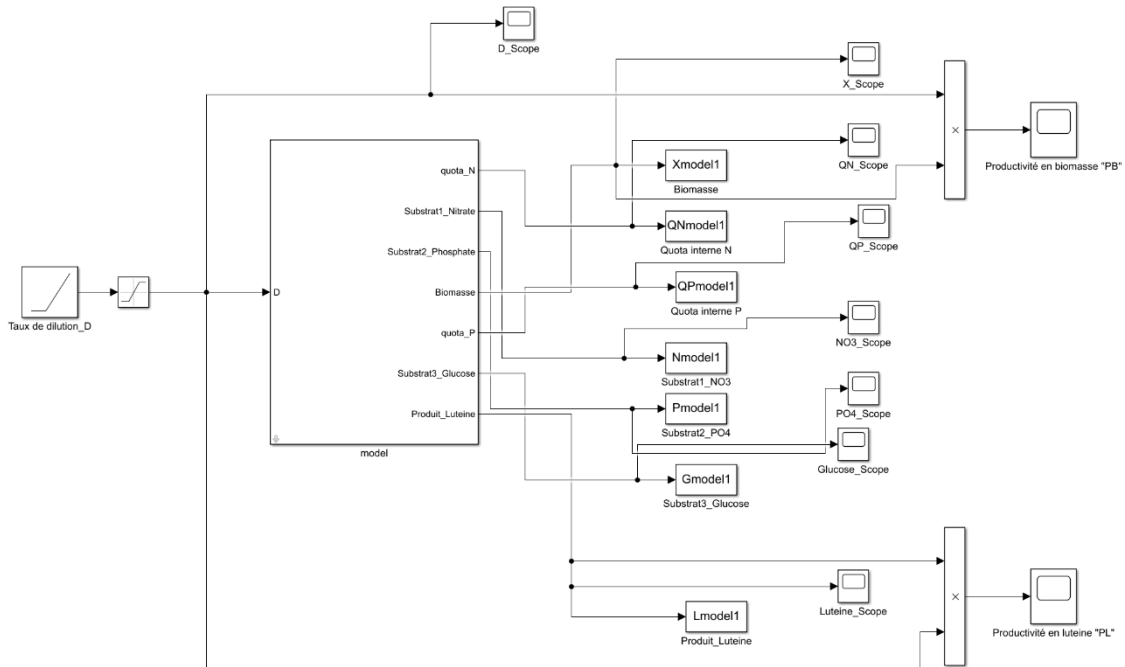
Les paramètres estimés pour les quatre niveaux de nitrate (Tableau 5.4) et les conditions initiales issues de la calibration du modèle (Tableau 6.2) ont été utilisés pour résoudre les équations du système (Équation 6.4) et décrire la dynamique de croissance de la biomasse et de la lutéine dans le photobioréacteur.



Le bloc Contrainte Algébrique de Simulink-MATLAB a été utilisé pour résoudre le système de culture en photobioréacteur continu en régime stationnaire. Ce bloc permet de contraindre le signal d'entrée  $f(z)$  à 0 et de forcer la sortie à affecter l'entrée via un chemin de rétroaction directe. Afin de déterminer les valeurs optimales de  $D_{opB}$  et  $D_{opL}$  et ainsi maximiser les productivités en biomasse ( $P_B$ ) et en lutéine ( $P_L$ ), respectivement, une étude a été menée pour étudier la relation entre la  $P_B$  et la  $P_L$  en fonction du taux de dilution ( $D$ ). Pour cela, le taux de dilution a été utilisé comme entrée sous forme d'une rampe linéaire générée par le bloc Rampe de Simulink avec une pente fixée à 1. Les courbes des fonctions ( $P_B = f(D)$  et  $P_L = f(D)$ ) ont été visualisées afin d'identifier les valeurs optimales de dilution. La Figure 6.1 présente le schéma de résolution du système de culture en photobioréacteur continu en régime stationnaire. Des informations supplémentaires sont disponibles dans l'Annexe B - Figure S3 pour une description plus détaillée de l'implémentation du système sur Simulink-MATLAB.

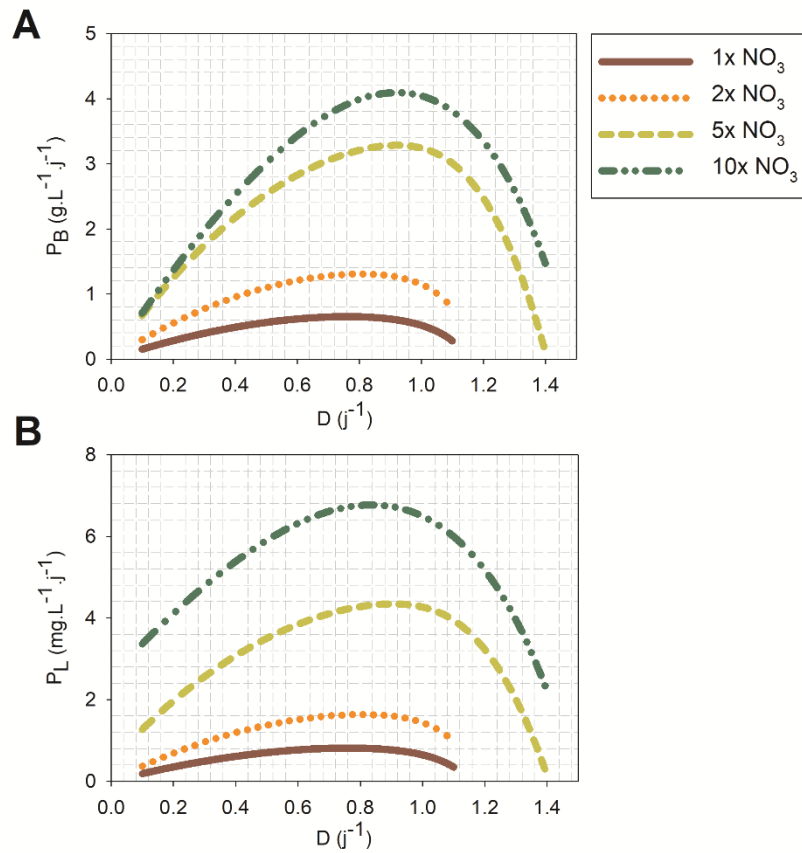
**Tableau 6.2** Conditions initiales de biomasse ( $x_0$ ), des quotas internes d'azote et de phosphore ( $Q_{N0}$  et  $Q_{P0}$ ), de nitrate ( $N_0$ ), de phosphate ( $P_0$ ), de glucose ( $G_0$ ) et de lutéine ( $L_0$ ) pour les quatre niveaux de nitrate.

Condition initiale	Unité	Niveau de nitrate (mg.L <sup>-1</sup> )			
		182.4 (BBM 1×)	364.8 (BBM 2×)	912 (BBM 5×)	1824 (BBM 10×)
$x_0$	g.L <sup>-1</sup>	0.01	0.01	0.01	0.009
$Q_{N0}$	gN.gC <sup>-1</sup>	0.07	0.07	0.07	0.07
$N_0$	mg nitrate.L <sup>-1</sup>	182.4	364.8	912	1600
$Q_{P0}$	gP.gC <sup>-1</sup>	0.015	0.015	0.015	0.015
$P_0$	mg phosphate.L <sup>-1</sup>	163.05	326.1	815.25	815.25
$G_0$	g glucose.L <sup>-1</sup>	10	10	10	10
$L_0$	mg lutein.L <sup>-1</sup>	0.1	0.01	0.3	0.3



**Figure 6.1** Schéma général du système en régime stationnaire.

Les résultats des simulations ont montré que  $D_{opB}$  et  $D_{opL}$  avaient des valeurs presque équivalentes, indiquant que la production maximale de lutéine était associée à une production maximale de biomasse (Figure 6.2). Le Tableau 6.3 présente les taux de dilution optimaux pour les quatre niveaux initiaux de nitrate. Ces résultats ont été utilisés pour valider le fonctionnement du modèle en régime permanent. Le système développé permet de simuler en temps réel les photobioréacteurs en mode continu afin d'optimiser la production de biomasse et de pigments (lutéine) par la microalgue *T. obliquus* dans des conditions mixotrophes.



**Figure 6.2** Identification des taux de dilution optimaux pour une productivité maximale en biomasse (A) et en lutéine (B). Les lignes pleines, pointillées, en tiretées et pointillées-tiretées avec des différentes couleurs représentent les quatre concentrations respectives de nitrate équivalentes à 1×, 2×, 5× et 10× BBM.

**Tableau 6.3** Taux de dilution optimaux pour des productivités maximales en biomasse ( $D_{opB}$ ) et en lutéine ( $D_{opL}$ ) selon les niveaux de nitrate.

Taux de dilution optimal	Unité	Concentration initiale en nitrate ( $\text{mg.L}^{-1}$ )			
		182.4	364.8	912	1824
		(BBM 1×)	(BBM 2×)	(BBM 5×)	(BBM 10×)
$D_{opB}$	$\text{j}^{-1}$	0.76	0.805	0.92	0.92
$D_{opL}$	$\text{j}^{-1}$	0.76	0.805	0.903	0.836

## 6.5 OPERATION EN MODE CONTINU

Le choix du mode de production en continu offre l'avantage d'atteindre un régime permanent dans le photobioréacteur, ce qui permet de stabiliser la concentration en biomasse ou du produit d'intérêt. En outre, cette méthode permet de réduire les coûts de production, en limitant les opérations de nettoyage, de stérilisation et d'ensemencement, en maximisant l'utilisation des équipements sur des durées prolongées (St-Onge, 2013; Thobie, 2018). Cependant, le fonctionnement continu nécessite un apport bien équilibré des nutriments dans la solution concentrée afin de s'assurer d'éviter leur épuisement dans le milieu de culture (Figuroa-Torres, Pittman, & Theodoropoulos, 2021). De plus, cela apporte une complexité opérationnelle plus importante.

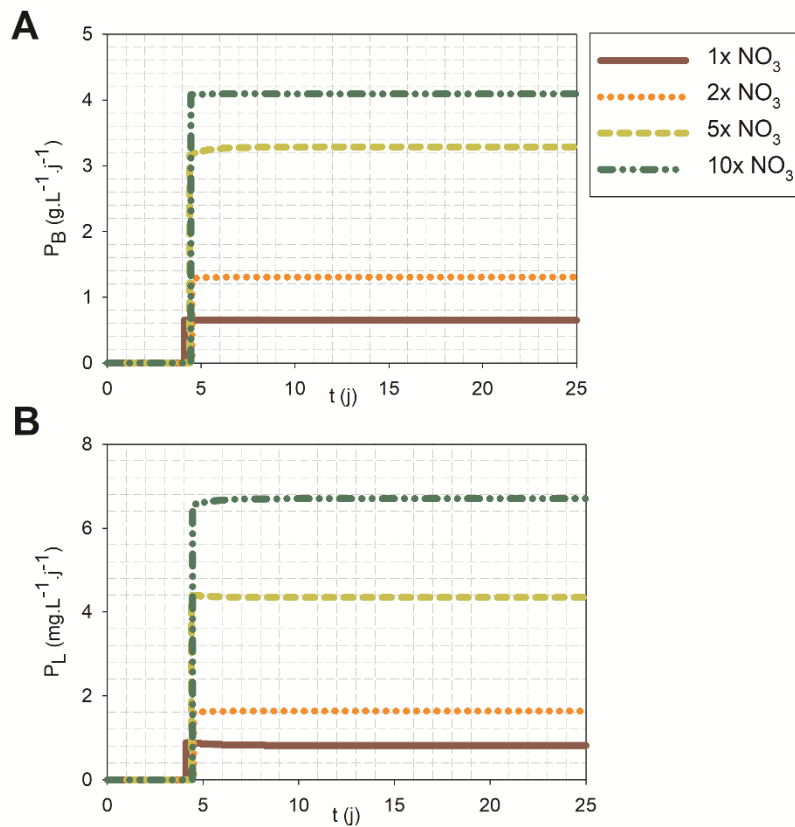
L'équation 6.1 a été implémentée dans Simulink afin de permettre l'opération du système en mode continu et maintenir les productivités en biomasse et en lutéine à leurs valeurs maximales. Pour ce faire, des échelons ont été appliqués sur le taux de dilution ( $D$ , variable d'entrée) du photobioréacteur en utilisant les valeurs  $D_{opB}$  et  $D_{opL}$  spécifiées par le régime stationnaire. Ces échelons représentent les opérations en mode batch au départ, suivi d'un passage en mode « automatique » dès l'atteinte de la valeur cible (maximale) calculée à l'optimum de productivité (Tableau 6.3). Les simulations ont montré qu'une productivité maximale en biomasse et en lutéine a été atteinte après seulement 4 à 4,5 jours de culture, ce qui est remarquablement rapide. Les résultats des productivités maximales en biomasse et en lutéine pour les quatre niveaux initiaux de nitrate sont présentés dans le Tableau 6.4.

**Tableau 6.4** productivité maximale en biomasse ( $P_B$ ) et en lutéine ( $P_L$ ) pour chacun des quatre niveaux de nitrate (1×, 2×, 5× et 10× BBM).

Productivité maximale	Unité	Concentration initiale en nitrate (mg.L <sup>-1</sup> )			
		182.4	364.8	912	1824
		(BBM 1×)	(BBM 2×)	(BBM 5×)	(BBM 10×)
$P_B$	(g.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	0.65	1.31	3.28	4.10
$P_L$	(mg.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	0.82	1.64	4.34	6.70

L'étude menée a permis de démontrer l'impact significatif de la concentration en nitrate sur la productivité de la microalgue *T. obliquus*. En effet, l'augmentation de la concentration initiale de nitrate de  $1\times$  BBM ( $182,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) à  $10\times$  BBM ( $1824 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a entraîné une augmentation respective importante de la productivité en biomasse et en lutéine de 6 et 8 fois, atteignant des productivités maximales en continu de  $4,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et de  $6,70 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  après seulement 4 à 4,5 jours de culture (Figure 6.3). À notre connaissance, ces productivités représentent l'un des résultats les plus élevés signalés pour *T. obliquus* en mode continu. Des études antérieures menées dans des photobioréacteurs en mode continu ont rapporté des productivités maximales en biomasse de 2,3 et  $3 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour cette espèce (Sforza *et al.*, 2014; de Farias Silva, Sforza, & Bertucco, 2018), ce qui est inférieur à nos résultats. D'autre part, la production de lutéine en mode continu à partir de microalgues reste largement inexplorée. Bien qu'une étude menée par Ho *et al.* (2015) en mode semi-continu sur *T. obliquus* ait démontré des productivités maximales respectives en biomasse et en lutéine de  $1,30 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et de  $6,01 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , ces résultats sont également inférieurs aux nôtres. Cependant, la production de lutéine en mode semi-continu sur d'autres espèces de microalgues a démontré de meilleurs résultats (Wang *et al.*, 2020).

Les taux de dilution optimaux pour les différents niveaux initiaux de nitrate permettant de maximiser les productivités en biomasse et en lutéine dans un régime permanent sont présentés dans l'Annexe B - Figure S4. Les résultats complets de la simulation de cinétique de biomasse ( $X$ ,  $\text{g cellules.L}^{-1}$ ), quota d'azote interne ( $q_N$ ,  $\text{gN.gC}^{-1}$ ), quota de phosphore interne ( $q_P$ ,  $\text{gP.gC}^{-1}$ ), nitrate ( $N$ ,  $\text{mg nitrate.L}^{-1}$ ), phosphate ( $P$ ,  $\text{mg phosphate.L}^{-1}$ ), glucose ( $G$ ,  $\text{g glucose.L}^{-1}$ ) et lutéine ( $L$ ,  $\text{mg lutéine.L}^{-1}$ ) sont quant à eux disponibles dans l'Annexe B - Figure S5.



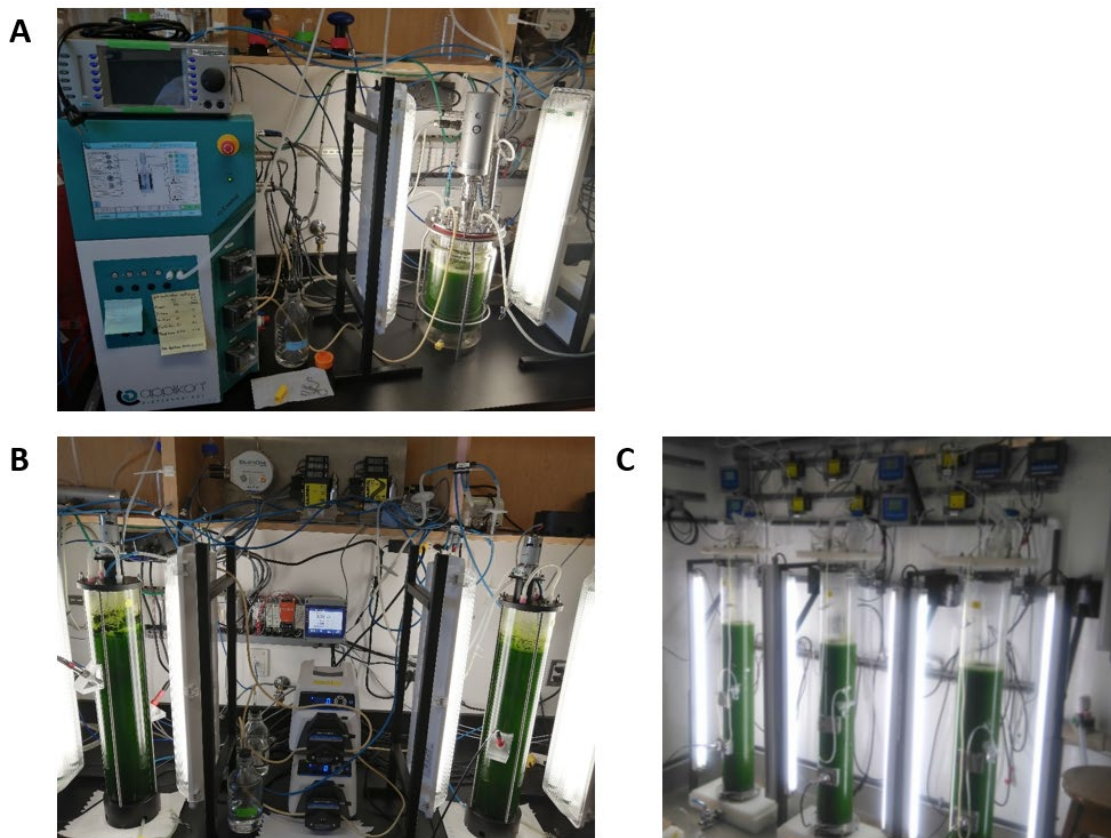
**Figure 6.3** Cinétique des productivités maximales simulées en biomasse (A) et en lutéine (B) en mode continu. Les lignes pleines, pointillées, en tiretés et pointillées-tirées avec des différentes couleurs représentent les quatre concentrations respectives de nitrate équivalentes à 1×, 2×, 5× et 10× BBM.

## 6.6 TRAVAUX FUTURS

Une première perspective sera de valider les résultats de la culture mixotrophe de *T. obliquus* en photobioréacteurs par une validation expérimentale. Ensuite, une stratégie de contrôle en mode continu pourra être élaborée et confrontée à des perturbations ainsi qu'à des variations de paramètres pour valider la stabilité et la robustesse de l'algorithme.

Bien que les résultats présentés dans ce chapitre aient été entièrement simulés, il est important de souligner que notre laboratoire dispose de photobioréacteurs de différents modèles et tailles, ce qui nous permet de réaliser des productions d'échelle plus importante

pour des expériences futures (Figure 6.5). De plus, ces démarches pourraient être étendues à d'autres espèces de microalgues.



**Figure 6.4** Exemples des modèles de photobioréacteurs disponibles dans notre laboratoire : (A) photobioréacteur Applikon à double paroi agitée (volume de travail = 5 L) ; (B) photobioréacteur à réservoir agitée (volume de travail = 6 L); (C) photobioréacteur à colonne à bulles verticale (volume de travail = 27 L) (Deschênes & Vande Wouwer, 2016).

La suite des travaux sur l'amélioration du modèle multiplicatif consistera à incorporer l'effet de la lumière et de l'auto-ombrage afin de mieux comprendre leur impact sur la production de biomasse et de pigments. En effet, l'effet de la lumière sur la culture des microalgues, qui est critique pour la production de biomasse et de pigments, n'a pas été pris en compte dans notre modèle. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour inclure cet élément dans le modèle existant. D'autres modèles tels que ceux de Bernard et al. (2009), Deschênes & Vande Wouwer (2016), Quinn et al. (2011) et Yuan et al. (2014) ont

déjà décrit l'effet de l'auto-ombrage sur la croissance des microalgues en raison de l'atténuation de la lumière dans les cultures denses. En outre, Ho et al. (2014) ont signalé qu'une optimisation de la source et de l'intensité lumineuse avait amélioré la productivité en lutéine chez *T. obliquus* de trois fois.

Enfin, d'autres modes de culture pourraient être explorés pour améliorer le rendement de la production de biomasse et des pigments. Bien que le mode continu (chémostat) soit une méthode courante d'opération en photobioréacteur, cette méthode présente l'inconvénient de vider la biomasse avec le flux de sortie continu. Pour éviter cette perte de biomasse, la culture en perfusion partielle pourrait être envisagée comme une alternative (Deschênes, 2007). Cette méthode de culture continue permet d'alimenter en continu le photobioréacteur en milieu frais et de retourner la plupart de la biomasse dans le flux de sortie au bioréacteur, ce qui permet d'obtenir des concentrations cellulaires plus élevées et un rendement en produits plus important tout en excluant le risque de lessivage des cellules dû à des taux de dilution trop élevés (Deschênes, 2007).



## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif général du présent ouvrage consiste à développer de nouveaux bioprocédés à partir de microalgues, en mettant l'accent sur leur application potentielle dans la production de molécules à haute valeur ajoutée via les pigments, notamment la lutéine ayant plusieurs applications nutritionnelles et pharmaceutiques. Le choix de la microalgue verte *T. obliquus* comme modèle d'étude s'est justifié par son potentiel pour la culture mixotrophe, qui permet de concilier la photosynthèse et la respiration aérobie tout en assimilant des sources de carbone organique et inorganique, ce qui se traduit généralement par une augmentation de la productivité en biomasse et une réduction de la durée du cycle de croissance (Salati *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2021). Toutefois, l'optimisation des conditions de culture reste une étape clé pour maximiser la production de biomasse et de lutéine. Dans cette perspective, les travaux présentés ont proposé des améliorations visant à optimiser la production de biomasse à haute densité cellulaire ainsi que de pigments chez la microalgue *T. obliquus* en mode mixotrophe, notamment en ce qui concerne la disponibilité des nutriments. Les quatre objectifs principaux étaient : 1) d'étudier les cinétiques de croissance de la microalgue en mode mixotrophe afin d'identifier les nutriments clés influençant la productivité en biomasse, optimiser la composition du milieu de culture pour approcher un optimum approximatif, et ainsi maximiser la productivité en biomasse, 2) d'élaborer des modèles cinétiques multifactoriels pour la croissance de *T. obliquus* en fonction de la quantité de nutriments disponibles, 3) d'élaborer des modèles cinétiques multifactoriels (à plusieurs facteurs/nutriments) pour la production de biomasse et de pigments (notamment la lutéine), 4) de conceptualiser des approches de contrôle automatique pour la production de biomasse microalgale et de pigments en utilisant les modèles mathématiques développés, et vérifier le potentiel d'application en photobioréacteurs grâce à des simulations en temps réel.

Le chapitre 2 a d'abord permis de relier le projet de maîtrise au projet de doctorat, en examinant l'influence de l'utilisation du perméat de lactosérum doux (SWP) comme source de carbone organique sur la croissance mixotrophe de la microalgue *T. obliquus* et la production de l'enzyme de type  $\beta$ -galactosidase. Cette étude s'inscrit dans une optique d'optimisation de l'utilisation de ce rejet industriel hautement polluant mais à faible coût, dans une perspective de valorisation accrue. Les résultats de cette étude ont montré que la substitution partielle du milieu de culture de base avec du SWP (à hauteur de 60% v/v) améliore significativement la croissance de *T. obliquus* ainsi que la production totale d'enzymes, tandis que l'utilisation de 100% (v/v) de SWP n'est pas rentable en raison de la carence de certains nutriments essentiels. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes de croissance des microalgues et ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement d'une industrie durable et respectueuse de l'environnement.

Dans le chapitre 3, une approche expérimentale de Taguchi a été utilisée pour optimiser la production de biomasse de la microalgue *T. obliquus* en conditions mixotrophes. Huit nutriments/facteurs importants, choisis en se basant sur la littérature et sur des résultats préliminaires, ont été étudiés : le glucose, le nitrate, le phosphate, le sulfate, le magnésium, le fer, le manganèse et le calcium. L'effet de ces nutriments et de leurs interactions sur la production de biomasse a été étudié en utilisant la méthode de Taguchi, un outil robuste pour l'optimisation de la conception expérimentale. Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide de techniques statistiques pour déterminer la composition optimale du milieu de culture qui maximisera la production de biomasse de cette microalgue. Les conditions expérimentales optimales globales ont été fournies, permettant d'obtenir des rendements en biomasse multipliés par 4, avec un maximum d'environ  $7,98 \text{ g.L}^{-1}$ , l'un des rendements les plus élevés signalés pour cette espèce. Les résultats ont également montré que le nitrate avait l'effet le plus significatif, tandis que le fer et le phosphate ont montré une forte influence sur les cultures à court terme et que le glucose et le calcium ont eu plus d'impact sur les cultures à long terme. Ces résultats sont importants pour le développement de la culture de microalgues à grande échelle, car ils fournissent des

informations précieuses sur les nutriments nécessaires pour maximiser la production de biomasse de *T. obliquus* en conditions mixotrophes. En outre, cette étude montre l'efficacité de la méthode de Taguchi pour l'optimisation de la conception expérimentale, qui peut être appliquée à d'autres systèmes biologiques pour améliorer leur performance.

Le chapitre 4 a décrit une méthode innovante de développement d'un modèle mathématique réaliste de production de biomasse de microalgues *T. obliquus* en conditions mixotrophes, en mettant l'accent sur les concentrations de nutriments dans le milieu. Cette approche expérimentale a utilisé pour la première fois la méthode de Taguchi pour concevoir un ensemble de données efficace pour le développement d'un modèle mathématique réaliste prenant en compte plusieurs facteurs/nutriments. Sur la base des résultats antérieurs présentés dans le chapitre 3, trois facteurs/nutriments critiques pour la croissance (nitrate, phosphate et fer) ont été sélectionnés pour une matrice expérimentale L16 ( $4^3$ ) comportant 16 variations. Chaque nutriment a été réglé à quatre niveaux de fonctionnement, avec des concentrations équivalentes de 1×, 2×, 5× et 10× BBM. Les avantages de la production de biomasse microalgale en conditions mixotrophes ont été exploités avec succès en utilisant le glucose ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) comme source de carbone organique. Le modèle final comprend cinq variables d'état et neuf paramètres, ayant chacun de très petits intervalles de confiance à 95% et des erreurs relatives inférieures à 5%. La validation du modèle a montré une grande fiabilité avec des valeurs de corrélation  $R^2$  comprises entre 0,77 et 0,99, suggérant que le modèle proposé puisse éventuellement servir à la commande de processus. Des suggestions d'améliorations ont été proposées à la fin du chapitre pour améliorer le modèle cinétique multifactoriel.

Dans le chapitre 5, nous avons réussi à développer un modèle cinétique multifactoriel complexe pour caractériser l'impact de trois nutriments critiques (nitrate, phosphate et glucose) sur la croissance et la production de lutéine de *T. obliquus* en flacons agités. Le modèle intègre sept variables d'état et treize paramètres inconnus, qui ont été estimés à l'aide d'une conception expérimentale unique impliquant des variations d'un facteur dix sur les concentrations de nitrate et de phosphate, ainsi qu'une combinaison de techniques

d'optimisation de moindres carrés non linéaires, de fonctions objectives et de contraintes. Les résultats ont indiqué que les valeurs estimées des paramètres étaient en grande partie cohérentes, suggérant une large applicabilité du modèle. L'augmentation de la concentration initiale de nitrate a significativement augmenté la production de biomasse et de lutéine jusqu'à 4 et 12 fois respectivement. Les résultats de validation ont démontré la capacité du modèle à prédire avec précision les profils de concentration dynamiques pour toutes les expériences de validation à travers divers régimes de concentration de nitrate et de phosphate. Enfin, les résultats obtenus dans ce chapitre démontrent la pertinence de l'approche pour la modélisation de la croissance et la production de métabolites d'intérêt par d'autres espèces de microalgues, ainsi que le potentiel pour la mise en place de stratégies de contrôle en temps réel de ces quantités en photobioréacteurs.

Le chapitre 6 de cette thèse a porté sur la conceptualisation d'approches de contrôle automatique pour maximiser la production de biomasse microalgale et de pigments (lutéine) en utilisant des modèles mathématiques adaptés au mode continu de culture. Ainsi, des simulations numériques ont été conduites à l'aide du logiciel Simulink MATLAB. Le choix du mode de culture continu a été déterminé par la volonté d'évaluer les capacités maximales du système en termes de production, sur une durée indéterminée, par une éventuelle stratégie de contrôle automatique du photobioréacteur. Les simulations ont montré que des productivités maximales en biomasse et en lutéine ont été atteintes après seulement 4 à 4,5 jours de culture, avec des concentrations maximales en continu de  $4,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et de  $6,70 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  respectivement. Ces productivités représentent l'un des résultats les plus élevés signalés pour la microalgue *T. obliquus* en mode continu. L'étude a également démontré l'impact significatif de la concentration en nitrate sur la productivité de la microalgue.

La thèse représente une avancée substantielle dans le domaine de la culture des microalgues, offrant un précieux guide méthodologique pouvant être étendu à diverses espèces de microalgues, notamment celles qui utilisent la mixotrophie. Des travaux futurs, relativement à l'amélioration de la production de biomasse et de pigments chez les

microalgues en photobioréacteurs, pourront consister à une validation expérimentale de la culture mixotrophe en photobioréacteurs, suivie par le développement et l'évaluation d'une stratégie de contrôle en mode continu face à diverses perturbations et variations de paramètres. L'intégration de l'impact de la lumière et de l'auto-ombrage dans le modèle multiplicatif doit être priorisée pour une meilleure compréhension de leur influence sur la production de biomasse et de pigments. Enfin, l'exploration de modes de culture alternatifs tels que la culture en perfusion partielle pourrait être envisagée pour optimiser le rendement de production tout en évitant les pertes de biomasse associées au mode continu.

## ANNEXE A

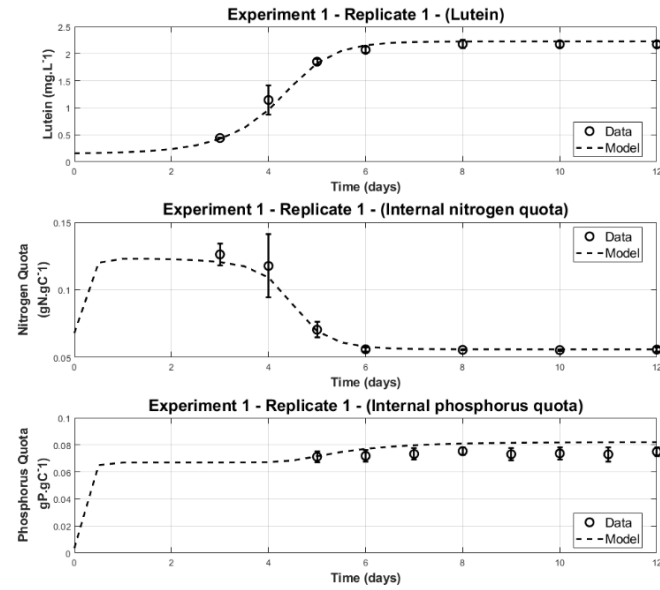
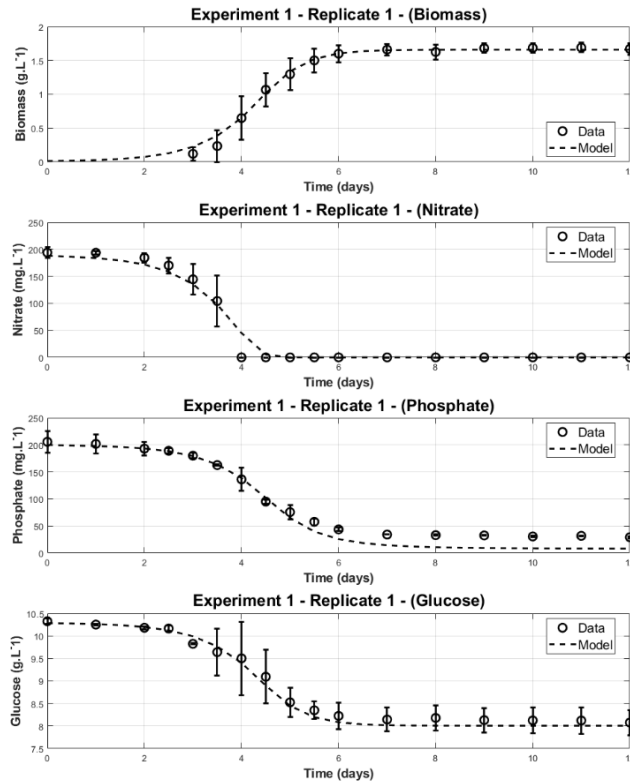
Cette annexe est une extension du chapitre 5 de la thèse et vise à présenter de manière détaillée les résultats complets de calibration et de validation de notre modèle. Nous avons effectué 12 expériences de calibration et 4 expériences de validation pour différents niveaux initiaux de nitrate, en mesurant la biomasse, la lutéine, le glucose, le nitrate, le phosphate et les quotas internes d'azote et de phosphore. Les résultats sont présentés sous forme de duplicata avec les écarts-types correspondants ( $n = 2$ ), pour une meilleure précision et une évaluation plus fiable des performances de notre modèle.

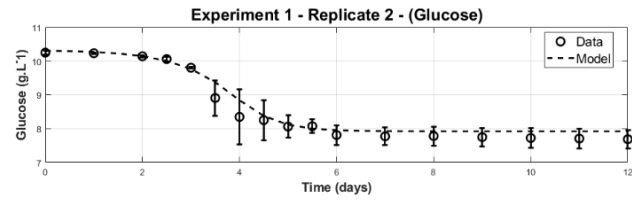
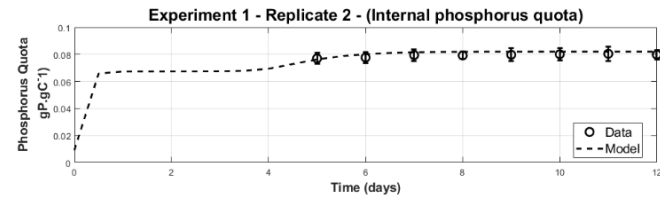
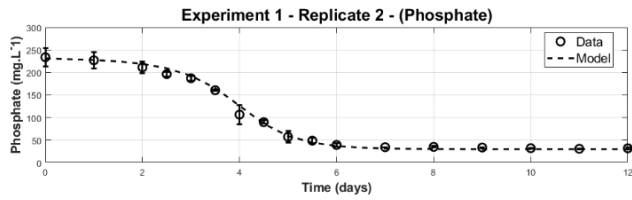
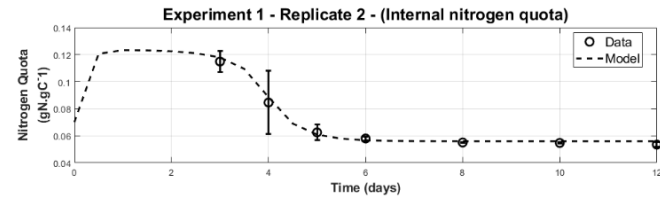
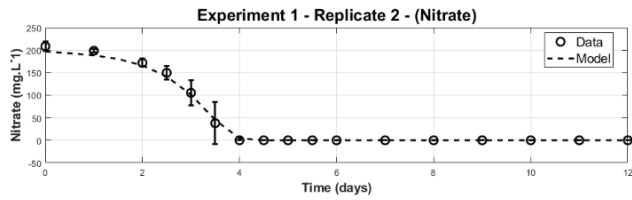
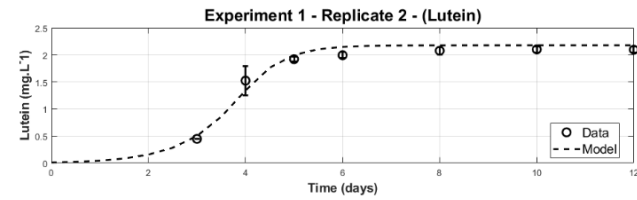
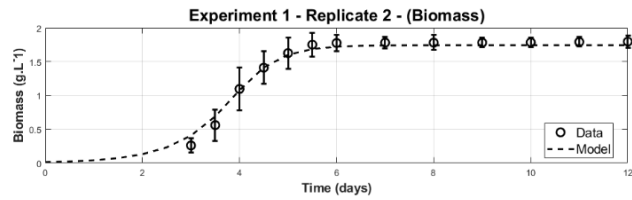
### 1. Calibration

**Figure S.1** Résultats individuels en duplicata des 12 expériences de calibration (niveaux de nitrate et de phosphate présentés dans le Tableau 5.3) pour la biomasse, la lutéine, le glucose, le nitrate, le phosphate et les quotas internes d'azote et de phosphore. Les simulations du modèle sont représentées par les lignes pointillées et les cercles représentent les résultats expérimentaux. Les résultats sont présentés avec leur écart-type ( $n = 2$ ) pour chaque expérience.

1

### Expérience 1 en duplicata : nitrate = 1× BBM ; phosphate = 1× BBM

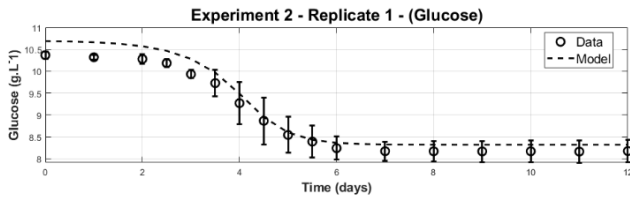
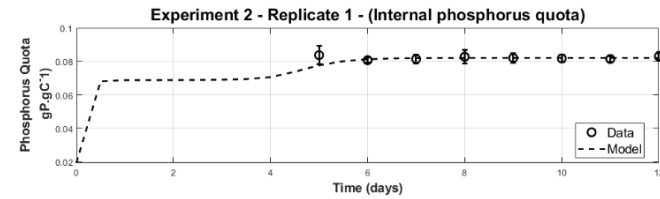
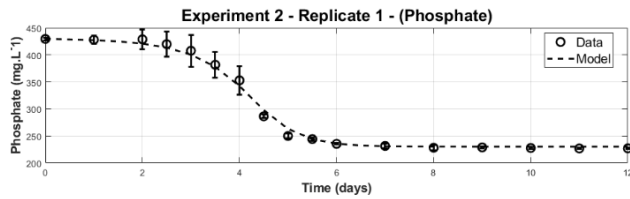
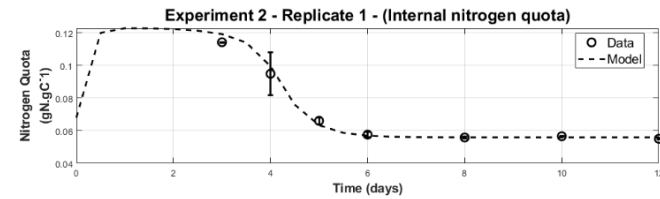
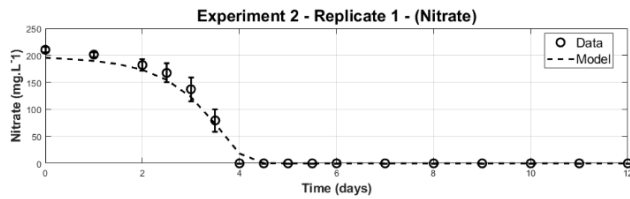
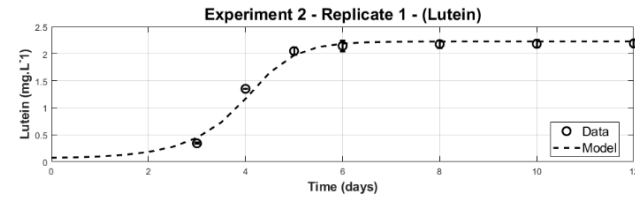
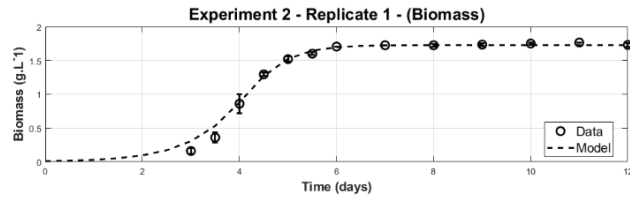


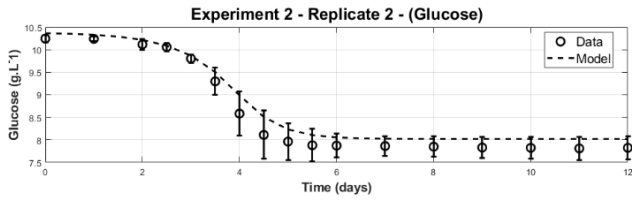
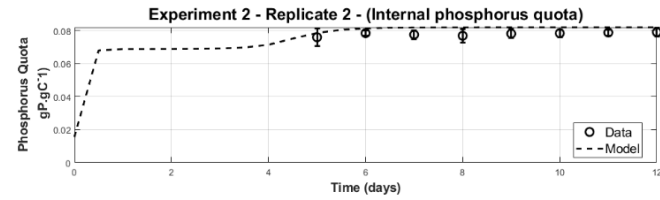
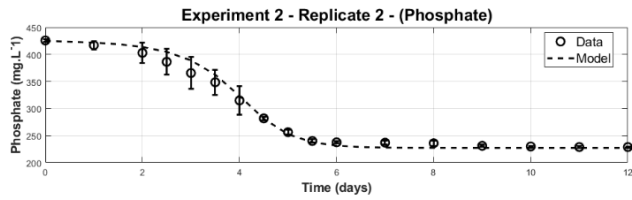
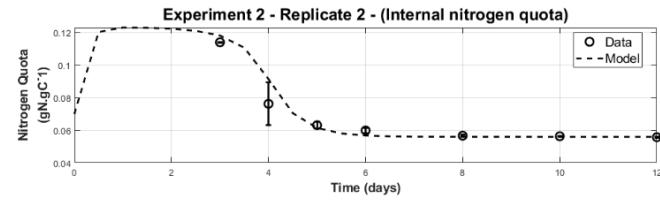
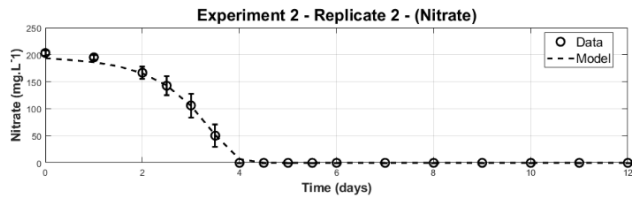
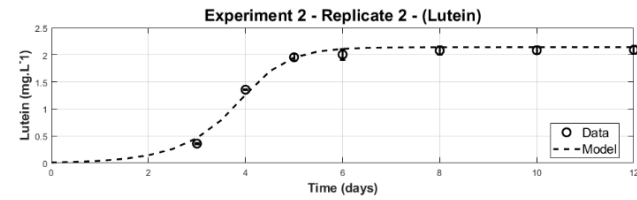
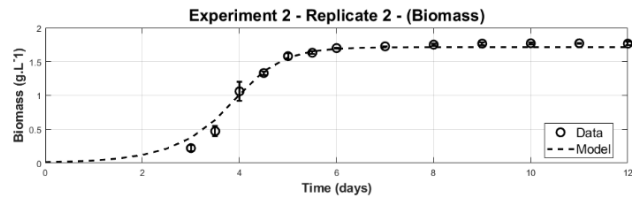




2

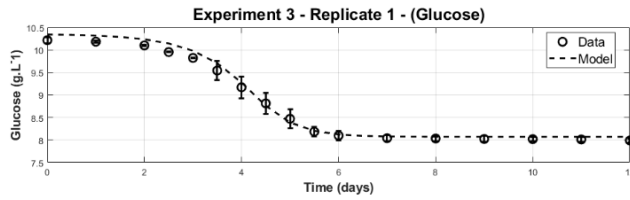
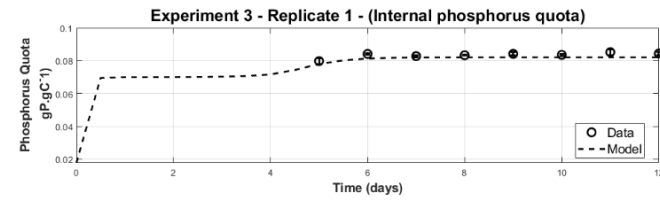
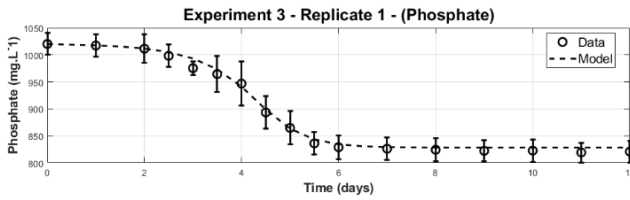
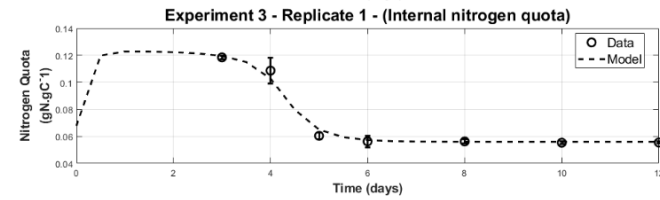
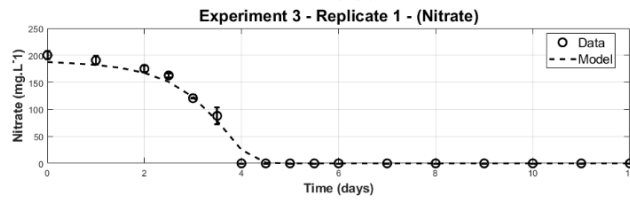
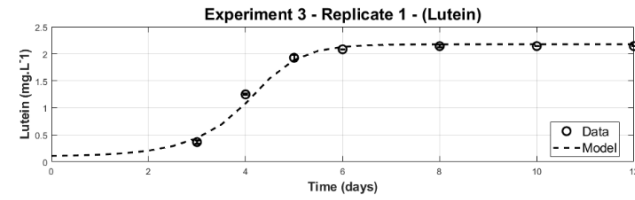
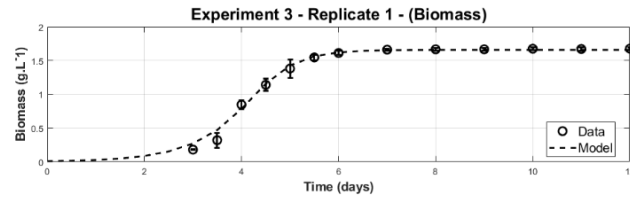
## Expérience 2 en duplicata : nitrate = 1× BBM ; phosphate = 2× BBM

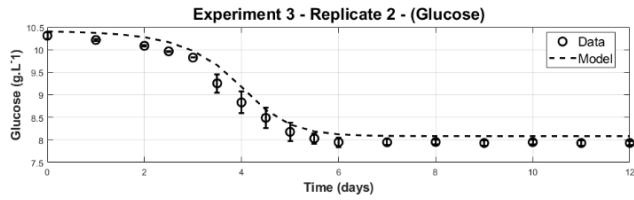
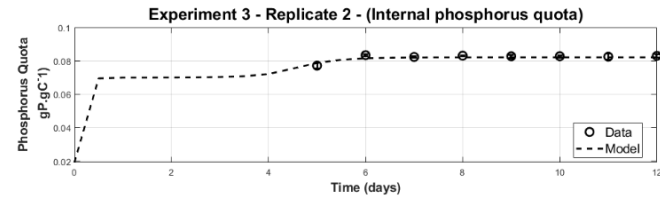
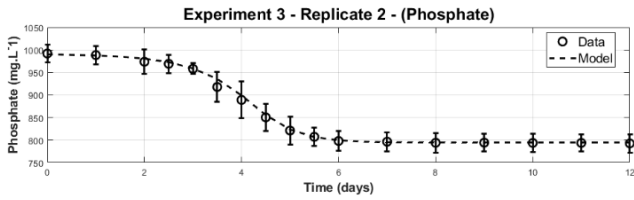
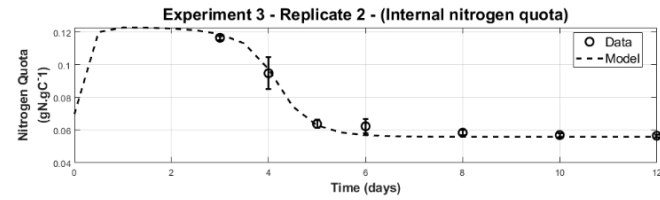
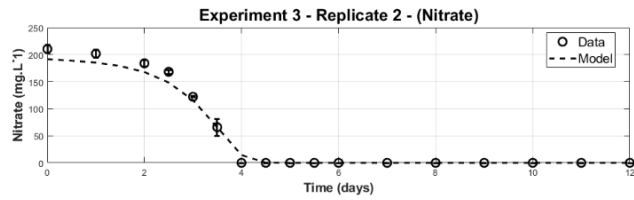
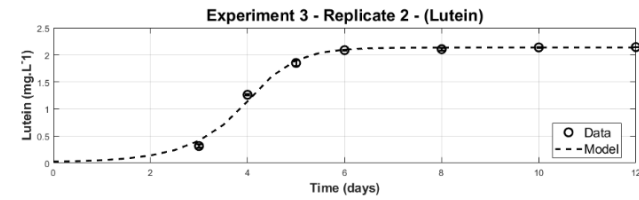
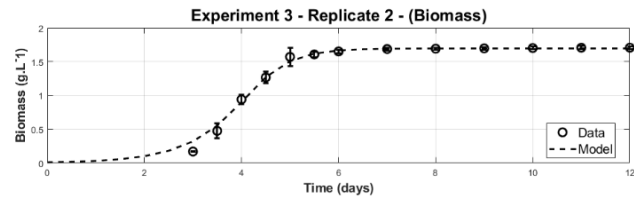




3

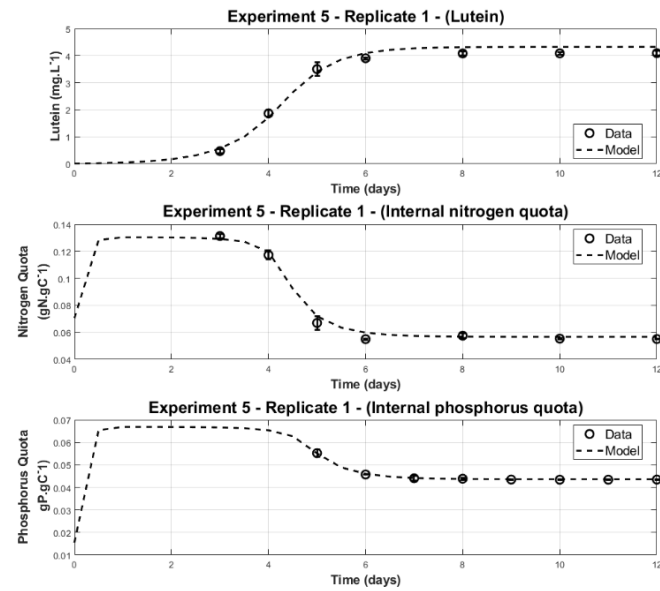
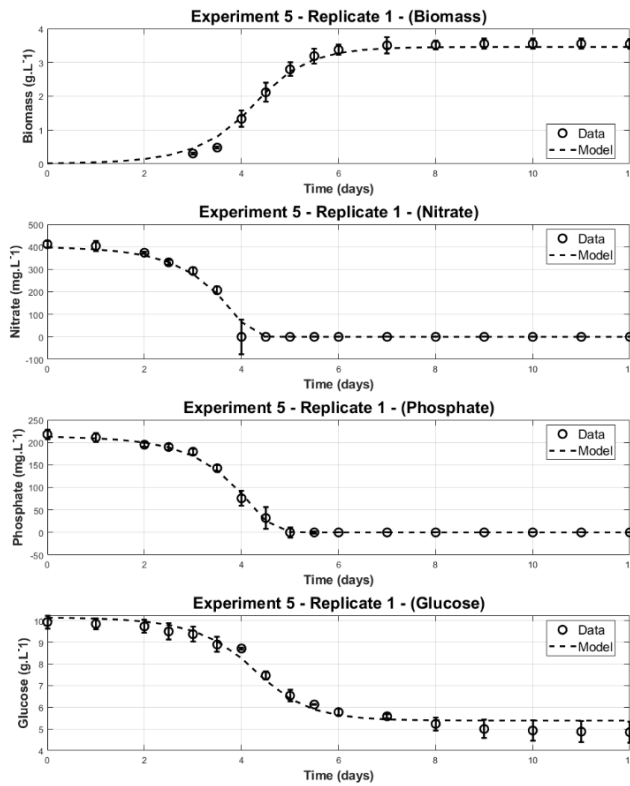
Expérience 3 en duplicata : nitrate = 1× BBM ; phosphate = 3× BBM

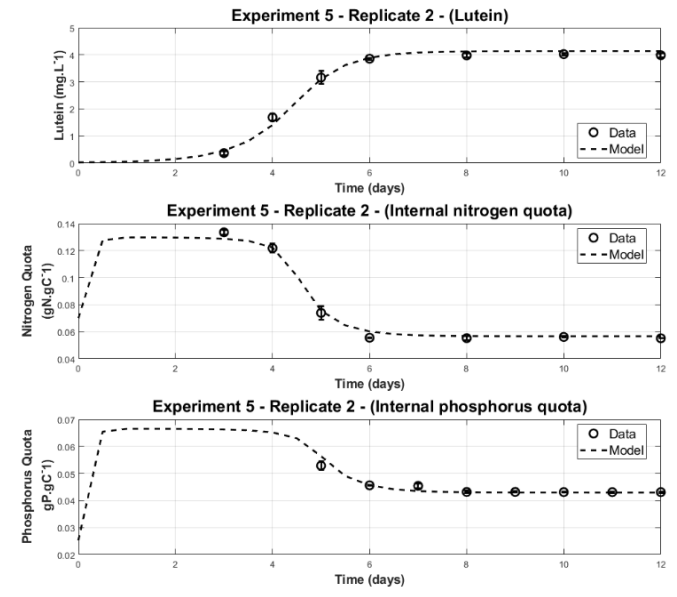
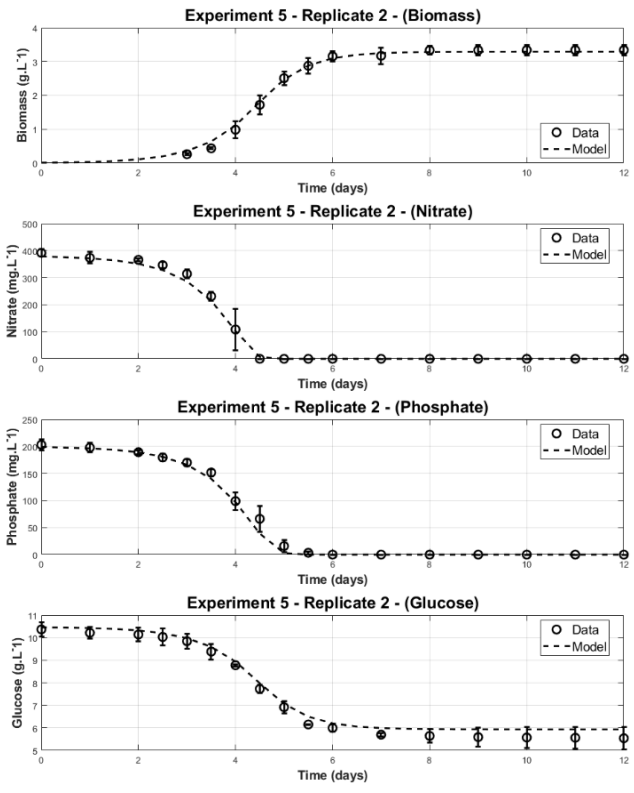




4

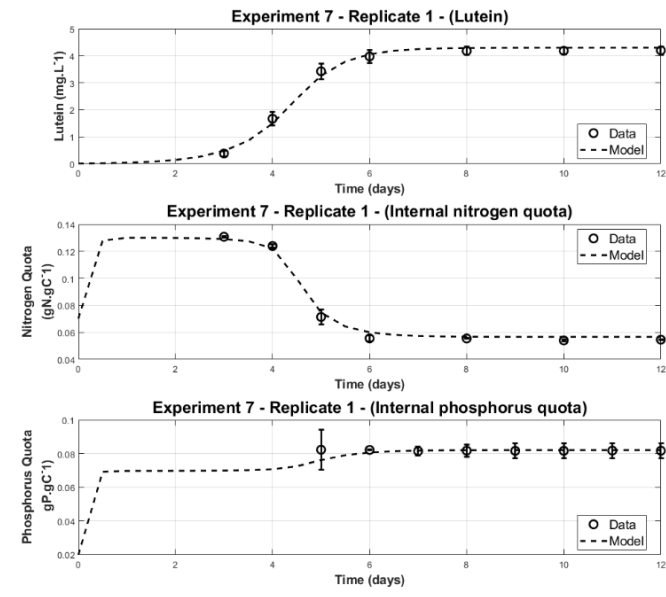
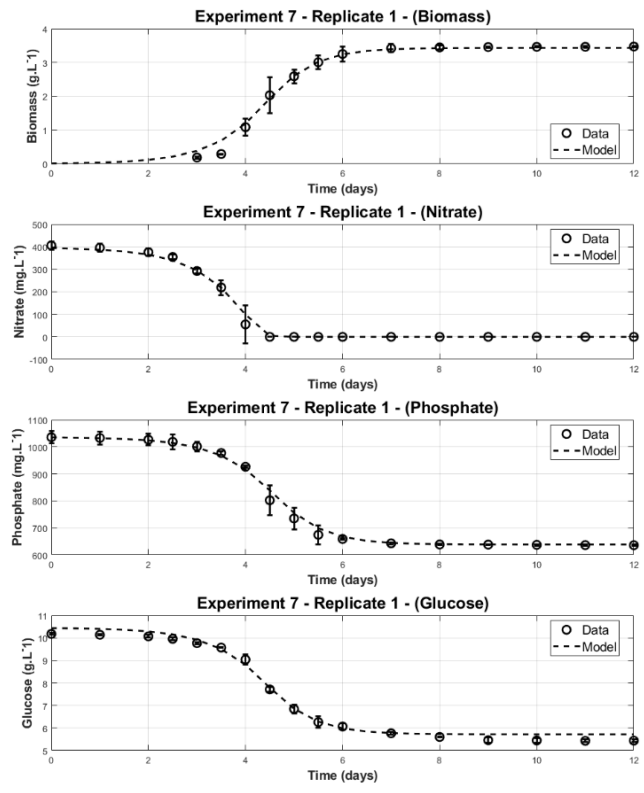
### Expérience 5 en duplicata : nitrate = 2× BBM ; phosphate = 1× BBM

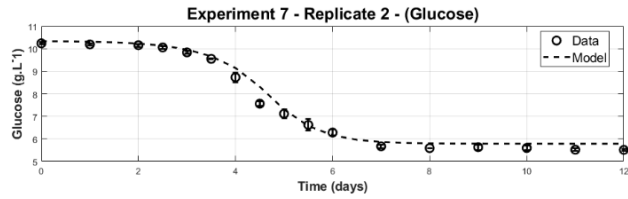
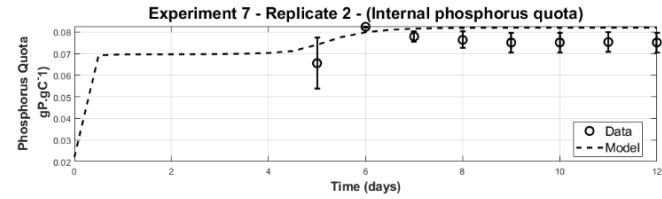
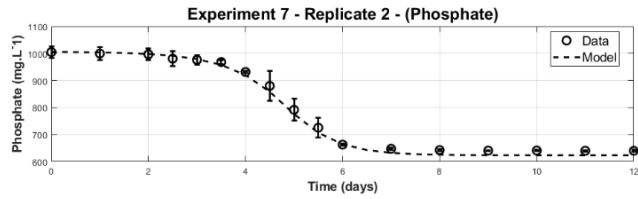
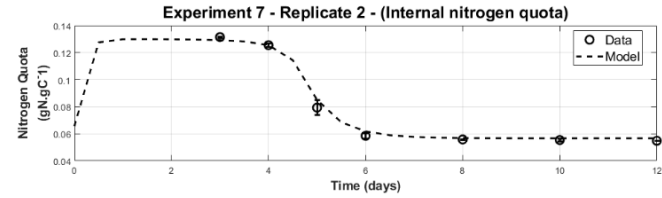
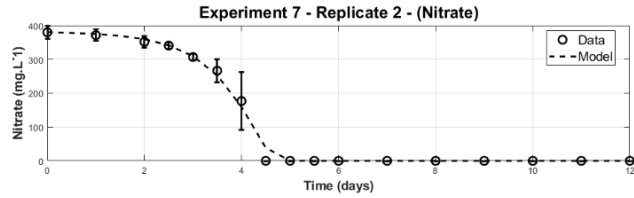
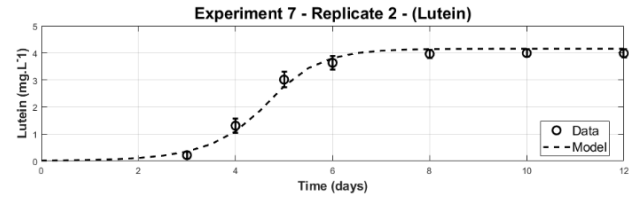
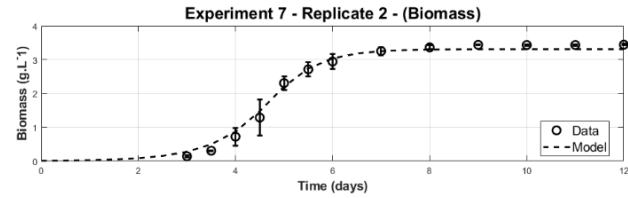




5

### Expérience 7 en duplicata : nitrate = 2× BBM ; phosphate = 3× BBM

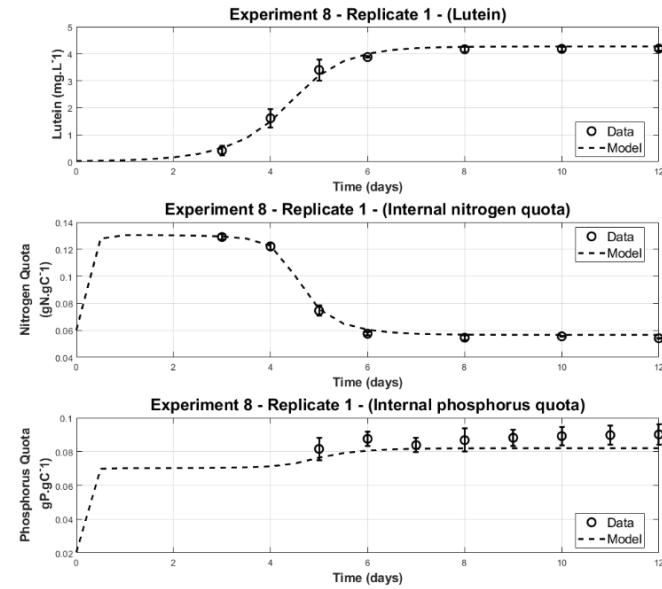
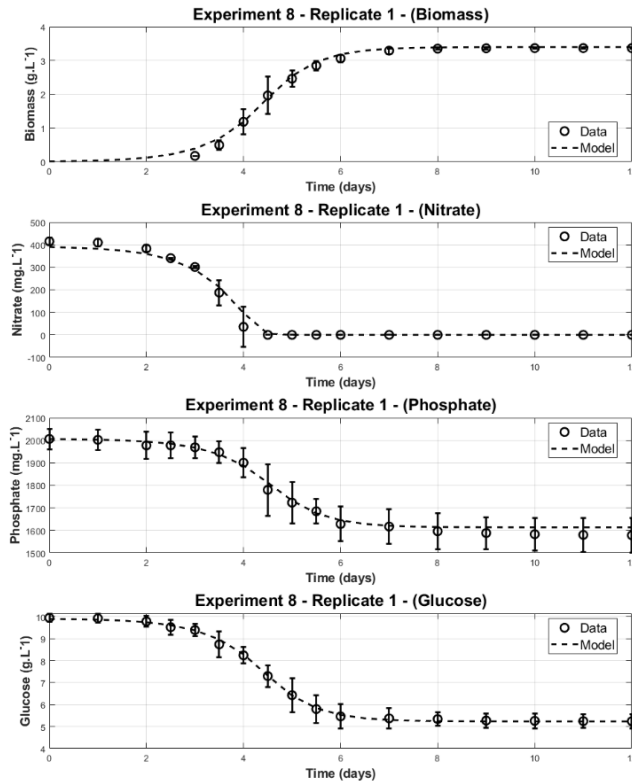


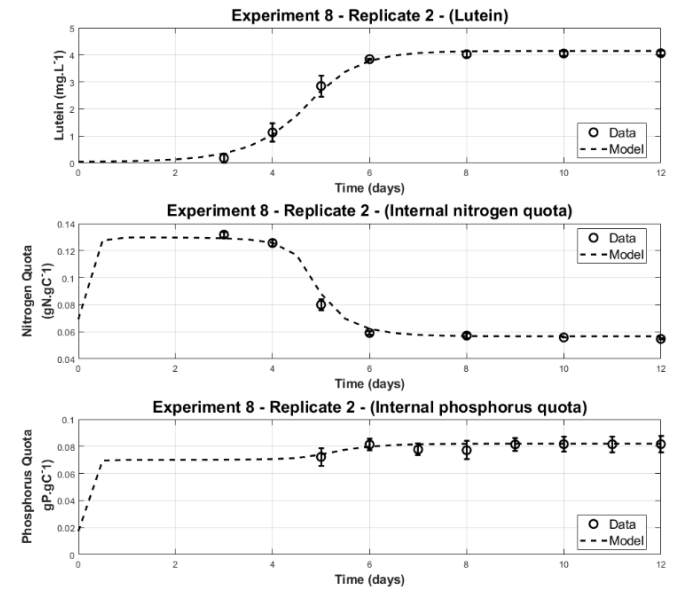
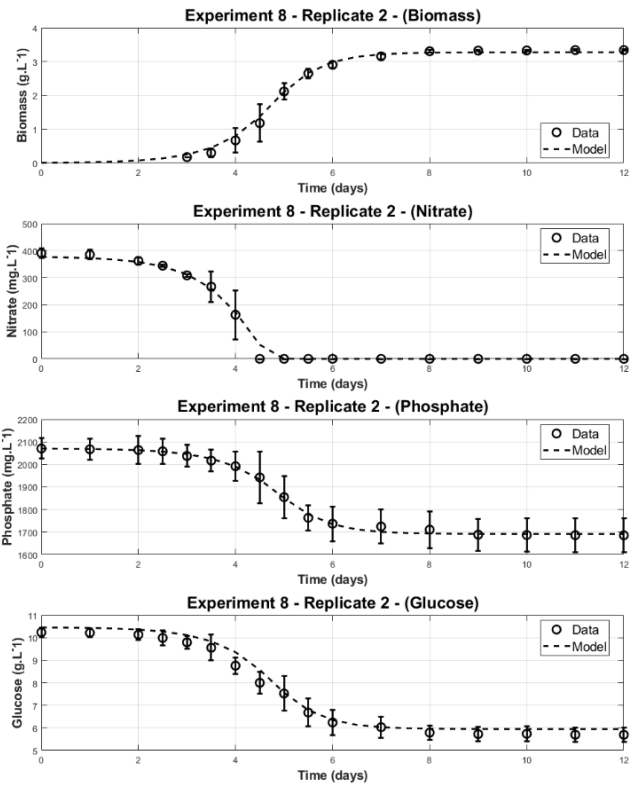




6

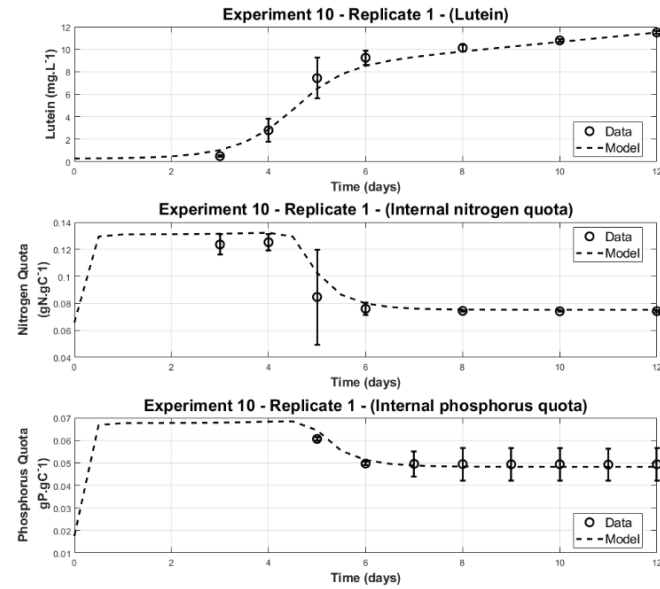
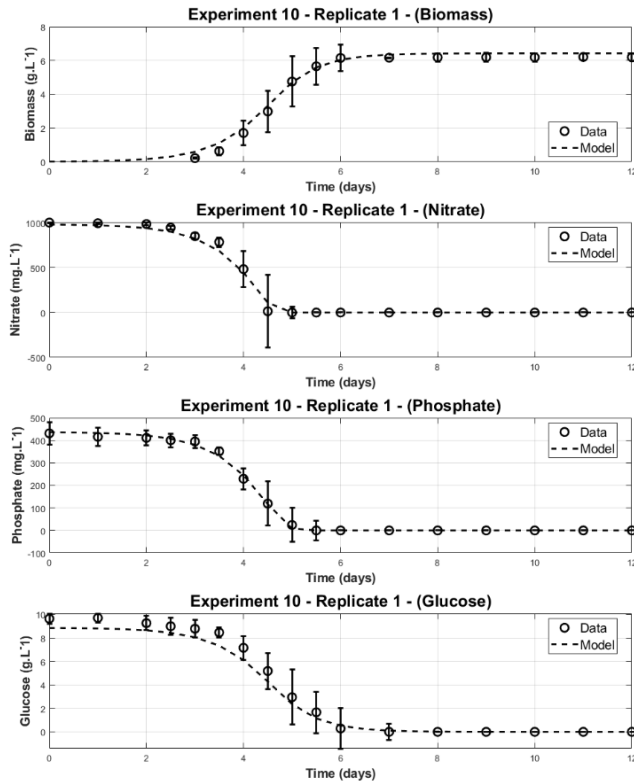
Expérience 8 en duplicata : nitrate = 2× BBM ; phosphate = 4× BBM

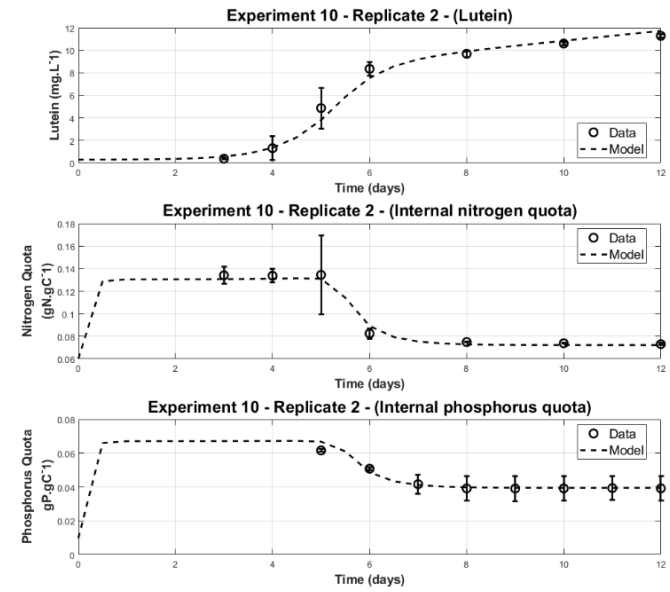
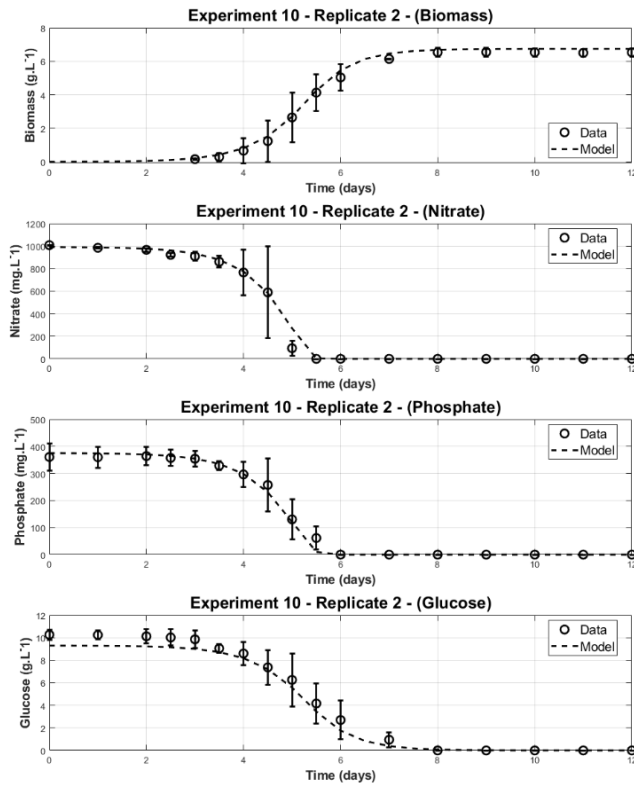




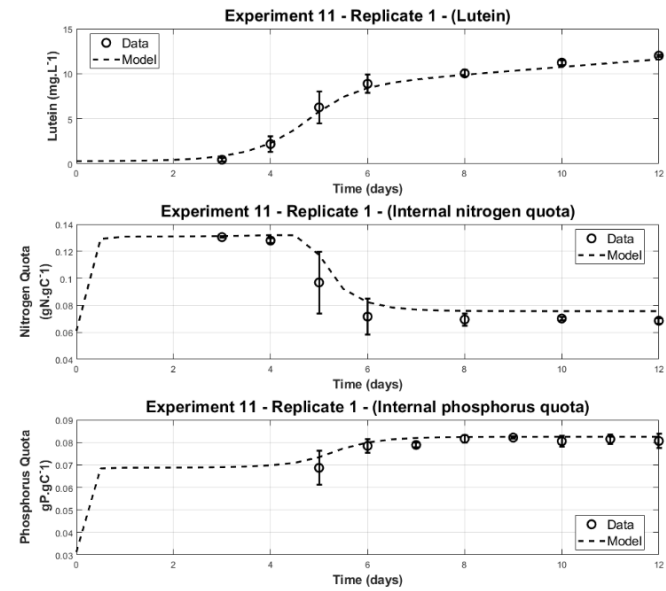
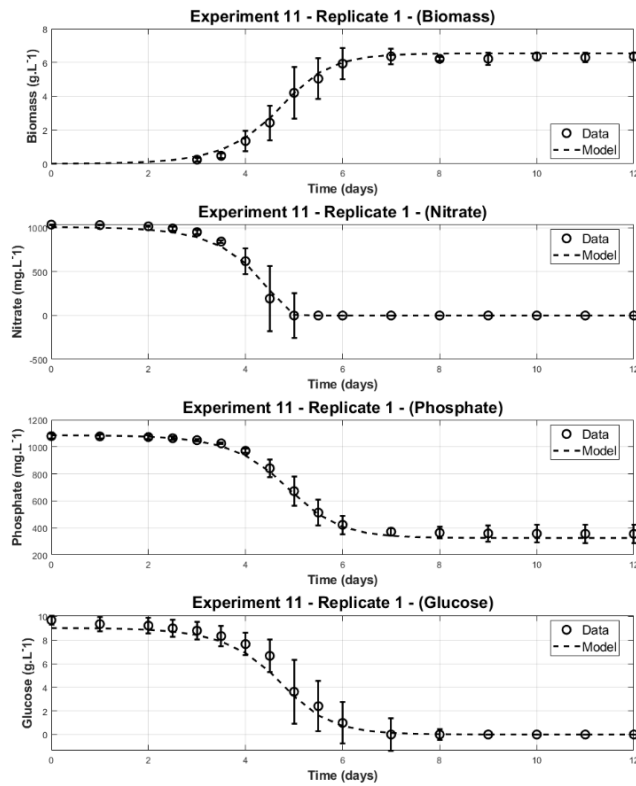
7

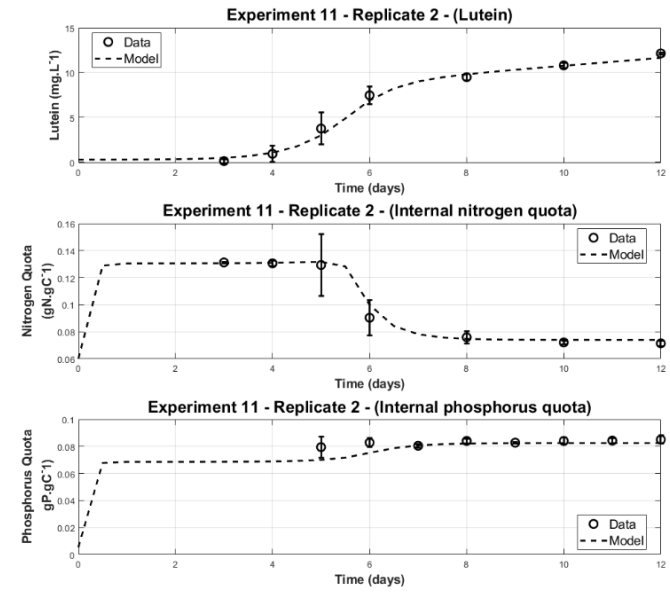
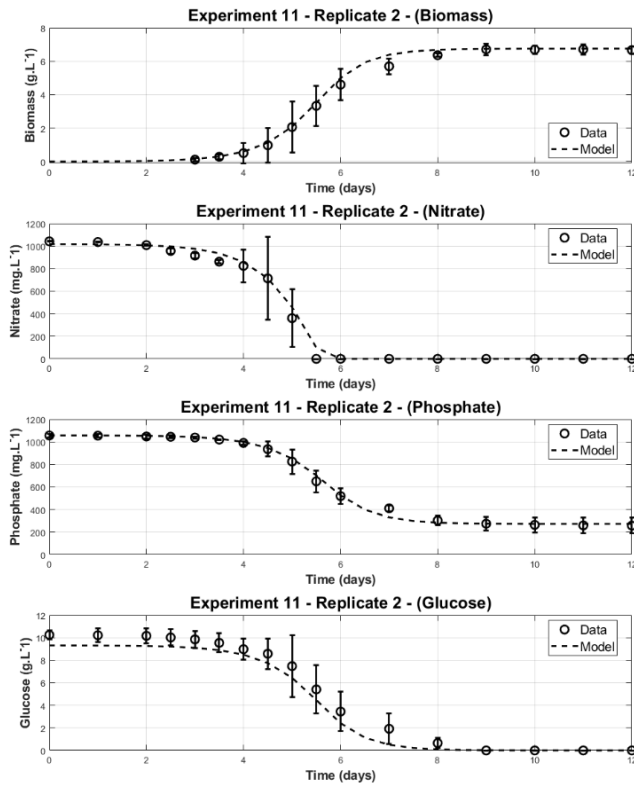
### Expérience 10 en duplicata : nitrate = 3× BBM ; phosphate = 2× BBM





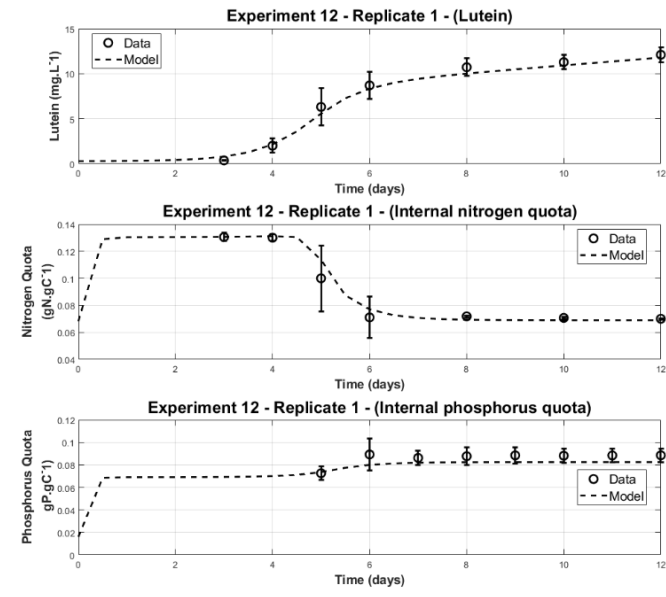
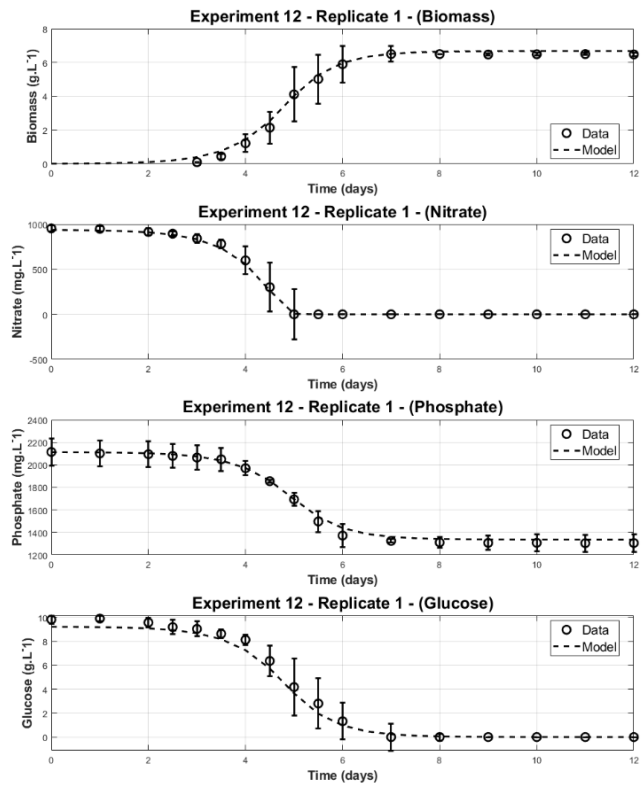
## Expérience 11 en duplicata : nitrate = 3× BBM ; phosphate = 3× BBM

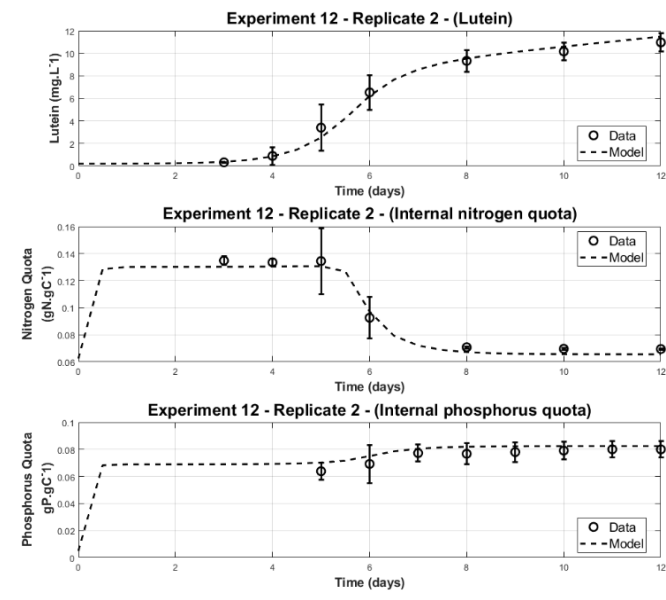
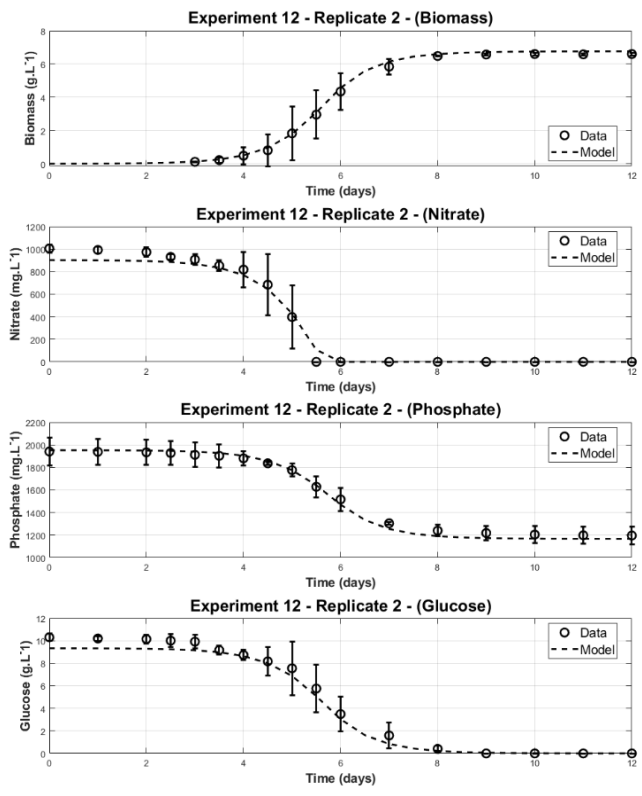




9

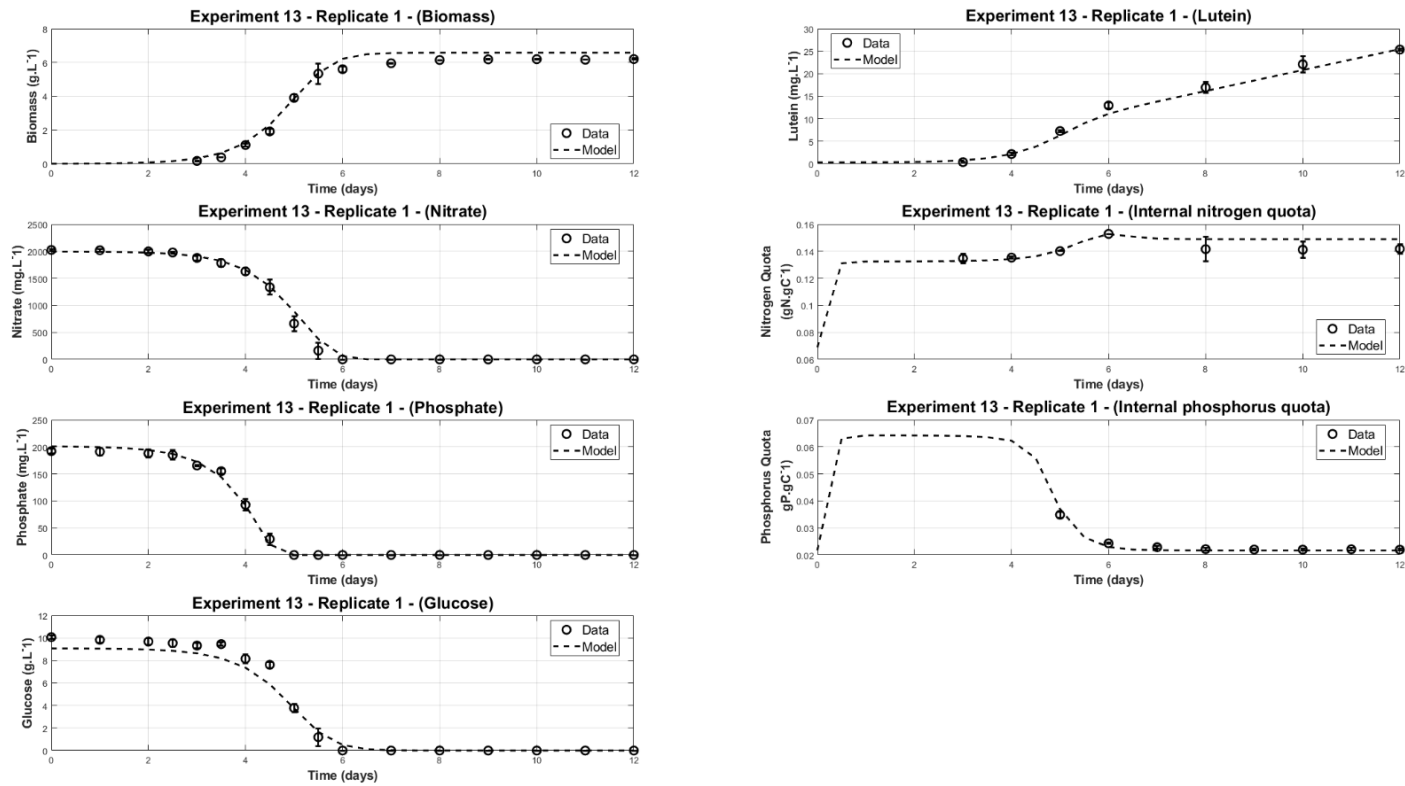
Expérience 12 en duplicata : nitrate = 3× BBM ; phosphate = 4× BBM

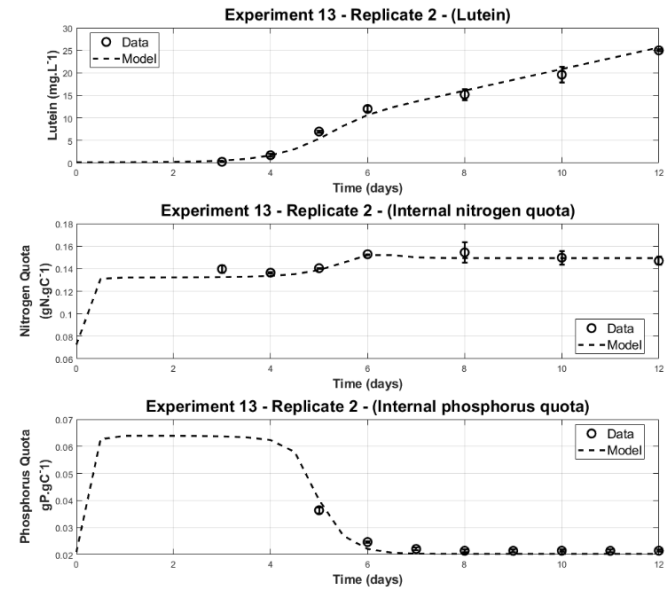
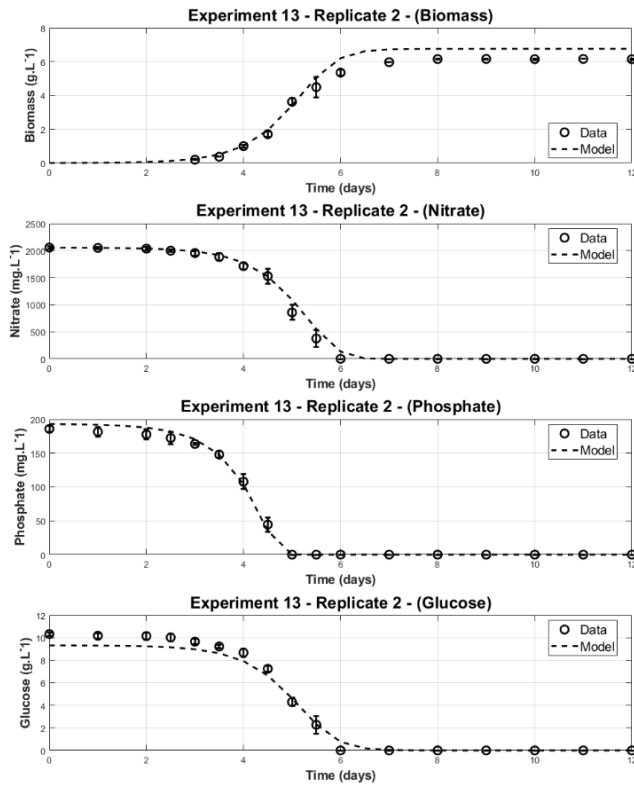




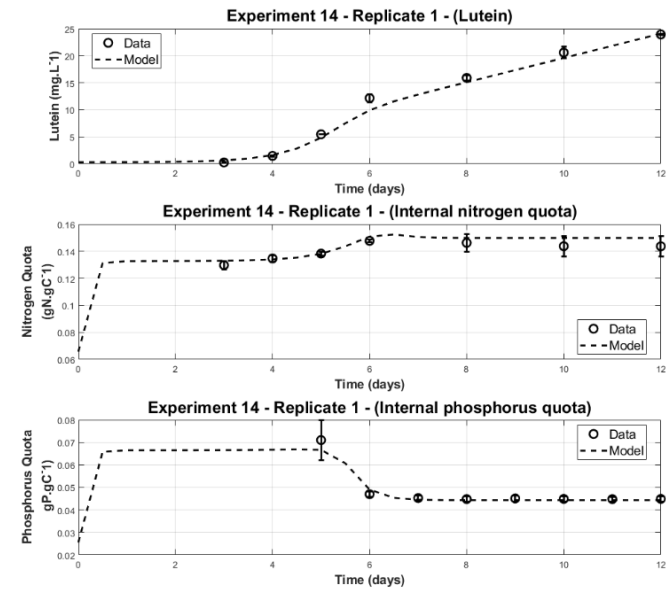
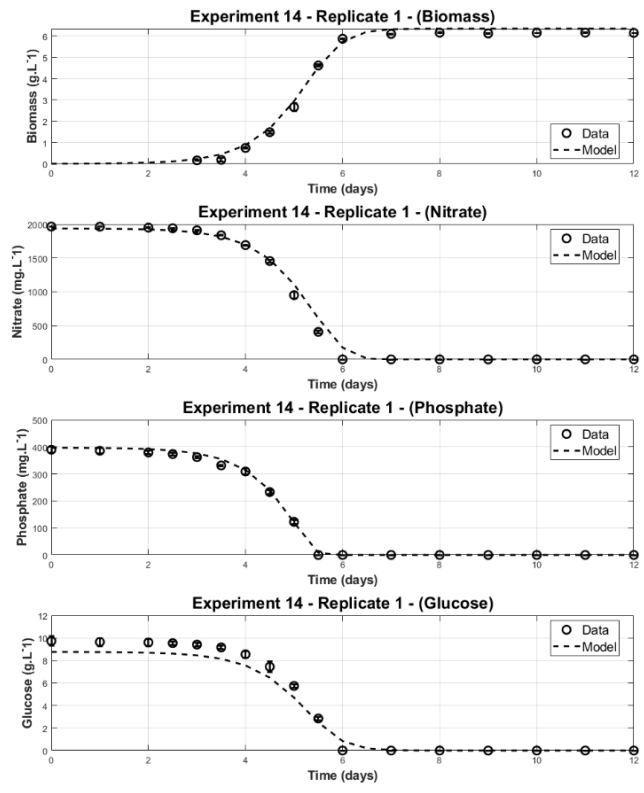


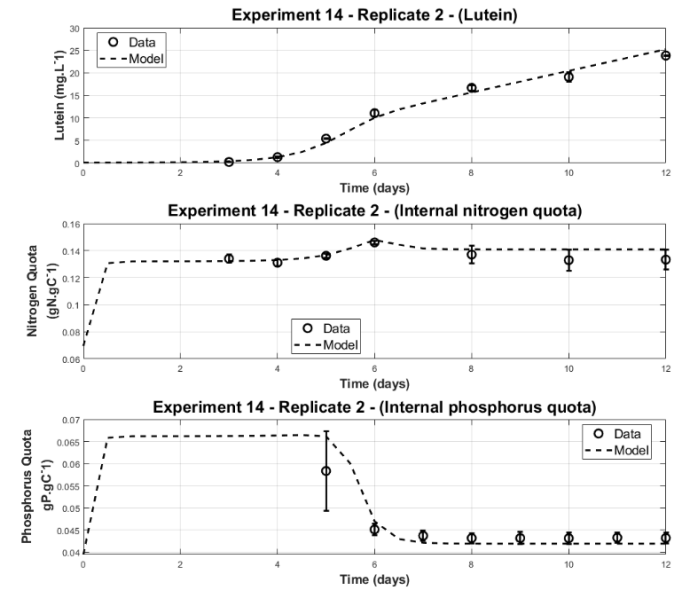
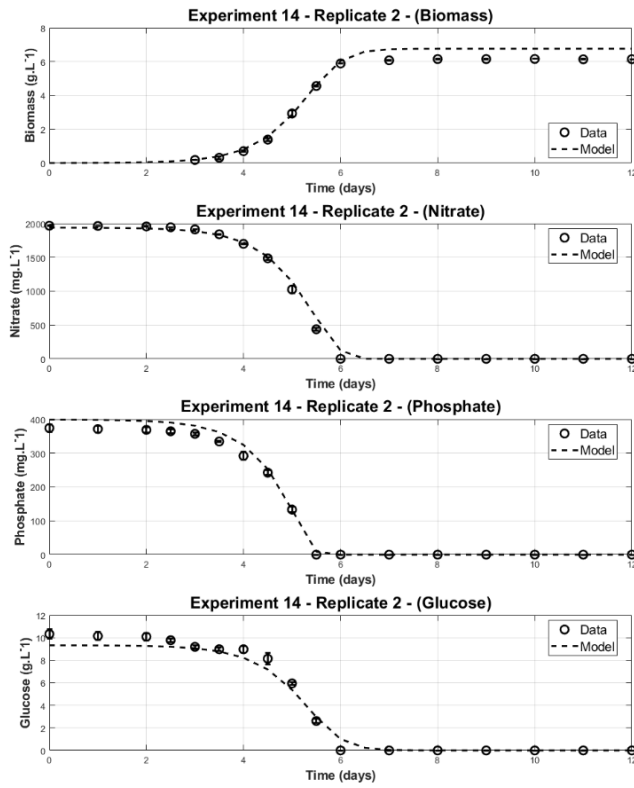
Expérience 13 en duplicata : nitrate = 4× BBM ; phosphate = 1× BBM



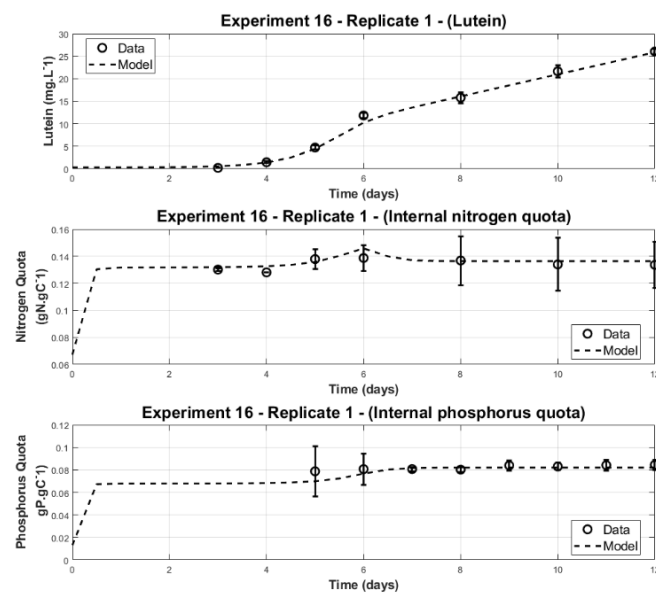
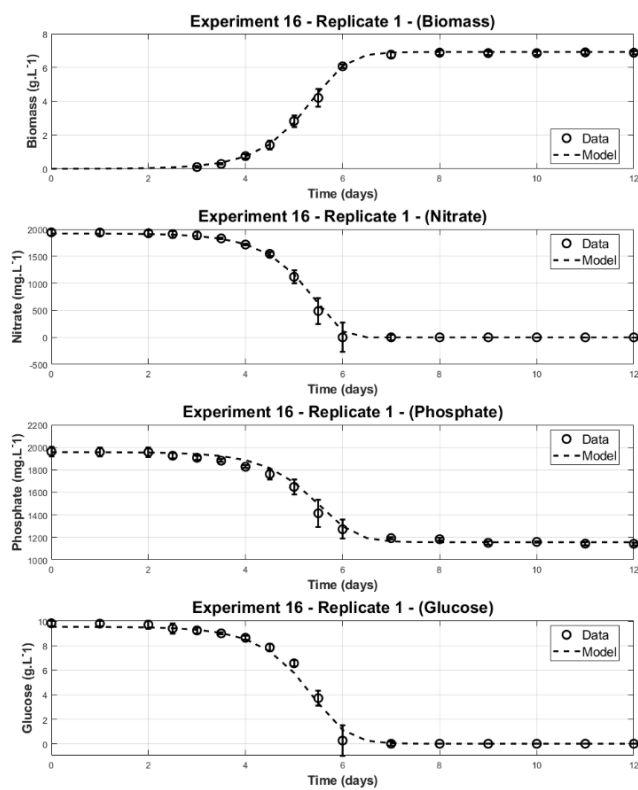


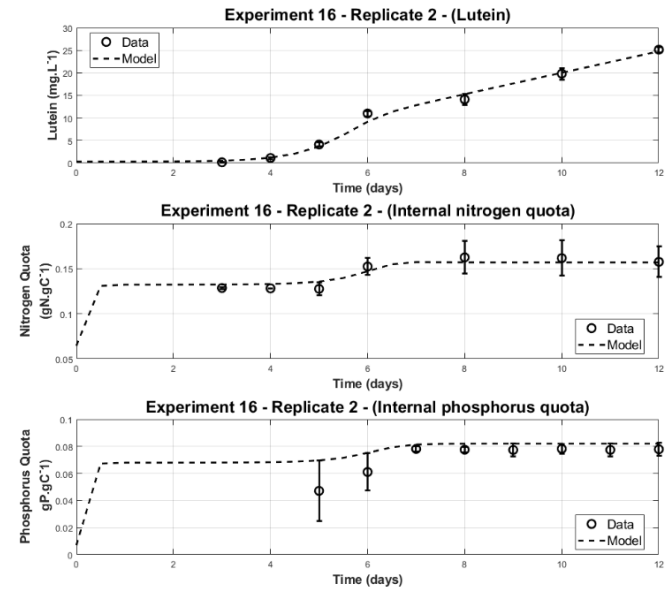
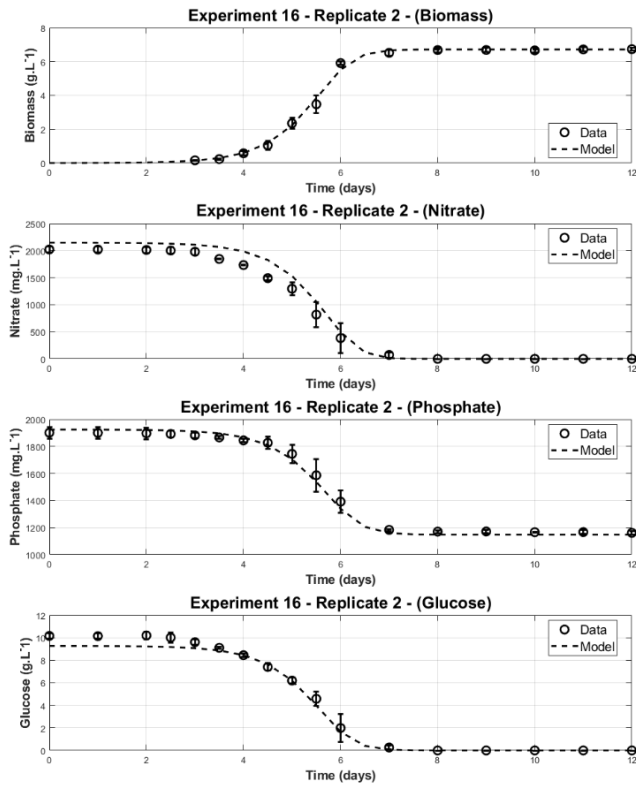
Expérience 14 en duplicata : nitrate = 4× BBM ; phosphate = 2× BBM





## Expérience 16 en duplicata : nitrate = 4× BBM ; phosphate = 4× BBM



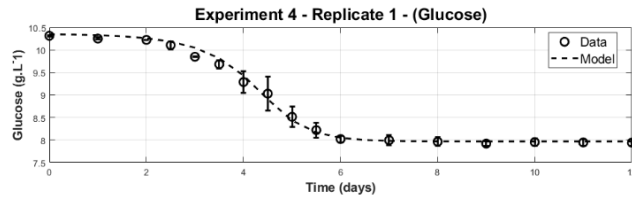
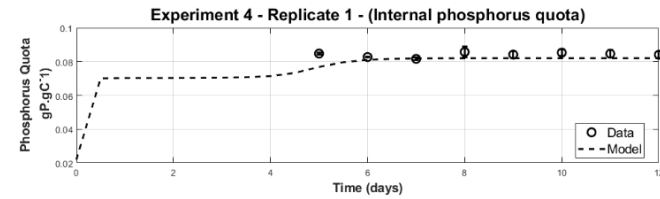
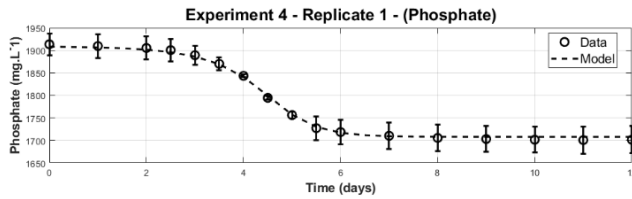
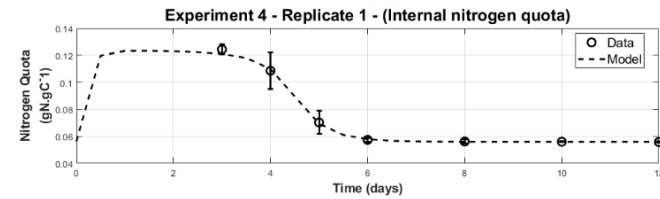
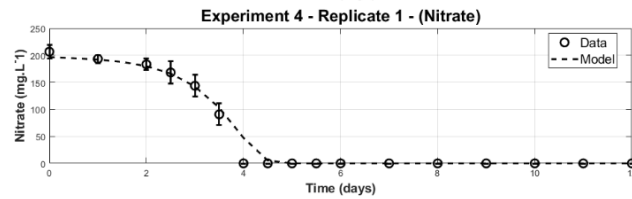
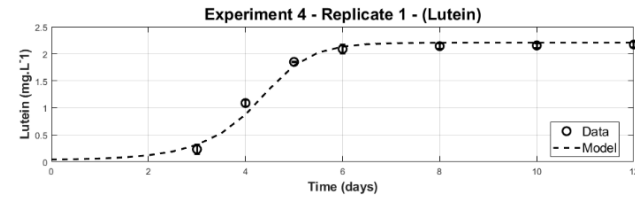
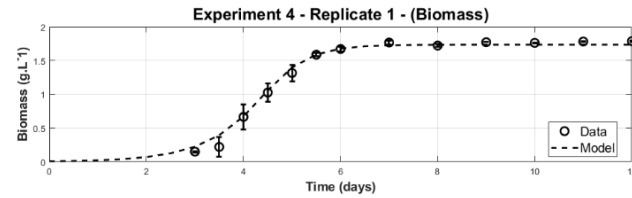


## 2. Validation

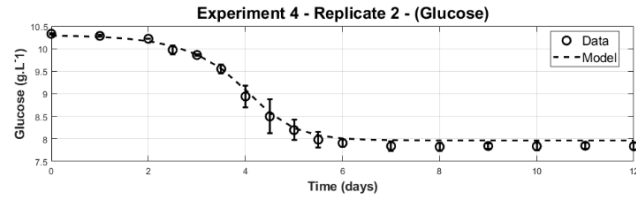
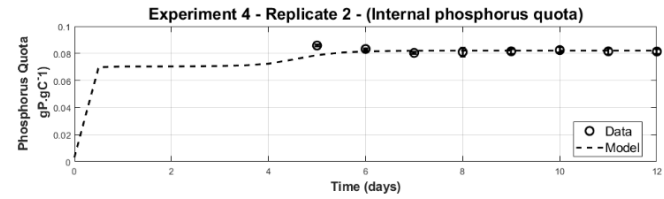
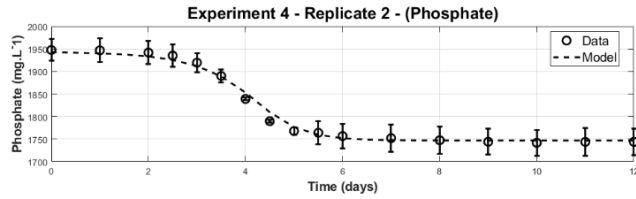
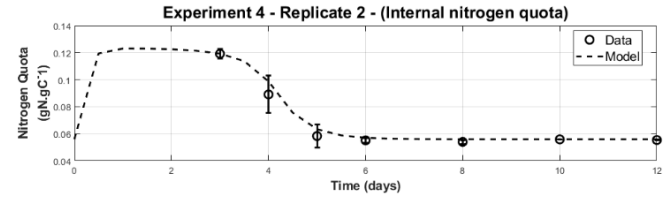
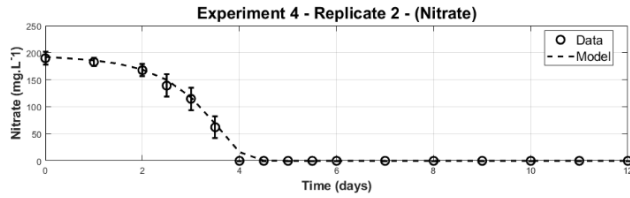
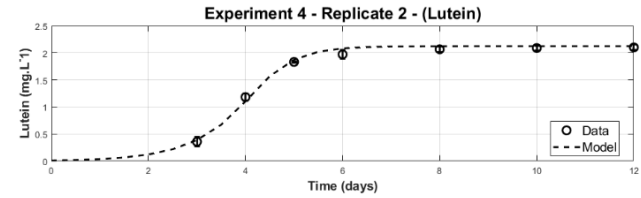
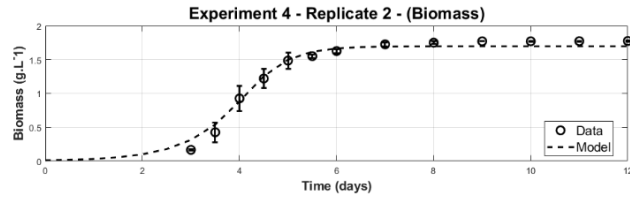
**Figure S.2** Résultats individuels en duplicata des 4 expériences de validation (niveaux de nitrate et de phosphate présentés dans le Tableau 5.3) pour la biomasse, la lutéine, le glucose, le nitrate, le phosphate et les quotas internes d'azote et de phosphore. Les simulations du modèle sont représentées par les lignes pointillées et les cercles représentent les résultats expérimentaux. Les résultats sont présentés avec leur écart-type ( $n = 2$ ) pour chaque expérience.

1

## Expérience 4 en duplicata : nitrate = 1× BBM ; phosphate = 4× BBM

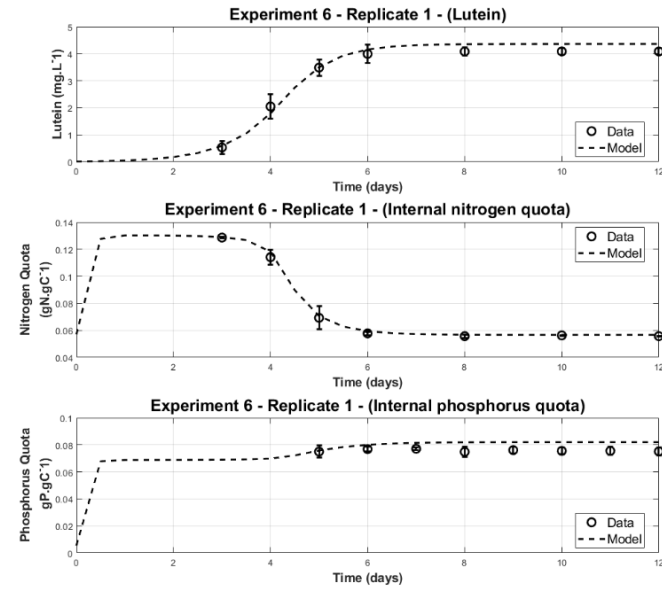
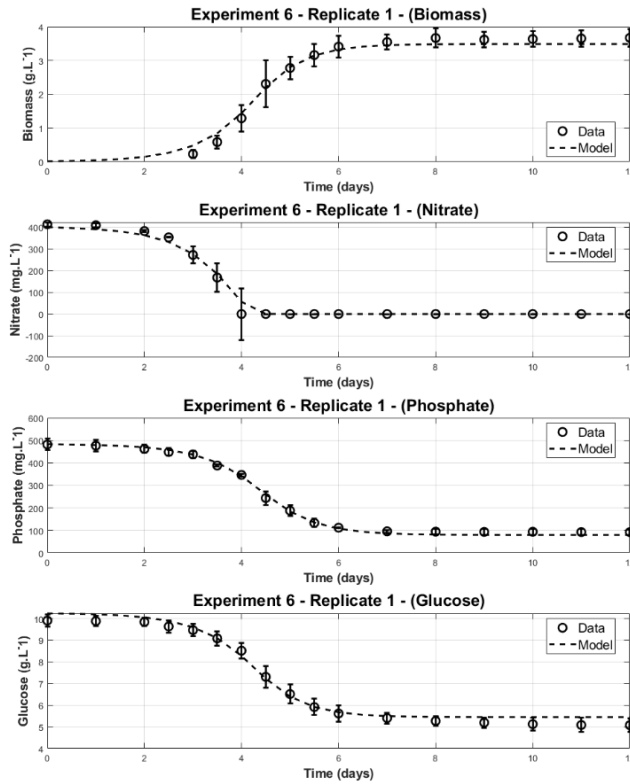


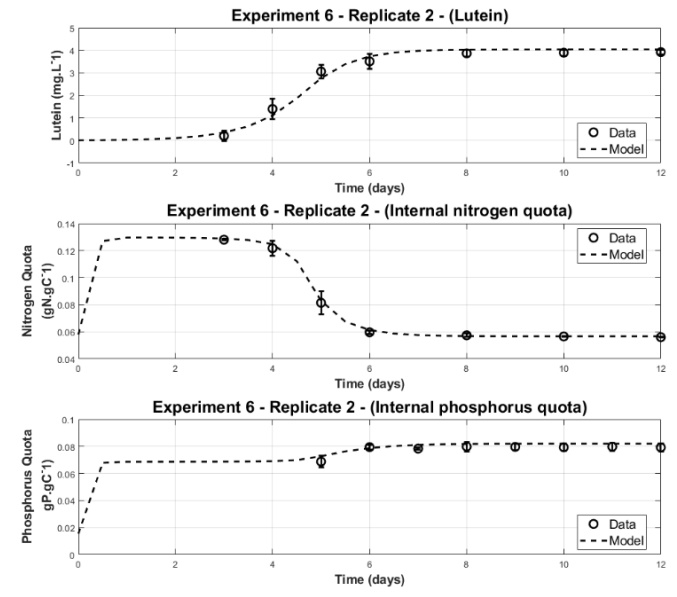
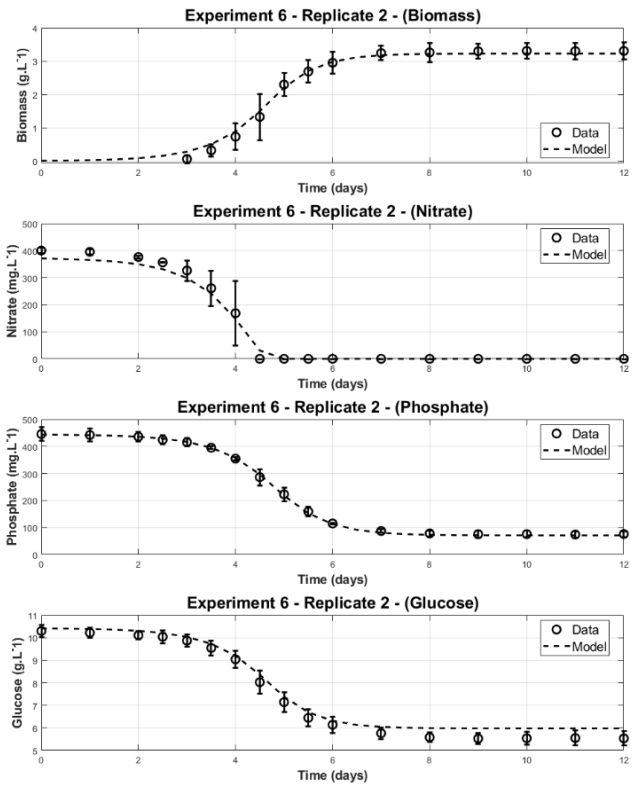




2

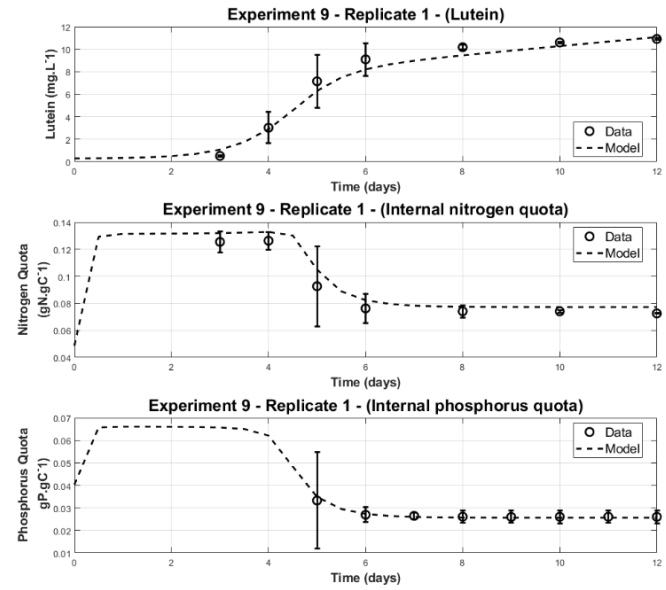
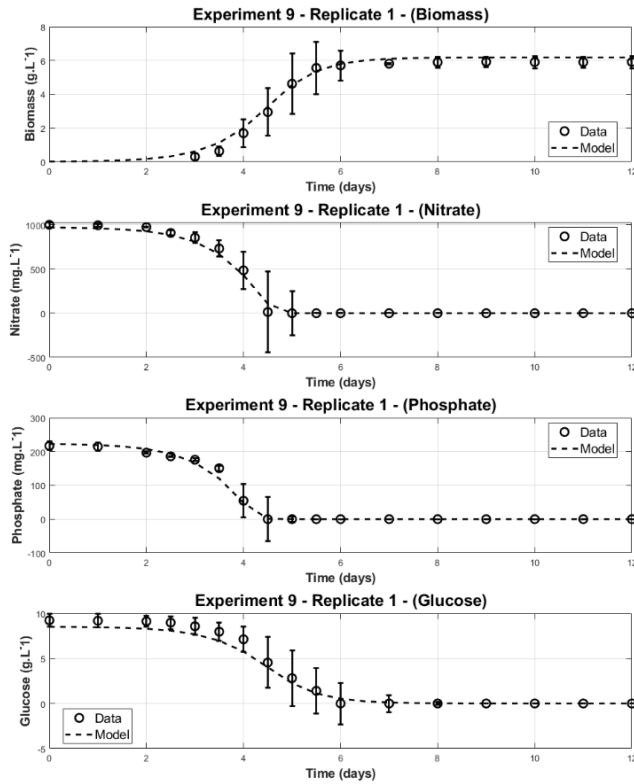
## Expérience 6 en duplicata : nitrate = 2× BBM ; phosphate = 2× BBM

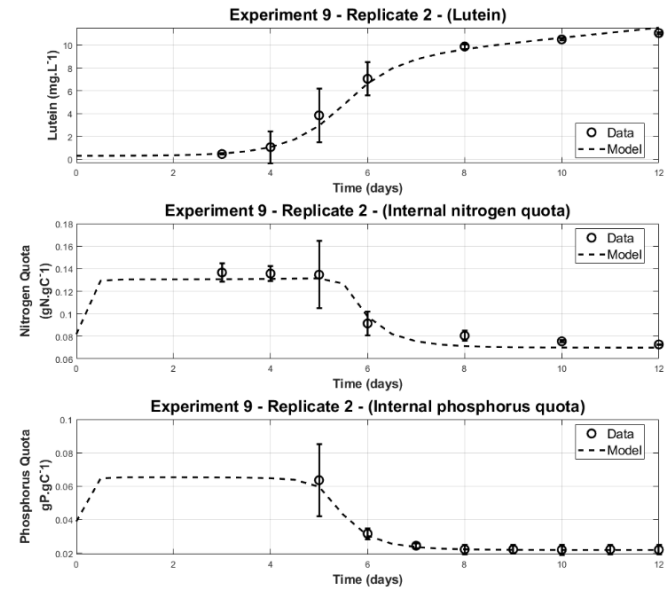
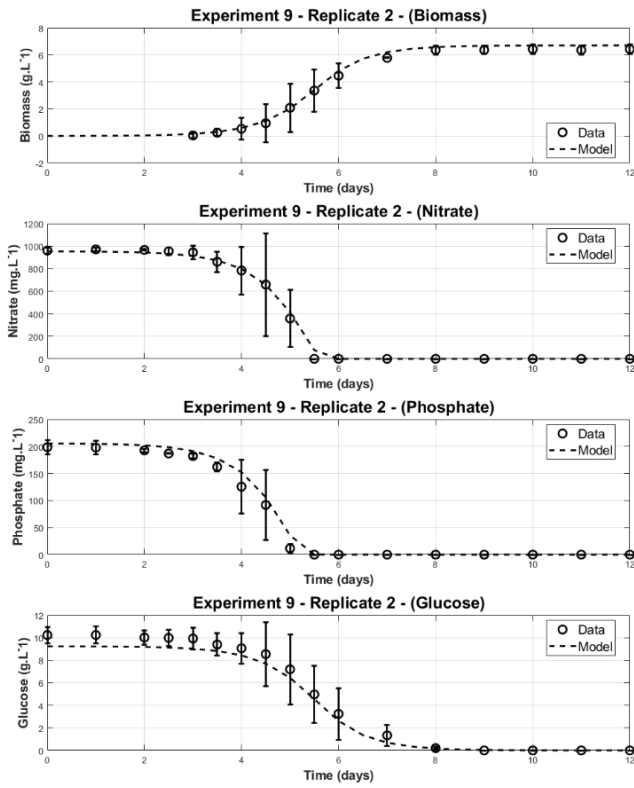




3

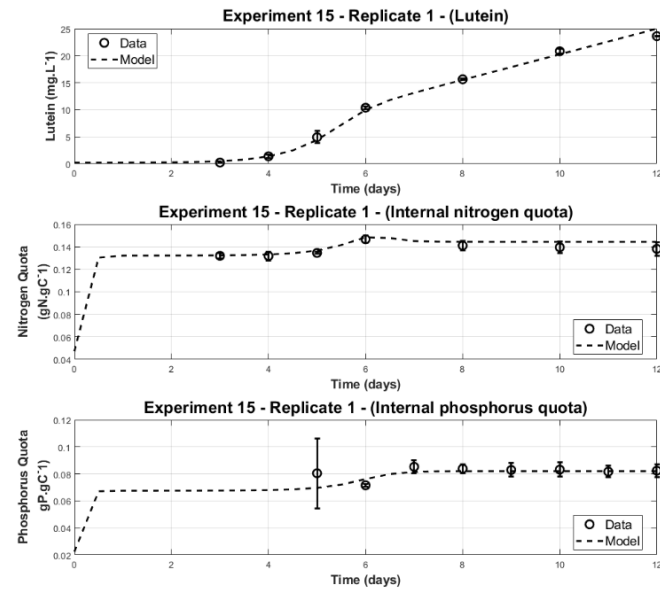
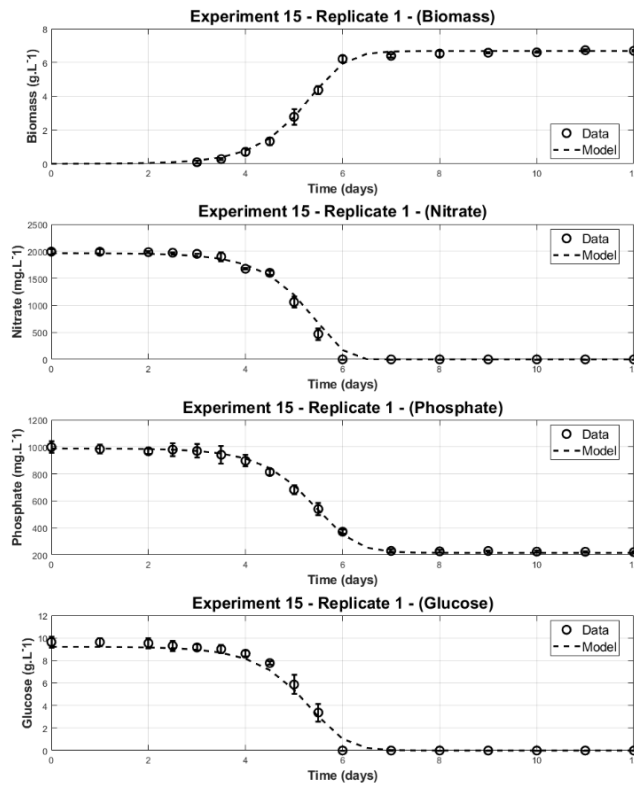
### Expérience 9 en duplicata : nitrate = 3 × BBM ; phosphate = 1 × BBM

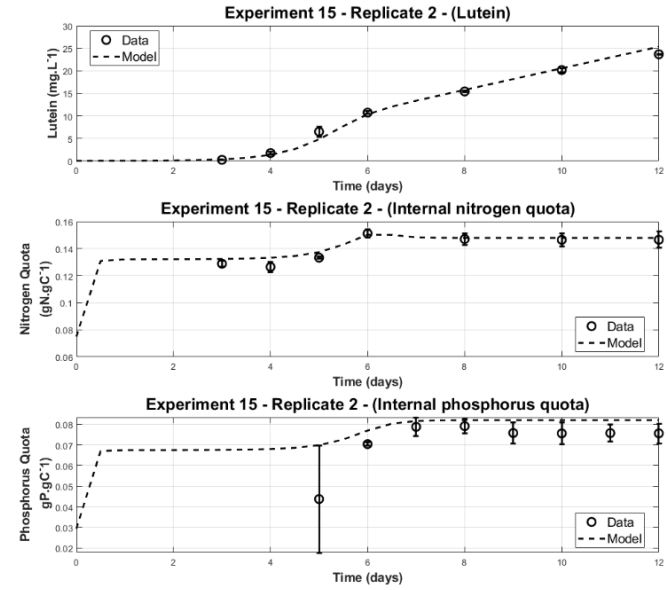
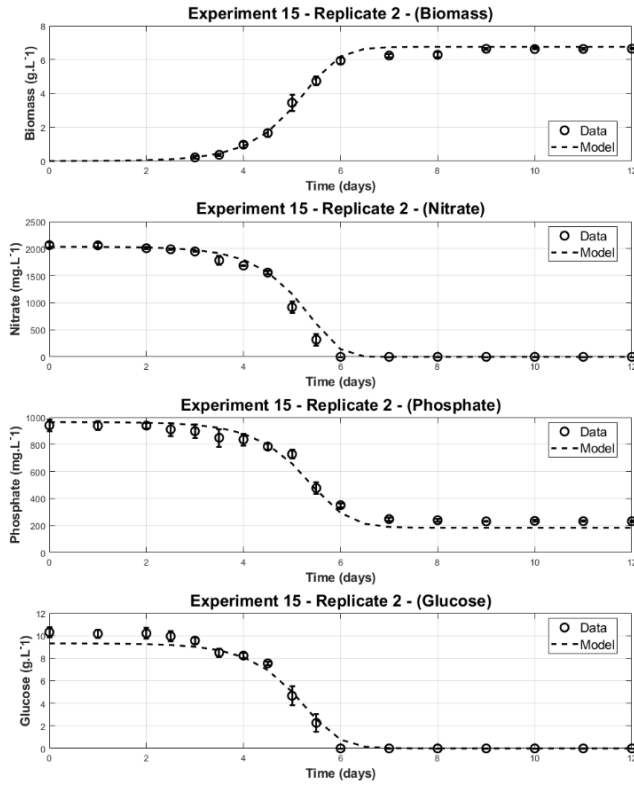




4

### Expérience 15 en duplicata : nitrate = 4× BBM ; phosphate = 3× BBM



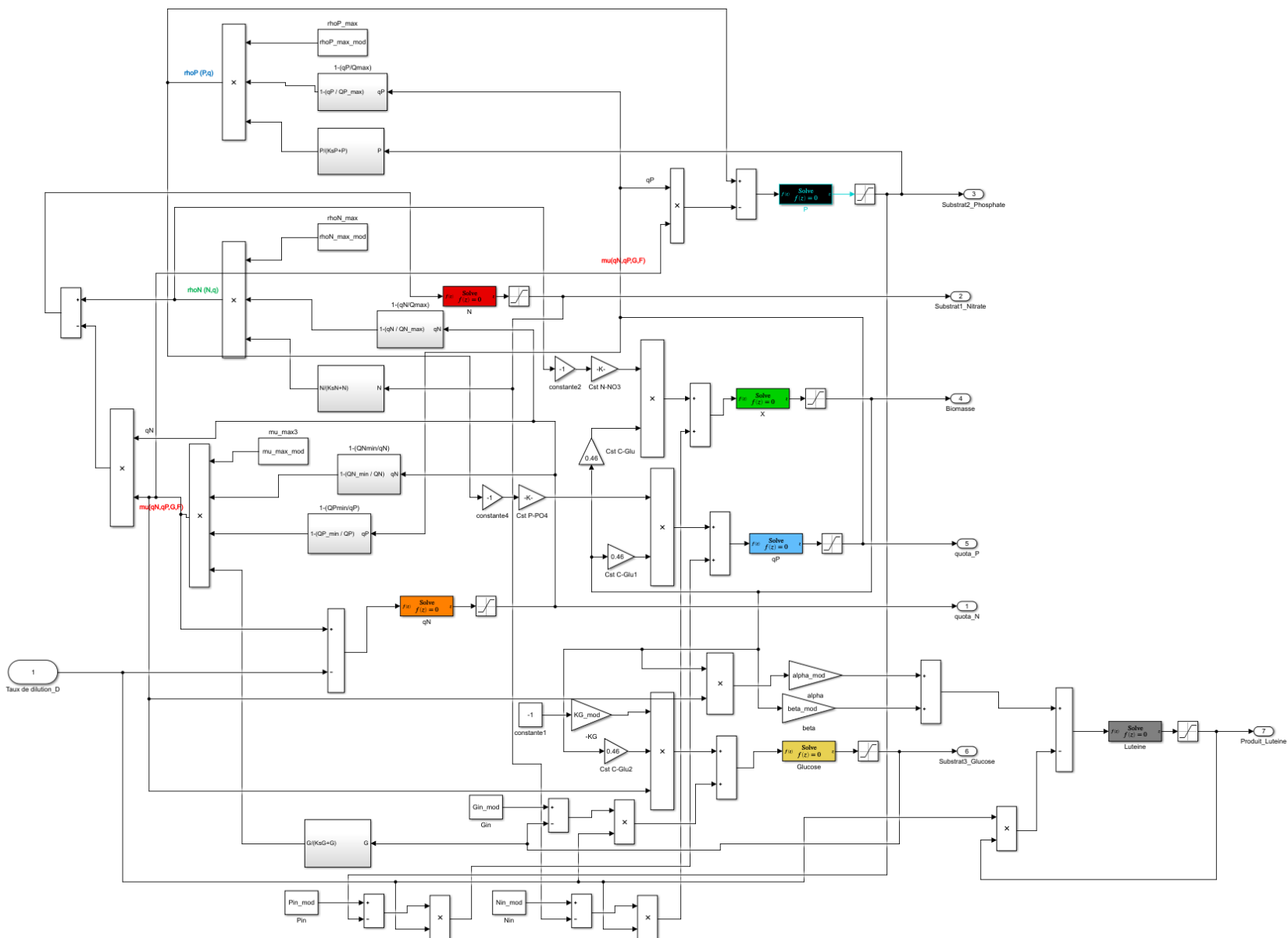


## ANNEXE B

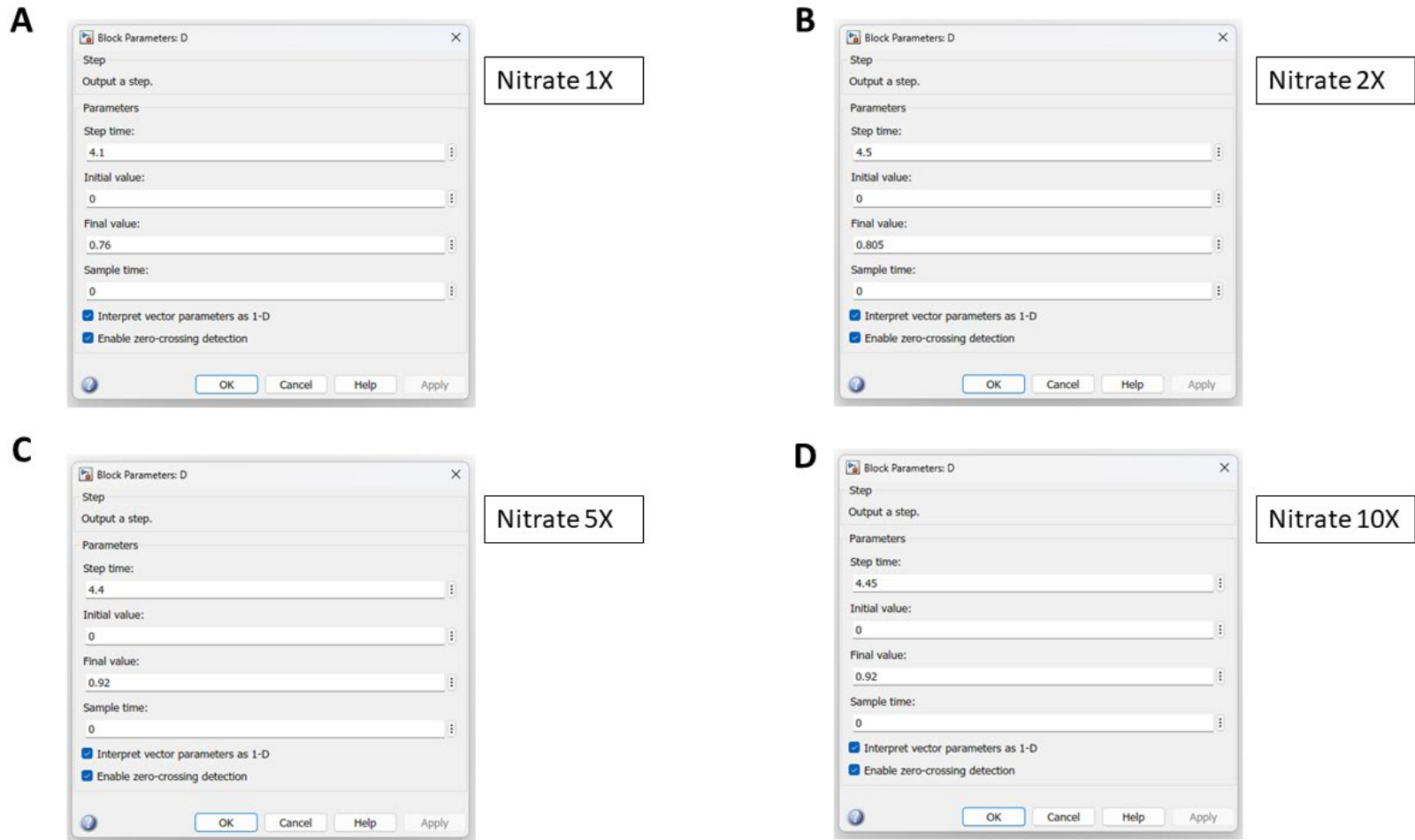
Cette annexe constitue une extension du chapitre 6 de la thèse et vise à fournir des informations complémentaires afin de décrire de manière plus approfondie la recherche de l'optimum de production de biomasse et de lutéine par les microalgues dans un photobioréacteur en mode continu. À cet effet, des simulations en temps réel ont été réalisées en utilisant Simulink - MATLAB.

**Figure S.3** Schéma détaillé représentant la résolution du système de culture en photobioréacteur (régime stationnaire) à l'aide du bloc Contrainte Algébrique ( $f(z) = 0$ ) de Simulink – MATLAB.



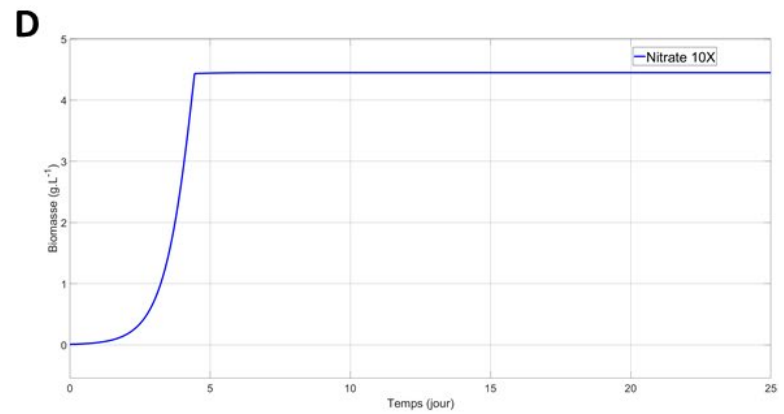
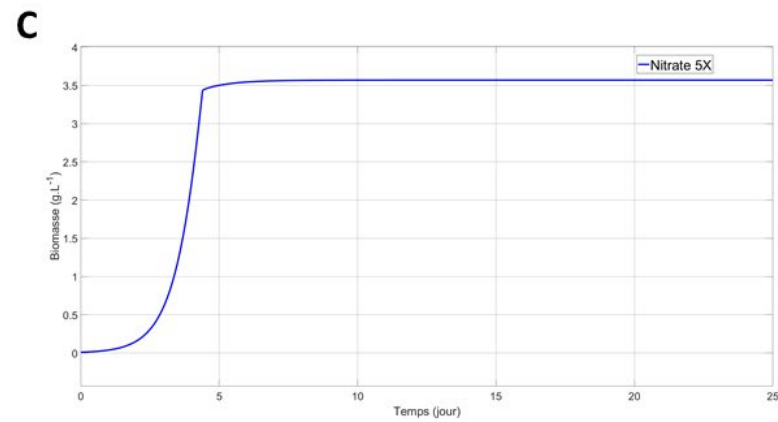
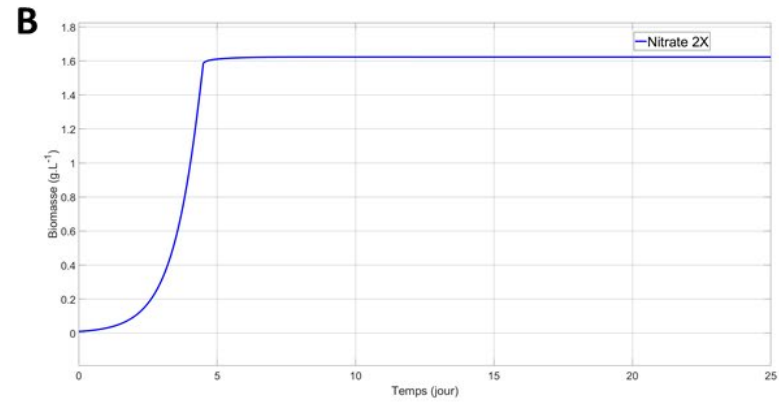
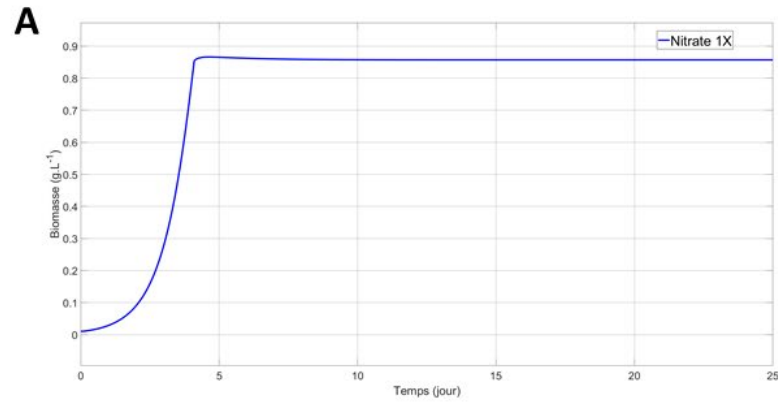


**Figure S.4** Taux de dilution optimaux pour maximiser les productivités en biomasse et en lutéine pour différents niveaux initiaux de nitrate dans un photobioréacteur en mode continu (1×, 2×, 5×, 10× BBM).

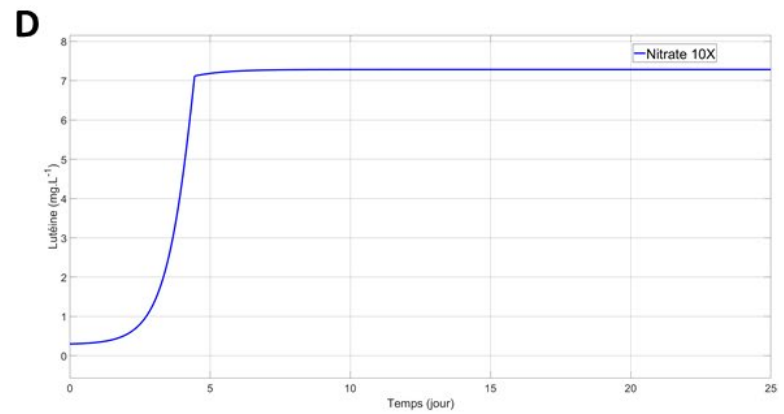
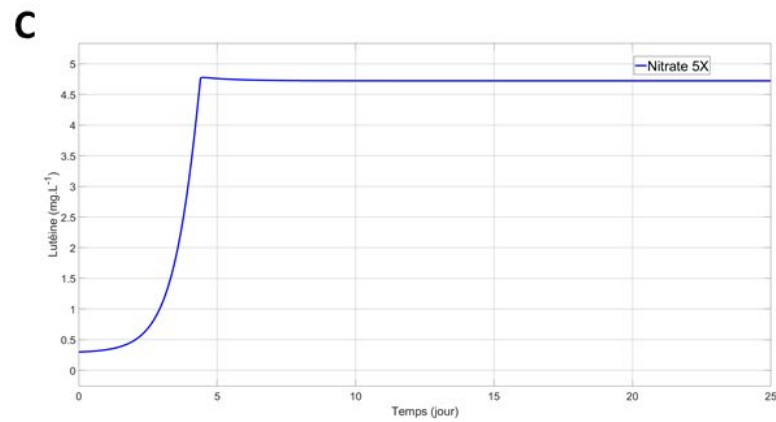
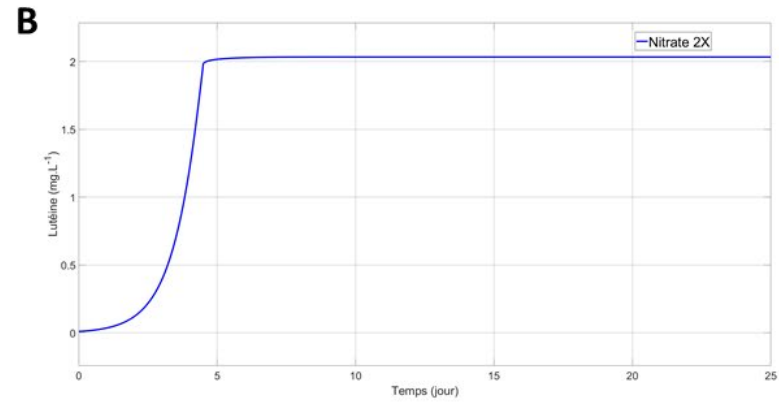
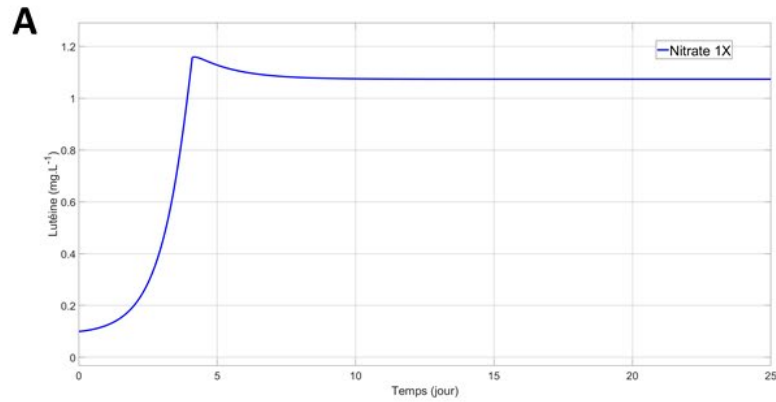


**Figure S.5** Simulation en régime permanent de la cinétique de la biomasse, des quotas internes d'azote et de phosphore, du nitrate, du phosphate, du glucose et de la lutéine pour différents niveaux initiaux de nitrate. Les taux de dilution optimaux ont été choisis pour maximiser les productivités en biomasse et en lutéine, en se basant sur les résultats en régime stationnaire.

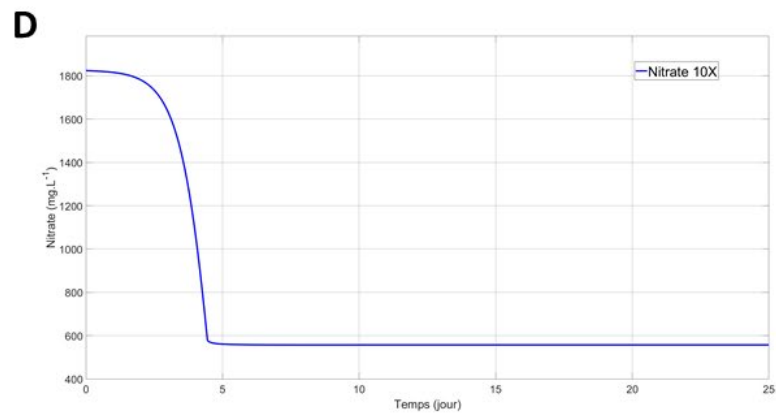
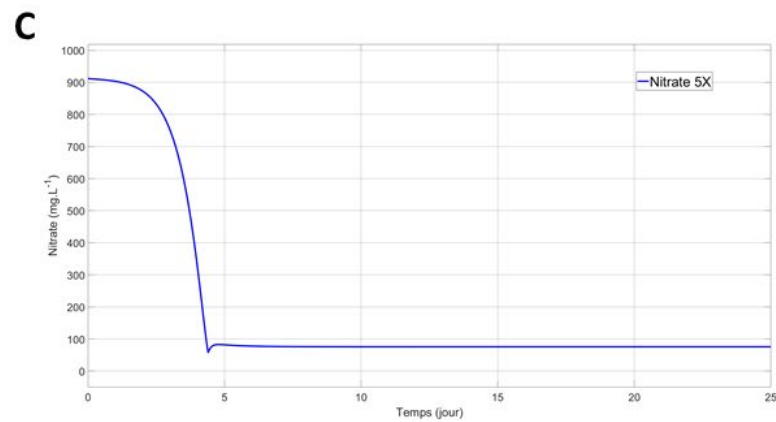
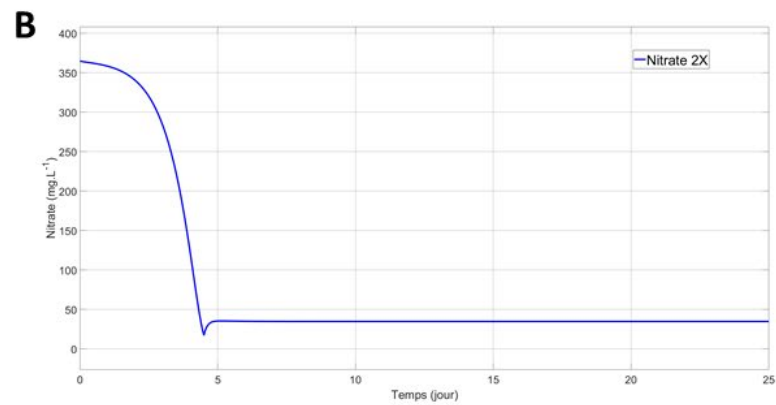
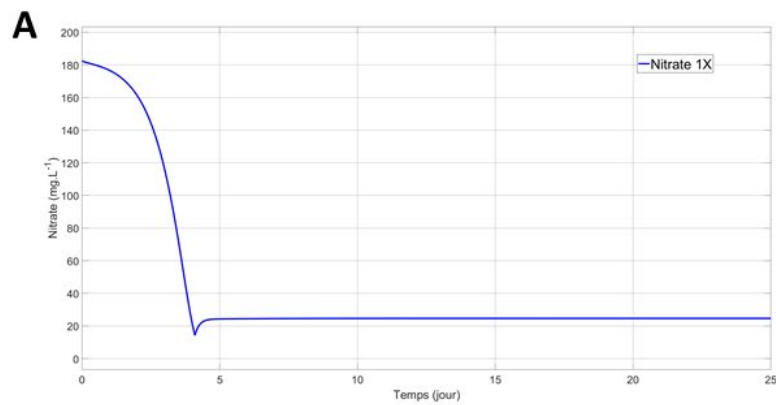
1 Simulation de la cinétique de production de biomasse dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.



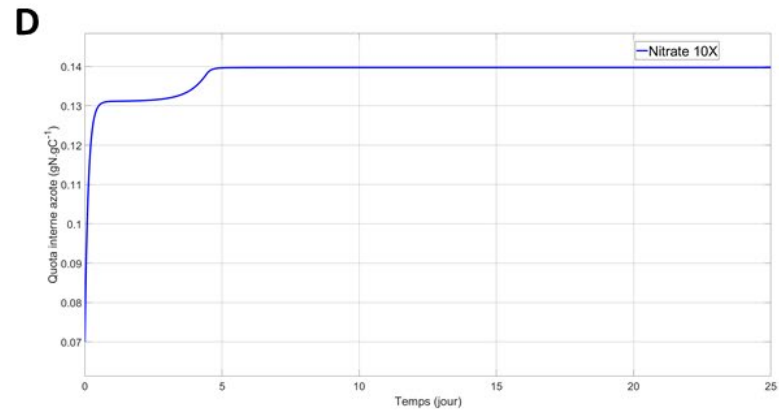
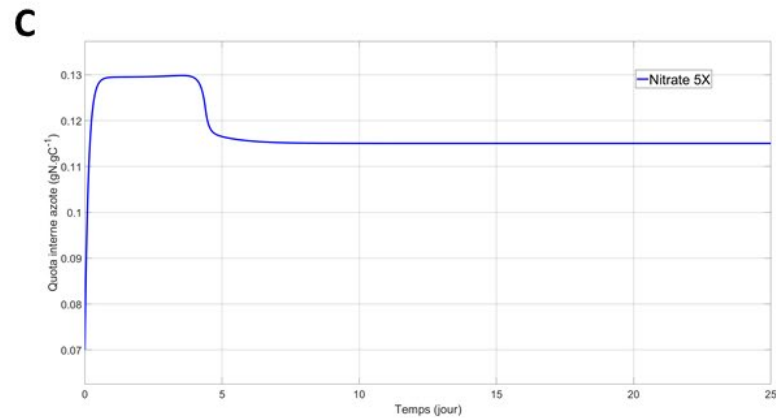
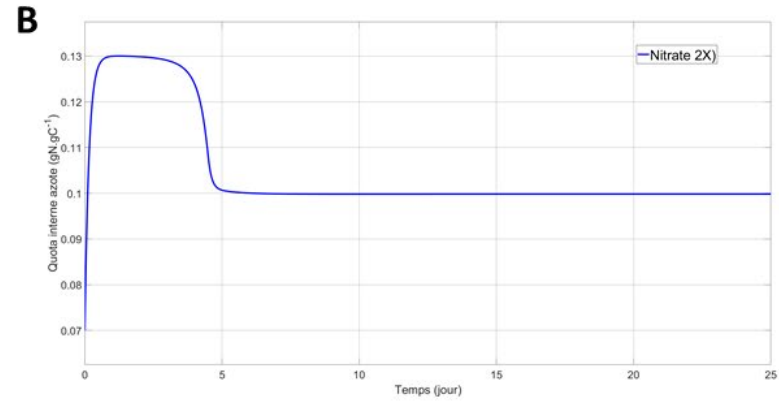
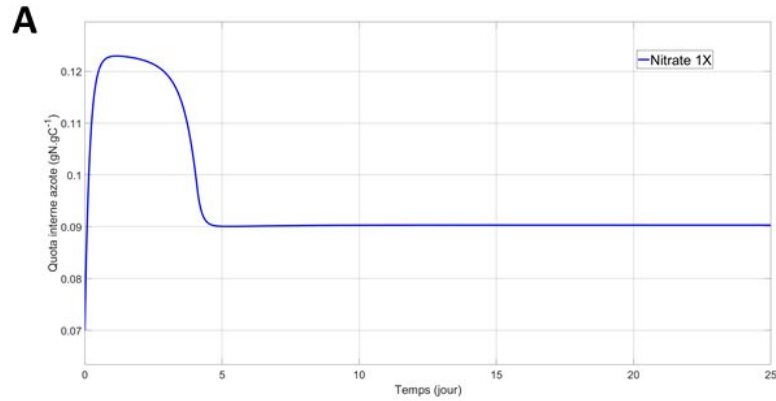
2 Simulation de la cinétique de production de lutéine dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.



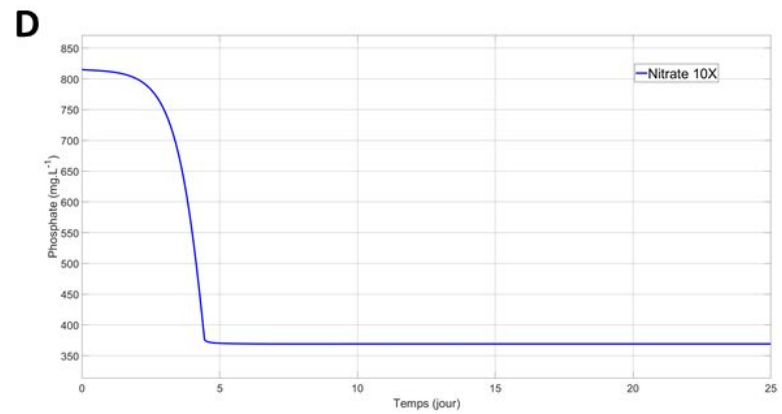
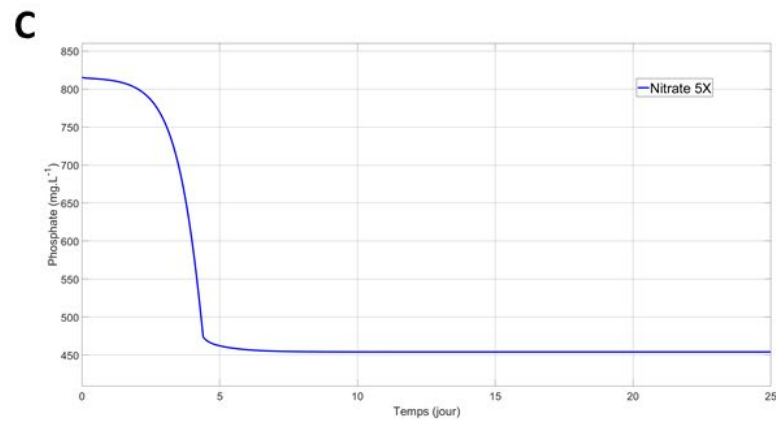
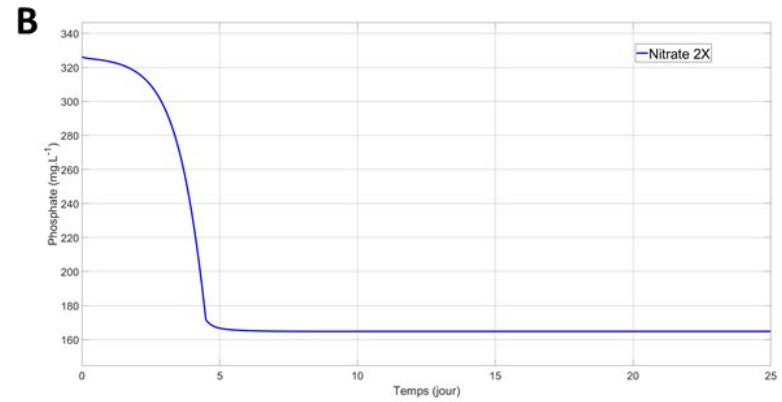
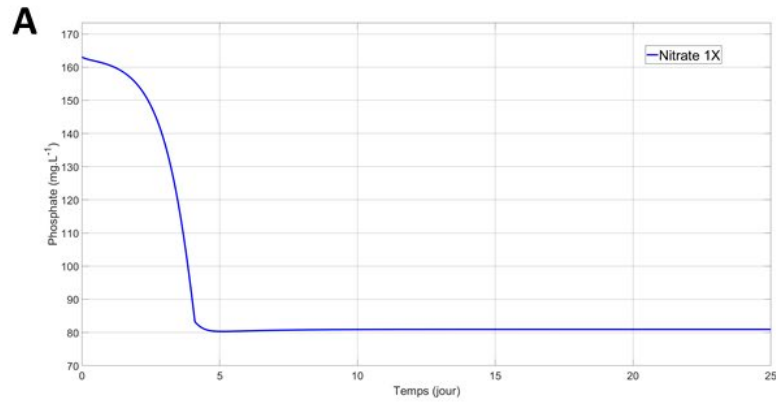
**3** Simulation de la cinétique de consommation de nitrate dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.



4 Simulation de la cinétique des quotas interne d'azote dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.

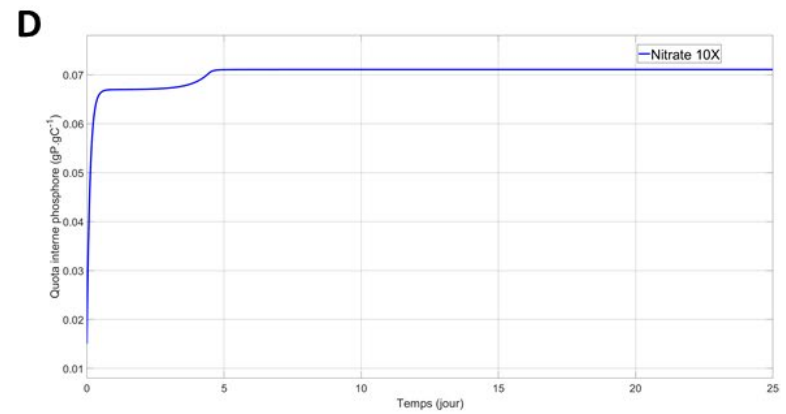
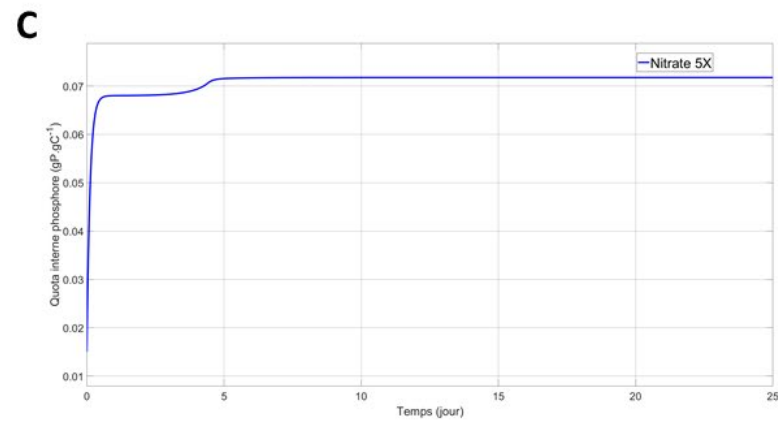
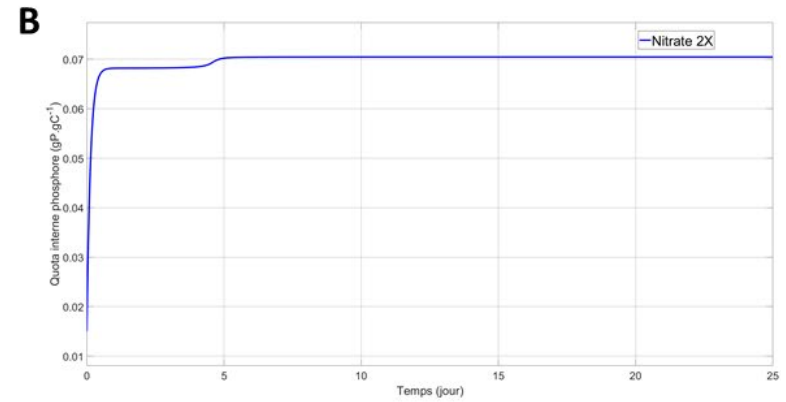
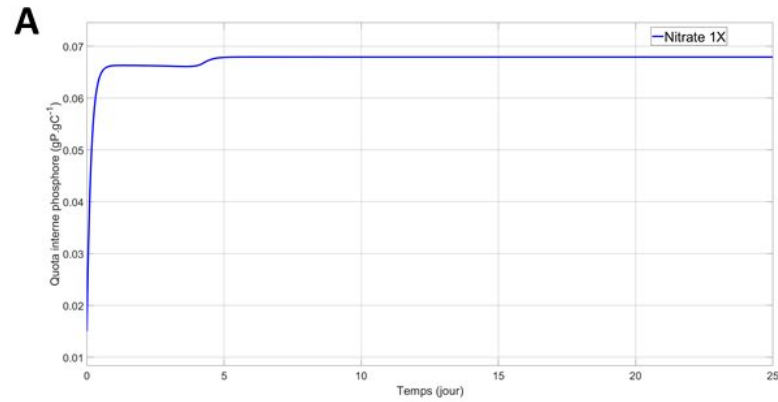


5 Simulation de la cinétique de consommation de phosphate dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.

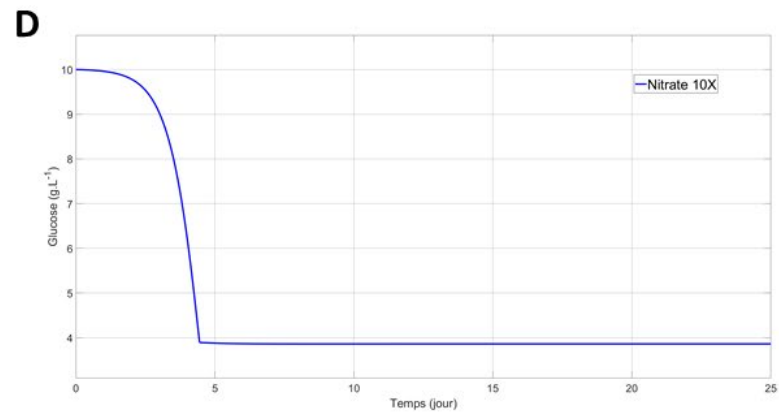
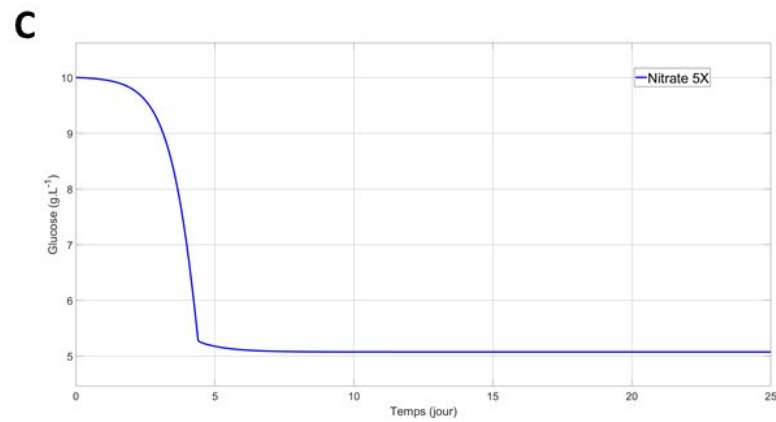
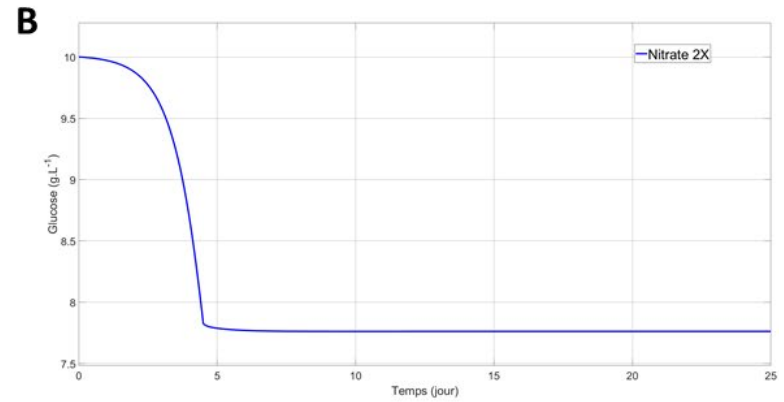
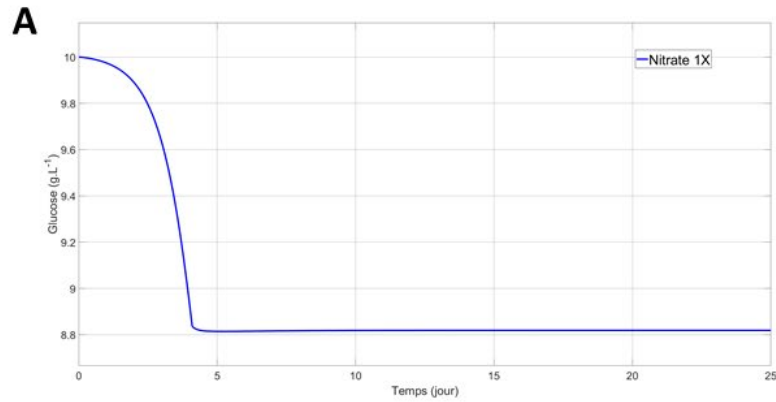




6 Simulation de la cinétique des quotas interne de phosphore dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.



7 Simulation de la cinétique de consommation de glucose dans un photobioréacteur en mode continu pour différents niveaux initiaux de nitrate : (A) 1× BBM, (B) 2× BBM, (C) 5× BBM et (D) 10× BBM.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abreu AP, Fernandes B, Vicente AA, Teixeira J & Dragone G. 2012.** Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology* **118**: 61–66.
- Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM & Molina Grima E. 2013.** Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **12**: 131–151.
- Aishvarya V, Jena J, Pradhan N, Panda PK & Sukla LB. 2015.** Microalgae: cultivation and application. *Environmental microbial biotechnology*: 289–311.
- Akgul F & Akgul R. 2022.** Combined effect of nitrogen and phosphorus on growth and biochemical composition of *Tetradismus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne. *International Journal of Secondary Metabolite* **9**: 525–537.
- Ambati RR, Gogisetty D, Aswathanarayana RG, Ravi S, Bikkina PN, Bo L & Yuepeng S. 2019.** Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical reviews in food science and nutrition* **59**: 1880–1902.
- Andersen RA. 2005.** *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press.
- Andrews JF. 1968.** A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and bioengineering* **10**: 707–723.
- Anjos M, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA & Dragone G. 2013.** Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* **139**: 149–154.
- Arbib Z, Ruiz J, Álvarez-Díaz P, Garrido-Pérez C, Barragan J & Perales JA. 2013.** Photobiotreatment: influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Phytoremediation* **15**: 774–788.
- Arevalo AT. 2017.** Étude environnementale comparative des procédés de valorisation du lactosérum. [Thèse de doctorat]. Université Laval, Québec, Canada.
- Arun J, Raghu R, Suhail Madhar Hanif S, Thilak PG, Sridhar D, Nirmala N, Dawn SS, Sivaramakrishnan R, Chi NTL & Pugazhendhi A. 2022.** A comparative review on photo and mixotrophic mode of algae cultivation: Thermochemical processing of biomass, necessity of bio-oil upgrading, challenges and future roadmaps. *Applied Energy* **325**: 119808.

- Atiku H, Mohamed R, Al-Gheethi A, Wurochekke A & Kassim AHM. 2016.** Harvesting of microalgae biomass from the phycoremediation process of greywater. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 24624–24641.
- Banerjee A, Sharma R, Chisti Y & Banerjee UC. 2002.** *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical reviews in biotechnology* **22**: 245–279.
- Barbera E, Sforza E & Bertucco A. 2015.** Maximizing the production of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors under different irradiation regimes: Experiments and modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **38**: 2177–2188.
- Barghbani R, Rezaei K & Javanshir A. 2012.** Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **1**: 128–133.
- Becker EW. 2007.** Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* **25**: 207–210.
- Bekirogullari M, Figueroa-Torres GM, Pittman JK & Theodoropoulos C. 2020.** Models of microalgal cultivation for added-value products - A review. *Biotechnology Advances* **44**: 107609.
- Benavides M, Telen D, Lauwers J, Logist F, Van Impe J & Vande Wouwer A. 2015.** Parameter identification of the droop model using optimal experiment design. In: *IFAC-PapersOnLine.*, 586–591.
- Bentahar J, Doyen A, Beaulieu L & Deschênes JS. 2019a.** Investigation of  $\beta$ -galactosidase production by microalga *Tetradismus obliquus* in determined growth conditions. *Journal of Applied Phycology* **31**: 301–308.
- Bentahar J, Doyen A, Beaulieu L & Deschênes JS. 2019b.** Acid whey permeate: An alternative growth medium for microalgae *Tetradismus obliquus* and production of  $\beta$ -galactosidase. *Algal Research* **41**: 101559.
- Bentahar J & Deschênes JS. 2022a.** Media optimization design towards maximizing biomass production of *Tetradismus obliquus* under mixotrophic conditions. *Bioresource Technology Reports* **17**: 100885.
- Bentahar J & Deschênes JS. 2022b.** Influence of sweet whey permeate utilization on *Tetradismus obliquus* growth and  $\beta$ -galactosidase production. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **100**: 1479–1488.
- Bentahar J & Deschênes JS. 2023.** A reliable multi-nutrient model for the rapid production of high-density microalgal biomass over a broad spectrum of mixotrophic conditions. *Bioresource Technology* **381**: 129162.

**Bernard O. 2011.** Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO<sub>2</sub> mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control* **21**: 1378–1389.

**Bernard O, Mairet F & Chachuat B. 2016.** Modelling of microalgae culture systems with applications to control and optimization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **153**: 59–87.

**Bernard O, Masci P & Sciandra A. 2009.** A photobioreactor model in nitrogen limited conditions. In: *Mathmod 09-6th Vienna International Conference on Mathematical Modelling.*, 1521–1530.

**Beuckels A, Smolders E & Muylaert K. 2015.** Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research* **77**: 98–106.

**Bhalamurugan GL, Valerie O & Mark L. 2018.** Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research* **23**: 229–241.

**De Bhowmick G, Sen R & Sarmah AK. 2019.** Analysis of growth and intracellular product synthesis dynamics of a microalga cultivated in wastewater cocktail as medium. *Biochemical Engineering Journal* **149**: 107253.

**Blackburn SI & Volkman JK. 2012.** Microalgae: a renewable source of bioproducts. *Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing*: 221–241.

**Borowitzka MA. 2013.** High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* **25**: 743–756.

**Bougaran G, Bernard O & Sciandra A. 2010.** Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology* **265**: 443–454.

**Brasil B, de Siqueira FG, Salum TFC, Zanette CM & Spier MR. 2017.** Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Research* **25**: 76–89.

**Caperon J & Meyer J. 1972a.** Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton—II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* **19**: 619–632.

**Caperon J & Meyer J. 1972b.** Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton—I. Changes in population characteristics with steady-state growth rate. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* **19**: 601–618.

**Di Caprio F, Pagnanelli F, Wijffels RH & Van der Veen D. 2018.** Quantification of *Tetrademus obliquus* (Chlorophyceae) cell size and lipid content heterogeneity at single-cell level. *Journal of Phycology* **54**: 187–197.

**Di Caprio F, Altimari P, Ianquaniello G, Toro L & Pagnanelli F. 2019.** *T. obliquus* cultivation under heterotrophic conditions: Determination of growth parameters. *Chemical Engineering Transactions* **74**: 133–138.

**Carvalho AP, Meireles LA & Malcata FX. 2006.** Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress* **22**: 1490–1506.

**Çelekli A, Balci M & Bozkurt H. 2008.** Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource Technology* **99**: 8742–8747.

**Chandra R, Rohit M V., Swamy Y V. & Venkata Mohan S. 2014.** Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology* **165**: 279–287.

**Cheah WY, Show PL, Chang JS, Ling TC & Juan JC. 2015.** Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. *Bioresource Technology* **184**: 190–201.

**Cheirsilp B, Suwannarat W & Niyomdecha R. 2011.** Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology* **28**: 362–368.

**Chen P, Min M, Chen Y, Wang L, Li Y, Chen Q, Wang C, Wan Y, Wang X & Cheng Y. 2010.** Review of biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* **2**: 1–30.

**Chen JH, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A, Chang CH, Ng IS & Chang JS. 2019a.** Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. *Bioresource Technology* **278**: 17–25.

**Chen WC, Hsu YC, Chang JS, Ho SH, Wang LF & Wei YH. 2019b.** Enhancing production of lutein by a mixotrophic cultivation system using microalga *Scenedesmus obliquus* CWL-1. *Bioresource Technology* **291**: 121891.

**Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, Lee DJ & Chang JS. 2017.** Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology* **229**: 53–62.

**Chew KW, Chia SR, Show PL, Yap YJ, Ling TC & Chang JS. 2018.** Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **91**: 332–344.

**Chiranjeevi P & Mohan SV. 2016.** Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renewable Energy* **98**: 64–71.

- Chisti Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**: 294–306.
- Choix FJ, Polster E, Corona-González RI, Snell-Castro R & Méndez-Acosta HO. 2017.** Nutrient composition of culture media induces different patterns of CO<sub>2</sub> fixation from biogas and biomass production by the microalga *Scenedesmus obliquus* U169. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **40**: 1733–1742.
- Chojnacka K & Marquez-Rocha FJ. 2004.** Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnology* **3**: 21–34.
- Clout A & Roos J. 1996.** Modelling of a relationship between phosphorus, pH, calcium and chlorophyll-a concentration. *Water SA* **22**: 49–55.
- Cordero BF, Obraztsova I, Couso I, Leon R, Vargas MA & Rodriguez H. 2011.** Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine Drugs* **9**: 1607–1624.
- Cui J, Yu C, Zhong D bo, Zhao Y & Yu X. 2020.** Melatonin and calcium act synergistically to enhance the coproduction of astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* under nitrogen deficiency and high light conditions. *Bioresource Technology* **305**: 123069.
- D'Alessandro EB & Antoniosi Filho NR. 2016.** Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **58**: 832–841.
- Darvehei P, Bahri PA & Moheimani NR. 2018.** Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **97**: 233–258.
- Demirbas A. 2010.** Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management* **51**: 2738–2749.
- Deschênes JS. 2007.** Commande non-linéaire des bioprocédés à des fins d'optimisation. [Thèse de doctorat]. Université Laval, Québec, Canada.
- Deschênes JS. 2016.** A Bacteriostatic Control Approach for Mixotrophic Cultures of Microalgae. In: *IFAC-PapersOnLine*. Elsevier B.V., 1074–1078.
- Deschênes JS, Boudreau A & Tremblay R. 2015.** Mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors: Practicability and process considerations. *Algal Research* **10**: 80–86.
- Deschênes JS & Vande Wouwer A. 2015.** Dynamic optimization of biomass productivity in continuous cultures of microalgae *Isochrysis galbana* through modulation of the light intensity. In: *IFAC-PapersOnLine.*, 1093–1099.

**Deschênes JS & Vande Wouwer A. 2016.** Parameter identification of a dynamic model of cultures of microalgae *Scenedesmus obliquus* - An experimental study. In: *IFAC-PapersOnLine*. Elsevier B.V., 1050–1055.

**Dickson RC & Markin JS. 1980.** Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology* **142**: 777–785.

**Dragone G. 2022.** Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **160**: 112284.

**Droop MR. 1968.** Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **48**: 689–733.

**DvOráková-Hladká J. 1976.** The effect of calcium on the growth of *Chlorella* and *Scenedesmus*. *Biologia Plantarum* **18**: 214–220.

**Ebenezer V, Medlin LK & Ki JS. 2012.** Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology* **14**: 129–142.

**Esakkimuthu S, Krishnamurthy V, Govindarajan R & Swaminathan K. 2016.** Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy* **88**: 126–134.

**de Farias Silva CE, Sforza E & Bertucco A. 2018.** Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation: effect of irradiation regime and intensity on *Tetradesmus obliquus*. *Journal of Applied Phycology* **30**: 261–270.

**Farizoglu B, Keskinler B, Yildiz E & Nuhoglu A. 2004.** Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. *Process Biochemistry* **39**: 2283–2291.

**Fernández-Nava Y, Marañón E, Soons J & Castrillón L. 2008.** Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresource Technology* **99**: 7976–7981.

**Figuroa-Torres GM, Pittman JK & Theodoropoulos C. 2017.** Kinetic modelling of starch and lipid formation during mixotrophic, nutrient-limited microalgal growth. *Bioresource Technology* **241**: 868–878.

**Figuroa-Torres GM, Pittman JK & Theodoropoulos C. 2021.** Optimisation of microalgal cultivation via nutrient-enhanced strategies: the biorefinery paradigm. *Biotechnology for Biofuels* **14**: 1–16.



- Filali R, Tebbani S, Dumur D, Isambert A, Pareau D & Lopes F. 2011.** Growth modeling of the green microalga *Chlorella vulgaris* in an air-lift photobioreactor. In: *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*. IFAC Secretariat, 10603–10608.
- Flynn KJ. 2002.** How critical is the critical N:P ratio? *Journal of phycology* **38**: 961–970.
- Franz A, Lehr F, Posten C & Schaub G. 2012.** Modeling microalgae cultivation productivities in different geographic locations—estimation method for idealized photobioreactors. *Biotechnology Journal* **7**: 546–557.
- Ghaly AE, Rushton DG & Mahmoud NS. 2007.** Potential air and groundwater pollution from continuous high land application of cheese whey. *American Journal of Applied Sciences* **4**: 619–627.
- Girard JM, Roy ML, Hafsa M Ben, Gagnon J, Faucheux N, Heitz M, Tremblay R & Deschênes JS. 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.
- Graziani G, Schiavo S, Nicolai MA, Buono S, Fogliano V, Pinto G & Pollio A. 2013.** Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermoacidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food and Function* **4**: 144–152.
- Grover JP. 1991.** Dynamics of competition among microalgae in variable environments: experimental tests of alternative models. *Oikos* **62**: 231–243.
- Guedes AC, Amaro HM & Malcata FX. 2011.** Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnology Progress* **27**: 597–613.
- Guest JS, Van Loosdrecht MCM, Skerlos SJ & Love NG. 2013.** Lumped pathway metabolic model of organic carbon accumulation and mobilization by the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology* **47**: 3258–3267.
- Haario H, Kalachev L & Laine M. 2009.** Reduced models of algae growth. *Bulletin of Mathematical Biology* **71**: 1626–1648.
- He L, Subramanian VR & Tang YJ. 2012.** Experimental analysis and model-based optimization of microalgae growth in photo-bioreactors using flue gas. *Biomass and Bioenergy* **41**: 131–138.
- Henríquez V, Escobar C, Galarza J & Gimpel J. 2016.** Carotenoids in microalgae. In: *Carotenoids in nature, subcellular biochemistry* **79**. Springer International Publishing Switzerland, 219–237.

- Ho SH, Kondo A, Hasunuma T & Chang JS. 2013.** Engineering strategies for improving the CO<sub>2</sub> fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. *Bioresource Technology* **143**: 163–171.
- Ho SH, Chan MC, Liu CC, Chen CY, Lee WL, Lee DJ & Chang JS. 2014.** Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource Technology* **152**: 275–282.
- Ho SH, Xie Y, Chan MC, Liu CC, Chen CY, Lee DJ, Huang CC & Chang JS. 2015.** Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with *Scenedesmus obliquus* FSP-3. *Bioresource Technology* **184**: 131–138.
- Hodaifa G, Martínez ME & Sánchez S. 2009.** Influence of pH on the culture of *Scenedesmus obliquus* in olive-mill wastewater. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **14**: 854–860.
- Hu C, Meng Q h M & Mandal M. 2005.** Efficient magnetic localization and orientation technique for capsule endoscopy. In: *International Journal of Information Acquisition.*, 23–36.
- Huang Q, Jiang F, Wang L & Yang C. 2017.** Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering* **3**: 318–329.
- Huang Y, Lou C, Luo L & Wang XC. 2021.** Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic *Chlorella vulgaris* growth under stably controlled nutrient conditions. *Science of the Total Environment* **752**: 141747.
- Ishaq AG, Matias-Peralta HM & Basri H. 2016.** Bioactive compounds from green microalga - *Scenedesmus* and its potential applications: A brief review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* **39**: 1–16.
- Islam MJ, Jang C, Eum J, Jung S min, Shin MS, Lee Y, Choi Y & Kim B. 2019.** C:N:P stoichiometry of particulate and dissolved organic matter in river waters and changes during decomposition. *Journal of Ecology and Environment* **43**: 1–8.
- Janssen JH, Driessen JLSP, Lamers PP, Wijffels RH & Barbosa MJ. 2018.** Effect of initial biomass-specific photon supply rate on fatty acid accumulation in nitrogen depleted *Nannochloropsis gaditana* under simulated outdoor light conditions. *Algal Research* **35**: 595–601.
- Ketheesan B & Nirmalakhandan N. 2013.** Modeling microalgal growth in an airlift-driven raceway reactor. *Bioresource Technology* **136**: 689–696.
- Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasad S & Banerjee UC. 2009.** Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **13**: 2361–2372.

**Kim G, Mujtaba G & Lee K. 2016.** Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. For lipid production. *Algae* **31**: 257–266.

**Klausmeier CA, Litchman E & Levin SA. 2004.** Phytoplankton growth and stoichiometry under multiple nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* **49**: 1463–1470.

**Klinthong W, Yang YH, Huang CH & Tan CS. 2015.** A review: microalgae and their applications in CO<sub>2</sub> capture and renewable energy. *Aerosol and Air Quality Research* **15**: 712–742.

**Krienitz L & Bock C. 2012.** Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia* **698**: 295–326.

**Kunikane S & Kaneko M. 1984.** Growth and nutrient uptake of green alga, *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio—II. Kinetic model. *Water Research* **18**: 1313–1326.

**Kunikane S, Kaneko M & Maehara R. 1984.** Growth and nutrient uptake of green alga, *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio—I. Experimental study. *Water Research* **18**: 1299–1311.

**Kwak HS, Kim JYH, Woo HM, Jin ES, Min BK & Sim SJ. 2016.** Synergistic effect of multiple stress conditions for improving microalgal lipid production. *Algal Research* **19**: 215–224.

**Larson CA, Mirza B, Rodrigues JLM & Passy SI. 2018.** Iron limitation effects on nitrogen-fixing organisms with possible implications for cyanobacterial blooms. *FEMS microbiology ecology* **94**: fiy046.

**Law J, Lee S, Tseng A, Wing Tsui KO & Yu N. 2002.** The role of glycerol and isopropyl thiogalactoside in *Escherichia coli* growth and lactose induction of  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* **2**: 97–102.

**Lee E, Jalalizadeh M & Zhang Q. 2015.** Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research* **12**: 497–512.

**León-Saiki GM, Ferrer Ledo N, Lao-Martil D, van der Veen D, Wijffels RH & Martens DE. 2018.** Metabolic modelling and energy parameter estimation of *Tetradasmus obliquus*. *Algal Research* **35**: 378–387.

**Levenberg K. 1944.** A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quarterly of applied mathematics* **2**: 164–168.

**Li SW, Luo SJ & Guo RB. 2012.** Influence of carbon dioxide concentration on microalgal growth in a bubble column photobioreactor. *Advanced Materials Research* **599**: 137–140.

- Liang S, Liu X, Chen F & Chen Z. 2004.** Current microalgal health food R & D activities in China. In: *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges: Proceeding of The Second Asian Pacific Phycological Forum, held in Hong Kong, China, 21–25 June 1999*. Springer, 45–48.
- Liang Y, Sarkany N & Cui Y. 2009.** Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters* **31**: 1043–1049.
- Lindsay MJ, Walker TW, Dumesic JA, Rankin SA & Huber GW. 2018.** Production of monosaccharides and whey protein from acid whey waste streams in the dairy industry. *Green Chemistry* **20**: 1824–1834.
- Liu J, Tan K, He L, Qiu Y, Tan W, Guo Y, Wang Z & Sun W. 2018.** Effect of limitation of iron and manganese on microalgae growth in fresh water. *Microbiology* **164**: 1514–1521.
- Liu Y, Zhou J, Liu D, Zeng Y, Tang S, Han Y, Jiang Y & Cai Z. 2022.** A growth-boosting synergistic mechanism of *Chromochloris zofingiensis* under mixotrophy. *Algal Research* **66**: 102812.
- Luedeking R & Piret EL. 1959.** A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1**: 393–412.
- Lupatini AL, Colla LM, Canan C & Colla E. 2017.** Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**: 724–732.
- Malerba ME, Connolly SR & Heimann K. 2012.** Nitrate-nitrite dynamics and phytoplankton growth: Formulation and experimental evaluation of a dynamic model. *Limnology and Oceanography* **57**: 1555–1571.
- Malerba ME, Connolly SR & Heimann K. 2016.** Standard flow cytometry as a rapid and non-destructive proxy for cell nitrogen quota. *Journal of Applied Phycology* **28**: 1085–1095.
- Manhaeghe D, Blomme T, Van Hulle SWH & Rousseau DPL. 2020.** Experimental assessment and mathematical modelling of the growth of *Chlorella vulgaris* under photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Water Research* **184**: 116152.
- 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.
- Markou G, Vandamme D & Muylaert K. 2014.** Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* **65**: 186–202.

- Marquardt DW. 1963.** An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* **11**: 431–441.
- Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N & Nagai S. 1993.** Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**: 408–410.
- Martínez ME, Jiménez JM & El Yousfi F. 1999.** Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* **67**: 233–240.
- Martínez Sancho ME, Jiménez Castillo JM & El Yousfi F. 1997.** Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry* **32**: 657–664.
- Mata TM, Martins AA & Caetano NS. 2010.** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 217–232.
- Matos ÂP. 2017.** The impact of microalgae in food science and technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **94**: 1333–1350.
- Mehta SK & Gaur JP. 2005.** Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* **25**: 113–152.
- Milledge JJ. 2011.** Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **10**: 31–41.
- Mohammad Mirzaie MA, Kalbasi M, Mousavi SM & Ghobadian B. 2016.** Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **46**: 150–156.
- Mohammadi M, Mowla D, Esmaeilzadeh F & Ghasemi Y. 2018.** Cultivation of microalgae in a power plant wastewater for sulfate removal and biomass production: A batch study. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **6**: 2812–2820.
- Mondal M, Ghosh A, Sharma AS, Tiwari ON, Gayen K, Mandal MK & Halder GN. 2016.** Mixotrophic cultivation of *Chlorella* sp. BTA 9031 and *Chlamydomonas* sp. BTA 9032 isolated from coal field using various carbon sources for biodiesel production. *Energy Conversion and Management* **124**: 297–304.
- Monod J. 1949.** The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology* **3**: 371–394.
- Montero E, Olguín EJ, De Philippis R & Reverchon F. 2018.** Mixotrophic cultivation of *Chlorococcum* sp. under non-controlled conditions using a digestate from pig manure within a biorefinery. *Journal of Applied Phycology* **30**: 2847–2857.

**Montgomery DC. 2013.** *Design and analysis of experiments*. USA: Arizona State University. John Wiley & Sons, Inc.

**Muller-Feuga A. 2000.** The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* **12**: 527–534.

**Murphy J & Riley JP. 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* **27**: 31–36.

**Musatti A, Cavicchioli D, Mapelli C, Bertoni D, Hogenboom JA, Pellegrino L & Rollini M. 2020.** From cheese whey permeate to Sakacin A: A circular economy approach for the food-grade biotechnological production of an anti-listeria bacteriocin. *Biomolecules* **10**: 597.

**Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A & Bux F. 2011.** Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* **102**: 57–70.

**Muylaert K, Beuckels A, Depraetere O, Foubert I, Markou G & Vandamme D. 2015.** Wastewater as a source of nutrients for microalgae biomass production. In: *Biomass and biofuels from microalgae: Advances in engineering and biology.*, 75–94.

**Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A & Biró S. 2001.** Carbon source regulation of  $\beta$ -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology* **41**: 351–362.

**Nelder JA & Mead R. 1965.** A simplex method for function minimization. *The computer journal* **7**: 308–313.

**Odjadjare EC, Mutanda T & Olaniran AO. 2017.** Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**: 37–52.

**OECD-FAO Agricultural Outlook 2011-2020. 2011.** <https://stats.oecd.org/>

**Oliveira CYB, Oliveira CDL, Prasad R, Ong HC, Araujo ES, Shabnam N & Gálvez AO. 2021.** A multidisciplinary review of *Tetradesmus obliquus*: a microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. *Reviews in Aquaculture* **13**: 1594–1618.

**Packer A, Li Y, Andersen T, Hu Q, Kuang Y & Sommerfeld M. 2011.** Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model. *Bioresource Technology* **102**: 111–117.

**Palabhanvi B, Kumar V, Muthuraj M & Das D. 2014.** Preferential utilization of intracellular nutrients supports microalgal growth under nutrient starvation: Multi-nutrient mechanistic model and experimental validation. *Bioresource Technology* **173**: 245–255.

- Pang N, Gu X, Chen S, Kirchoff H, Lei H & Roje S. 2019.** Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **112**: 450–460.
- Pangestuti R & Kim SK. 2011.** Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* **3**: 255–266.
- Parashar A, Jin Y, Mason B, Chae M & Bressler DC. 2016.** Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science* **99**: 1859–1867.
- Patel AK, Singhanian RR, Sim SJ & Dong C Di. 2021.** Recent advancements in mixotrophic bioprocessing for production of high value microalgal products. *Bioresource Technology* **320**: 124421.
- Pegallapati AK & Nirmalakhandan N. 2012.** Modeling algal growth in bubble columns under sparging with CO<sub>2</sub>-enriched air. *Bioresource Technology* **124**: 137–145.
- Peters RH. 2005.** Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *International Dairy Journal* **15**: 537–545.
- Phong WN, Show PL, Ling TC, Juan JC, Ng EP & Chang JS. 2018.** Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae—Recent developments and future perspectives. *Algal Research* **31**: 506–516.
- Pignolet O, Jubeau S, Vaca-Garcia C & Michaud P. 2013.** Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **40**: 781–796.
- Pittman JK, Dean AP & Osundeko O. 2011.** The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* **102**: 17–25.
- Posten C. 2009.** Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* **9**: 165–177.
- Powell N, Shilton A, Chisti Y & Pratt S. 2009.** Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics. *Water Research* **43**: 4207–4213.
- Priyadarshani I & Rath B. 2012.** Commercial and industrial applications of micro algae - A review. *Journal of Algal Biomass Utilization* **3**: 89–100.
- Pulz O & Gross W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 635–648.
- Quinn J, de Winter L & Bradley T. 2011.** Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. *Bioresource Technology* **102**: 5083–5092.

**Rajabi Islami H & Assareh R. 2019.** Effect of different iron concentrations on growth, lipid accumulation, and fatty acid profile for biodiesel production from *Tetradismus obliquus*. *Journal of Applied Phycology* **31**: 3421–3432.

**Rajendran L, Nagarajan NG & Karuppan M. 2020.** Enhanced biomass and lutein production by mixotrophic cultivation of *Scenedesmus* sp. using crude glycerol in an airlift photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal* **161**: 107684.

**Rashad S, El-Chaghaby G, Lima EC & Simoes dos Reis G. 2023.** Optimizing the ultrasonic-assisted extraction of antioxidants from *Ulva lactuca* algal biomass using factorial design. *Biomass Conversion and Biorefinery* **13**: 5681–5690.

**Razzak SA, Hossain MM, Lucky RA, Bassi AS & De Lasa H. 2013.** Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**: 622–653.

**del Rio-Chanona EA, Ahmed N rashid, Zhang D, Lu Y & Jing K. 2017.** Kinetic modeling and process analysis for *Desmodesmus* sp. lutein photo-production. *AIChE Journal* **63**: 2546–2554.

**Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, Lee K & Rashid N. 2018.** Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **92**: 394–404.

**Rösch C & Posten C. 2012.** Challenges and perspectives of microalgae production: Introduction to the thematic focus. *TATuP-Zeitschrift für Technikfolgenabschätzung in Theorie und Praxis* **21**: 5–16.

**Rosenberg ZMM. 2006.** Current trends of  $\beta$ -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research* **45**: 47–54.

**Ross BS & Pott RWM. 2022.** Investigating and modeling the effect of light intensity on *Rhodospseudomonas palustris* growth. *Biotechnology and Bioengineering* **119**: 907–921.

**Ryan MP & Walsh G. 2016.** The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **15**: 479–498.

**Ryu KH, Sung MG, Kim B, Heo S, Chang YK & Lee JH. 2018.** A mathematical model of intracellular behavior of microalgae for predicting growth and intracellular components syntheses under nutrient-replete and -deplete conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **115**: 2441–2455.

**Saha SK, Ermis H & Murray P. 2020.** Marine microalgae for potential lutein production. *Applied Sciences* **10**: 6457.



- Saito MA, Goepfert TJ & Ritt JT. 2008.** Some thoughts on the concept of colimitation: Three definitions and the importance of bioavailability. *Limnology and Oceanography* **53**: 276–290.
- Salati S, D’Imporzano G, Menin B, Veronesi D, Scaglia B, Abbruscato P, Mariani P & Adani F. 2017.** Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology* **230**: 82–89.
- Sforza E, Gris B, De Farias Silva CE, Morosinotto T & Bertucco A. 2014.** Effects of light on cultivation of *Scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor. *Chemical Engineering Transactions* **38**: 211–216.
- Shi XM, Zhang XW & Chen F. 2000.** Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and microbial technology* **27**: 312–318.
- Shon J & Haque ZU. 2007.** Functional attributes of native and thermized sour and sweet whey. *International Journal of Dairy Technology* **60**: 135–142.
- Sin G & Gernaey K. 2016.** Data handling and parameter estimation. In: *Experimental methods in wastewater treatment*. IWA Publishing London, UK, 201–234.
- Singh N, Roy K, Goyal A & Moholkar VS. 2019.** Investigations in ultrasonic enhancement of  $\beta$ -carotene production by isolated microalgal strain *Tetradesmus obliquus* SGM19. *Ultrasonics Sonochemistry* **58**: 104697.
- Singh D, Nedbal L & Ebenhöf O. 2018.** Modelling phosphorus uptake in microalgae. *Biochemical Society Transactions* **46**: 483–490.
- Singh SP & Singh P. 2014.** Effect of CO<sub>2</sub> concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **38**: 172–179.
- Skjånes K, Rebours C & Lindblad P. 2013.** Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in biotechnology* **33**: 172–215.
- Spijkerman E, de Castro F & Gaedke U. 2011.** Independent colimitation for carbon dioxide and inorganic phosphorus. *PLoS One* **6**: e28219.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E & Isambert A. 2006.** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 87–96.
- Stein JR. 1973.** *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

**St-Onge P. 2013.** Optimisation en temps réel de la production de microalgues en photobioréacteur par la commande extrême. [Mémoire de maîtrise]. Université de Québec à Rimouski, Québec, Canada.

**Sun XM, Ren LJ, Zhao QY, Ji XJ & Huang H. 2018.** Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels* **11**: 1–16.

**Suwal S, Bentahar J, Marciniak A, Beaulieu L, Deschênes JS & Doyen A. 2019.** Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetradismus obliquus*. *Algal Research* **39**: 101470.

**Tang H, Chen M, Simon Ng KY & Salley SO. 2012.** Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering* **109**: 2468–2474.

**Thobie C. 2018.** Caractérisation de l'hydrodynamique et des transferts gaz-liquide dans un photobioréacteur intensifié. Etude de l'effet du bullage sur le développement de biofilm micro-algal. [Thèse de doctorat]. Université de Nantes, France.

**Tramontin DP, Gressler PD, Rörig LR, Derner RB, Pereira-Filho J, Radetski CM & Quadri MB. 2018.** Growth modeling of the green microalga *Scenedesmus obliquus* in a hybrid photobioreactor as a practical tool to understand both physical and biochemical phenomena in play during algae cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* **115**: 965–977.

**Tremblay G, Belzile C, Gosselin M, Poulin M, Roy S & Tremblay JÉ. 2009.** Late summer phytoplankton distribution along a 3500 km transect in Canadian Arctic waters: Strong numerical dominance by picoeukaryotes. *Aquatic Microbial Ecology* **54**: 55–70.

**Tyystjärvi E. 2008.** Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* **252**: 361–376.

**Van Dam RA, Hogan AC, McCullough CD, Houston MA, Humphrey CL & Harford AJ. 2010.** Aquatic toxicity of magnesium sulfate, and the influence of calcium, in very low ionic concentration water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**: 410–421.

**Varfolomeev SD & Wasserman LA. 2011.** Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology* **47**: 789–807.

**Venkata Mohan S, Sirisha K, Sreenivasa Rao R & Sarma PN. 2007.** Bioslurry phase remediation of chlorpyrifos contaminated soil: Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **68**: 252–262.

**Vera C, Guerrero C, Conejeros R & Illanes A. 2012.** Synthesis of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology* **50**: 188–194.

- Volkman JK & Brown MR. 2006.** Nutritional value of microalgae and applications. In: *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Science Publishers, Inc., 407–457.
- Wang B, Li Y, Wu N & Lan CQ. 2008.** CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**: 707–718.
- Wang J, Chen H, Wang Y & Xing L. 2015.** Synthesis and characterization of a new *Inonotus obliquus* polysaccharide-iron(III) complex. *International Journal of Biological Macromolecules* **75**: 210–217.
- Wang X, Zhang MM, Sun Z, Liu SF, Qin ZH, Mou JH, Zhou ZG & Lin CSK. 2020.** Sustainable lipid and lutein production from *Chlorella* mixotrophic fermentation by food waste hydrolysate. *Journal of Hazardous Materials* **400**: 123258.
- Wessinger EW, O'brien DJ & Kurantz MJ. 1990.** Identification of fungi for sweet whey permeate utilization eicosapentaenoic acid production. *Journal of Industrial Microbiology* **6**: 191–197.
- Wu YH, Li X, Yu Y, Hu HY, Zhang TY & Li FM. 2013.** An integrated microalgal growth model and its application to optimize the biomass production of *Scenedesmus* sp. LX1 in open pond under the nutrient level of domestic secondary effluent. *Bioresource Technology* **144**: 445–451.
- Wu YH, Hu HY, Yu Y, Zhang TY, Zhu SF, Zhuang LL, Zhang X & Lu Y. 2014.** Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **33**: 675–688.
- Wu ZY, Shi CL & Shi XM. 2007.** Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**: 1233–1238.
- Wynne MJ & Hallan JK. 2015.** Reinstatement of *Tetradasmus* GM Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium* **126**: 83–86.
- Xie Y, Ho SH, Chen CNN, Chen CY, Ng IS, Jing KJ, Chang JS & Lu Y. 2013.** Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource Technology* **144**: 435–444.
- Xin L, Hong-ying H, Ke G & Ying-xue S. 2010.** Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* **101**: 5494–5500.
- Yang A. 2011.** Modeling and evaluation of CO<sub>2</sub> supply and utilization in algal ponds. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **50**: 11181–11192.

- Yang S, Liu G, Meng Y, Wang P, Zhou S & Shang H. 2014.** Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* **172**: 180–185.
- Yang WH & Tarng YS. 1998.** Design optimization of cutting parameters for turning operations based on the Taguchi method. *Journal of Materials Processing Technology* **84**: 122–129.
- Ye CP, Zhang MC, Yang YF & Thirumaran G. 2012.** Photosynthetic performance in aquatic and terrestrial colonies of *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae) under aquatic and aerial conditions. *Journal of Arid Environments* **85**: 56–61.
- Yen HW, Sun CH & Ma TW. 2011.** The comparison of lutein production by *Scenedesmus* sp. in the autotrophic and the mixotrophic cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**: 353–361.
- Yu L, Li T, Ma J, Zhao Q, Wensel P, Lian J & Chen S. 2022.** A kinetic model of heterotrophic and mixotrophic cultivation of the potential biofuel organism microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research* **64**: 102701.
- Yuan S, Zhou X, Chen R & Song B. 2014.** Study on modelling microalgae growth in nitrogen-limited culture system for estimating biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **34**: 525–535.
- Zapata M, Rodriguez F & Garrido JL. 2000.** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series* **195**: 29–45.
- Zeng X, Danquah MK, Chen XD & Lu Y. 2011.** Microalgae bioengineering: From CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**: 3252–3260.
- Zhang J, Sun Z, Sun P, Chen T & Chen F. 2014.** Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food and Function* **5**: 413–425.
- Zhang Y, Yang X, Shardt YAW, Cui J & Tong C. 2018.** A KPI-based probabilistic soft sensor development approach that maximizes the coefficient of determination. *Sensors (Switzerland)* **18**: 3058.
- Zhang XW, Shi XM & Chen F. 1999a.** A kinetic model for lutein production by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **23**: 503–507.
- Zhang XW, Zhang YM & Chen F. 1999b.** Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry* **34**: 477–481.

**Zheng H, Wang Y, Li S, Nagarajan D, Varjani S, Lee DJ & Chang JS. 2022.** Recent advances in lutein production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **153**: 111795.

**Zhou W, Wang J, Chen P, Ji C, Kang Q, Lu B, Li K, Liu J & Ruan R. 2017.** Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **76**: 1163–1175.

**Zhu L, Wang Z, Takala J, Hiltunen E, Qin L, Xu Z, Qin X & Yuan Z. 2013.** Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. *Bioresource technology* **137**: 318–325.

**Zhu L. 2015.** Microalgal culture strategies for biofuel production: A review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **9**: 801–814.