



# Thèse de Doctorat

Antoinette KAZBAR

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

**École doctorale :** *Ecole doctorale de science pour l'ingénieur  
Ecole doctorale des sciences et de technologies, Liban*

**Discipline :** *Science pour l'ingénieur*

**Spécialité :** *Génie des procédés*

**Unité de recherche :** *Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144*

*Plateforme de recherche et d'analyse en sciences de l'environnement, campus Rafic HARIRI, Liban*

## Etude de l'impact de la concentration en oxygène dissous et la présence d'une fraction sombre sur la performance des photobioréacteurs

### JURY

Rapporteurs : **Marcel JANSSEN**, assistant professor, Université de Wageningen  
**Jérôme MORCHAIN**, Maître de conférences HDR, INSA de Toulouse

Examineurs : **Jack LEGRAND**, Professeur, Université de Nantes  
**Jean-François Cornet**, Professeur, Institut Pascal de Clermont Ferrand  
**Filipa LOPES**, Maître de conférences, Central Supélec, Paris

Invité: **Hosni TAKACHE**, Docteur, Université Libanaise (Co-directeur)

Directeur de Thèse : **Jérémy PRUVOST**, Professeur, Université de Nantes

Co-directeur de Thèse : **Ali ISMAIL**, Professeur, Université Libanaise



# Thèse de Doctorat

Antoinette KAZBAR

## Etude de l'impact de la concentration en oxygène dissous et la présence d'une fraction sombre sur la performance des photobioréacteurs

Investigation of the impact of dissolved oxygen concentration and design dark fraction on photobioreactor's performance

### Résumé

Les microalgues, grâce à leur grande biodiversité, présentent une matière première d'intérêt dans différents domaines : nutrition, cosmétique, agrochimie ou énergie. Ces microorganismes sont cultivés dans différents systèmes de culture : soit des systèmes ouverts comme les raceways soit en systèmes fermés comme les photobioréacteurs (PBR). L'objectif général est alors d'apporter les conditions favorables aux microorganismes. La croissance par photosynthèse amène cependant à un dégagement d'oxygène, dont l'accumulation sous forme dissoute dans le système dépend à la fois de la production biologique, mais également de la performance et du transfert gaz-liquide du système de culture. Cette thèse vise à étudier les effets de la concentration en oxygène dissous sur les performances cinétiques des PBRs. Cela sera abordé sur différents géométries de PBRs en lumière continu. L'étude de l'impact d'une fraction sombre pouvant être introduite dans certaines géométries sera également abordée, montrant au final l'interdépendance forte entre paramètres de conception, paramètres opératoires, réponse métabolique et performances cinétiques des PBRs.

**Mots clés :** Photobioréacteurs, microalgues, oxygène dissous, respiration, fraction sombre.

### Abstract

Because of their great biodiversity, microalgae can produce an enormous variety of high-value compounds for human needs. These microorganisms are cultivated in different culture systems: either open systems such as raceways or closed systems such as photobioreactors (PBR). The design of these PBRs takes into consideration the various parameters affecting the growth of microalgae such as pH, temperature, nutrients etc. Photosynthesis growth leads to an evolution of oxygen that can build up in dissolved form in the system depending on the biological production and the gas-liquid transfer of the system culture. This thesis aims to study the effects of dissolved oxygen concentration on the kinetic performance of PBRs. This will be tackled on different geometries of PBRs in continuous light. The study of the impact of a dark fraction present in certain geometries will also be discussed, showing finally the strong interdependence between design parameters, operating parameters, metabolic response and the kinetic performances of the PBRs.

**Key words:** Photobioreactors, microalgae, dissolved oxygen, respiration, dark fraction.



## *Remerciements*

L'achèvement de ce travail mené sur plusieurs années procure une grande satisfaction. Il est l'occasion de se remémorer les personnes qui m'ont permis d'en arriver là et d'en aller au bout de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Messieurs Jack Legrand, directeur précédent de Laboratoire GEPEA et Pascal Jaouen, directeur actuel, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe.

Je remercie également Dr. Fouad El Haj Hassan, directeur de la plateforme PRASE (Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement), pour avoir accepté la collaboration pour ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Jérôme Morchain, maître de conférences HDR à INSA Toulouse et Monsieur Marcel Janssen, assistant professeur à l'Université de Wageningen, pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux. Merci pour leurs observations et remarques pertinentes qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce mémoire.

Je remercie Monsieur Jean-François Cornet, professeur au laboratoire de génie chimique à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, pour son aide et ses réponses à plusieurs questions qui m'ont intrigué durant ce travail. Merci pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon Jury de thèse.

J'associe à ces remerciements Mme Filipa Lopes, maître de conférences à Central Supélec, Paris, et à Monsieur Jack Legrand pour avoir accepté d'examiner mon travail. Je me permets de vous remercier M. Jack, pour la confiance et la sécurité que vous m'avez accordé tout au long de mon parcours. Votre support était un des éléments qui m'ont poussé à donner toujours de mon mieux !

Un grand Merci à mon directeur de thèse en France, Monsieur Jérémy Pruvost, Professeur à l'université de Nantes. Tout au long de ce travail, il a su m'apporter un soutien important, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines. Merci pour tout !

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse au Liban, Monsieur Ali Ismail, professeur à la faculté d'agronomie de l'université Libanaise et Monsieur Hosni Takache, docteur à la faculté d'agronomie de l'Université Libanaise pour avoir encadré mes travaux. Merci pour tout votre soutien.

Je tiens, tout particulièrement, à témoigner une vive reconnaissance à tout l'équipe GEPEA qui ont participé de près ou de loin à cette expérience. Je voudrais insister sur la chaleur de l'accueil, la disponibilité et la gentillesse de l'ensemble des acteurs que j'ai pu côtoyer tout au long de ce travail. Vous étiez ma deuxième famille !

Merci Laurette Mouille, Delphine Drouin, Laurence Lavenant, Hélène Marec, Guillaume Roelens, Sébastien Chollet, Raphaëlle Touchard, Emmanuel Dechandol, Carole Broussard, Jocelyne Nicolleau et Marie-Pierre Fuchs. Merci au personnel enseignant-chercheur du Laboratoire pour vos conseils, votre suivi, votre aide et votre écoute. Merci Guillaume Cogne, Mariana Titica, Olivier Goncalves, Dominique Grizeau, Catherine Dupré, Caroline Gentric, Luc Marchal, Estelle Couallier, Walid Blel, Emilie Gadoin, Matthieu Frappart, Anthony Masse, Gerard Van Vooren, Abdellah Arhaliass, El-Khider Si-Ahmed.

Merci à l'équipe Algosource, dont j'adresse mes chaleureux remerciements pour leur amitié, leur soutien et le « bon café ». Merci Jean-Michel, Fanny, Jérôme, François, Sébastien.J. Merci pour votre accueil très agréable.

Je ne t'ai pas oublié Arnaud : tu m'as encadré durant mon stage, tu es mon ami proche et mon collègue, quelle chance ! Merci pour tout. Merci aussi à Valéria Montalescot pour le « push » que tu m'as donné la dernière année, j'ai découvert plein de compétences cachées !

Je remercie tous mes collègues dont a échangé nos connaissances et nos savoirs. Merci Brieuc, Benjamin Le Gouic, Rémy et Rémi, Alexandra, Eglantine, Philippe, Antoine D., Guillaume T., Armel, Jérémy M., Astride et ma stagiaire Zeinab. Merci pour mes amis dont j'ai reconnu pour une courte durée, durant mon stage ou ma thèse, mais notre amitié a continué jusqu'à présent, Antoine S., Camille, Thomas et Benjamin M., sans oublier Jordan, Mathilda et Kenza. Merci pour les beaux moments qu'on a vécus ensemble.

Je remercie infiniment ces amis à qui je n'ai jamais su dire toute l'affection que j'ai pour eux, qui furent présents à mes côtés lorsque j'en avais besoin. Merci ma chère Myriam (ma sœur adorable), Erika, Rosine, Liliana, Shuli, Charlène, Fernando, Vladimir, Dounia, Lisa, Adeline, Bahareh, Jian, Wenli, Kohei, Camillo, Kabayi et Momo.

Un chaleureux remerciement à Jacqueline Duclou pour tous ses conseils et son support. Sans toi, ça aura dû être difficile. Un grand Merci aussi à « 3ammo » René.

Je renouvelle toute mon amitié et ma sympathie à mes amis Libanais : Ashour, Georgina, Hasan, Hsein, Ghassan, Mahdi, Stéphanie, Marlène, Georgio, Mhammad S., Abdelkader, Lara, Mira, Michel, Ramzi, Perla, Nour, Ali et Darwish. Merci pour les agréables moments vécus ensemble. Un Merci spécial à Aumaya Taleb, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour être toujours le troisième élément qui clarifie les points de vue. Bref, qui me facilite la vie et diminue le poids des montagnes que je construis. Merci Razmig Kandilian, pour tous tes conseils personnels et professionnels.

Finalement, J'offre ce travail à ma merveilleuse famille qui m'a beaucoup soutenu durant ce parcours. Merci Maman, papa, Antoine, Mona, Daniella, Oriano, Cynthia et mes très chers Charbel, Georges et Jocelyne.



# *Listes des communications*

## **Articles à soumettre**

1) Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors  
Auteurs: Kazbar A., Cogne G., Urbain B, Tallec J, Le Gouic B., Takache H., Ismail A, Pruvost J  
Sera soumis dans: Bioresource Technology Journal

2) Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors  
Auteurs : Kazbar A., Takache H., Marec.H., Ismail A, Pruvost J  
Sera soumis dans: Algal Research Journal

3) Experimental characterization of the dynamic response of microalgal culture in outdoor simulated conditions: investigation of dissolved oxygen concentration effects on biomass loss at night  
Auteurs : Kazbar A., Titica M., Bonnanfant M, Marec H., Takache H., Ismail A, Pruvost J  
Sera soumis dans: Algal Research Journal

## **Communications orales à des congrès internationaux**

1) Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors:  
International congress of applied phycology, Nantes Juin 2017

2) Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors:  
International congress of chemical engineering WCCE, Barcelone, octobre 2017

## **Communication posters à des congrès nationaux**

1) Experimental characterization of the dynamic response of microalgal culture in outdoor simulated conditions: investigation of temperature and dissolved oxygen concentration effects on biomass loss at night: FFB symposium, Lille, Mai 2017

2) Optimisation et modélisation de la croissance de *Parachlorella kessleri* en photobioréacteurs solaires, 7èmes rencontres biologie-physique du Grand-Ouest, RBPGO7, Nantes, France, le 23 et 24 Juin 2016.



# *Table de matière*

<b>Introduction Générale</b> .....	1
<b>Chapitre 1</b>	
<b>Culture des microalgues en photobioréacteurs : caractéristiques et paramètres de culture</b>	
<b>I. Bibliographie</b> .....	6
I.1 Les microalgues .....	6
I.1.1 Définition.....	6
I.1.2 Classification.....	6
I.2 Réactions biochimiques des microalgues photosynthétiques en présence de lumière.....	8
I.2.1 La photosynthèse.....	8
I.2.2 Mécanismes de transferts d'électrons alternatifs au transfert d'électrons linéaire des réactions claires de la photosynthèse .....	13
Transfert cyclique d'électrons.....	13
Photoinhibition ou transition d'état.....	14
Réactions de Mehler .....	15
I.2.3 La Photorespiration .....	16
I.2.4 La respiration à la lumière.....	17
I.3 Réactions biochimiques des microalgues photosynthétiques en obscurité. ....	18
I.3.1 La respiration .....	18
I.3.2 La chlororespiration.....	19
I.4 Facteurs influençant la culture en photobioréacteurs.....	20
I.4.1 Facteurs opératoires.....	20
Le carbone.....	27
L'azote.....	28
Les microéléments .....	30
I.4.2 Paramètres de conception des systèmes de culture de microalgues .....	30
I.5 Systèmes de culture.....	34
I.5.1 Systèmes de cultures ouverts.....	35
I.5.2 Les systèmes de culture fermés .....	39
I.5.3 Bilan sur les technologies de culture de microalgues.....	45
I.6 Modes de fonctionnement en photobioréacteurs .....	46

	Le mode batch .....	46
	Le mode fed-batch et semi-continu .....	48
	Le mode continu .....	48
I.7	Modélisation de la croissance des microalgues.....	49
I.7.1	Modèles de croissance en photobioréacteurs .....	49
I.7.2	Modèle de croissance cinétique retenu .....	50
I.7.3	Modélisation des performances cinétiques d'un photobioréacteur .....	55
I.8	Conclusion .....	56

## **Chapitre 2**

### **Matériels et Méthodes :**

#### **Mise en place des pilotes d'étude et définition des protocoles de suivi de culture**

II.	Matériel et méthodes .....	60
II.1	Souche d'étude: <i>Chlorella vulgaris</i> .....	60
II.2	Milieux de culture en photobioréacteurs: BBM et Sueoka.....	61
II.3	Systèmes de culture.....	62
II.3.1	Le photobioréacteur torique.....	62
II.3.2	Le photobioréacteur Airlift.....	64
II.4	Contrôle des paramètres de cultures.....	64
II.4.1	Logiciel de pilotage LabVIEW.....	64
II.4.2	Flux lumineux incident .....	65
II.4.3	Suivi et contrôle du pH .....	66
II.4.4	La température .....	67
II.4.5	L'oxygène dissous.....	67
II.5	Protocoles d'analyses des microalgues .....	67
II.5.1	Concentration en biomasse sèche.....	67
II.5.2	Pigments.....	68
II.5.3	Détermination de la composition élémentaire .....	68
II.5.4	Analyse de taille et de forme .....	70
II.5.5	Détermination de l'activité photosynthétique Fv/Fm.....	71
II.5.6	Carbone inorganique total (CIT).....	72
II.6	Bancs expérimentaux.....	72
II.6.1	Photobioréacteur Airlift plan avec fraction sombre .....	72
II.6.2	Pilote de l'étude de l'effet de l'oxygène dissous sur les performances des PBRs.....	75
II.6.3	PBR torique pour l'étude du transfert de gaz .....	76

## Chapitre 3

### Etude de l'effet de la concentration en oxygène dissous sur la performance des photobioréacteurs

III.	Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors .....	86
III.1	Introduction and objectives.....	86
III.2	Methodology .....	88
III.2.1	Experimental setup .....	88
	Selected strain .....	88
	Cultivation system .....	88
	Analysis .....	89
III.2.2	Theoretical consideration .....	90
	Calculating photobioreactor kinetic performances.....	90
	Overview of the Light-limited kinetic growth model in a PBR.....	91
	Kinetic growth model for <i>Chlorella vulgaris</i> .....	93
	Experimental determination of $J_{NADH2}$ .....	95
	Estimation of photorespiration activity .....	95
III.2.3	Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer.....	97
	Gas-liquid mass transfer determination.....	97
	Theoretical determination of dissolved oxygen concentration .....	98
III.3	Results and discussion.....	99
III.3.1	Experimental investigation of the effect of dissolved oxygen concentration on the growth of <i>Chlorella vulgaris</i> .....	99
III.3.2	Determination of $J_{NADH2}$ as a function of dissolved oxygen concentration.....	102
III.3.3	Modeling of the influence of dissolved oxygen concentration on kinetic growth .	103
III.3.4	Gas-liquid mass transfer in lab scale and industrial photo bioreactors .....	108
III.4	Conclusion.....	112

## Chapitre 4

### Eude de l'impact d'une fraction sombre dans un photobioréacteur

IV.	Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors .....	114
IV.1	Introduction and objectives.....	114
IV.2	Methodology .....	116
IV.2.1	Photobioreactor setup .....	116
IV.2.2	Validation of the dark recirculation loop on cells mechanical integrity .....	117

IV.2.3	Strains and culture medium: .....	118
IV.2.4	Biomass analysis .....	118
IV.3	Theoretical consideration .....	119
IV.3.1	Dark fraction and residence time.....	119
IV.3.2	Volumetric and surface productivity.....	121
IV.3.3	Light-limited growth and the concept of working illuminated volume fraction....	121
IV.3.4	Overview of the Kinetic growth model .....	123
IV.3.5	Parameters of the kinetic growth model in in different Nitrogen source media ....	126
IV.3.6	Adaptation of the model to photobioreactors presenting a design dark fraction ...	127
IV.3.7	Calculation of respiration terms in Ammonium Medium N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	128
IV.3.8	Analogy to light/dark cycles.....	131
IV.4	Results and discussion.....	134
IV.4.1	Effect of dark fraction on the growth of <i>Chlorella vulgaris</i> on ammonium medium and for low dissolved oxygen concentration (DO < 30mg/L) .....	134
IV.4.2	Effect of nitrogen source under non-inhibitory dissolved oxygen concentration..	137
IV.4.3	Influence of dissolved oxygen concentration .....	138
IV.4.4	Analogy to Light/Dark cycles .....	141
IV.5	Conclusion.....	145
	<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>145</b>

## Listes des figures

Figure 1-1 : Schéma des différents paramètres pris en compte pour la conception d'un photobioréacteur. ....	2
Figure I-1 : Structure d'une algues unicellulaire <i>Chlamydomonas</i> sp. ( <a href="http://les-biocarburants-vs-le-petrole.e-monsite.com/">http://les-biocarburants-vs-le-petrole.e-monsite.com/</a> ).....	6
Figure I-2 : schéma d'un chloroplaste en coupe transversale ( <a href="http://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/botanique-cellule-vegetale-439/page/8/">http://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/botanique-cellule-vegetale-439/page/8/</a> ).....	8
Figure I-3 : schéma récapitulatif des deux réactions de la photosynthèse ( <a href="http://www.salamandre.net/article/au-plus-pres-du-miracle/">http://www.salamandre.net/article/au-plus-pres-du-miracle/</a> ).....	10
Figure I-4 : Chaîne de transport d'électrons, schéma en Z ; ( <a href="http://www.biocourse.com">http://www.biocourse.com</a> )....	11
Figure I-5 : production d'ATP dans le stroma du chloroplaste par l'ATP synthase ( <a href="http://www.biocourse.com">http://www.biocourse.com</a> ).....	12
Figure I-6 : Cycle de Calvin ( <a href="http://www.biocourse.com">http://www.biocourse.com</a> ).....	13
Figure I-7 : les flèches rouges représentent le transfert d'électrons linéaire de la phase claire de la photosynthèse. Les flèches bleues représentent le transport d'électrons cyclique (Joliot et Johnson 2011). ....	14
Figure I-8 : Schéma de transition d'état entre les deux photosystème (Wollman 2001).....	15
Figure I-9 : Reactions de Mehler .....	15
Figure I-10 : Compétition entre l'oxygène et le dioxyde de carbone pour l'enzyme RuBisCO dans la voie de photorespiration et le cycle calvin. ....	16
Figure I-11 : Interactions entre le chloroplaste et la mitochondrie des cellules photosynthétiques en conditions lumineuses. ....	18
Figure I-12 : schéma résumant les 3 étapes de la respiration mitochondriale ( <a href="http://tpe-levure-biere.e-monsite.com">http://tpe-levure-biere.e-monsite.com</a> ) .....	19
Figure I-13 : schéma récapitulatif des différentes réactions s'effectuant à la lumière (en jaune) et à l'obscurité (en gris) en terme de production de dioxygène et sa consommation .....	20
Figure I-14 : représentation schématique de la réponse photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse (Masojídek et al 2013) .....	21
Figure I-15 : effet de différents régimes d'atténuation de lumière sur la productivité en biomasse (Pruvost et al. 2016).....	23
Figure I-16 : effet de la concentration d'oxygène dissous et de la température sur l'activité photosynthétique $f_v/f_m$ chez <i>Arthrospira platensis</i> cultivée en conditions solaires. Les carrés noirs présentent la condition de température optimale à une concentration en dioxygène dissous faible. Les triangles noirs présentent la condition d'une concentration en oxygène dissous élevée –température optimale et les ronds noirs présentent les conditions d'une concentration en dioxygène dissous élevée et une température basse (Torzillo et Vonshak 2013) .....	26
Figure I-17 : Forme du carbone dissous dans l'eau selon le pH. ....	28
Figure I-18 : Influence de la surface éclairée $a_{light}$ et de la fraction sombre $f_d$ sur la culture de <i>Chlorella vulgaris</i> en PBR. A : $f_d = 0$ et B : $f_d = 0.2$ (Pruvost et al 2016).....	31

Figure I-19 : Cycles lumière/obscurité dans deux géométries de système de culture (photo de PBR airlift plan prise de Takache 2010 et photo du Raceway ouvert prise de Z. Chen et al. 2016) .....	32
Figure I-20 : Représentation schématique du modèle de double film pour le transfert d'oxygène au travers d'interface gaz-liquide.(Jimenez 2013) .....	34
Figure I-21 : Photos de lacs naturels dans différentes régions. ....	36
Figure I-22 : schéma de l'évolution de l'oxygène dissous dans les lacs eutrophisés .....	37
Figure I-23: Photos de différentes géométries de bassins ouverts.....	38
Figure I-24 Photos de photobioréacteurs tubulaires présentés en différentes positionnement et matériel de conception .....	40
Figure I-25 : Photos de photobioréacteurs plans .....	41
Figure I-26 : Photos of different lab scale photobioreactors. ....	42
Figure I-27 : photos des photobioréacteurs en innovation.....	44
Figure I-28 : Photos des photobioreacteurs flottants .....	45
Figure I-29 : courbe de croissance d'une culture de microalgue dans un système en batch. ( <a href="https://www.emaze.com/">https://www.emaze.com/</a> ).....	47
Figure I-30 : représentation schématique de l'obtention des propriétés radiatives des microalgues .....	51
Figure I-31 : Représentation schématique du modèle à deux flux (Takache 2010).....	52
Figure II-1: schéma résumant les différents domaines d'utilisation de <i>Chlorella vulgaris</i> . ...	60
Figure II-2 : Photo de <i>Chlorella vulgaris</i> prise par microscope ZEISS AXIO LAB™. ....	61
Figure II-3: Schéma type du photobioréacteur torique (Souliès 2014).....	63
Figure II-4: Schéma type du photobioréacteur plan Airlift ( Pruvost et al. 2011).....	64
Figure II-5 : Spectre d'émission normalisé du panneau de LED blanches (Takache 2010)...	65
Figure II-6 : Exemples d'étalonnage d'un panneau de LED Blanches.....	65
Figure II-7: Schéma explicatif des étapes de dosage des pigments.....	68
Figure II-8: a : photo de <i>Chlorella vulgaris</i> en photobioréacteur à l'état stationnaire et sans pompe en agrandissement ( $\times 40$ ), b : photo « a » interprétée par imagej, c : photo « a » calculée par imagej. ....	71
Figure II-9 : à gauche ; vue en face du montage expérimentale . Le photobioréacteur fonctionne en continu : le pH, la température, la lumière et le taux de dilution sont réglés. A droite, le montage expérimentale vue en profil ; une boucle sombre est mise en place (comportant une pompe peristaltique, un débitmètre et un tuyau de recirculation).....	73
Figure II-10 : Pour un $f_d=0.1$ , 100ml de la culture est soutiré pour passer pendant un temps $t_d$ (s) variable selon le débit ( $Q_d$ ) ( $\text{cm}^3/\text{min}$ ) de la pompe péristaltique. Idem pour $f_d=0.2$ (200ml) et $f_d=0.3$ (300ml) .....	74
Figure II-11 : Schéma du pilote pour l'étude de l'effet de la concentration d'oxygène dissous .....	75
Figure II-12 : Pilote d'étude de l'activité respiratoire pour des phases sombres prolongées. ....	77
Figure II-13 : Graphe représentant l'évolution de la concentration en $\text{O}_2$ dans la PBR en cycle J/N. Ici la valeur consigne de $\text{O}_2$ était 15mg/L.....	80
Figure II-14 : Graphe représentant l'évolution de la concentration en $\text{O}_2$ dans la PBR en cycle J/N. Ici la valeur consigne de $\text{O}_2$ était 40mg/L.....	81



Figure II-15 : figure décrivant la méthode désoxygénation/ré oxygénation pour la détermination de $K_{LA}$ .....	83
Figure II-16 : Graphe représentant les valeurs de $K_{LA}$ pour le torique et l'airlift plan.....	84
Figure III-1: Model prediction of biomass surface and volumetric productivities as a function of dilution rate for two PBR geometries operated at $q_0 = 250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . ....	94
Figure III-2 : biomass productivity loss as a function of ratio of photorespiration (Urbain 2017) .....	97
Figure III-3: Evolution of the surface productivity ( $P_s$ ) of <i>Chlorella vulgaris</i> for different dissolved oxygen concentration in the torus PBR (DO). PFD = $250\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.02\text{h}^{-1}$ .....	100
Figure III-4: Pigment concentration as a function of dissolved oxygen concentration. ....	102
Figure III-5: Evolution of $J_{\text{NADH}_2}$ (rate of production of the respiratory cofactor $\text{NADH}_2$ ) as a function of dissolved oxygen concentration.....	103
Figure III-6: Averaged spectral mass absorption $E_{a\lambda}$ (1) and scattering cross-section $E_{s\lambda}$ of <i>Chlorella vulgaris</i> grown in two dissolved oxygen concentrations (high DO, i.e $\text{DO}>30\text{mg}/\text{l}$ and Low DO, i.e $\text{DO}<30\text{mg}/\text{L}$ ) PFD = $250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . ....	104
Figure III-7: Modeling surface productivity for different dissolved oxygen concentration	105
Figure III-8: Comparison between experimental surface productivity and theoretical surface productivity predicted by the model for different dissolved oxygen concentrations. ....	106
Figure III-9: Error percentage for each dilution rate by comparing surface productivity used to establish the kinetic model to surface productivity predicted by the same model for $\text{DO} = 8\text{mg}/\text{L}$ and $\text{DO} = 31\text{mg}/\text{L}$ .....	107
Figure III-10: Surface productivity in Airlift and torus PBR for different microalgae strain at different dissolved oxygen concentrations .....	109
Figure III-11: Gas-liquid mass transfer and dissolved oxygen concentration in torus and Airlift photobioreactor as a function of different air flowrates. ....	110
Figure III-12 : emplacement of different PBRs geometry towards dissolved oxygen concentration. ....	112
Figure IV-1: Photos of lab scale and industrial photobioreactor with design dark fraction	115
Figure IV-2: experimental setup of the photobioreactor presenting a design dark fraction	116
Figure IV-3: Size distribution of <i>Chlorella vulgaris</i> while exposed to the peristaltic pump, after grinding and for different exposure to pump flows (different design dark fraction cases)...	118
Figure IV-4: Schematic representation of the pilot used in this study .....	120
Figure IV-5: Schematic of the three regimes of illumination in microalgae cultures as a function of microalgae residence time $\tau$ ( Pruvost et Cornet 2012).....	123
Figure IV-6 : Effect of dark fraction on photobioreactor productivity for <i>Chlorella vulgaris</i> in Sueoka ( $\text{N-NH}_4^+$ ) medium. PFD = $250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , $D = 0.02\text{h}^{-1}$ . 1 represents results for a dark fraction $f_d = 10\%$ and 2:represents results for $f_d = 30\%$ .....	135
Figure IV-7: Effect of dark fraction on photobioreactor productivity for <i>Chlorella vulgaris</i> in BBM (Nitrate) medium. PFD = $250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , $D = 0.02\text{h}^{-1}$ . 1 represents results for a dark fraction $f_d = 10\%$ and 2:represents results for $f_d = 200\%$ .....	138

Figure IV-8: Surface productivity for $f_d = 0$ and $f_d = 30\%$ for two dissolved oxygen concentration in ammonium N-source medium for <i>Chlorella vulgaris</i> . PFD = $250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$ .	139
Figure IV-9: Surface productivity for $f_d = 0$ and $f_d = 20\%$ for two dissolved oxygen concentration in nitrate N-source medium for <i>Chlorella vulgaris</i> . PFD = $250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$ .	140
Figure IV-10: Predicted time evolution of $J_{\text{NADH2}}(t)$ in the illuminated part of the system and in the design dark fraction calculated following Eq IV-46. In the light : $J_{\text{NADH2,Leq}} \approx 1.8 \text{ mol}_{\text{NADH2}}.\text{kg}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . In the dark: $J_{\text{NADH2,Deq}} \approx 10 \text{ mol}_{\text{NADH2}}.\text{kg}^{-1}.\text{s}^{-1}$	144

## *Liste des tableaux*

Tableau I-1 : Classification des microorganismes photosynthétiques selon (Barsanti et Gualtieri 2006)	7
Tableau I-2 : Influence de la température sur la perte de biomasse la nuit de la cyanobactérie <i>Arthrospira platensis</i> cultivée en photobioréacteur tubulaire (Torzillo et al 1991).	24
Tableau I-3 : effet de la concentration d'oxygène dissous sur la productivité en biomasse de <i>Arthrospira platensis</i> en conditions solaires (Torzillo et Vonshak 2013). LO pour une concentration en oxygène dissous faible. OT pour température optimale, LT pour température basse et HO pour une concentration d'oxygène élevée.	27
Tableau I-4 : Substrats azotés préférés de différentes souche de microalgues	29
Tableau I-5 : Différentes géométries de systèmes de culture ouverts et fermés.	35
Tableau II-1 : Composition massique et molaire des milieux de culture Sueoka et BBM pour <i>Chlorella vulgaris</i> .	61
Tableau II-2 : Composition des deux solutions d'oligoéléments pour la culture de <i>Chlorella vulgaris</i> .	62
Tableau II-3 : Composition élémentaire de <i>Chlorella vulgaris</i> pour les deux milieux de culture.	69
Tableau II-4 : Récapitulatif de l'analyse de taille et de forme de <i>C. vulgaris</i> (Souliès 2014).	71
Tableau II-5 : Concentration d'oxygène dissous correspondante à chaque débit d'azote dans les conditions de culture.	76
Tableau II-6 : KLa pour différents débit en PBR Airlift plan	83
Tableau II-7 : KLa pour différents débit en PBR torique.	83
Table III-1 : Summary of kinetic model parameters of <i>Chlorella vulgaris</i> (Souliès et al. 2016)	94
Table III-2: ratio of photorespiration for each DO.	101
Table III-3: equivalent radius (Dauchet et al. 2015)of <i>Chlorella vulgaris</i> for each dissolved oxygen concentration	104
Table III-4: Gas-liquid mass transfer and dissolved oxygen concentration DO for different industrial photobioreactors.	111

Table IV-1: Orders of magnitude of Damköhler numbers encountered in PBR for different dynamic processes of metabolism (these values are for agitated tanks),the phenomenon characterizing the limiting step governing the process is mentioned also (Cornet 2007) ...	132
Table IV-2: Productivity loss for different conditions of design dark fraction.....	136
Table IV-3: Respiratory activity of <i>Chlorella vulgaris</i> for a dark fraction $f_d = 30\%$ in Sueoka medium ( $N-NH_4^+$ ).....	136
Table IV-4: Determination of the illuminated fraction $\gamma$ for $f_d = 30\%$ in two dark residence time (45s and 300s).....	137
Table IV-5: Damköhler number and $J_{NADH2}$ calculated for different $f_d$ for <i>Chlorella vulgaris</i> . PFD = $250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $D = 0.02\text{h}^{-1}$ . ....	141
Table IV-6: comparison between experimental $J_{NADH2t}$ and predicted $J_{NADH2 t}$ with partial integration and $J_{NADH2 t}$ without time integration.....	144



---

# Introduction générale

---

La photosynthèse est le processus unique de conversion de l'énergie solaire en matières organiques par des organismes photoautotrophes. L'homme a utilisé de tous temps ce processus naturel pour notamment l'agriculture traditionnelle. Depuis quelques années, l'exploitation d'un autre type de bioressource végétale tend à apparaître. Il s'agit des cultures des microalgues. Cette exploitation date d'une soixantaine d'années environ avec une augmentation importante de l'intérêt ces dernières années ( Ugwu et al. 2008; Chaumont 1993; Benemann et al. 1987).

Les microalgues, grâce à leur grande biodiversité, peuvent être une matière première dans les domaines de nutrition humaine ou animale, de la cosmétique, des traitements secondaires des eaux usées ou dans l'industrie agrochimique et de l'énergie (Zittelli et al. 2013; A. Richmond 2004). Les microalgues destinées à l'exploitation commerciale sont aujourd'hui soit récoltées à partir d'habitats naturels, soit obtenues grâce à des procédés de culture apportant des niveaux de contrôle différent, allant des lacs ou étangs, aux systèmes fermés appelés photobioréacteurs (PBR) ( Richmond 2004).

Les photobioréacteurs fournissent un environnement clos qui protège la culture contre une contamination par des espèces indésirables. Ces systèmes permettent un contrôle des différents paramètres de culture (pH, température, nutriments...). Ces dernières années, l'ingénierie des PBRs a beaucoup progressé et des nouvelles technologies ont été proposées (Posten 2009). Cependant, la limitation principale est l'extrapolation de ces systèmes qui amène à des coûts élevés d'investissement. Néanmoins, l'amélioration de la conception des photobioréacteurs permet d'atteindre une efficacité photosynthétique élevée, proche des valeurs maximales théoriques, et donc une productivité importante de conversion, en biomasse ou produits d'intérêt.

D'une façon générale, on peut dire qu'il n'existe pas de photobioréacteur idéal. Le choix d'un PBR approprié est dépendant de l'espèce cultivée, de l'emplacement du PBR et du produit

final visé. Cependant, les principes qui conduisent à une productivité maximale des systèmes de culture de microalgues sont aujourd'hui bien connus (Posten 2009), et sont résumés dans la Figure 1.1.

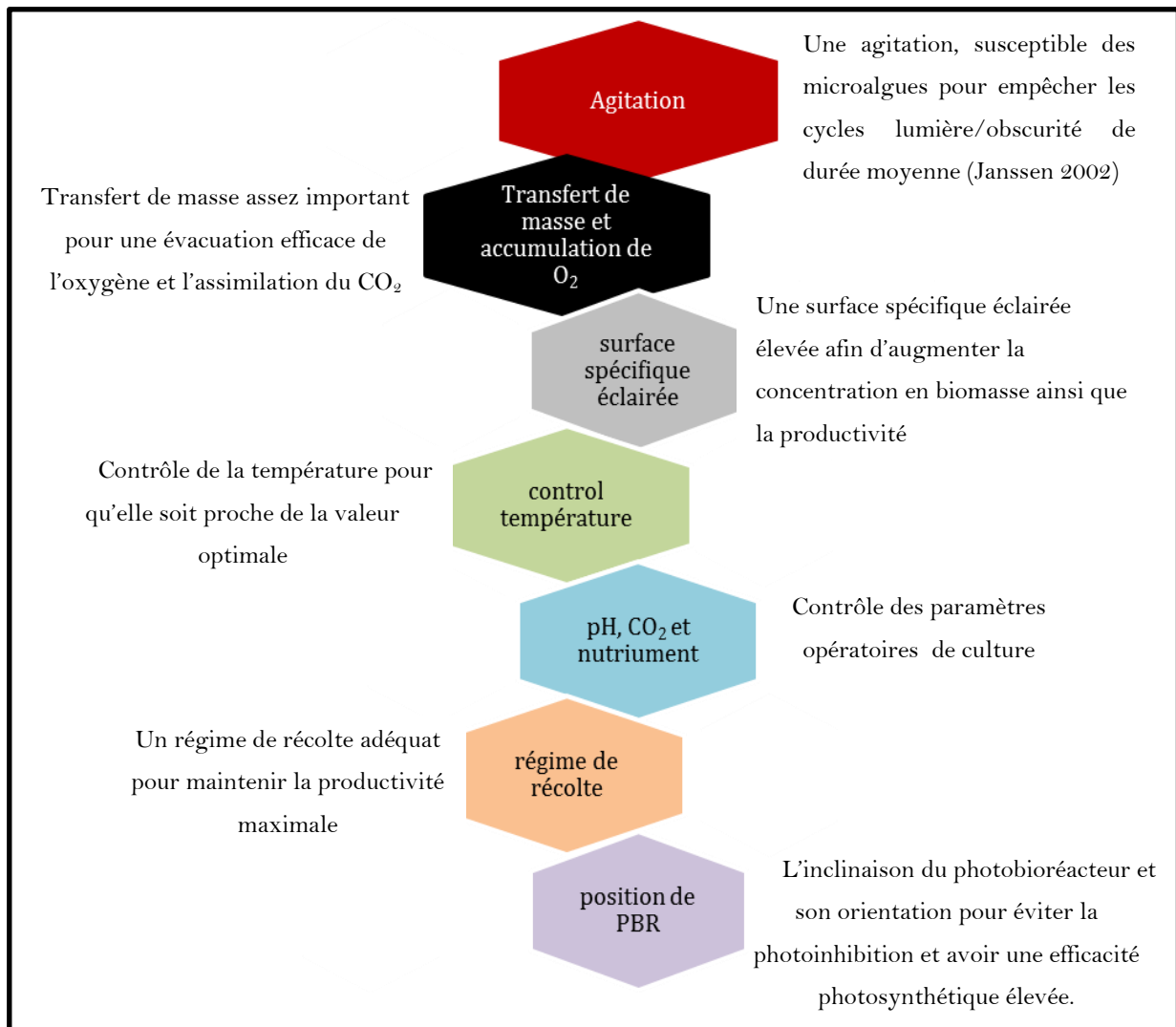


Figure 1.1 : Schéma des différents paramètres pris en compte pour la conception d'un photobioréacteur.

D'une façon générale, les nouvelles géométries de PBRs cherchent à répondre à ces critères. Malgré une conception relativement complexe, la technologie des PBRs qui est déployée à grande échelle existe et la production industrielle de biomasse en grande quantité par cette technologie est aujourd'hui une réalité (Borowitzka et Moheimani 2013). Les différentes technologies et applications seront détaillées dans la partie I.5.2.

Parmi les paramètres pouvant influencer les performances, on note que les photobioréacteurs, en tant que technologie fermée, ont tendance à accumuler des

concentrations élevées de dioxygène dissous, celui-ci étant le coproduit principal de la photosynthèse. Un système de culture tubulaire, par exemple, peut accumuler de l'oxygène jusqu'à atteindre 400% de la valeur obtenue en équilibre avec l'air. Cet oxygène peut inhiber alors la croissance en impactant le métabolisme des cellules ; il y aura alors une perte de productivité (Raso et al. 2012; Rubio et al. 1999; Mendoza et al. 2013; Marquez et al. 1995; Costache et al. 2013; G. Torzillo et al. 1984; Ogawa et al. 1980; Ugwu et al. 2007; Vonshak et al. 1996; Mendoza et al. 2013; Lee et Ding 1995; Sousa et al. 2013).

La prédiction de l'évolution de la biomasse algale au sein de bioprocédés est un domaine largement étudié, notamment à l'aide de modèles mathématiques. Ces modèles permettent l'optimisation du procédé en prédisant le comportement du microorganisme dans le système de culture en fonction des conditions appliquées. Ces modèles peuvent être de complexité variable. Plusieurs approches ont été proposées dans la littérature (Béchet et al. 2013).

Ce manuscrit concerne l'étude de l'impact de la concentration d'oxygène dissous sur la performance des photobioréacteurs, avec pour objectif final de faire évoluer les modèles existants pour prendre en compte ce paramètre. Le premier chapitre, présente la photosynthèse, phénomène principale à l'origine de la croissance des microalgues, et de la production associée de dioxygène. Les autres processus intervenant dans le métabolisme sont également détaillés ainsi que les facteurs influençant la culture de microalgues et les différents systèmes de cultures. Le chapitre 2 présente la souche d'étude, les pilotes utilisés et les différents protocoles de suivi utilisés dans l'étude. Le troisième chapitre met l'accent sur l'étude de l'effet inhibiteur d'une concentration élevée d'oxygène sur la croissance des microalgues et par voie de conséquence, sur la performance cinétique des photobioréacteurs. Des expériences ont été menées pour cela dans un photobioréacteur torique à échelle laboratoire avec la souche *Chlorella vulgaris*. Une comparaison entre différents photobioréacteurs à échelle laboratoire et à échelle industrielle sera présentée pour finalement déduire l'impact de l'oxygène dissous et des performances en transfert gaz-liquide sur les photobioréacteurs. Le cas particulier d'un photobioréacteur présentant une fraction sombre est étudiée dans le chapitre 4. En effet, certains PBRs possèdent une zone non éclairée par conception. Cela peut être nécessaire par exemple pour l'agitation par un système airlift (dégazeur) (Hall et al. 2003) ou par une cuve déportée pour assurer des besoins d'apport en nutriments ou de régulation thermique ( Pruvost et al. 2017, Scoma et al. 2012). Comme il sera montré, cette fraction sombre pourra avoir un impact négatif sur la croissance des

microalgues, en jouant notamment sur l'activité respiratoire, elle-même influencée par l'oxygène dissous.



---

# Chapitre 1

---

## *Culture des microalgues en photobioréacteurs : caractéristiques et paramètres de culture.*

Ce premier chapitre introduit les microalgues photosynthétiques. La biologie de ces microorganismes est abordée afin d'avoir une idée globale des mécanismes où le dioxygène intervient. Le dioxygène est en effet produit par photosynthèse mais il est consommé par différents mécanismes biologiques définis dans ce chapitre. Les paramètres influençant la culture des microalgues sont présentés. Puis différents systèmes de production de microalgues seront présentés, et comparés selon leur tendance à accumuler le dioxygène dissous. Enfin, la modélisation de la croissance des microalgues sera abordée.

# I. Bibliographie

## I.1 Les microalgues

### I.1.1 Définition

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques unicellulaires se trouvant en abondance dans les milieux aquatiques. Elles sont considérées comme une source de molécules d'intérêt : protéines, lipides, glucides, vitamines et antioxydants. Comme toute cellule, les microalgues sont délimitées par une membrane plasmique contenant au sein de leur cytoplasme de nombreux organites dont les plus importants sont le chloroplaste, la mitochondrie, les plasmides et le noyau. La plupart des microalgues sont autotrophes, et sont capables de transformer l'énergie lumineuse en matières organiques par photosynthèse (A. Richmond 2004).

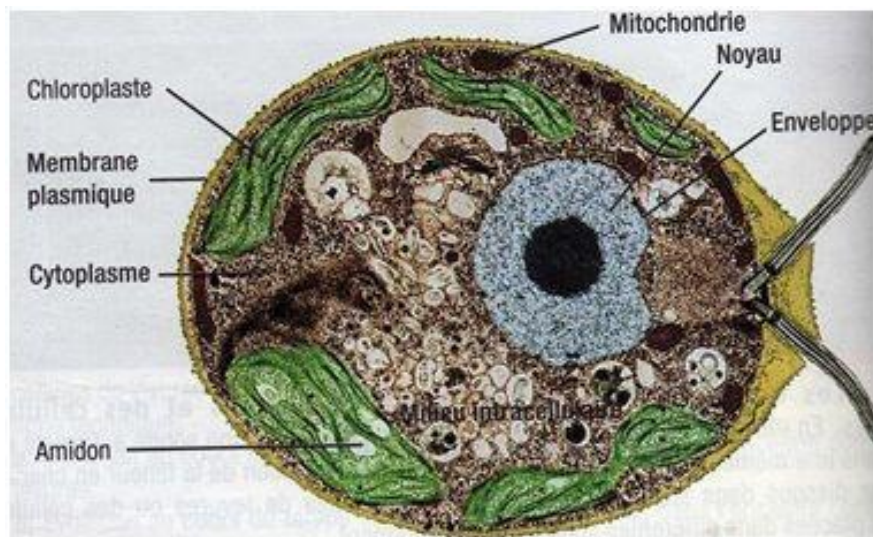


Figure I-1 : Structure d'une algue unicellulaire *Chlamydomonas sp.* (<http://les-biocarburants-vs-le-petrole.e-monsite.com/>)

### I.1.2 Classification

Il existe deux types de microorganismes photosynthétiques : i) Les eucaryotes ayant au sein de leur cytoplasme des nombreuses organites cellulaires (noyau, chloroplaste et mitochondrie...), ii) les procaryotes ne possédant pas d'organites cellulaires. Les microalgues sont des cellules eucaryotes alors que les cyanobactéries sont procaryotes. Concernant leur

classification, il n'y a pas un système exact ; les critères de différenciation changent en fonction du développement de nouvelles preuves génétiques et ultrastructurales. Barsanti et Gualtieri (2006) proposent deux divisions pour les procaryotes et 9 divisions pour les eucaryotes. Cette classification est détaillée dans le Tableau I-1 . La classification la plus simple est donnée par Fritsch (1935). Il a classé les algues en 11 classes : *Myxophyceae* (*Cyanophyceae*), *Euglenophyceae*, *Chlorophyceae*, *Chloromonadineae*, *Xanthophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae* (*Diatomés*), *Cryptophyceae*, *Dinophyceae*, *Phaeophyceae*, *Rhodophyceae*. Cette classification est basée sur les critères de pigmentation, type de flagelle, structure du thallus et méthodes de reproduction.

Kingdom	Division	Class	
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae	
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae	
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae	
	Rhodophyta	Bangiophyceae	
		Florideophyceae	
	Heterokontophyta	Chrysophyceae	
		Xanthophyceae	
		Eustigmatophyceae	
		Bacillariophyceae	
		Raphidophyceae	
		Dictyochophyceae	
		Phaeophyceae	
		Haptophyta	Haptophyceae
		Cryptophyta	Cryptophyceae
		Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae	
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae	
	Chlorophyta	Prasinophyceae	
		Chlorophyceae	
		Ulvophyceae	
		Cladophorophyceae	
Bryopsidophyceae			
Zygnematophyceae			
Trentepohliophyceae			
Klebsormidiophyceae			
Charophyceae			
Dasycladophyceae			

Tableau I-1 : Classification des microorganismes photosynthétiques selon (Barsanti et Gualtieri 2006)

Etant des microorganismes photosynthétiques, les microalgues réalisent la photosynthèse pour leur croissance. Cette dernière s'effectue en présence de lumière et implique une

consommation du dioxyde de carbone et une production d'oxygène. Cette étude se focalise sur l'impact de la concentration d'oxygène dissous sur la performance de photobioréacteurs. Ainsi une meilleure connaissance de l'implication de l'oxygène dans le métabolisme cellulaire des microalgues est nécessaire et détaillée ci-après.

## I.2 Réactions biochimiques des microalgues photosynthétiques en présence de lumière

Les microalgues photosynthétiques, en présence de lumière, induisent plusieurs réactions biochimiques dépendantes de différents facteurs : la lumière elle-même, la disponibilité en substrats de croissance, la température, le pH et les concentrations de dioxygène et de dioxyde de carbone dissous.

### I.2.1 La photosynthèse

La photosynthèse est effectuée uniquement dans les chloroplastes (Figure I-2).

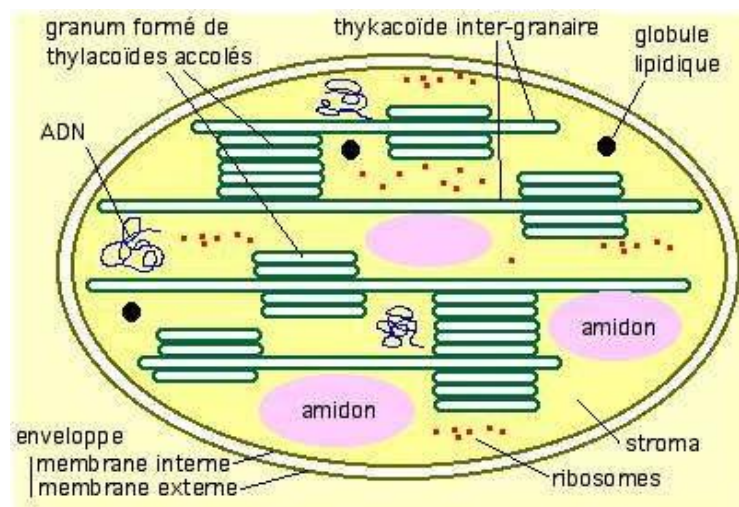


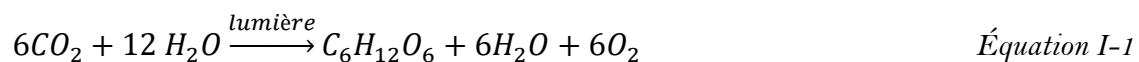
Figure I-2 : schéma d'un chloroplaste en coupe transversale (<http://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/botanique-cellule-vegetale-439/page/8/>)

La membrane interne du chloroplaste est organisée en des petits sacs aplatis appelés thylakoïdes. Ces derniers, empilés les uns sur les autres, forment des colonnes appelées grana. Elles sont entourées par une substance semi-liquide appelée stroma. Dans les membranes des thylakoïdes se trouvent les pigments photosynthétiques.

Les étapes de la photosynthèse sont expliquées en se basant sur la description de Masojídek et al. (2013). La photosynthèse se déroule ainsi en trois étapes :

- 1) Capture de l'énergie lumineuse par les pigments photosynthétiques.
- 2) Utilisation de cette énergie pour produire de l'énergie sous forme d'ATP et d'agent réducteurs sous forme de NADPH<sub>2</sub>.
- 3) Utilisation de l'ATP et le NADPH<sub>2</sub> produits pour fixer le dioxyde de carbone et produire des glucides.

Les deux premières étapes ont lieu en présence de lumière, d'où l'appellation « réactions à la lumière » ou réactions claires de la photosynthèse. La troisième étape représentant la formation des composés organiques à partir du CO<sub>2</sub> est appelée la « phase obscure » ou « phase sombre » connue sous le nom du cycle de Calvin (Figure I-6). L'équation globale de la réaction de photosynthèse est donnée ci-dessous :



Nous verrons plus tard qu'il s'agit d'une formulation simplifiée, qui ne fait pas intervenir les différents éléments de croissance comme les nutriments chimiques.

Les réactions claires se déroulent dans les thylakoïdes du chloroplaste. L'oxygène est alors produit par photolyse d'eau, et l'ATP et le NADPH sont fournis au cycle de Calvin (réactions sombres). Durant les réactions sombres, il y aura assimilation de carbone inorganique et les glucides seront produits (Figure I-3).

### Réactions claires

Le rôle principal de ces réactions est de fournir le réducteur biochimique sous forme de NADPH<sub>2</sub> et l'énergie chimique sous forme d'ATP afin de pouvoir assimiler le carbone inorganique lors des réactions sombres.

L'énergie lumineuse (photon) est captée au cours deux photoréactions effectuées par le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). Ces derniers fonctionnent en série et ils sont liés par une chaîne de transport d'électrons généralement visualisée par un schéma en Z (Figure I-4).

A la lumière, 2 électrons sont extraits de l'eau (une molécule d'oxygène est produite). Ils sont ensuite transportés par la chaîne de transport d'électrons pour produire une molécule de NADPH<sub>2</sub>.

En même temps, les protons (H<sup>+</sup>) sont transportés du stroma vers l'espace interthylacoïdale formant un gradient de pH. Ce dernier actionne l'ATP synthase pour produire l'ATP à partir de l'ADP et Pi (Masojídek et al.2013).

L'équation de phosphorylation suivante résume ce qui se passe durant les réactions claires :

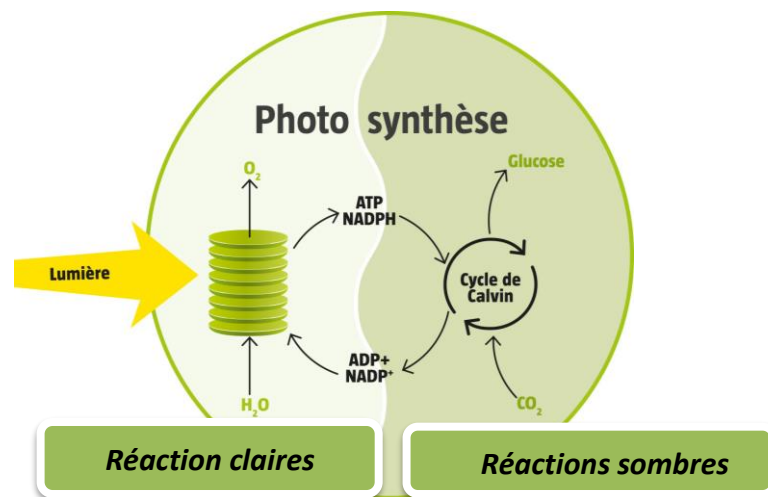


Figure I-3 : schéma récapitulatif des deux réactions de la photosynthèse (<http://www.salamandre.net/article/au-plus-pres-du-miracle/>)

Selon la Figure I-4 , les PSI et PSII fonctionnent en parallèle. Le photon absorbé par le photosystème II entraîne la libération d'un électron. Ce dernier passe tout au long de la chaîne des cytochromes pour arriver au photosystème I. Ce dernier, excité par un photon, augmente le potentiel de l'électron permettant au final la formation du NADPH (<http://www.biocourse.com>).

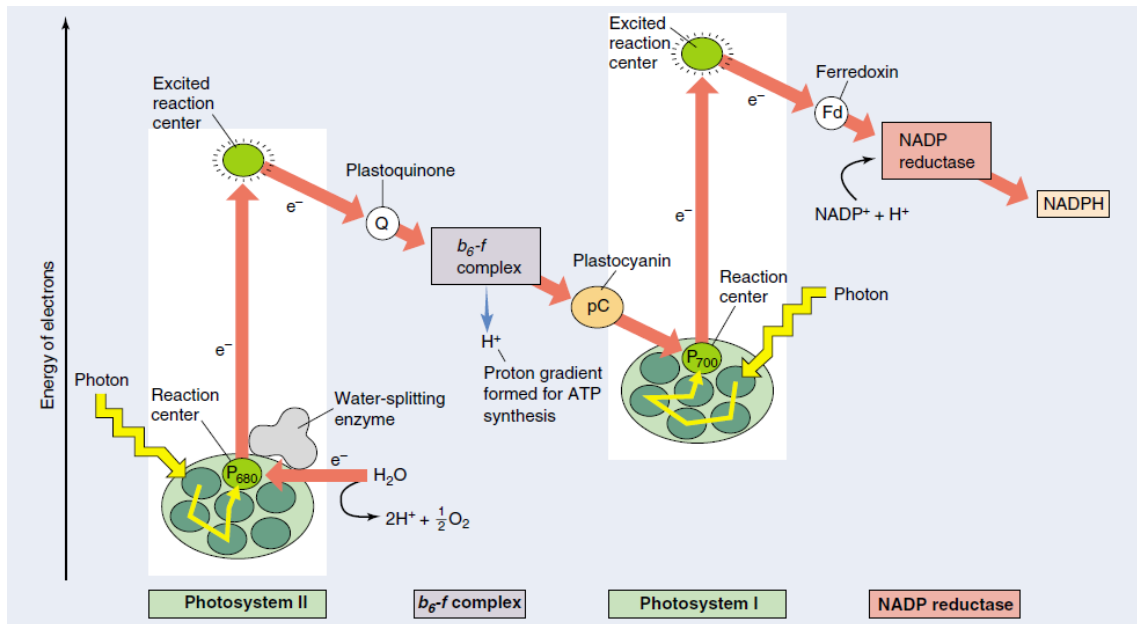


Figure I-4 : Chaîne de transport d'électrons, schéma en Z ; (<http://www.biocourse.com>).

Le PSI ou P700 est un complexe intermembranaire constitué de plusieurs sous-unités (10 protéines, 100 chlorophylles). C'est grâce à ce photosystème que les réactions claires sont effectuées et le NADPH<sub>2</sub> est produit.

Le PSII ou P680, localisé dans la membrane thylacoïdale est constitué de plus que 20 sous-unités. Il constitue le centre réactionnel de la photosynthèse et l'antenne collectrice de lumière. Cette dernière, constituée des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes et phycobilines), joue un rôle principal dans le transfert d'énergie vers le centre réactionnel. Il existe deux classes majeures d'antennes collectrices de lumière :

- Les phycobiliprotéines hydrophiles. On les trouve chez les cyanobactéries et les microalgues rouges.
- Les complexes protéines-pigments hydrophobes : LHCII et LHCI contenant la chlorophylle a, chlorophylle b et les caroténoïdes (xanthophylles). On les trouve chez les microalgues vertes.

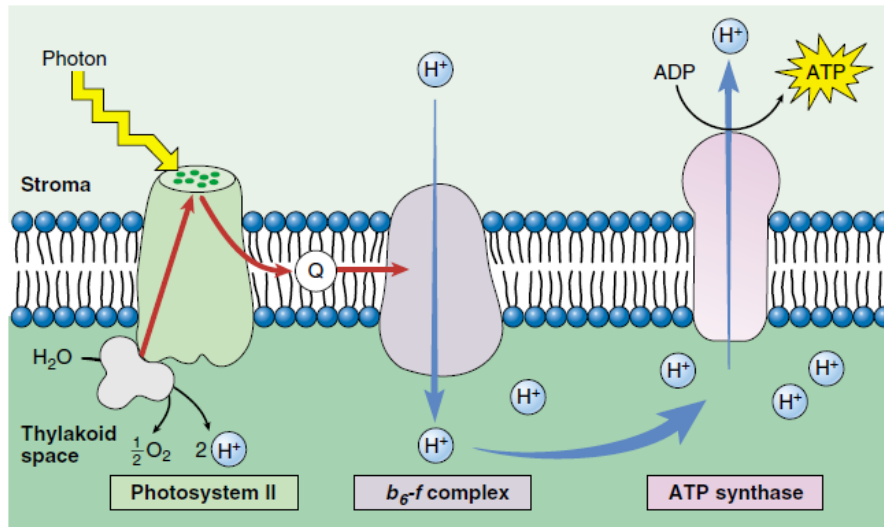


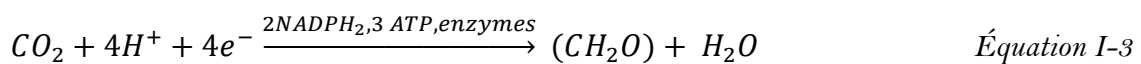
Figure I-5 : production d'ATP dans le stroma du chloroplaste par l'ATP synthase  
(<http://www.biocourse.com>).

## Cycle de Calvin

Durant les réactions sombres, les molécules organiques (glucides) sont produites à partir du  $\text{CO}_2$ . La matière première de ces réactions est fournie par les réactions claires :

- Energie sous forme d'ATP
- Pouvoir réducteur sous forme de  $\text{NADPH}_2$

La réaction sombre peut être exprimée de la manière suivante :



Le cycle de Calvin est constitué de 4 phases principales :

- 1) Phase de Carboxylation
- 2) Phase de réduction
- 3) Phase de régénération
- 4) Phase de production

C'est un processus utilisant l'ATP et le NADPH comme source d'énergie générée par les réactions claires. Il s'effectue dans le stroma du chloroplaste.



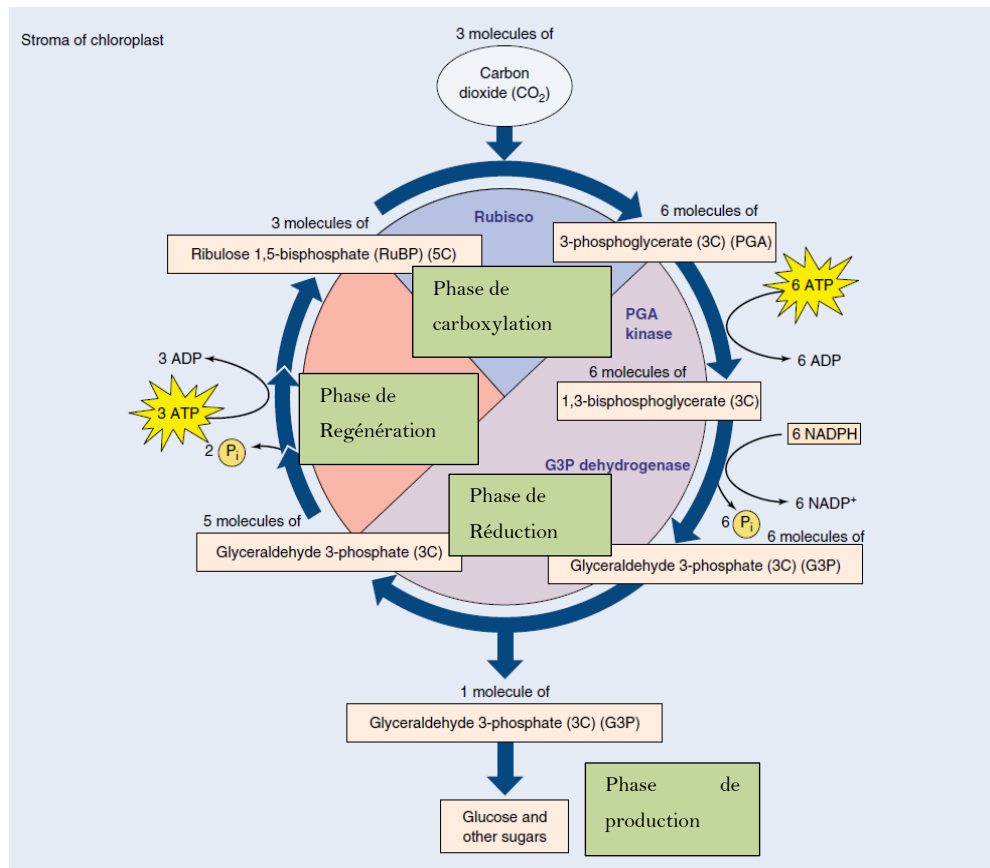


Figure I-6 : Cycle de Calvin (<http://www.biocourse.com>).

### I.2.2 Mécanismes de transferts d'électrons alternatifs au transfert d'électrons linéaire des réactions claires de la photosynthèse

La production de  $\text{NADPH}_2$  et d'ATP par les réactions claires de la photosynthèse ne se fait pas dans des proportions stœchiométriques suffisantes pour leur utilisation par le cycle de Calvin ( $2\text{NADPH}$  pour 3 ATP). Ainsi d'autres transferts d'électrons, alternatifs à la voie principale du transfert photochimique linéaire, sont nécessaires pour l'ajustement de la stœchiométrie entre  $\text{NADPH}_2$  et ATP (Joliot et Johnson 2011, Cardol et al. 2011)

#### Transfert cyclique d'électrons

Le transfert d'électrons linéaire débute par la photolyse de l'eau afin d'obtenir le  $\text{NADPH}$  via le PSII,  $\text{cytb}_6$  et le PSI (Figure I-4). Le transfert cyclique implique seulement le PSI et le  $\text{cytb}_6$  et non le PSII.

Les deux fonctions principales du transfert cyclique d'électrons sont i) la synthèse d'ATP ii) la protection du PSII lorsqu'il est exposé à des fortes intensités lumineuses (risque de photoinhibition).

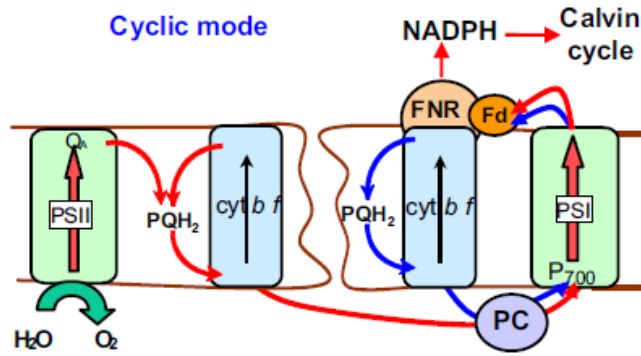


Figure I-7 : les flèches rouges représentent le transfert d'électrons linéaire de la phase claire de la photosynthèse. Les flèches bleues représentent le transport d'électrons cyclique (Joliot et Johnson 2011).

### Photoinhibition ou transition d'état

Si la lumière est nécessaire au fonctionnement de la chaîne photosynthétique, elle peut également mener à sa dégradation en cas d'excès. Plusieurs mécanismes de défense sont ainsi mis en place afin de protéger les cellules : changement de composition pigmentaire (caroténoïdes) ou cycle de dégradation du PSII appelé transition d'état (Eberhard 2008)

Murata (1969) a montré que pour des fortes intensités lumineuses, les photosystèmes I et II créent un mécanisme de défense grâce à un contrôle de transfert des électrons entre les deux photosystèmes. Cela a été étudié dans plusieurs études. Wollman (2001) explique la transition d'état des deux photosystèmes par la *Figure I-8*.

L'état I présente les PSII et PSI en série coopérant pour la fixation du CO<sub>2</sub>. Chaque photosystème possède des chlorophylles distinctes et spécifiques. Une fois exposé à une forte lumière, la distribution des chlorophylles dans les photosystèmes change entraînant l'absorption de la lumière par le PSI en faveur du PSII (état II) (Wollman 2001).

Le phénomène de transition d'état implique le transfert réversible d'une partie de la fraction de l'antenne externe PSII (LHCII) (état I) vers le PSI (état II). Cette migration de l'antenne LHCII permet une redistribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes et une baisse de la capture des photons au niveau du PSII. Ce mécanisme implique la phosphorylation des LHCII par une kinase. Ensuite de cette phosphorylation,

LHCII migre vers PSI par diffusion latérale dans les thylakoïdes. Le processus inverse se produit après déphosphorylation du LHCII par une phosphatase (Finazzi et al. 2002)

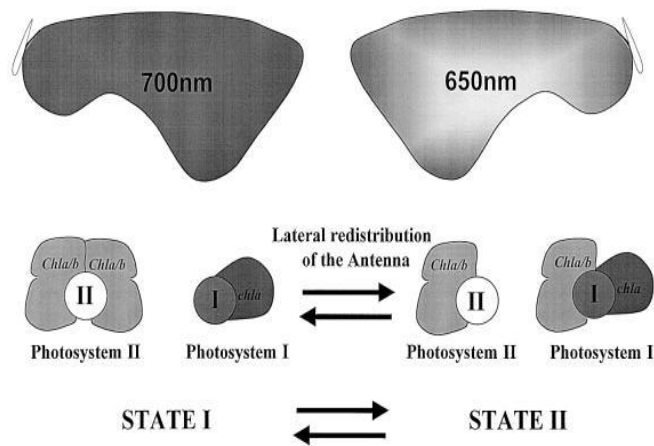


Figure I-8 : Schéma de transition d'état entre les deux photosystème (Wollman 2001)

### Réactions de Mehler

Cette réaction décrit un transfert où les électrons provenant du PSI viennent réduire l'oxygène et produire des superoxydes  $O_2^-$  rapidement convertis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par des superoxydes dismutases (SOD) (Mehler 1951, Badger et al. 2000). Au final, le peroxyde d'hydrogène est détoxifié par une ascorbate peroxydase. On suppose également que la réaction de Mehler résulterait en une production d'ATP sans production de NADPH, et aurait également un rôle photoprotecteur.

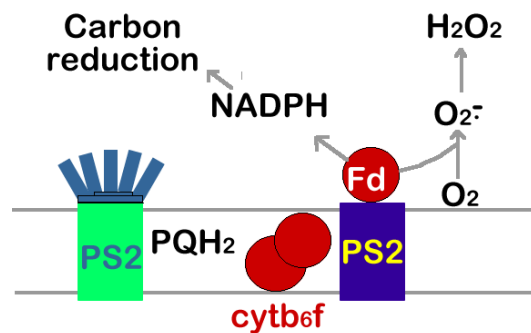


Figure I-9 : Reactions de Mehler

([http://web.pdx.edu/~rueterj/algae/notes/nutrient\\_uptake\\_assim.htm](http://web.pdx.edu/~rueterj/algae/notes/nutrient_uptake_assim.htm))



du RuBisCO. C'est ce dernier mécanisme qui est mis en jeu lors des mécanismes de concentration. Le carbone inorganique est alors assimilé sous forme de bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), malate ou aspartate.

#### **I.2.4 La respiration à la lumière**

Chez les cellules photosynthétiques, la respiration est souvent considérée comme un processus consommant l'oxygène pour produire du dioxyde de carbone. Elle est alors supposée fonctionner indépendamment de la lumière, donc de la photosynthèse, dans la mitochondrie. Les produits de la respiration sont alors principalement l'ATP, l'eau et le  $\text{CO}_2$ . Ce processus assure le maintien et la maintenance de la cellule photosynthétique. Il constitue la source principale d'ATP pour ces cellules (Burris 1980, Kliphuis et al. 2011). Cependant, du point de vue métabolique, la respiration dans les cellules photosynthétiques n'est pas juste un processus qui consomme l'oxygène et produit le  $\text{CO}_2$ . L'activité mitochondriale est en effet la source principale d'ATP assurant le bon fonctionnement de la photosynthèse dans les chloroplastes. Comme en effet cela est expliqué dans la partie I.2.2, la production de  $\text{NADPH}_2$  et d'ATP par les réactions claires de la photosynthèse ne se fait pas dans des proportions stœchiométriques suffisantes et il s'avère que les mécanismes de transferts d'électrons alternatifs à la photosynthèse ne peuvent fournir dans certains cas la quantité suffisante d'ATP pour avoir l'équilibre avec le  $\text{NADPH}_2$ . La mitochondrie et le chloroplaste fonctionnent donc en parallèle d'où le terme « respiration à la lumière » (Hoefnagel et al. 1998). La respiration à la lumière est donc un processus qui s'effectue dans la mitochondrie des cellules photosynthétiques et qui peut consommer jusqu'à 25% de l'énergie chimique (ATP, NADPH) produite par photosynthèse (Falkowski et Owens 1978). Son principe est le même principe de la respiration à l'obscurité sauf que la proportion des substrats et des produits dans les deux cas changent, pour notamment garder un équilibre de fonctionnement avec la photosynthèse. La figure 11 résume les différentes réactions qui se produisent à la lumière, entre le chloroplaste et la mitochondrie principalement. Les substrats les plus importants de la respiration à la lumière (de la mitochondrie vers le chloroplaste) sont la sérine produite par photorespiration, le  $\text{NH}_4^+$  produit du cycle de Krebs et l'énergie sous forme d'ATP. Les substrats de la photosynthèse fournis par le chloroplaste à la mitochondrie sont le pyruvate et le NADPH.

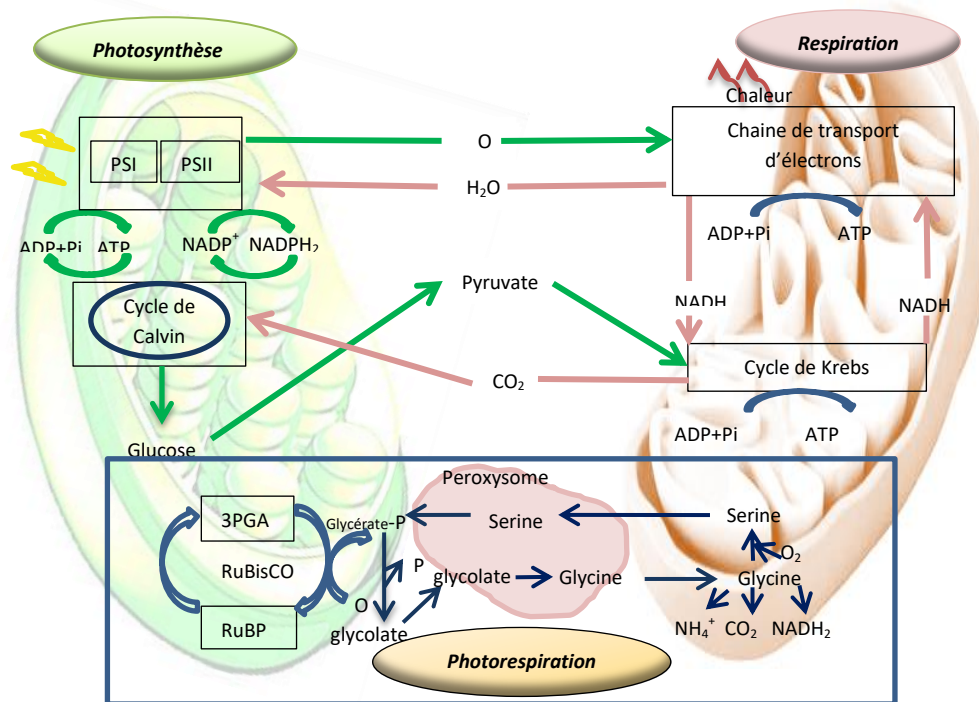


Figure I-11 : Interactions entre le chloroplaste et la mitochondrie des cellules photosynthétiques en conditions lumineuses.

### I.3 Réactions biochimiques des microalgues photosynthétiques en obscurité.

#### I.3.1 La respiration

A l'obscurité, la respiration mitochondriale est l'activité dominante. Il n'y a pas de photosynthèse dans le chloroplaste. Ce dernier reste cependant métaboliquement actif afin de convertir les glucides produits de la réaction de Calvin en d'autres sucres exportés vers le cytosol (Hoefnagel et al.1998). La respiration mitochondriale s'effectue en 3 grandes étapes :

- 1) La glycolyse : elle a lieu en anaérobiose et s'effectue dans le cytoplasme. Les produits de cette dégradation du glucose entrent dans la mitochondrie où la deuxième et la troisième étape se produisent.
- 2) Cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique ou cycle de l'acide tricarboxylique : Dans la mitochondrie, le pyruvate provenant de la glycolyse est converti en acétyl CoA, point de départ du cycle de Krebs, avec libération d'une première molécule de  $\text{CO}_2$ .

- 3) La phosphorylation oxydative : ce processus nécessite une série d'enzymes appelées ETC (chaîne de transport d'électron). C'est un processus aérobie qui produit la majorité de l'ATP. Les deux étapes précédentes servent d'appui à cette dernière étape. Tous les  $H^+$  provenant du cycle de Krebs vont ainsi être utilisés dans la phosphorylation oxydative.

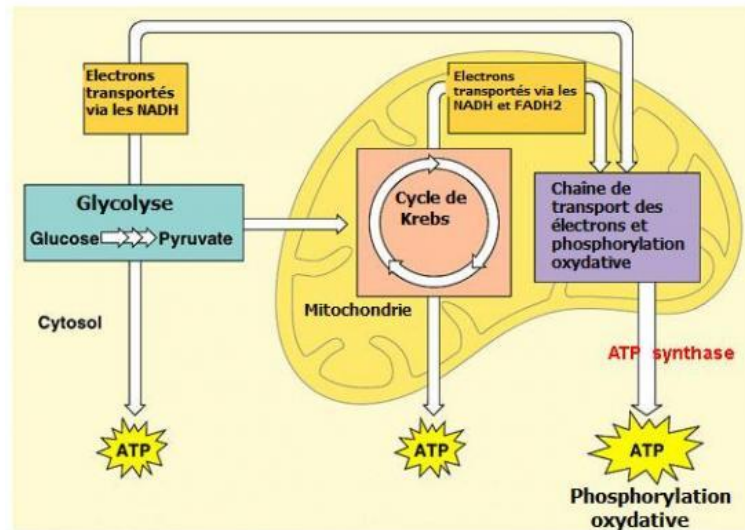


Figure I-12 : schéma résumant les 3 étapes de la respiration mitochondriale (<http://tpe-levure-biere.e-monsite.com>)

### I.3.2 La chlororespiration

Le terme chlororespiration est utilisé pour décrire l'activité d'une chaîne respiratoire de transfert d'électrons qui partage des transporteurs d'électrons (les plastoquinones) au sein des membranes thylakoidales des chloroplastes conduisant à l'oxydation du NADPH et à la consommation de l'oxygène (Nixon 2000). Dans les thylakoïdes des chloroplastes, la chlororespiration ne se s'active qu'à l'obscurité ou à une très faible intensité lumineuse, lorsque la photosynthèse est absente. Elle semble être une voie relativement mineure par rapport à la chaîne de transfert d'électrons linéaire photosynthétique (réactions claires de la photosynthèse). Cependant, la chlororespiration pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'ATP synthase ou de la photosynthèse en modulant l'activité du flux d'électrons cycliques autour du photosystème I (PS I) (Peltier et Cournac 2002)

Les réactions décrites dans les parties I.2 et I.3 sont résumées dans la Figure I-13.

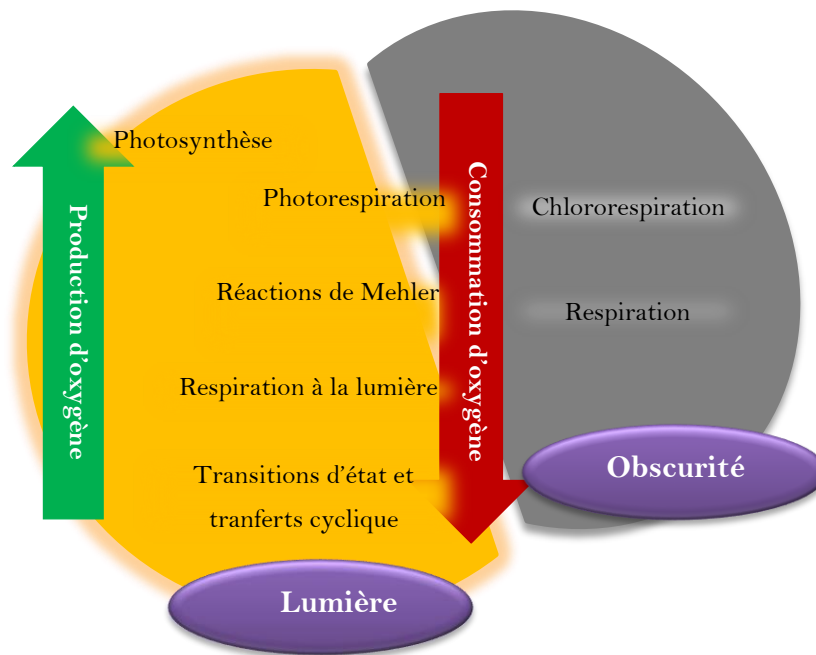


Figure I-13 : schéma récapitulatif des différentes réactions s'effectuant à la lumière (en jaune) et à l'obscurité (en gris) en terme de production de dioxygène et sa consommation

Ce schéma divise les réactions en deux ; celles qui ont lieu à la lumière et celles qui ont lieu à l'obscurité. Ce qui nous intéresse sera leur implication en termes de production ou consommation de dioxygène dans un système de culture. En effet, chacune de ces réactions est influencée par des paramètres de cultures comme la lumière, la température, la salinité du milieu.... Ces facteurs seront détaillés dans la partie suivante. On distingue les facteurs opératoires reliés aux besoins de la microalgue et les facteurs géométriques reliés au système de culture utilisé.

## I.4 Facteurs influençant la culture en photobioréacteurs

### I.4.1 Facteurs opératoires

#### La lumière

La lumière joue un rôle important sur la réponse photosynthétique des microalgues, et de ce fait, sur leur croissance. Ce paramètre a un effet complexe car il limite la croissance dans la plupart des cas, mais un excès de lumière conduit aussi à des phénomènes de saturation voire de photoinhibition, tendant à réduire l'efficacité de la photosynthèse (Henley 1993; Kula et al. 2017; Masojídek et al. 2013). De nombreuses études ont été menées afin de quantifier et de formaliser la réponse des organismes photosynthétiques à différentes intensités lumineuses.



La réponse de la photosynthèse (P) à l'intensité lumineuse (I) est souvent formalisée par une « courbe PI ». Le taux de photosynthèse est déterminé à partir de la production d'oxygène ; la variation de l'oxygène dans le milieu est due d'une part à sa production durant la photosynthèse et d'autre part à sa consommation par respiration.

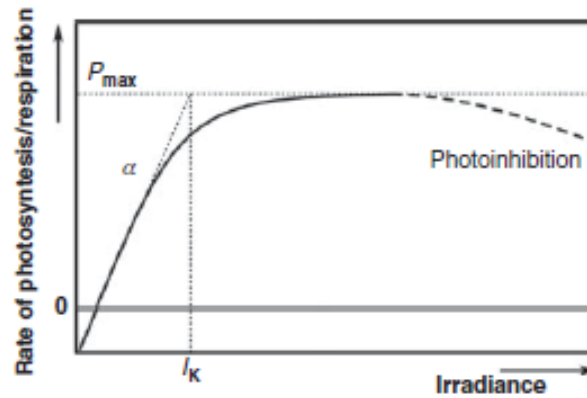


Figure I-14 : représentation schématique de la réponse photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse (Masojídek et al 2013)

La pente principale  $\alpha$  dans la Figure I-14 est égale à  $P_{max}/I_k$  où  $I_k$  représente l'intensité de lumière à saturation et  $P_{max}$  la vitesse maximale de photosynthèse. A l'obscurité, une consommation nette d'oxygène apparaît comme résultat d'une activité respiratoire. A faibles intensités lumineuses, la photosynthèse est totalement dépendante de l'intensité lumineuse reçue. Pour des intensités supérieures, s'approchant d' $I_k$  ou supérieures, le rendement photosynthétique décroît. La photosynthèse devient moins efficace jusqu'à ce qu'elle atteigne la saturation caractérisée par un plateau correspondant à la réponse photosynthétique maximale ( $P_{max}$ ) où la limitation est imposée par le pool enzymatique permettant la conversion des photons captés.

### La nature de la lumière

La lumière utile à la photosynthèse est constituée d'un ensemble d'ondes électromagnétiques dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 380 nm (violet) et 780 nm (rouge). Cette gamme est appelée PAR (photosynthetically active radiation). L'énergie lumineuse est délivrée sous forme de photons. L'énergie d'un photon est le produit de sa fréquence et de la constante de Planck, à savoir,  $E = h\nu$  ( $h = 6.626 \times 10^{-34} J s$ ). Dans ce

manuscrit, l'énergie lumineuse sera exprimée par le nombre de photons atteignant la surface du système de culture par unité de temps, à savoir la densité surfacique de photons ou PFD (photon flux density) en  $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2/\text{s}$ .

### **Effet de la lumière sur les microalgues en photobioréacteurs**

L'efficacité d'un photobioréacteur à produire de la biomasse algale est fortement gouvernée par la quantité de lumière qui pénètre dans la culture (Cornet 2010). De nombreuses études ont été effectuées pour bien comprendre l'effet de la lumière sur la croissance des microalgues en photobioréacteurs. Modéliser cet effet n'est pas trivial car il nécessite de distinguer l'échelle de la cellule, dont le comportement biologique dépend de la quantité de photons qu'elle absorbe, du système de culture au sein duquel l'énergie lumineuse est hétérogène. De ce fait il sera impossible de maintenir des conditions optimales d'éclairement pour l'ensemble des microorganismes du PBR contenu dans le volume de culture. Il en ressortira des phénomènes particuliers, comme la présence simultanée de zones éclairées et de zones sombres impactant la croissance des microalgues.

L'atténuation de la lumière au sein du volume de culture dépend de l'épaisseur du photobioréacteur, de la lumière reçue en surface, de la concentration en microalgues et des propriétés radiatives propre à chaque microalgue (Souliès 2014). Ainsi 3 régimes d'atténuation de lumière sont usuellement proposés (Takache 2010), ceux-ci étaient différenciés par la fraction volumique éclairée du photobioréacteur exprimée par  $\gamma$ . Cette fraction est le ratio entre le volume éclairé et le volume total du PBR. . Les régimes sont les suivants ( Pruvost et al. 2016, 2012) :

- Régime photolimité : dans ce cas  $\gamma < 1$ . Dans le photobioréacteur, il y a des zones sombres dues à une concentration élevée en biomasse. Cela favorise la contribution des activités de respiration, cela tend donc à diminuer la vitesse de croissance moyenne dans le PBR et donc la productivité maximale n'est pas atteignable.
- Régime luminostat : dans ce cas  $\gamma = 1$ . C'est le cas idéal. Tout le photobioréacteur est éclairé et il n'y a pas de zone sombre. Dans ce régime, la productivité maximale est atteignable.
- Régime cinétique :  $\gamma > 1$ . Une partie de la lumière n'est pas absorbée par les microalgues et/ou un volume du photobioréacteur reçoit une quantité de photons sur-

saturante. Dans ce cas, la productivité maximale est non atteignable car toute l'énergie transmise n'est pas utilisée, soit parce qu'elle est perdue par transmission, soit parce qu'elle est dissipé de façon importante par les cellules.

La Figure I-15 traduit l'effet des différents régimes d'atténuation de lumière sur la stabilité de culture. Dès qu'une zone sombre est présente ( $\gamma < 1$ ), on observe une stabilité de culture plus élevée. Ceci s'explique par une vitesse d'absorption de photons moins élevée par cellule (Artu 2016). On note également que les microalgues sont capables d'adapter leurs pigments aux différents régimes de lumière. Ce phénomène est appelé photoacclimatation. Les cellules s'adaptent en créant une balance entre l'absorption des photons et la chaîne de transport d'électrons (Figure I-4) (Falkowski et Chen 2003; MacIntyre et al. 2002; Artu 2016).

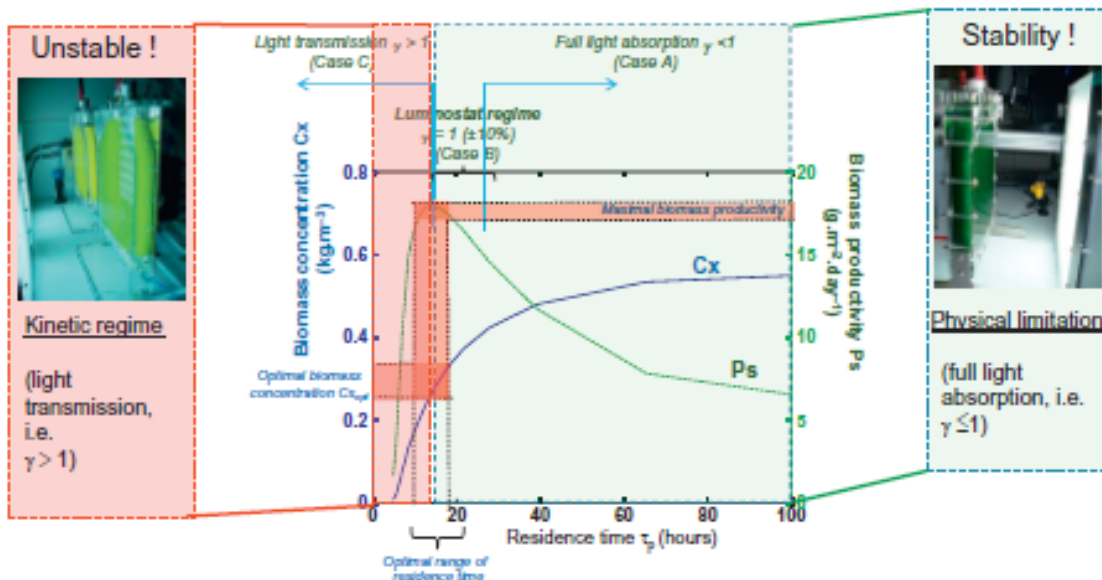


Figure I-15 : effet de différents régime d'atténuation de lumière sur la productivité en biomasse (Pruvost et al. 2016)

## Température

La réponse des cellules à différentes températures est variable selon les espèces de microalgues. Ainsi, la croissance de *Chlorella vulgaris* par exemple augmente jusqu'à 23°C puis diminue pour des températures supérieures, cette souche pouvant supporter des températures allant de 26°C jusqu'à 30°C (Souliès 2014). De même, *Arthrospira platensis* présente une vitesse

de croissance maximale à 35°C, au-dessus de laquelle sa croissance chute ; la température optimale habituelle pour la culture en laboratoire de cette souche se situe dans la gamme des 35°C-38°C (Vonshak 1997). Le contenu cellulaire va lui aussi varier avec la température (Tamburic et al. 2014).

En conditions solaires, la température, comme la lumière, sont deux facteurs majeurs qui affectent la culture des microalgues. On voit ainsi dans le Tableau I-2 qu'en diminuant la température la nuit au mois de juillet par exemple, le pourcentage de perte de biomasse diminue. Ceci est due au ralentissement du métabolisme cellulaire à des faibles températures. Torzillo et al (1991) montrent que la perte de biomasse la nuit est directement liée à la température. Diminuer la température peut ainsi avoir un effet positif (Vonshak 1997).

Months	Sunlight irradiance (MJ m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> )	Temperature regime (°C) Light:Dark	Night biomass loss	
			A	B
May	18	25:25	6.5	22.0
		35:35	5.3	19.6
June	22	25:25	10.3	31.5
		35:35	6.0	16.0
July	24.5	25:25	8.6	24.3
		35:35	6.0	14.8
		35:25	4.1	10.4
August	20	25:25	6.7	19.2
		35:35	3.8	10.0
September	16	25:25	5.9	19.8
		35:35	3.6	11.8

Tableau I-2 : Influence de la température sur la perte de biomasse la nuit de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* cultivée en photobioréacteur tubulaire (Torzillo et al 1991).

Dans le Tableau I-2, « A » représente le pourcentage de perte de biomasse la nuit rapporté à la masse sèche obtenue à la fin de la journée. « B » : le pourcentage de perte de biomasse la nuit rapporté à la biomasse produite la journée (Torzillo et al 1991)

Le jour, l'augmentation de la température a un effet positif sur la photosynthèse et la division cellulaire. Ceci est principalement expliqué par une activation de l'activité enzymatique liée au cycle de Calvin (Falkowski 1980). Pour des températures plus hautes que la température optimale, ces enzymes sont dénaturées menant à une efficacité photosynthétique moins importante et donc une chute de productivité (Salvucci et Crafts-

Brandner 2004). On note aussi que la température joue un rôle important sur l'activité du RubisCO (Ribulose 1,5-biphosphate). Dans le cas des plantes supérieures, à une température  $>30^{\circ}\text{C}$ , l'affinité du  $\text{CO}_2$  pour l'enzyme RubisCO est réduite impliquant une activité photosynthétique réduite (Salvucci et Crafts-Brandner 2004). La température joue également sur le métabolisme cellulaire. Une diminution de la température a ainsi un effet positif sur l'accumulation des lipides (Converti et al. 2009). Pour *Chlorella vulgaris*, une diminution de température de  $30^{\circ}\text{C}$  à  $25^{\circ}\text{C}$  induit une augmentation de la concentration en lipides de 2.5 fois sans affecter la productivité. Des résultats identiques ont été obtenus pour *Scenedesmus* sp. (Xin, Hong-ying, et Yu-ping 2011). Au final, il se révèle que la température a un effet large sur le métabolisme et reste complexe à prédire.

### **Concentration en oxygène dissous**

Une concentration élevée en dioxygène dissous est le résultat souvent d'une activité photosynthétique non négligeable. Comme cela est détaillé en partie (I.2.3), l'oxygène est impliqué dans différentes voies : il est produit par photosynthèse (I.2.1) et il est consommé par les différentes activités respiratoires (photorespiration, respiration à la lumière, respiration à l'obscurité, chlororespiration, réaction de Mehler pour protéger contre la photoinhibition (Foyer et Noctor 2000), (Badger et al. 2000)). Sa présence en grande concentration en photobioréacteurs peut avoir un effet inhibiteur de croissance. Si une concentration en oxygène importante est combinée à une concentration moins importante en dioxyde de carbone, cela est connu pour stimuler la photorespiration chez les microalgues (I.2.3). À l'inverse, à des fortes intensités lumineuses, la concentration d'oxygène dissous pourra protéger l'appareil photosynthétique. La photorespiration et la réaction de Mehler seront en effet activées, protégeant ainsi le PSII de l'énergie excessive reçue (Wu et al 1991).

Torzillo et al. (1984) étaient les premiers à mettre en évidence l'inhibition de la photosynthèse par une concentration d'oxygène dissous (DO) élevée chez *Arthrospira maxima*. Dans cette étude, il a été démontré que pour une pression partielle d'oxygène de 0.7 atm, la croissance de la cyanobactérie diminue de 40% en comparant à une culture avec une pression partielle d'oxygène de 0.2 atm. Des résultats similaires ont été démontrés par Marquez et al. (1995), Ogawa et al. (1980), Ugwu et al (2007) pour *Chlorella vulgaris*. Costache et al. (2013), ont démontré qu'une concentration d'oxygène dissous proche de la saturation (9mg/L) accélère la vitesse de la photosynthèse. Or, à partir d'une concentration de 32mg/L, la vitesse

de photosynthèse diminue jusqu'à atteindre zéro. C'est à partir d'une concentration de 23 mg/L que l'efficacité de la photosynthèse commence à être affectée. Les mêmes résultats ont été obtenus pour *Nanochloropsis sp* (Raso et al. 2012).

Il se révèle au final qu'en photobioréacteurs fermés, l'accumulation d'oxygène peut se révéler avoir un effet négatif. L'avantage d'avoir des productivités élevées en biomasse peut être réduit par l'accumulation d'oxygène dissous. Afin de régler ce problème, des systèmes de dégazage avec un meilleur transfert gaz-liquide sont alors nécessaires.

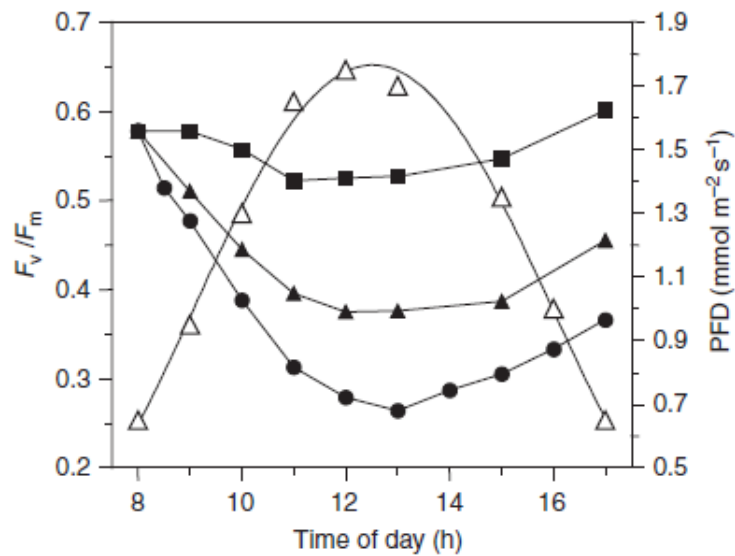


Figure I-16 : effet de la concentration d'oxygène dissous et de la température sur l'activité photosynthétique  $f_v/f_m$  chez *Arthrospira platensis* cultivée en conditions solaires. Les carrés noirs présentent la condition de température optimale à une concentration en dioxygène dissous faible. Les triangles noirs présentent la condition d'une concentration en oxygène dissous élevée –température optimale et les ronds noirs présentent les conditions d'une concentration en dioxygène dissous élevée et une température basse (Torzillo et Vonshak 2013)

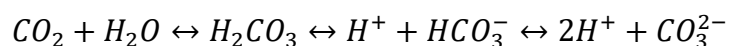
Culture conditions	Oxygen concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Temperature (°C)	Chlorophyll synthesis (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Biomass synthesis (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
LO-OT	22 ± 2	35	6.02 ± 0.18	570 ± 28
HO-OT	60 ± 19	35	2.57 ± 0.05	380 ± 18
HO-LT	58 ± 16	25	0.22 ± 0.01	230 ± 10

Tableau I-3 : effet de la concentration d'oxygène dissous sur la productivité en biomasse de *Arthrospira platensis* en conditions solaires (Torzillo et Vonshak 2013). LO pour une concentration en oxygène dissous faible. OT pour température optimale, LT pour température basse et HO pour une concentration d'oxygène élevée.

## Les nutriments

### Le carbone

Les microalgues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse. Il peut être apporté sous forme de sels (bicarbonate) ou par enrichissement de l'air injecté et transféré au milieu. En effet, pour que les microalgues puissent utiliser le CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse, celui-ci doit être solubilisé. Le dioxyde de carbone dissous dans l'eau prend plusieurs formes, en fonction du pH. Ceci est représenté par les réactions suivantes et par la Figure I-17.



A un pH inférieur à 4,4, la forme du carbone principale est le dioxyde de carbone. A un pH de 6,4 il y a autant de dioxyde de carbone que d'ions bicarbonates et à un pH de 10,4 il y a autant ions carbonates que d'ions de bicarbonates. Pour un pH situé entre 8,3 et 9,5, les ions bicarbonates sont majoritaires. A partir d'un pH de 12,3 les ions carbonates sont majoritaires. Les microalgues vivent généralement dans un milieu à pH neutre. Le carbone dissous sera donc sous forme de dioxyde de carbone et d'ions carbonates. A noter également que la température influence la dissolution du CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture ; en augmentant la température pour une pression partielle de gaz donnée, la concentration du dioxyde de carbone dissous diminue.

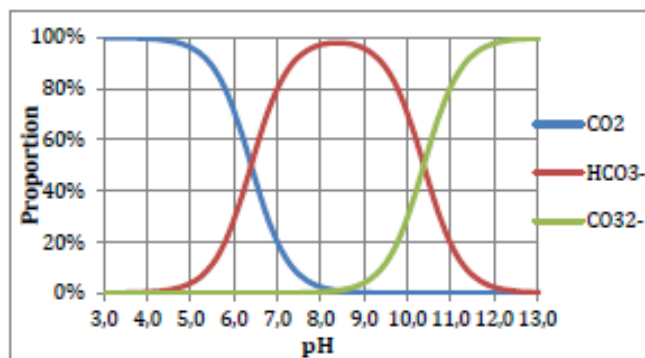


Figure I-17 : Forme du carbone dissous dans l'eau selon le pH.

Les microalgues sont très consommatrices de dioxyde de carbone. Ainsi pour produire 1 kilogramme de biomasse, 1,8 kg de dioxyde de carbone seront métabolisés.

### L'azote

L'azote, après le carbone, est le constituant cellulaire majeur des microalgues. Sa quantité varie en fonction des espèces et des conditions du milieu, mais elle correspond en moyenne à environ 7% de la matière sèche de la cellule. Cet élément est constitutif de différentes protéines comme les peptides, enzymes, chlorophylle et le matériel génétique des microalgues. La disponibilité de cette source dans le milieu affecte fortement la productivité et la composition biochimique des microalgues. Il peut être fourni sous différentes formes inorganiques (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). De nombreuses études se sont penchées sur l'effet de la concentration de cet élément dans le milieu de culture (Tableau I-4). L'utilisation du nitrate comme substrat azoté chez les microalgues est très répandue. On note qu'au niveau de la cellule, cela requiert qu'il soit réduit au niveau intracellulaire en ammonium pour qu'il soit assimilé (Payne 1973). Les différentes étapes d'assimilation du nitrate dans les cellules sont donc les suivantes :

1. Le nitrate est assimilé par les cellules, une nitrate réductase catalyse le nitrate et le réduit en nitrile qui sera à son tour transporté au chloroplaste.
2. Une enzyme nitrite réductase catalyse le nitrile en ammonium pour qu'il soit enfin incorporé dans les squelettes carbonés.

L'ammonium, étant réduit directement, il est assimilé facilement par les microalgues et nécessite au final moins d'énergie (Podevin et al. 2015). Néanmoins, toutes les souches ne



peuvent assimiler l'azote sous cette forme. Le Tableau I-4 donne différentes souches avec leur substrat préféré.

Souche	Substrat azoté préféré	Référence
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Chen et al. 2011)
<i>Tetraselmis sp</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Kim, Mujtaba, et Lee 2016)
<i>Botryococcus braunii</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Ruangsomboon 2015)
<i>Chlorella sp</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(Li et al. 2013)
<i>Neochloris oleabundans</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Chen et al. 2011)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Li et al. 2013)
<i>Isochrysis Galbana</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(Roopnarain, Sym, et Gray 2015)
<i>Nannochloropsis sp</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Y.S. HII et al 2011
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(Sanz-Luque et al. 2015)

Tableau I-4 : Substrats azotés préférés de différentes souches de microalgues

On note également que des concentrations élevées peuvent inhiber la croissance des microalgues. Une concentration >10mM d'ammonium inhibe la croissance de *Dunaliella tertiolecta* (Chen et al. 2011) et une concentration de 15mM inhibe la croissance de *Arthrospira platensis* (Ferreira et al. 2010). Cet effet inhibiteur est causé par le fait que le transport excessif d'ammonium au sein des cellules peut empêcher la formation d'ATP dans le chloroplaste provoquant une inhibition de la photosynthèse (Ramanna et al. 2014).

### Le phosphore

Le phosphore intervient dans la synthèse des acides nucléiques et des phospholipides (constituants des membranes cellulaires) et dans la constitution des molécules du métabolisme énergétique, l'ATP et le NADPH. Sa concentration cellulaire va donc avoir un impact direct sur la production de biomasse. Chez *Chlorella vulgaris*, il a été montré que les cellules déficientes en phosphore augmentaient la production de glycolate via le mécanisme de photorespiration permettant ainsi la dissipation de l'énergie absorbée en excès par le photosystème, évitant ainsi d'endommager la cellule. Cependant, les mécanismes de régulation du manque de phosphore par la cellule restent peu connus (Moseley et al. 2006).

## Les microéléments

Les microéléments sont des éléments présents dans le milieu en très faible quantité. Les microalgues ont besoin notamment de potassium, de fer, de silice (pour les diatomées), de soufre, de métaux sous forme de traces et de vitamines. Leur rôle est varié. Ainsi le fer est un oligo-élément essentiel pour la croissance des microalgues de par son implication dans le transport des électrons dans le processus de la photosynthèse (Hu. 2003).

## **pH**

Comme pour la température, chaque espèce possède un pH optimal pour sa croissance et répondra différemment aux variations de pH en fonction de cette valeur et de sa physiologie. Par exemple, la microalgue d'étude *Chlorella vulgaris* croît pour des pH compris entre 5 et 9, avec un pH optimal compris entre 7 et 8 (Richmond 2004). Pour la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, le pH optimal se situe autour de 9.5 (Vonshak 1997). Dans les systèmes de culture, le pH est influencé principalement par la concentration de dioxyde de carbone dans le milieu et par la source d'azote utilisée par le microorganisme. Le bullage et le transfert gaz-liquide joue donc un rôle direct sur la variation du pH. L'ammonium, consommé par les microalgues mène à une acidification du milieu. Au contraire, le nitrate, une fois consommé, a tendance à basifier le milieu. Ces deux phénomènes sont importants à prendre en considération pour ne pas avoir une carence en carbone dans un photobioréacteur, en particulier dans le cas où la source d'azote est l'ammonium, l'acidification du milieu étant défavorable à la dissolution du carbone.

### **I.4.2 Paramètres de conception des systèmes de culture de microalgues**

#### **Fraction sombre**

Certains photobioréacteurs présentent par conception une fraction sombre pouvant affecter la croissance des microalgues. Cela peut être un dégazeur par exemple dans un photobioréacteur tubulaire, ou une boucle de recirculation dans le cas d'utilisation de pompes. Cette fraction sombre diminue l'efficacité globale du système en réduisant le volume éclairé, mais également en induisant une perte possible de productivité par respiration. Afin de maximiser la productivité et minimiser l'impact négatif de cette fraction sombre, cette dernière doit donc être réduite au maximum dans un PBR (et idéalement nulle). Pruvost et al (2016) a ainsi présenté l'effet sur *Chlorella vulgaris*. Une fraction sombre de 20% peut réduire la

productivité de la microalgue d'un facteur 2 par rapport à un photobioréacteur sans fraction sombre. Ceci est dû à la respiration dans cette zone sombre. A noter toutefois que ces résultats sont très préliminaires, car ils supposent une vitesse de respiration constante, égale à celle obtenue après un temps long à l'obscurité. On peut toutefois penser que le temps passé en boucle sombre peut jouer sur les mécanismes de respiration, ceux-ci étant connus pour posséder des dynamiques d'activation différentes. Ce point sera étudié spécifiquement dans cette thèse.

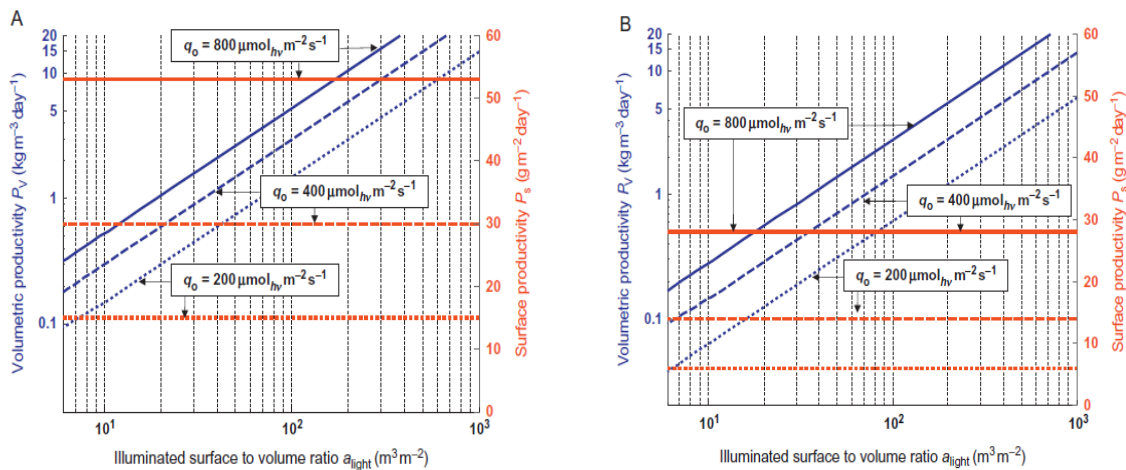


Figure I-18 : Influence de la surface éclairée  $a_{light}$  et de la fraction sombre  $f_d$  sur la culture de *Chlorella vulgaris* en PBR. A :  $f_d = 0$  et B :  $f_d = 0.2$  (Pruvost et al 2016)

### Épaisseur du photobioréacteur et sa surface spécifique éclairée

La Figure I-18 montre l'effet de la surface spécifique éclairée. Cette dernière représente le rapport entre la surface éclairée d'un PBR et le volume de culture, et est donc directement liée à l'épaisseur du photobioréacteur par la formule suivante :

$$a_{light} = \frac{S_{light}}{V_R} = \frac{1}{L} \quad \text{Équation I-4}$$

$a_{light}$  est donc la surface spécifique éclairée du photobioréacteur exprimée en  $m^{-1}$ , et elle est inversement proportionnelle à l'épaisseur du PBR « L » (en m),  $S_{light}$  est la surface éclairée du photobioréacteur ( $m^2$ ) et  $V_R$  le volume du PBR. Ainsi en diminuant l'épaisseur « L »,  $a_{light}$  augmente et la productivité volumique sera plus importante. Ces paramètres illustrent les concepts de base de l'intensification des photobioréacteurs ( Pruvost et al. 2016)

## Agitation et mélange hydrodynamique

Les cultures de microalgues ont besoin d'être mélangées, continuellement ou non selon les espèces, et pour plusieurs raisons : prévenir la sédimentation algale, prévenir la formation d'un gradient de nutriment, de pH ou de température, déplacer les cellules suivant le gradient de lumière, favoriser les échanges gaz-liquide et diminuer la photolimitation et photoinhibition. Dans cette partie, l'effet de l'hydrodynamique sur le transfert gaz-liquide influençant la concentration d'oxygène dissous dans le milieu ainsi que l'effet de l'hydrodynamique sur le déplacement des cellules dans le gradient de lumière (cycle lumière/obscurité) sont décrits.

### Cycles lumières/obscurités : L/D cycles

Quelle que soit la géométrie de photobioréacteur ou son système d'agitation, des cycles lumière/obscurité apparaissent. En effet, à des concentrations en biomasse élevées, le PBR présente des zones où l'atténuation de lumière est plus faible (régime photolimité partie I.4.1). Ceci induit des cycles générés par le fait que les microalgues se déplacent d'une zone frontale du PBR la plus exposée à la lumière vers une autre zone sombre. La fréquence de ce déplacement est dépendante de la vitesse d'agitation, de la géométrie du photobioréacteur et des conditions d'atténuation de lumière.

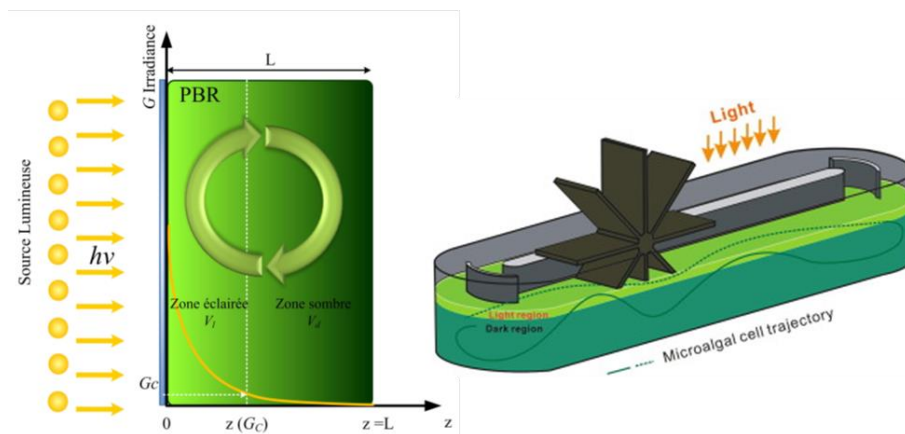


Figure I-19 : Cycles lumière/obscurité dans deux géométries de système de culture (photo de PBR airlift plan prise de Takache 2010 et photo du Raceway ouvert prise de Z. Chen et al. 2016)

Cette alternance entre les zones sombres et éclairées peut être bénéfique dans les cas d'une intensité lumineuse haute pour limiter les effets de surexposition des cellules (Phillips et Myers 1954; Terry 1986). Janssen (2002) a étudié l'effet des cycles lumière/obscurité (L/D) selon leur durée. Dans un PBR Airlift tubulaire, il a prouvé qu'un très court cycle L/D (200ms) a un effet positif sur l'efficacité photosynthétique pour des intensités lumineuses élevées. Une perte de productivité a été observée par contre pour des cycles moyens (10s-100s). L'effet bénéfique des cycles court a été démontré par Liao et al. (2014) pour un photobioréacteur tubulaire ; la productivité en biomasse de *Chlorella pyrenoidosa*, à une intensité lumineuse de  $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  était plus élevée en cycle lumière/obscurité de 20ms qu'en lumière continue. La prise en compte de ce paramètre pour la conception des photobioréacteurs peut donc être intéressante, en particulier pour des intensités lumineuses et des concentrations en biomasse importantes.

### Transfert gaz-liquide

L'optimisation du transfert du dioxyde de carbone est largement étudiée vue l'importance pour le métabolisme photosynthétique de ces microorganismes (Valiorgue et al. 2014). Néanmoins, cela joue également sur l'évacuation de l'excès du dioxygène, qui peut inhiber la croissance des microorganismes photosynthétiques (partie I.4.1). Différents modèles ont été étudiés afin de pouvoir quantifier la concentration en oxygène dissous et dioxyde de carbone dans un système de culture (Rubio et al. 1999, Molina et al. 2001, Hall et al. 2003; Contreras et al. 1998; Mendoza et al. 2013).

Les deux modèles principaux de représentation du mécanisme de transfert de matière à l'interface gaz/liquide sont :

- Le modèle de double film Lewis & Whitman (Lewis et Whitman 1924) :

Selon Roustan (2003), ce modèle est applicable aux systèmes diphasiques gaz-liquide en contact et qui échangent de la matière à travers une interface les séparant (Figure I-20). L'application de ce modèle est basée sur un certain nombre d'hypothèses, à savoir l'épaisseur de l'interface est nulle, le transfert se fait dans des films de chaque côté de l'interface, chaque film étant caractérisé par son coefficient de transfert,  $k_L$  (coefficient de transfert en phase liquide) et  $k_G$  (coefficient de transfert en phase gazeuse). Les concentrations à l'interface sont à l'équilibre et reliées par la loi de Henry (Sander 1999), la concentration est constante dans

les deux phases à l'extérieur de leur film respectif et le transport à travers les deux films se fait en régime permanent.

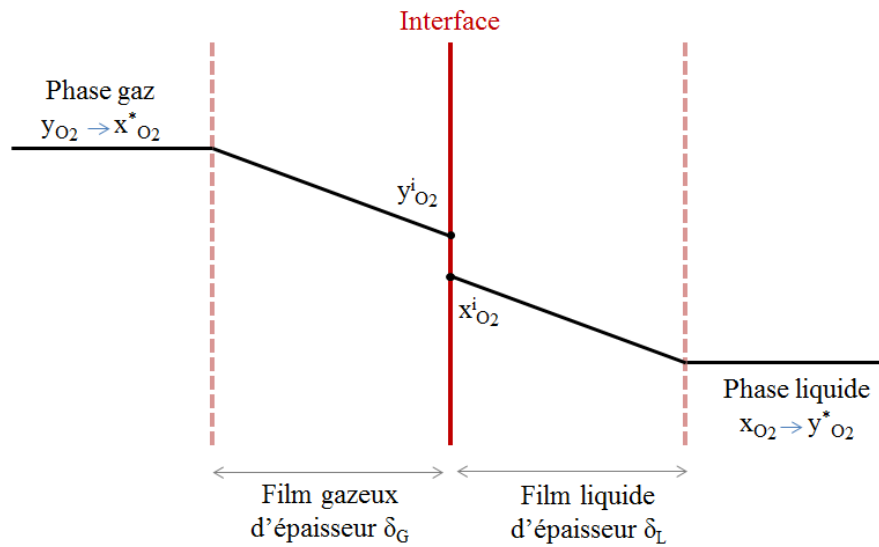


Figure I-20 : Représentation schématique du modèle de double film pour le transfert d'oxygène au travers d' interface gaz-liquide. (Jimenez 2013)

- Modèle de Higbie (Higbie 1935) :

En considérant que, à cause de la turbulence, le temps de contact entre les deux phases est très court, Higbie remplace l'hypothèse de régime permanent de Lewis et Whitman par une hypothèse de transfert en régime transitoire.

On note que d'autres modèles de représentation du transfert de matière gaz-liquide existent dans la littérature, ils sont résumés par Roustan (2003). Dans ce manuscrit, on ne s'intéressera pas à déterminer avec précision les mécanismes de transfert. Le terme de transfert global sera utilisé afin de pouvoir calculer la concentration en oxygène dissous dans les systèmes de cultures. Le calcul de cette concentration en plus de la méthode de détermination expérimentale du coefficient de transferts ( $K_{La}$ ) seront détaillés en chapitre 2 et 3.

## I.5 Systèmes de culture

Dans cette partie, la classification des systèmes de cultures est basée sur la classification de Verdelho Vieira (2017). Les systèmes de cultures sont repartis en deux grandes catégories :

les systèmes ouverts et les systèmes fermés. Ces derniers sont classifiés en photobioréacteurs industriels (ou PBRs solaire) et photobioréacteurs à échelle laboratoire (lumière artificielle) détaillés dans les figures suivantes selon leur géométrie.

Systèmes de culture ouverts	Lacs naturels		Tubulaires (horizontales, verticales annulaires) Plans (vertical, horizontal) Biodomes Immobilisés	PBRs industriels	Systèmes de culture fermés
	Bassins ouverts	Raceway Circulaires Rectangulaire Cascade Biofilm PBR Ponds en V		Airlift Plan Algofilm Torique	
			EOSS-1		

Tableau I-5 : Différentes géométries de systèmes de culture ouverts et fermés.

### I.5.1 Systèmes de cultures ouverts

#### Lac

En milieu naturel, les microalgues sont abondantes dans les lacs eutrophisés. L'eutrophisation est un phénomène d'enrichissement des lacs en phosphates et azote, induisant une augmentation excessive de microalgues en surface. Ces types de lacs sont généralement pauvres en dioxygène dissous. Les microalgues photoautotrophes se multiplient en utilisant la lumière. En présence d'une concentration excessive de nutriments (phosphores et azotes) expliquée par la géologie du lac ou par une pollution humaine (rejets de fermes ou de stations d'épuration des eaux usées), les microalgues peuvent alors se développer massivement. Il y aura par suite une superposition d'une couche de microalgues sur l'autre, empêchant l'arrivée de lumière aux couches inférieures. Les microalgues n'auront plus accès à la lumière. Elles consommeront alors l'oxygène par respiration jusqu'à pouvoir mourir, notamment si le mélange est insuffisant.



Figure I-21 : Photos de lacs naturels dans différentes régions.

Quelques exemples sont donnés en Figure I-21. Le lac Tchad en Afrique est un lac très ancien qui produit toujours de la spiruline (*Arthrospira platensis*) en importantes quantités. La photo du milieu présente aussi un lac pour la culture de spiruline en Myanmar (en Asie). Les deux dernières photos sont prises pour le lac Klamath d'Oregon aux Etats Unies pour la culture d'*Aphanizomenon* et du « Hutt Lagoon » pour la culture de *Dunaliella salina* en Australie. Les lacs étaient stagnants ou faiblement aérés, la dissolution du carbone et du



dioxygène du milieu atmosphérique vers le milieu aquatique est faible (Yang et al. 2008). Un équilibre proche de l'air est souvent atteint (Figure I-22).

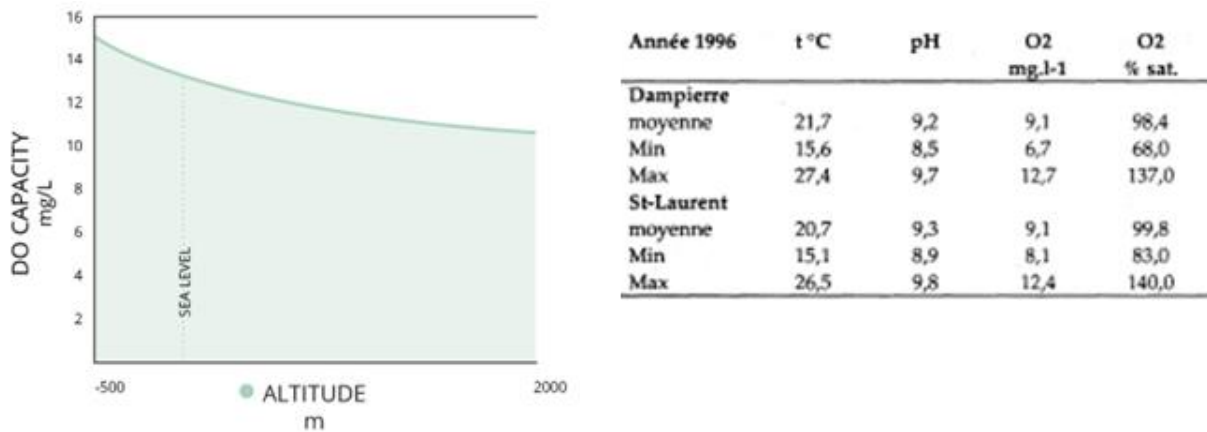


Figure I-22 : schéma de l'évolution de l'oxygène dissous dans les lacs eutrophisés A gauche : évolution de la concentration d'oxygène dissous dans les lacs eutrophisés en fonction de la profondeur (Fondriest Environmental, Inc. "Dissolved Oxygen." *Fundamentals of Environmental Measurements*. 19 Nov. 2013. Web. < <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/dissolved-oxygen/> >). A droite, exemple de mesures effectués sur des lacs en Loire moyenne, France (Lair 1998)

### Les bassins ouverts

La Figure I-23 présente des photos de plusieurs géométries de bassins ouverts. Cela regroupe les raceways, les bassins circulaires et les bassins rectangulaires. Ces bassins ressemblent aux lacs naturels, sauf qu'ils sont artificiels et agités en permanence. Par conséquent, ils sont en général plus productifs. A noter que l'accumulation d'oxygène dissous (DO) y est différente que dans les milieux naturels.

Les raceways ouverts par exemple, peuvent accumuler de l'oxygène dissous avec des valeurs supérieures à 300% d'oxygène en saturation avec l'air, si la capacité en transfert gazeux est faible (Marquez et al. 1995, Weissman et al. 1988) . Cette concentration dépend de plusieurs facteurs, comme la vitesse d'agitation par la roue à aubes ou l'épaisseur du système par exemple (Chisti 2016).

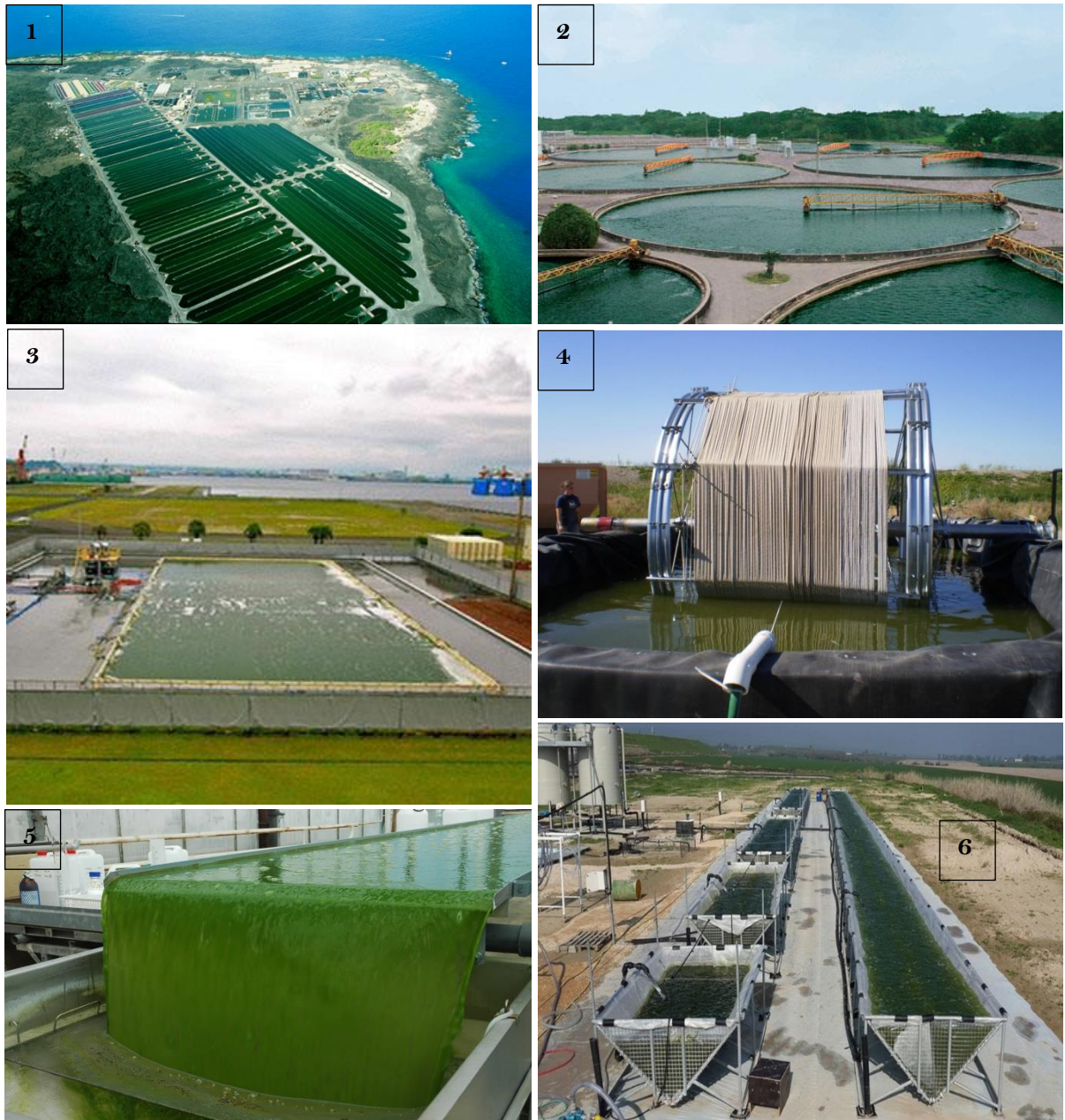


Figure I-23: Photos de différentes géométries de bassins ouverts. Les références des photos sont les suivantes (1 → Cyanotech USA : [www.cyanotech.com](http://www.cyanotech.com), 2 → Sunchlorella Indonésie: [www.sunchlorella.com](http://www.sunchlorella.com), 3 → Japan : [www.ihl.co.jp](http://www.ihl.co.jp), (<http://news.algaeworld.org> pour la version anglais), 4 → SWBEC, USA : [www.swbec.usu.edu](http://www.swbec.usu.edu), 5 → Institute of botany gaz , Czech Republic : [www.ibot.cas.cz](http://www.ibot.cas.cz), 6 → Iniverve biofuel : [www.univerve-biofuel.com](http://www.univerve-biofuel.com))

Les systèmes en cascades basés sur un film ruisselant (photos 5), présentent des avantages vis-à-vis de la captation de lumière ; grâce à leur faible épaisseur, l'absorption de lumière et donc leur productivité sera plus importante. Ces photobioréacteurs accumulent moins de dioxygène vue leur faible épaisseur, avec donc une surface de contact importante avec la phase gazeuse (Pruvost et al. 2017).

La photo n°4 est un système de culture utilisé pour le traitement des eaux usées. Il fonctionne en rotation dans un bassin contenant les microalgues et l'eau à traiter. Les microalgues s'accrochent sous forme de biofilm au support qui tourne en permanence pour apporter les nutriments nécessaires aux microalgues. Dans ce système, l'accumulation d'oxygène dissous est faible et l'effet sur la biomasse est limité vue que les cellules passent du bassin vers l'atmosphère et ainsi de suite (Christenson et Sims 2012).

## **I.5.2 Les systèmes de culture fermés**

### **Les photobioréacteurs tubulaires :**

Les photobioréacteurs tubulaires sont les systèmes clos les plus utilisés en industrie (Ugwu et al. 2008). Pourtant, ces PBRs peuvent atteindre des concentrations en oxygène dissous de 400% de la saturation avec l'air (Molina et al. 2001). Cette concentration peut être réduite en modifiant le diamètre des tubes ou leur positionnement (horizontales, verticales), la longueur des tubes et la vitesse d'aération afin de favoriser le transfert gaz-liquide (Ugwu et Aoyagi 2012, Chaumont 1993). Dans la Figure I-24, on trouve différents photobioréacteurs tubulaires utilisés de par le monde. Il existe par exemple, les photobioréacteurs tubulaires horizontaux en Espagne (photo 1), les tubulaires verticaux en Indonésie (photo 2). Dans ces deux géométries, les tubes sont en verre. Or dans les photos 4 et 7, les tubes sont en plastique (en Allemagne et Israël respectivement). Des photobioréacteurs annulaires ont également été conçus en Allemagne (photo 3) et au Portugal (photo 6).

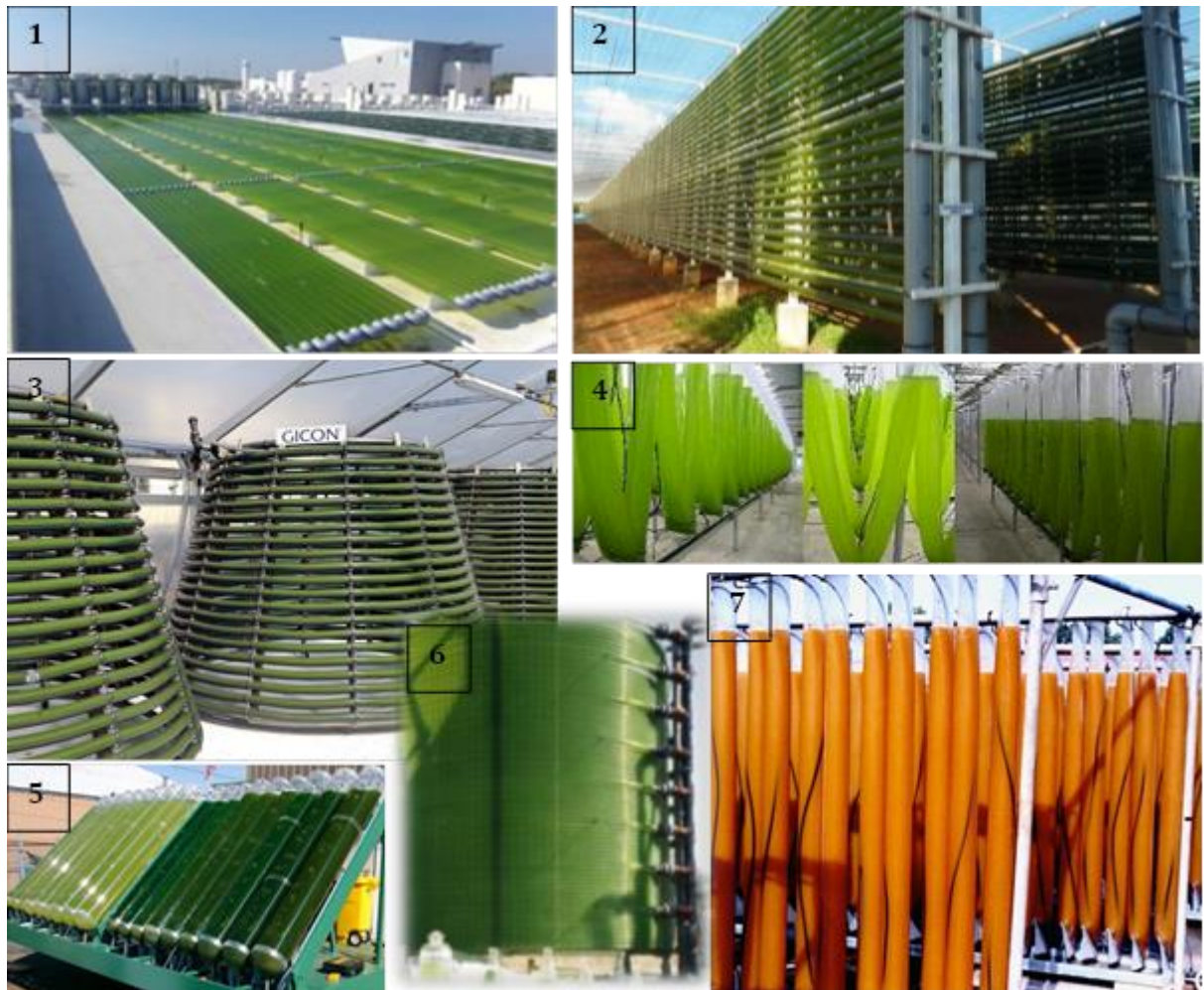


Figure I-24 Photos de photobioréacteurs tubulaires présentés en différents positionnement et matériel de conception. Les références des photos sont les suivantes : 1 → fitoplancton Marino, Espagne : [www.fitoplanctonmarino.com](http://www.fitoplanctonmarino.com), 2 → Varicon Aqua, UK : [www.variconaqua.com](http://www.variconaqua.com), 3 → Gicon, Allemagne : [www.gicon.de](http://www.gicon.de), 4 → Nova grean, Allemagne : [www.novagreen-microalgae.com](http://www.novagreen-microalgae.com), 5 → <http://tpemicroalgue.e-monsite.com/pages/i-la-production-de-micro-algues.html> → Portugal : <http://biofuels2010.blogspot.fr/2010/11/manufacturing-processes-of-algae.html>, 7 : → Minapro : [www.minapro.com](http://www.minapro.com).

### Les photobioréacteurs plans

La géométrie plane est de plus en plus utilisée en industrie, en Allemagne (photo 1), aux Etats-Unis (photos 2), au Portugal (photo 4) et en France (Photos 3 et 5). L'aération de ces PBRs est assurée généralement par un système Airlift qui assure un mélange efficace, un

coefficient de transfert gaz-liquide élevé (Olivieri et al. 2014) et enfin une formation moins importante de biofilm à la surface (Zittelli et al. 2013; Karemore et al. 2015)

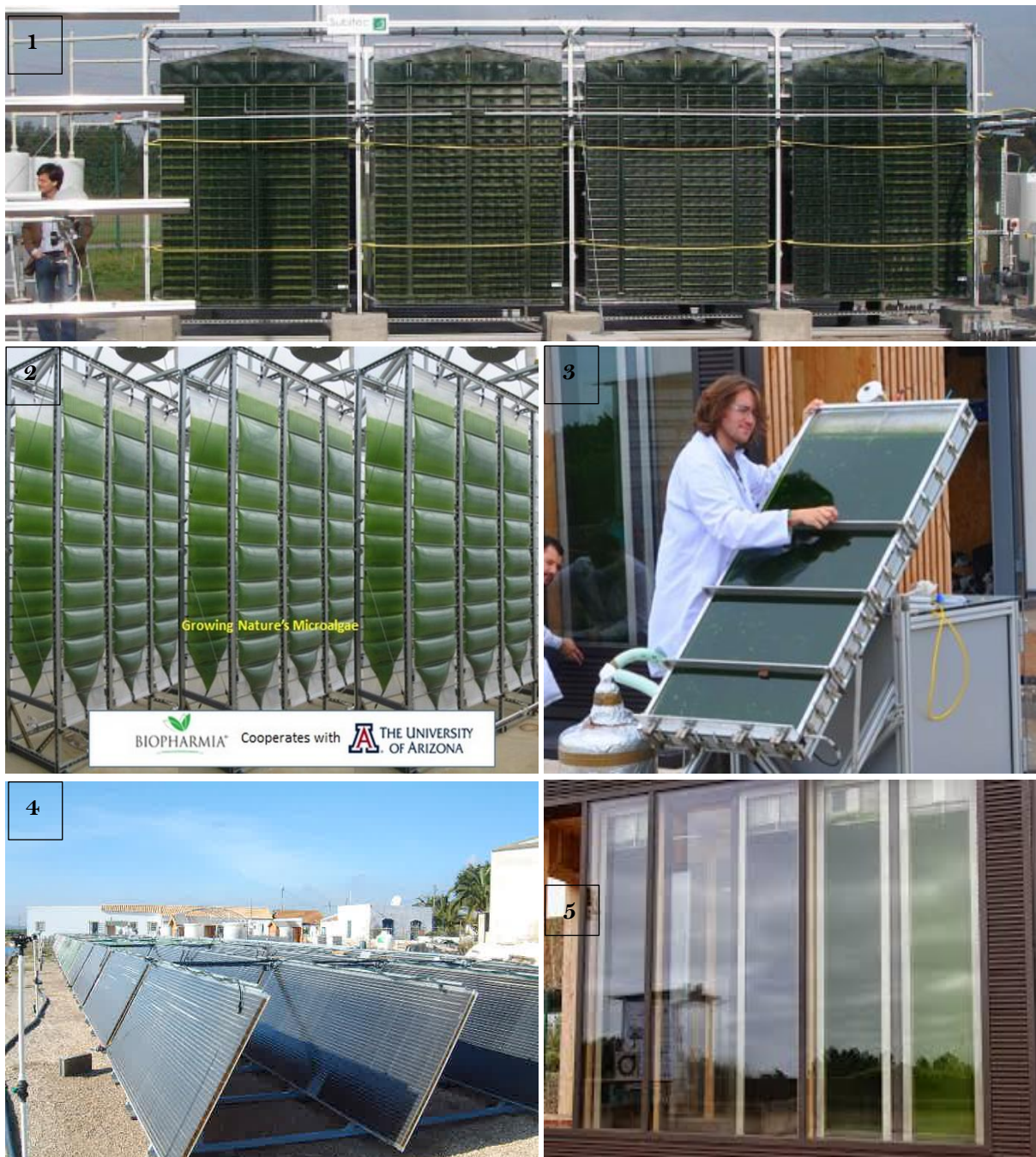


Figure I-25 : Photos de photobioréacteurs plans. Les références des photos sont les suivantes : 1 → Subitec, Allemagne : [subitec.com](http://subitec.com), 2 → Biofarmia, Norvège : [www.biopharmia.no](http://www.biopharmia.no), 3 et 5 → Algosolis, France : [algosolis.com](http://algosolis.com), 4 → Necton, Portugal : [www.necton.pt](http://www.necton.pt).

## Les photobioréacteurs à échelle laboratoire

Les photobioréacteurs à échelle laboratoire sont très utiles pour des études fondamentales en biologie, pour valider des nouveaux concepts d'ingénierie ou optimiser des paramètres de croissance d'une souche de microalgues. Par conséquent, ces PBRs doivent répondre aux différents critères permettant une bonne croissance par photosynthèse (atténuation de lumière contrôlée, transfert gaz-liquide efficace pour un apport de carbone et une évacuation de l'oxygène produit, effet de cisaillement limité). Dans la Figure I-26 différents photobioréacteurs de laboratoire sont présentés.



Figure I-26 : Photos de différents photobioréacteurs à échelle laboratoire.

Algofilm (photo 1) (Pruvost et al. 2017) est un prototype de nouvelles technologies qui a été conçu au GEPEA. Ce système est un photobioréacteur intensifié. Il permet d'obtenir des concentrations en biomasse 100 fois plus importantes que dans un bassin de type raceway, pour une même productivité en surface de captation de lumière. Ceci est rendu possible en diminuant l'épaisseur de culture (ce qui augmente le rapport surface de captation sur volume de culture). Ce PBR fonctionne sur le principe de film ruisselant, permettant d'obtenir une épaisseur de culture de 1,5 millimètre. Il a été montré que ce photobioréacteur accumule peu le dioxygène vu son coefficient de transfert élevé. Par contre, 20% de son volume éclairé est en fraction sombre (boucle de recirculation). Ceci peut avoir un effet négatif sur la productivité en biomasse, ce qui sera discuté dans le chapitre 4.

Dans la photo 2, le système de criblage EOSS 1 (GEPEA) a été développé pour évaluer la croissance de certaines microalgues vis-à-vis de la production de molécules d'intérêts. Taleb et al. (2015, 2016) ont criblé différentes souches de microalgues pour la production de biodiesel grâce à ce système. Le photobioréacteur torique (Pruvost et al. 2006) est un exemple de photobioréacteur qui a été utilisé en optimisation de culture pour modéliser la production de *Chlamydomonas reinhardtii* (Takache 2010, 2012) et l'effet des cycles lumière/obscurité (Takache 2015). Ce photobioréacteur a été modélisé en terme de transfert radiatif (Pottier et al. 2005), et a été utilisé en particulier pour la production de dihydrogène (Fouchard et al. 2008) et la fixation du CO<sub>2</sub> par les microalgues (Le Gouic 2013). Les photobioréacteurs mini-raceway et Airlift sont aussi des photobioréacteurs utilisés en laboratoire pour des fins d'extrapolation de la culture à échelle industrielle. Le PBR torique et le photobioréacteur plan Airlift en plus du Raceway seront étudiés dans le chapitre 3 en terme d'accumulation d'oxygène dissous.

### **Nouveaux concepts de photobioréacteurs**

La Figure I-27 donne quelques exemples de PBRs originaux; La photo 1 est une photo de photobioréacteurs basés sur la technique des cellules immobilisées. Ils ont été conçus pour la capture du dioxyde de carbone et l'utilisation des effluents des eaux de stations d'épuration des eaux usées (STEP). Ils sont actuellement localisés en Espagne (Technical university of Madrid). La deuxième photo est une photo d'un raceway clos se trouvant sur la plateforme Algosolis (Saint-Nazaire, France, Université de Nantes). Ils permettent notamment de contrôler l'ambiance gazeuse, et sont donc intéressants pour la valorisation du CO<sub>2</sub> issu de fumées industrielles. Les dômes (photos 3) ont été utilisés à Hawaii. Ce sont des chambres hémisphériques de 2.5 à 10 cm de largeur. Ils ont l'inconvénient de la difficulté de nettoyage et du besoin de grand nombre d'unités pour fournir une production importante en biomasse. On notera également la photo des systèmes de culture en gouttelettes prise de la société BIOALGOSTRAL à la Réunion. La Figure I-28 donne d'autres exemples de photobioréacteurs qui flottent sur la mer ou sur les lacs. L'agitation est assurée ici par les vagues. L'intérêt ici notamment d'utiliser l'inertie thermique du volume d'eau pour diminuer les besoins en régulation.



Figure I-27 : photos des photobioréacteurs en innovation. Les références des photos sont les suivantes : 1 → technical university of Madrid, Spain : [www.upm.es](http://www.upm.es), 2 → Algosolis ,France : [algosolis.com](http://algosolis.com), 3 → Micro Gaia, Inc, Japan : [www.icis.com](http://www.icis.com), 4 → Bioalgostral, La reunion : [www.bioalgostral.net](http://www.bioalgostral.net).



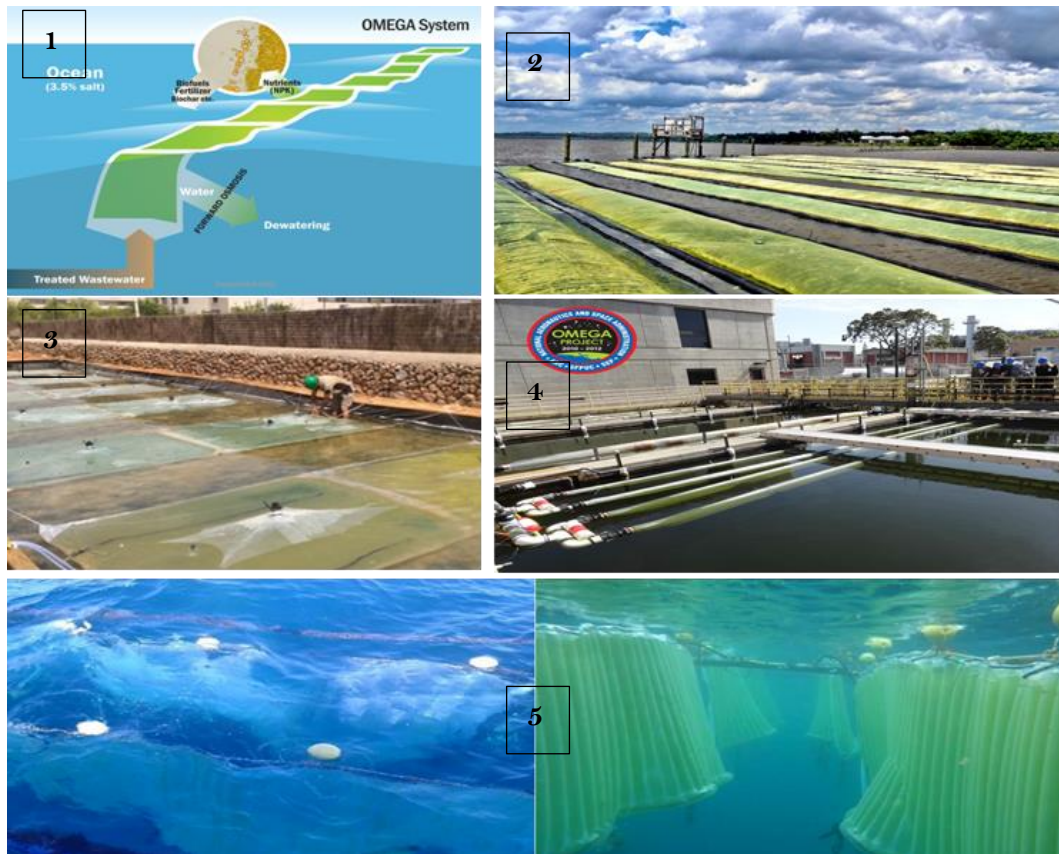


Figure I-28 : Photos des photobioréacteurs flottants. Les références des photos sont les suivantes :  
 1,4 → Omega Project, California : [www.nasa.gov/centers/ames/research/OMEGA/index.html](http://www.nasa.gov/centers/ames/research/OMEGA/index.html),  
 3 → Algasol renewables, Spain Bengladesh : [www.algasolrenewables.com](http://www.algasolrenewables.com), 2 → Algae systems, USA :  
[algaesystems.com](http://algaesystems.com), 5 → Phytolutions, Allemagne, Chine : [www.phytolutions.de](http://www.phytolutions.de).

### I.5.3 Bilan sur les technologies de culture de microalgues

Chaque système de culture possède ses avantages et ses inconvénients. La plus grande différence entre les systèmes fermés et les systèmes ouverts est le coût d'investissement. Les systèmes fermés étant beaucoup plus coûteux que les systèmes ouverts. Mais les systèmes fermés sont plus efficaces (Grobbelaar et Kurano 2003) de par leur contrôle des conditions de culture, la limitation du risque de contamination, de l'évaporation de l'eau et de la perte de CO<sub>2</sub>. L'un des inconvénients des photobioréacteurs est le risque de formation d'un biofilm s'accrochant sur les parois, diminuant la disponibilité de la lumière dans le photobioréacteur. On notera également pour certains systèmes, une tendance à l'échauffement et à l'accumulation d'oxygène qui peut être néfaste à la croissance.

Si on analyse plus en détail, on notera que les systèmes Airlift ont un meilleur transfert de masse, par rapport aux photobioréacteurs tubulaires horizontaux (Reyna-Velarde et al. 2010), La disponibilité de la lumière est plus grande pour les systèmes à faible profondeur de culture comme les photobioréacteurs plans et les photobioréacteurs tubulaires. Pour les colonnes à bulles ou les airlifts, la profondeur de culture est également plus élevée.

Concernant les transferts gaz-liquide, les systèmes aérés facilitent les échanges entre les phases facilitant l'évacuation de l'oxygène produit pendant la photosynthèse et la dissolution du dioxyde de carbone apporté par l'injection de l'air. L'aération et l'accumulation de l'oxygène sont par contre des problèmes majeurs dans les photobioréacteurs tubulaires en particulier si à cela s'ajoute de très fortes intensités lumineuses. Des dommages cellulaires pourront apparaître alors (Molina Grima et al. 1999).

Au final, le système de culture idéal n'existe pas, et des compromis doivent être faits entre les différents paramètres de conception affectant les performances.

## **I.6 Modes de fonctionnement en photobioréacteurs**

La culture des microalgues, comme pour d'autres microorganismes tels que les bactéries, se déroule pour différents modes de fonctionnement. La particularité dans le cas des microalgues réside dans l'activité photosynthétique donc avec le besoin d'un apport d'énergie. Les modes décrits ci-dessous sont donnés par Richmond (2004).

### **Le mode batch**

On se trouve dans le cas d'un système fermé pour lequel on introduit en une seule fois, en début de culture, l'inoculum contenant les microalgues et tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance, sauf ceux apportés éventuellement par une phase gaz (CO<sub>2</sub> notamment). La concentration cellulaire augmente au cours du temps jusqu'à apparition d'une limitation de croissance.

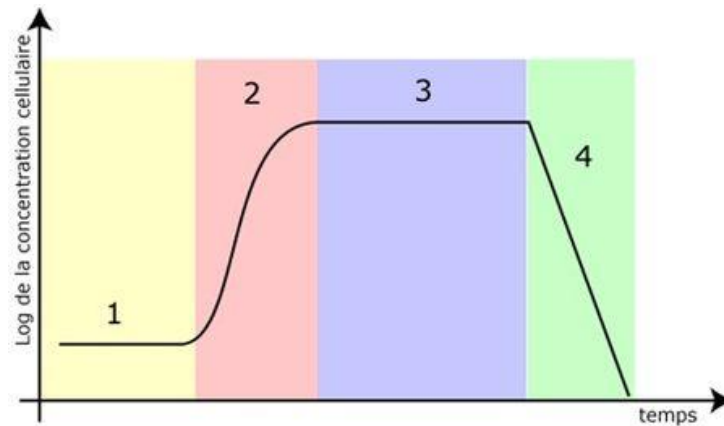


Figure I-29 : courbe de croissance d'une culture de microalgue dans un système en batch.

(<https://www.emaze.com/>)

Les différentes phases de cette croissance sont les suivantes :

1. Phase 1 : phase de latence. La cellule a besoin d'un temps d'acclimatation aux nouvelles conditions de culture qui lui sont appliquées ; la vitesse de croissance est très faible.
2. Phase 2 : phase d'accélération. Les cellules ont accumulé suffisamment de composés intracellulaires et ont doublé leur matériel génétique. La population va commencer à croître grâce à la reproduction végétative. Chaque cellule se divise donc en deux cellules filles identiques contenant chacune la moitié du contenu de la cellule mère et qui par la suite se diviseront elles-mêmes en deux
3. Phase 3 : phase exponentielle. La vitesse de croissance de la culture reste constante et maximale. Les conditions du milieu sont optimales pour la croissance cellulaire. La quantité moyenne des constituants cellulaires ainsi que l'évolution de la population sont constantes
4. Phase 4 : phase stationnaire. Un des éléments du milieu va venir à manquer (lumière, azote, phosphore, carbone...) et en conséquence la vitesse de croissance diminue. Cependant tant que les cellules possèdent des produits de stockage leur permettant d'alimenter leur métabolisme, elles survivent. Certains composés, tel que les lipides et les glucides, peuvent continuer à s'accumuler dans les cellules pendant cette période. Au final, la quantité de cellules qui se reproduit est égale à la quantité de cellules qui meurent donc la concentration cellulaire reste constante.
5. Phase 5 : phase de décroissance. La majorité des cellules a épuisé ses réserves intracellulaires, et ne peut donc plus produire l'énergie nécessaire pour les processus

de maintenance cellulaire. La quantité de cellules qui meurt est alors fortement supérieure à la quantité de cellules pouvant encore se reproduire. En culture Batch, la productivité volumique sera donnée par l'équation :

$$P_x = \frac{C_{x_{finale}} - C_{x_{initiale}}}{T_{final} - T_{initial}} \quad \text{Équation I-5}$$

$P_x$  est la productivité volumique en Kg/m<sup>3</sup>/h

$C_{x_{finale}}$  est la concentration en biomasse finale en kg/m<sup>3</sup> à un temps  $T_{final}$  (h)

$C_{x_{initiale}}$  est la concentration en biomasse en kg/m<sup>3</sup> à un temps  $T_{initial}$  (h)

### **Le mode fed-batch et semi-continu**

Ce mode de culture se distingue du précédent par l'introduction du milieu de culture au fur et à mesure jusqu'à atteindre un volume final souhaité (fed-batch). Ce mode de fonctionnement se caractérise donc par un volume de culture variable. Le mode fed-batch permet d'optimiser la productivité de biomasse en évitant une inhibition par les substrats.

Une alternative consiste à retirer régulièrement du milieu de culture contenant de la biomasse et par le remplacement par du milieu neuf (mode semi-continu). Dans ce cas, le calcul de la productivité dans ce mode de culture se fait en réalisant une moyenne des différentes séquences sur la période de production.

### **Le mode continu**

Le mode continu se caractérise par un apport permanent de milieu de culture et une récolte de la biomasse simultanée permettant de maintenir le volume de la culture constant. Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire à l'intérieur du réacteur stable. La culture est débutée en mode batch jusqu'à ce que la concentration cellulaire souhaitée soit obtenue, puis le milieu de culture est injecté en continu. Ainsi, théoriquement, la culture se trouvera continuellement en phase de croissance. Il existe deux types de mode continu : le mode chemostat et le mode turbidostat.

Le mode chemostat se caractérise par un débit d'alimentation en milieu nutritif constant et un débit de récolte égal au débit d'alimentation, le plus souvent réalisé par débordement (ou surverse) du photobioréacteur.

Dans le mode turbidostat, le débit d'alimentation est ajusté en fonction de la concentration dans le PBR. Une sonde de turbidité transmet le signal de concentration à la pompe d'alimentation qui régule son débit pour maintenir la concentration constante. La variation de la concentration est donc nulle en fonction du temps. Lorsque l'équilibre est atteint, la productivité volumique s'écrit alors :

$$P_x = D \cdot C_x = \frac{C_x}{\tau_p} \quad \text{Équation I-6}$$

$D$  : taux de dilution ( $\text{h}^{-1}$ )

$\tau_p$  : taux de renouvellement du milieu,  $\tau_p = 1/D$

$P_x$  : productivité volumique en  $\text{Kg}/\text{m}^3/\text{h}$

$C_x$  : concentration en biomasse en  $\text{kg}/\text{m}^3$

## I.7 Modélisation de la croissance des microalgues

La modélisation de la croissance des microalgues représente un défi scientifique du fait de la complexité des phénomènes à considérer. En effet, ce système biologique interagit avec de nombreux facteurs physiques et biologiques, eux-mêmes fortement dépendant des paramètres opérationnels et environnementaux. Divers modèles de complexité variables ont été proposés dans la littérature afin de caractériser le comportement des microalgues dans les systèmes de cultures. La partie ci-dessous donne les principaux éléments nécessaires à leur compréhension.

### I.7.1 Modèles de croissance en photobioréacteurs

La modélisation de la croissance des microorganismes photosynthétique est un enjeu scientifique important. Il existe plus de 40 modèles dans la littérature (Béchet et al. 2013). Ils permettent d'une façon générale, l'optimisation du procédé et ont pour but la prédiction du comportement du microorganisme dans le procédé. Ces différents types de modèles mathématiques font intervenir les principaux paramètres de cultures cités dans la partie I.4.

Béchet et al. (2013), ont classés les modèles selon 3 types. Ce classement se base sur le paramètre le plus important de la culture des microalgues : la lumière.

#### Les modèles de type I :

Ces modèles considèrent la moyenne de l'intensité lumineuse dans un photobioréacteur ; les microalgues, dans un PBR parfaitement mélangé, recevant la même intensité lumineuse

moyenne, en conséquence, ils ont la même réponse photosynthétique. Dans ces modèles, les paramètres cinétiques sont fonction des conditions opératoires comme la concentration cellulaire, le flux incident reçu en surface et la taille de la cellule. Les modèles de Grima et al. (1994) et Ogbonna et al. (1995) sont deux exemples de ce type de modèles.

### **Les modèles de type II :**

Ces modèles prennent en considération l'impact des gradients de lumière au sein du photobioréacteur. En effet, en système de culture dense, les cellules ne reçoivent pas toutes la même intensité lumineuse à cause de la présence de zone sombre dans le PBR par exemple. Dans ce cas, la réponse photosynthétique n'est plus considérée identique au sein du photobioréacteur. Ces modèles nécessitent de quantifier la distribution de la lumière au sein du photobioréacteur, et de retenir un modèle biologique qui exprime le taux local de photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse locale reçue pour ensuite obtenir le taux global de photosynthèse. Ces modèles peuvent prédire la productivité en biomasse selon une large gamme de conditions opératoires et différentes conceptions de photobioréacteurs. Les modèles de Cornet et Dussap (2009), Grobbelaar et al. (1990) et Takache et al. (2012) sont des exemples de ce type de modèles.

### **Les modèles de type III**

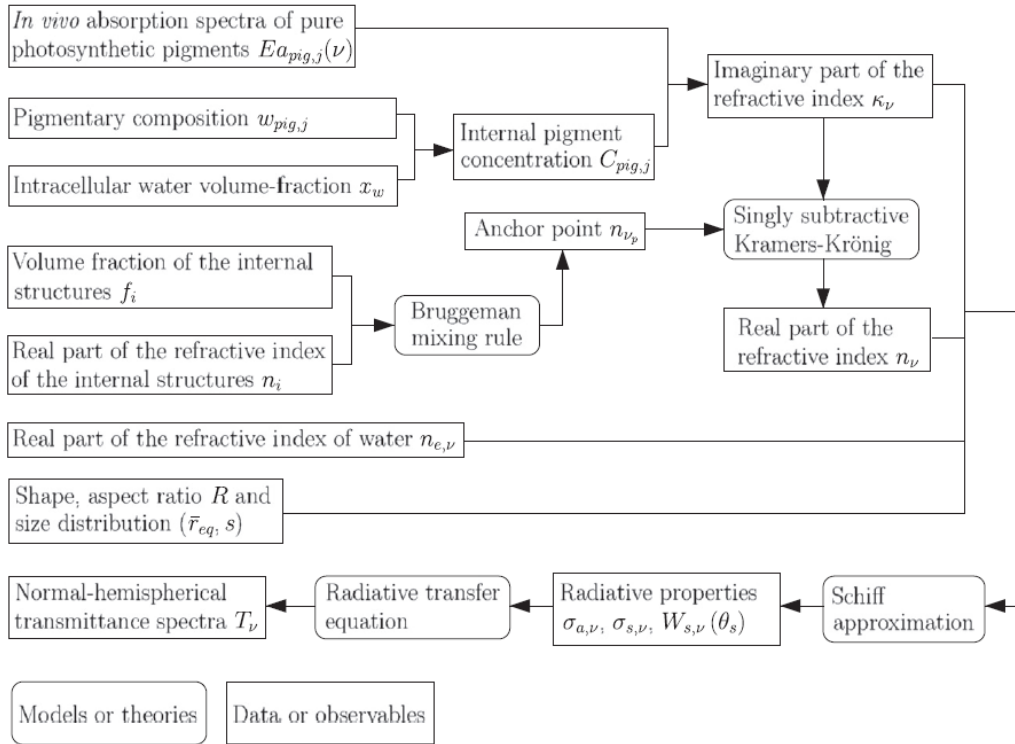
Ces modèles étudient le taux de photosynthèse d'une seule cellule en fonction de l'intensité lumineuse reçue au fil du temps et au fil de son passage dans le système de culture. Leur principe repose sur la détermination de l'intensité lumineuse reçue par chaque microalgue, la détermination du taux de photosynthèse en utilisant un modèle biologique dynamique et la somme des taux de photosynthèse de chaque cellule afin de calculer le taux globale de la photosynthèse au sein de la culture en prenant en compte le trajet de cette dernière (dynamique de fluide). Pruvost et al. (2008) ont comparé ce type de modèle à ceux de type II (Cornet et Dussap 2009).

#### **I.7.2 Modèle de croissance cinétique retenu**

Le modèle détaillé dans cette partie sera le modèle retenu dans ce manuscrit. Il consiste en trois étapes successives : l'obtention des propriétés radiatives, la résolution de l'équation du transfert radiatif et le couplage du transfert radiatif à la cinétique de photosynthèse.

## Détermination des propriétés radiatives

Le calcul des propriétés radiatives se fait à partir de paramètres morphologiques et biochimiques des microorganismes tels que leur forme, leur taille et leur teneur en pigments. Les calculs et les méthodes numériques détaillés pour déterminer les propriétés radiatives sont détaillés par Kandilian et al. (2016). Ils sont schématisés dans la *Figure I-30*.



*Figure I-30 : représentation schématique de l'obtention des propriétés radiatives des microalgues (Dauchet et al, 2015)*

## Résolution de l'équation de transfert radiatif

Cette étape consiste en la détermination du champ radiatif en tout point du photobioréacteur. Le modèle de transfert radiatif proposé, dit à deux flux, s'applique à des géométries où l'atténuation de lumière est monodimensionnelle (comme dans le cas des systèmes plans utilisés dans cette thèse). Il décrit l'atténuation de la lumière en prenant en compte son absorption et la diffusion de la lumière par l'ensemble des cellules. Les hypothèses sont les suivantes : le milieu est supposé absorbant, diffusant et non fluorescent. Par

conséquent, il suffit de déterminer trois paramètres pour caractériser le trajet lumineux : le coefficient massique d'absorption de la lumière ( $Ea_\lambda$  en  $\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$ ), le coefficient massique de diffusion ( $Es_\lambda$  en  $\text{m}^2.\text{kg}^{-1}$ ) et le coefficient de rétrodiffusion ( $b_\lambda$  sans unité).

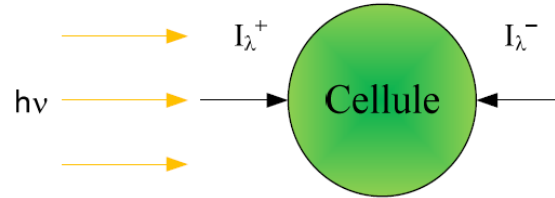


Figure I-31 : Représentation schématique du modèle à deux flux (Takache 2010)

Le modèle à deux flux prend en compte la propagation de la lumière pour une longueur d'onde donnée ( $\lambda$  en nm) suivant l'axe  $z$  et dans deux directions opposées ( $I_\lambda^+$ ,  $I_\lambda^-$ ,  $I_\lambda^-$  représentant la partie rétrodiffusée du flux lumineux).

En connaissant la teneur en pigments de la microalgue cultivée en PBR et sa distribution de taille, les propriétés radiatives  $Ea_\lambda$ ,  $Es_\lambda$  et  $b_\lambda$  peuvent être déterminées théoriquement d'une façon totalement prédictive en utilisant la théorie de Lorenz-Mie (Mie 1908).

Le comportement d'une culture de microalgues est caractérisé par une vitesse d'absorption du flux lumineux notée  $\mathcal{A}$  (Pruvost et al. 2008; Cornet et al. 1998). Elle représente la vitesse spécifique d'absorption des photons par la biomasse, et relie donc l'irradiance  $G_\lambda$  (la lumière reçue par les microalgues) et le coefficient massique d'absorption de la biomasse  $Ea_\lambda$ .

$$\langle \mathcal{A} \rangle = \frac{1}{L} \int_{PAR} \int_0^L \mathcal{A}_\lambda(z) dz d\lambda = \frac{1}{L} \int_{PAR} \int_0^L \overline{Ea_\lambda} G_\lambda(z) dz d\lambda \quad \text{Équation I-7}$$

On notera ici que  $\mathcal{A}(z)$  est une grandeur locale, et représente la valeur spécifique locale d'absorption de photons ( $\mathcal{A}(z) = Ea_\lambda \cdot G_\lambda(z)$ ). Elle peut aussi être déterminé en réalisant un bilan sur la phase photonique, établi ici dans le volume réactionnel (Pruvost, et al. 2008).

$$\langle \mathcal{A} \rangle = \frac{S}{V C_X} (q_0 - q_L) = \frac{a_{light}}{C_X} (q_0 - q_L) \quad \text{Équation I-8}$$



où  $a_{light}$  représente la surface spécifique du PBR, c'est-à-dire le rapport entre la surface éclairée et le volume du PBR (en  $m^{-1}$ ),  $q_0$  et  $q_L$  représentent respectivement le flux de photons (PFD) à l'entrée et à la sortie du système.

Lorsque l'intégralité du flux lumineux est absorbée dans le PBR cette expression se résume à :

$$\langle \mathcal{A} \rangle \simeq \frac{q_0 a_{light}}{C_X} \quad \text{Équation I-9}$$

Suivant cette dernière équation, il suffit de connaître le flux reçu en surface de PBR, la concentration en biomasse (par mesure de la masse sèche) et l'épaisseur de culture pour estimer la valeur de  $\mathcal{A}$ .

### Couplage du transfert radiatif à la cinétique de photosynthèse

Le modèle cinétique se divise en deux parties ; la photosynthèse et la respiration. La partie photosynthèse a été proposée et validée par de nombreux travaux expérimentaux portant sur des cyanobactéries (Cornet et Dussap 2009). La partie respiration a été ajoutée par Takache et al. (2012) pour tenir compte de la respiration à la lumière chez les microalgues eucaryotes. Le modèle complet a été validé expérimentalement (Pruvost et al. 2015). Ce modèle exprime la vitesse locale de production de biomasse  $r_x$  en fonction de la quantité de photons absorbée. Une reformulation récente de ce modèle a été proposée où la vitesse  $r_x$  est exprimée en fonction de la vitesse locale d'absorption des photons  $\mathcal{A}$ , plus rigoureuse (Pruvost et al. 2016, Dauchet 2012, Souliès et al. 2016) :

$$r_X = \frac{J_{O_2} C_X M_X}{v_{O_2-x}} = \frac{C_X M_X}{v_{O_2-x}} \cdot \left[ \rho_M \frac{K_A}{K_{A+\mathcal{A}}} \bar{\phi}'_{O_2} \mathcal{A} - \frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \frac{Kr}{K_{r+\mathcal{A}}} \right] \quad \text{Équation I-10}$$

Cette équation sera détaillée dans les paragraphes suivants.

## Terme de photosynthèse

La photostynthèse s'effectue en présence de lumière. Elle est donc totalement dépendante de  $\mathcal{L}$ . La conversion des photons absorbés en électrons se fait avec un rendement appelé rendement photochimique primaire ( $\rho$ ). Ce dernier est modélisé selon l'équation suivante :

$$\rho = \rho_{MAX} \frac{K}{K + \mathcal{L}} \quad \text{Équation I-11}$$

$\rho_{MAX}$  : rendement photochimique primaire maximum

$K$  : constante de saturation des antennes photosynthétiques

La séparation de charges induit une activation du schéma en Z de la photosynthèse ; l'eau est oxydée, le dioxygène, l'ATP et le NADPH<sub>2</sub> sont produits.  $\bar{\phi}'_{O_2}$  est alors introduit et est défini comme le rendement de conversion des excitations en dioxygène (rendement quantique). La vitesse locale de production de dioxygène par photosynthèse  $J_{O_2 photo}$  s'exprime selon l'équation suivante :

$$J_{O_2 photo} = \bar{\phi}'_{O_2} \cdot \rho_{MAX} \frac{K}{K + \mathcal{L}} \quad \text{Équation I-12}$$

## Terme de respiration

La respiration décrite ici concerne la respiration à la lumière chez les microalgues (partie I.2.4). Le modèle de la respiration est expliqué en détail dans Takache et al. (2012).  $J_{NADH_2}$  est le terme lié directement à l'activité de la respiration et qui va être le paramètre clé dans la représentation de l'activité respiratoire dans le chapitre 3 et 4. Il représente la vitesse de consommation spécifique de cofacteur par respiration et s'exprime en mol NADH<sub>2</sub> par kilogramme de biomasse par seconde. Au final, la vitesse locale de consommation de dioxygène par respiration  $J_{O_2 resp}$  s'exprime selon l'équation suivante :

$$J_{O_2 resp} = \frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \frac{K_r}{K_r + \mathcal{L}} \quad \text{Équation I-13}$$

$K_r$  est la constante d'inhibition de la respiration par la lumière et  $v_{NADH_2-O_2}$  est le coefficient stœchiométrique de régénération du cofacteur dans la chaîne photosynthétique.

En présence de lumière, les réactions de photosynthèse et de respiration ont lieu en même temps chez les microalgues. La vitesse de production nette de dioxygène  $J_{O_2}$  prend donc en compte les deux termes de photosynthèse et de respiration (Équation I-12 et Équation I-13) et est donnée par:

$$J_{O_2} = J_{O_2 photo} - J_{O_2 resp} = \left[ \rho_M \bar{\Phi}'_{O_2} \frac{K_{..} \mathcal{L}}{K + \mathcal{L}} - \frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2}} \frac{K_r}{K_r + \mathcal{L}} \right] \quad \text{Équation I-14}$$

Cette grandeur étant locale, il est nécessaire de l'intégrer sur le volume :

$$\langle J_{O_2} \rangle = \frac{1}{V_R} \iiint J_{O_2} dV_R \quad \text{Équation I-15}$$

Comme  $\langle J_{O_2} \rangle$  s'exprime en mole d'oxygène par seconde par kilogramme de biomasse, pour passer à la vitesse volumique molaire, il suffit de multiplier par la concentration en biomasse, puis pour passer de la vitesse de production molaire de dioxygène à la vitesse de production massique de biomasse  $\langle r_x \rangle$ , il suffit d'utiliser le rapport stœchiométrique de production de dioxygène par rapport à la biomasse moyenne  $v_{O_2-x}$  et la masse molaire  $M_X$  de la biomasse. On aura au final :

$$\langle r_x \rangle = \frac{\langle J_{O_2} \rangle C_X M_X}{v_{O_2-x}} \quad \text{Équation I-16}$$

En supposant que  $\mathcal{L}$  est connu et à condition de connaître les différents paramètres de la loi de couplage ( $\bar{\Phi}'_{O_2}, \rho_{MAX}, K, J_{NADH_2}, K_r$ ) ainsi que la stœchiométrie de la réaction, nous serons capables de calculer la vitesse volumétrique de croissance  $\langle r_x \rangle$  et productivité volumique moyenne ainsi que la productivité surfacique du réacteur comme ceci est décrit ci-dessous.

### I.7.3 Prédiction des performances cinétiques d'un photobioréacteur

L'équation bilan appliquée sur le système de culture donne l'évolution temporelle de la concentration en biomasse  $C_X$  :

$$\frac{dC_X}{dt} = -D \cdot C_X + \langle r_x \rangle = -\frac{1}{\tau_p} \cdot C_X + \langle r_x \rangle \quad \text{Équation I-17}$$

La résolution de cette équation donne la concentration  $C_X$ , qui permet de prédire la productivité volumique du système. Pour un système fonctionnant en continu et en régime stationnaire :

$$P_X = D \cdot C_X = \frac{1}{\tau_p} \cdot C_X \quad \text{Équation I-18}$$

où  $D$  est le taux de dilution du photobioréacteur (en  $h^{-1}$ ), lié au temps de passage  $\tau_p$  et au débit de sortie de biomasse  $Q_s$  par :

$$D = \frac{1}{\tau_p} = \frac{Q_s}{V_R} \quad \text{Équation I-19}$$

La productivité volumique est utilisée pour déterminer la productivité surfacique, qui est également un critère de performance des photobioréacteurs. La productivité surfacique est la production totale ramenée à la surface de captation  $S_{light}$  :

$$S_X = \frac{P_X}{a_{light}} = P_X \cdot \frac{V}{S_{light}} \quad \text{Équation I-20}$$

## I.8 Conclusion

Les microalgues, pour croître, ont besoin de lumière en premier lieu, de nutriments (surtout azote et phosphore) et d'une source de carbone (partie I.4). Pour répondre à ses besoins, différents types de systèmes de culture ont été développés. La revue bibliographique a cependant montré que selon la technologie, ces systèmes ont différentes capacités à accumuler de l' $O_2$  dissous, et peuvent présenter une activité respiratoire dans les fractions non éclairés de certains PBRs. Il a été montré pour ces cas un effet possible de la concentration d'oxygène dissous sur la productivité en biomasse. La plupart des modèles prédictifs ne prennent cependant aujourd'hui en compte que l'atténuation de la lumière (partie I.7) dans des conditions où normalement cette dernière est le seul facteur limitant. La validation de ces modèles pour différentes concentrations d'oxygène dissous sera donc réalisée dans cette thèse afin de quantifier l'effet global de ce paramètre sur les performances des PBRs et le besoin éventuel d'améliorer les modèles existants.

Au final, dans ce manuscrit, on cherchera à analyser la performance des photobioréacteurs vis-à-vis de la concentration d'oxygène dissous, ainsi la fraction sombre d'un photobioréacteur.

En effet, la concentration d'oxygène dissous peut avoir un effet global sur l'activité respiratoire, comme cela a été montré dans la littérature. Cela sera donc étudié dans le chapitre 3. De plus, certains photobioréacteurs présentent par conception une fraction sombre qui est donc une partie ajoutée au PBR non éclairée et traversée par les microalgues. En considérant que les cellules traversent des zones éclairées puis zones sombres, elles expérimentent donc des cycles qui peuvent altérer l'activité respiratoire, pouvant impacter au final la productivité globale. Il a été démontré que cela peut impacter négativement la productivité en biomasse, mais ceci n'a pas été étudié en détails à ce jour. Une étude spécifique sera donc réalisée (Chapitre 4).



---

# Chapitre 2

---

## *Matériels et Méthodes :*

### *Mise en place des pilotes d'étude et définition des protocoles de suivi de culture.*

Ce chapitre décrit les différents pilotes utilisés dans ce manuscrit. Il sera divisé en différentes parties présentant les microalgues d'étude puis les méthodes de suivi de culture. Les pilotes utilisés pour ce manuscrit seront finalement décrits.

## II. Matériel et méthodes

### II.1 Souche d'étude: *Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* (CCAP 211/19) a été choisie comme espèce modèle de cette thèse. C'est en effet une espèce bien documentée, et largement utilisée aussi bien en laboratoire que dans l'industrie. Elle s'adapte facilement à différentes conditions de culture et est facile à cultiver et se multiplie rapidement. Elle est utilisée dans différents domaines résumés dans le schéma suivant (Figure II-1):

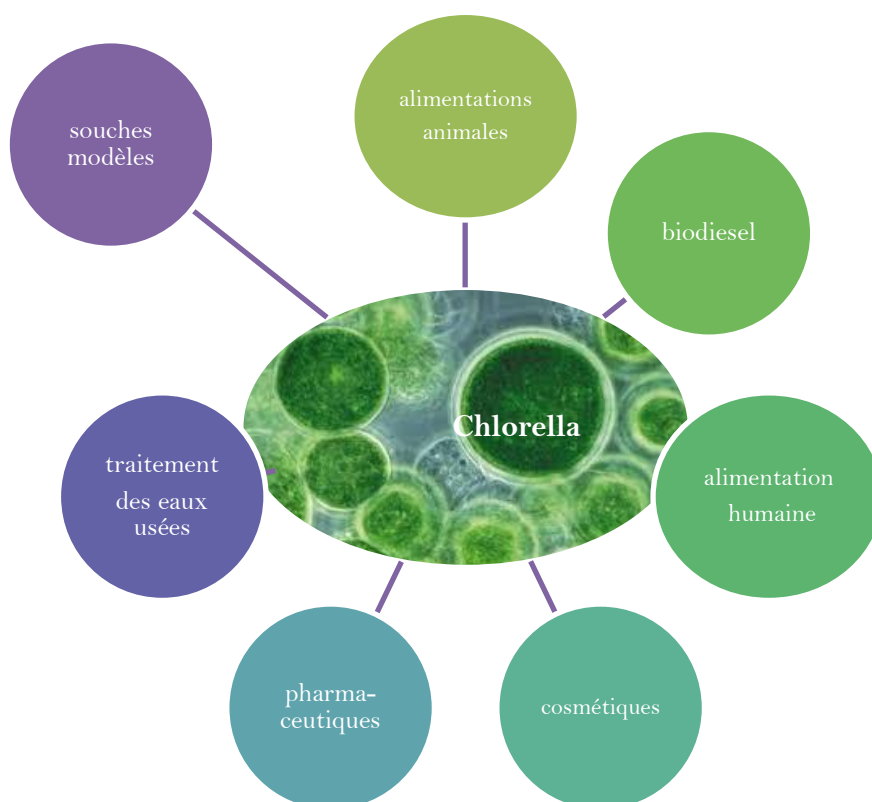


Figure II-1: schéma résumant les différents domaines d'utilisation de *Chlorella vulgaris*.

C'est une microalgue eucaryote appartenant à la lignée des Chlorophytes (Beyenrick 1890). Le genre *Chlorella* se retrouve dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eau douce. Elle est de forme ronde ou ellipsoïde, d'un diamètre moyen de 5  $\mu\text{m}$ . Elle possède un chloroplaste pariétal contenant de la chlorophylle a et b ainsi que des caroténoïdes comme pigments accessoires, un pyrénoïde, des thylakoïdes, des grains d'amidons et du matériel génétique. L'amidon est la réserve majeure de glucides de la cellule (Figure II-2).



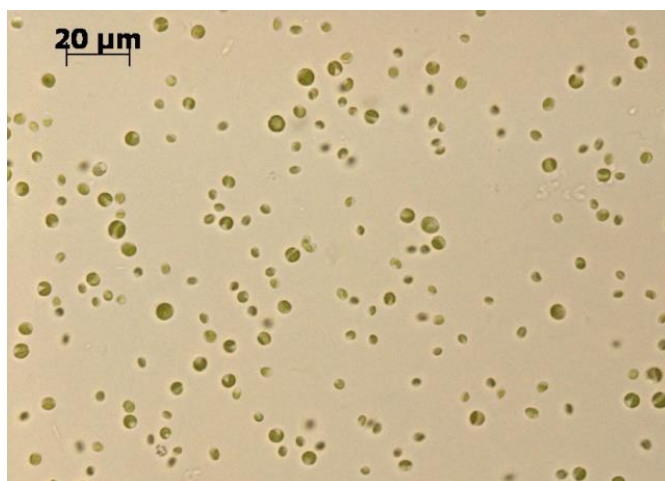


Figure II-2 : Photo de *Chlorella vulgaris* prise par microscope ZEISS AXIO LAB™.

## II.2 Milieux de culture en photobioréacteurs: BBM et Sueoka

Milieu Sueoka			Milieu BBM		
Réactif	C.molaire (mmol/L)	C. massique (g.l <sup>-1</sup> )	Réactif	C.molaire (mmol/L)	C.massique (g.l <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> Cl	27.1	1.45	NaNO <sub>3</sub>	8.82	1.5
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.14	0.28	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.91	0.225
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.48	0.61	EDTANa <sub>2</sub>	0,13	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.34	0.05	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9	0.123
NaHCO <sub>3</sub>	20	1.68	FeSO <sub>4</sub>	0.05	0.014
Solution hutner	1ml/L		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.86	0.15
			CaCl <sub>2</sub>	0.17	0.025
			NaHCO <sub>3</sub>	15	1.26

Tableau II-1 : Composition massique et molaire des milieux de culture Sueoka et BBM pour *Chlorella vulgaris*.

Solution Hutner (Sueoka) (Hutner et al. 1950)		Solution d'oligoéléments (BBM)	
Réactif	C.molaire (mmol/L)	Réactif	Concentration molaire (mmol/L)
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	76.5	ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0.772
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	184	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0.151
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	25.6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4.95×10 <sup>-4</sup>
COCl <sub>2</sub>	6.77	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.046
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	6.29	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0.009
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	17.9	EDTANa <sub>2</sub>	1.063
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ,4 H <sub>2</sub> O	0.89		
KOH	285.18	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1.063
EDTANa <sub>2</sub>	134.32		

Tableau II-2 : Composition des deux solutions d'oligoéléments pour la culture de *Chlorella vulgaris*

Deux milieux de culture ont été utilisés pour *Chlorella vulgaris* à savoir le milieu BBM (Bold's Basal Medium) (Bold 1949) et le milieu Sueoka (Sueoka 1960). La principale différence entre ces milieux est la source d'azote, à savoir ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) pour Sueoka et nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour BBM. L'apport des oligoéléments est donné par la solution de Hutner pour le milieu Sueoka et un mélange de composés donné dans le Tableau II-2 pour le milieu BBM. Ces deux milieux permettent d'obtenir une concentration maximale en biomasse de 4g/L avant apparition d'une carence minérale ; en effet, l'analyse élémentaire de la biomasse, comme nous le verrons ultérieurement, donne la composition molaire de la microalgue d'étude, ce qui permet de calculer l'apport nécessaire de nutriments pour 1g de biomasse. L'ajout du bicarbonate de sodium se fait après autoclavage pour éviter les risques de précipitation et la décarbonatation due à l'augmentation de la température.

## II.3 Systèmes de culture

### II.3.1 Le photobioréacteur torique

Les expérimentations ont été réalisées dans un photobioréacteur torique développé au laboratoire GEPEA. La caractérisation hydrodynamique de ce PBR a été étudiée par Pruvost

et al. (2006), ainsi que le transfert de lumière (Pottier et al. 2005) et le transfert de gaz (LE GOUIC 2013, Fouchard et al. 2008).

Deux types de photobioréacteurs toriques ont été utilisés pour le développement des bancs expérimentaux. Le premier de volume 1.3L est composé d'un corps en polyméthacrylate (PMMA) et d'une plaque arrière en acier inoxydable, tandis que le deuxième est totalement en acier inoxydable excepté la face optique en polycarbonate permettant la pénétration de la lumière au sein de la culture. Il présente un volume de 1.5L. La section carrée du tore (d'une profondeur de 4 cm pour les deux systèmes) et la surface optique plane permettent de considérer la pénétration de la lumière comme étant monodirectionnelle, ce qui simplifie la modélisation du transfert radiatif (modèle à deux flux). L'étanchéité du PBR aux gaz est réalisée avec des joints spécifiques EDPM (éthylène propylène diène). Ces joints offrent une bonne résistance à l'usure physique, à la chaleur et, si besoin, à la stérilisation acide. La platine du PBR permet la disposition des sondes pH et de dioxygène dissous, et propose une sortie pour l'analyse des gaz produits et un système de canules pour travailler en mode continu.

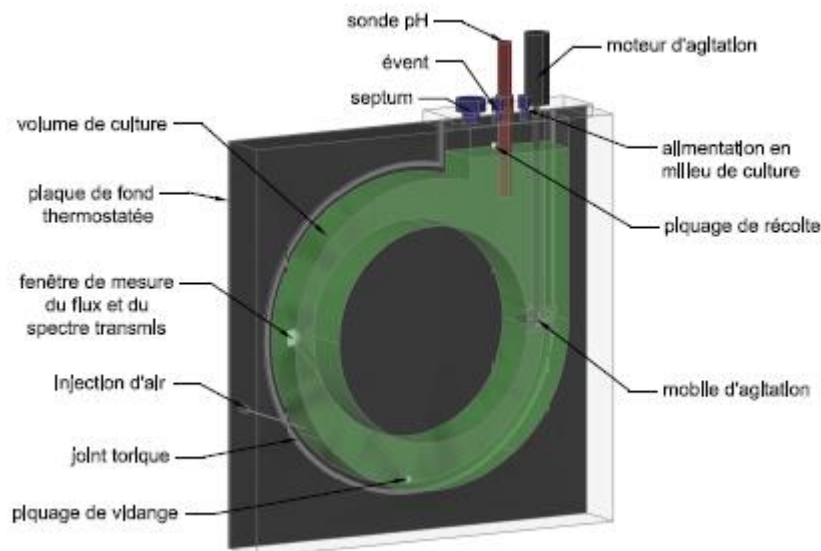


Figure II-3: Schéma type du photobioréacteur torique (Soulès 2014)

### II.3.2 Le photobioréacteur Airlift

Ce PBR est entièrement fabriqué en PMMA. Il se compose d'un corps de réacteur, d'une plaque inox en arrière et une platine pour l'insertion d'une sonde pH/température, d'une sonde d'oxygène dissous (Pyroscience, P-FSO<sub>2</sub>-MINI-ST, oxymètre firesting O<sub>2</sub> OEM avec connecteur ST), d'une alimentation en milieu, d'un évent et d'un septum. L'apport de lumière se fait frontalement. L'agitation est assurée par un bullage à l'air, réglée par un débitmètre massique (Bronkhorst HIGH-TECH), provenant d'un piquage situé au milieu de la base du PBR. L'ajout du CO<sub>2</sub>, pour la régulation du pH, est assuré par un bullage CO<sub>2</sub> provenant d'un piquage situé à l'extrémité de la base du PBR. Ce PBR présente une épaisseur de 3 cm et un volume de 1 litre ( Pruvost et al. 2011).

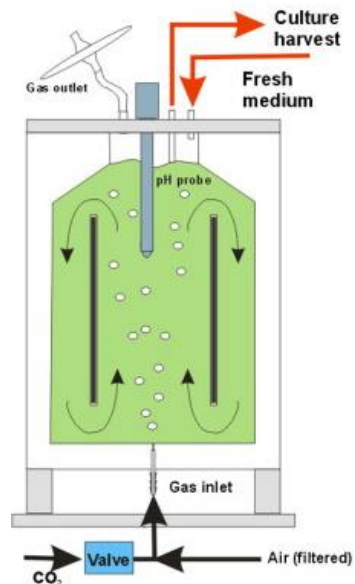


Figure II-4: Schéma type du photobioréacteur plan Airlift ( Pruvost et al. 2011)

## II.4 Contrôle des paramètres de cultures

### II.4.1 Logiciel de pilotage LabVIEW

LabVIEW (Laboratory Virtual instrument Engineering Workbench) est un logiciel permettant l'acquisition et l'affichage des données ainsi que le contrôle des instruments. Il est basé sur une interface graphique permettant une programmation aisée et un affichage clair des différents signaux transmis par l'instrumentation du banc expérimental. Son utilisation dans ce travail varie selon chaque pilote ; elle sera détaillée ultérieurement.

## II.4.2 Flux lumineux incident

Le flux lumineux incident joue un rôle primordial dans les cultures des microorganismes photosynthétiques. Ceux-ci captent la lumière dans le domaine de visible (400nm-700nm). Ce domaine est appelé le PAR (photosynthetic active radiation). Un panneau de diodes électroluminescentes (*light emitting diode* LED) a été utilisé ici comme source de lumière artificielle. Cela apporte une homogénéité et une facilité de contrôle de l'intensité lumineuse incidente, avec un échauffement modéré par comparaison à d'autres sources lumineuses, une durée de vie importante et une intensité lumineuse élevée. Le spectre incident est donné dans la Figure II-5.

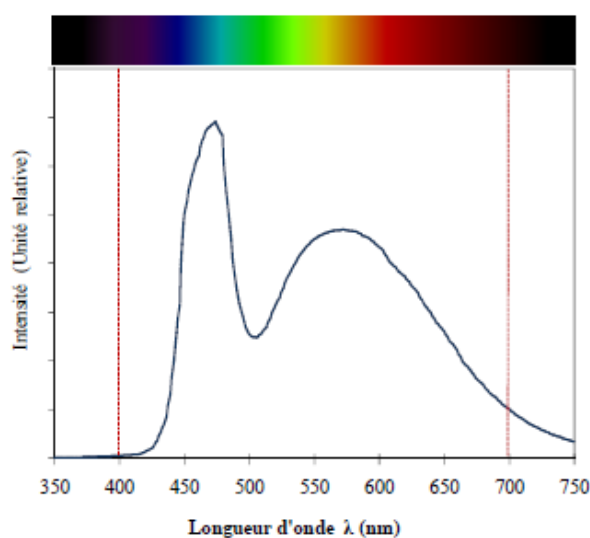


Figure II-5 : Spectre d'émission normalisé du panneau de LED blanches (Takache 2010)

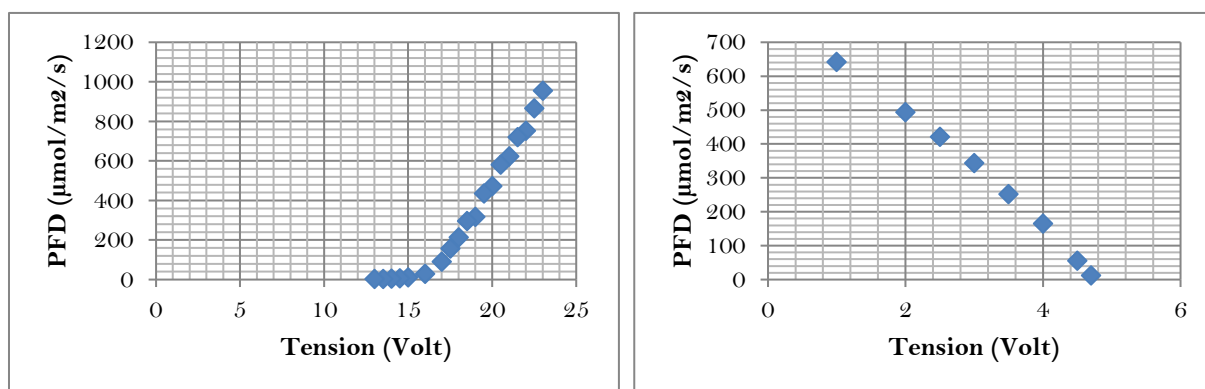


Figure II-6 : Exemples d'étalonnage d'un panneau de LED Blanches

En tant que paramètre de culture, la notion de densité de flux incident ou PFD (Photon Flux Density), est utilisée. Elle présente la quantité moyenne de photons reçus par la culture par unité de surface et de temps et est exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . La détermination du PFD a été réalisée à l'aide d'un capteur quantique plan (LI-190SA, LI-COR) par des mesures effectuées sur la surface optique intérieure du photobioréacteur en 11 points. Ces mesures sont ensuite moyennées pour calculer la valeur du flux incident moyen reçu par la surface de culture. L'étalonnage du panneau de LED doit être effectué en faisant varier la tension appliquée au panneau et en déterminant la valeur du PFD correspondante. La tension appliquée au panneau de LED est directement pilotée depuis l'interface du logiciel LabVIEW.

### II.4.3 Suivi et contrôle du pH

L'acquisition et le contrôle du pH sont effectués à l'aide d'une sonde (Mettler Toledo, Inpro 4801SG) reliée à un transmetteur (Mettler Toledo, M300). Le signal électrique obtenu dans la gamme 4/20mA est récupéré par une carte d'acquisition DAQmx, converti via le logiciel « Measurement and Automation explorer » (MAX) et transféré au logiciel Labview qui enregistre en temps réel le pH de la culture.

La régulation du pH dans le photobioréacteur à une valeur de 7.5 se fait par l'injection de  $\text{CO}_2$  gazeux via une électrovanne. Ce dernier a un pouvoir acidifiant et contrebalance l'élévation du pH par la croissance, que ce soit par consommation de  $\text{CO}_2$  nécessaire à la croissance des microalgues ou par décarbonation du carbone inorganique dissous dans le milieu par le bullage du gaz vecteur ( $\text{N}_2$ ). Cette injection permet également de réaliser l'apport en carbone de la culture.

L'ajout du  $\text{CO}_2$  peut être régulé par le logiciel LabVIEW par deux manières :

1. Loi de commande TOR (Tout Ou Rien) : dès que le pH dépasse la valeur consigne, le déclenchement du relais associé à une électrovanne permet au  $\text{CO}_2$  de passer à travers un débitmètre massique (Bronkhorst HIGH-TECH).
2. Régulation PID (proportionnel, intégral, dérivé) : C'est un système d'auto régulation (boucle fermée), qui cherche à réduire l'erreur entre la consigne et la mesure. Il calcule en continu une valeur d'erreur  $e(t)$  comme la différence entre un point de consigne souhaité et une variable de processus mesurée (pH dans notre cas ) et applique une correction basée sur des termes proportionnels, intégrés et dérivés. Le contrôleur tente

de minimiser l'erreur dans le temps en ajustant une variable de contrôle  $u(t)$  (débit de  $\text{CO}_2$  gazeux), à une nouvelle valeur déterminée par une somme pondérée. Il remplit essentiellement trois fonctions:

- Il fournit un signal de commande  $u(t)$  en tenant compte de l'évolution du signal de sortie par rapport à la consigne.
- Il élimine l'erreur statique grâce au terme intégrateur.
- Il anticipe les variations de la sortie grâce au terme dérivateur.

#### **II.4.4 La température**

Comme pour la régulation pH, l'acquisition et le contrôle de la température sont effectués à l'aide d'une sonde (Mettler Toledo, Inpro 4801SG) reliée à un transmetteur (Mettler Toledo, M300). La régulation de la température se fait soit par l'intermédiaire d'un ventilateur placé sur la surface arrière du PBR, piloté par une loi de commande TOR, soit par l'intermédiaire d'un thermocryostat induisant une circulation d'eau thermorégulée dans une double enveloppe à l'arrière du photobioréacteur. Cette régulation est piloté par une loi de commande TOR contrôlée par LabVIEW.

#### **II.4.5 L'oxygène dissous**

La mesure de la concentration d'oxygène dissous dans le photobioréacteur est essentielle dans cette étude. A cet effet, une sonde Pyroscience (P-FSO<sub>2</sub>-MINI-ST, oxymètre firesting O<sub>2</sub> OEM avec connecteur ST) et une sonde optique Mettler Toledo (InPro 6000 Optical O<sub>2</sub> sensor) ont été utilisées selon l'étude. Ces sondes servent d'indicateurs de concentration d'oxygène dissous et ont servi dans certains cas pour assurer une régulation. Cette dernière est assurée par une régulation PID (partie II.4.3). Le contrôleur tente alors de minimiser l'erreur dans le temps en ajustant une variable de contrôle  $u(t)$  (débit de N<sub>2</sub> gazeux).

### **II.5 Protocoles d'analyses des microalgues**

#### **II.5.1 Concentration en biomasse sèche**

La concentration en biomasse sèche est déterminée par filtration d'un volume précis de culture sur un filtre Wattman GF/F, d=47mm. Un filtre Wattman est mis dans une étuve à 100°C pendant 24h. Après son pesage, un volume variant de 5ml à 20ml est filtré (le volume est choisi selon la concentration). Le filtre est ensuite mis à nouveau dans l'étuve pendant 24h. La concentration de matière sèche est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Concentration}(g/L) = (\text{massefiltre}_{\text{aprèsfiltration}} - \text{massefiltre}_{\text{avantfiltration}})/V_{\text{filtré}} \quad \text{Équation II-1}$$

### II.5.2 Pigments

Les pigments sont extraits des microalgues par différents solvants comme l'acétone, le méthanol et l'éthanol. Le solvant utilisé durant les expérimentations est le méthanol. Le protocole d'extraction par ce solvant est présenté dans le schéma suivant. Les différentes concentrations en pigments sont déterminées par les équations suivantes (Ritchie 2006) :

$$C_{chl-a} = [-8,0962 (DO_{652} - DO_{750}) + 16,5169 (DO_{665} - DO_{750})] \times V_{\text{méthanol}}/V_{\text{culture}} \quad \text{Équation II-2}$$

$$C_{chl-b} = [27,4405 (DO_{652} - DO_{750}) - 12,1688 (DO_{665} - DO_{750})] \times V_{\text{méthanol}}/V_{\text{culture}} \quad \text{Équation II-3}$$

$$C_{PPC} = [4 (DO_{480} - DO_{750})] \times V_{\text{méthanol}}/V_{\text{culture}} \quad \text{Équation II-4}$$

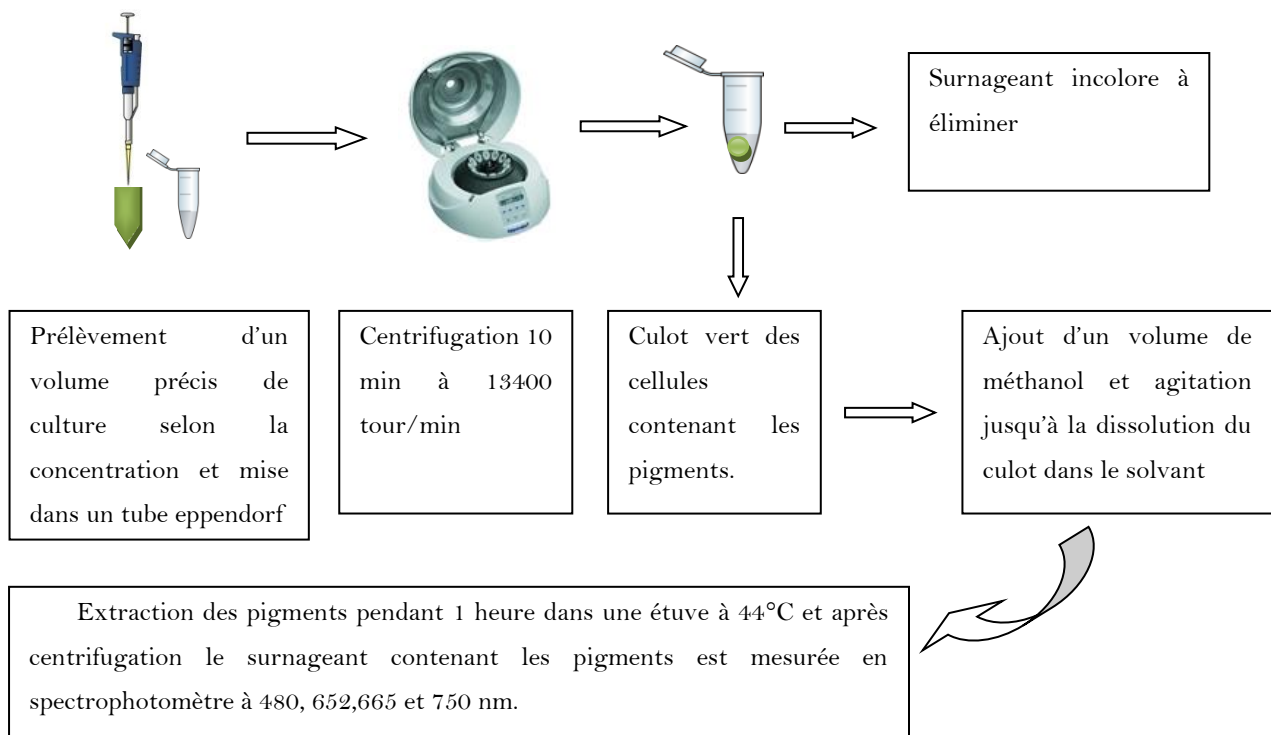


Figure II-7: Schéma explicatif des étapes de dosage des pigments

### II.5.3 Détermination de la composition élémentaire



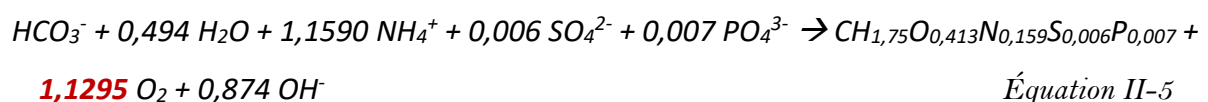
La composition élémentaire d'une microalgue est utile pour déterminer la composition d'un milieu nutritif non limitant et contenant les substrats minéraux nécessaires à sa croissance. Dans notre cas, la détermination de la composition élémentaire nous a servi également pour connaître le rapport stœchiométrique de la production de l'oxygène ( $v_{O_{2-x}}$ ). Ce dernier a été déterminé pour les deux milieux (BBM et Sueoka) de culture de *Chlorella vulgaris* afin de pouvoir passer de la vitesse de production molaire de dioxygène à la vitesse de production massique de biomasse. Cette analyse a été réalisée par le Service central d'analyse (SCA) du CNRS (département des sciences analytiques - Villeurbanne, Lyon, France). L'analyse élémentaire a été faite sur 3 échantillons différents de *Chlorella vulgaris* pour chaque milieu, cultivés dans un PBR d'épaisseur de 4 cm sous une irradiation de  $250\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La composition moyenne est présentée dans le Tableau II-3.

% massique				
	BBM	Sueoka	BBM	Sueoka
<b>C</b>	47,83	48	1	1
<b>H</b>	7,1	7	1,781	1,742
<b>N</b>	9,48	8,9	0,169	0,158
<b>O</b>	29,99	26,4	0,470	0,413
<b>S</b>	1	0,8	0,0079	0,006
<b>P</b>	0,95	0,9	0,0076	0,007

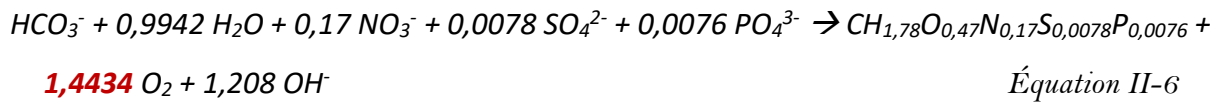
Tableau II-3 : Composition élémentaire de *Chlorella vulgaris* pour les deux milieux de culture.

A partir de ces compositions élémentaires, la stœchiométrie globale de la conversion des substrats a été établie et est donnée ci-dessous.

**Equation stœchiométrique de *Chlorella vulgaris* en milieu Sueoka (Ammonium:  $\text{NH}_4^+$ ) :**



**Equation stœchiométrique de *Chlorella vulgaris* en milieu BBM (Nitrate:  $\text{NO}_3^-$ )**



Les deux coefficients de dioxygène obtenus en rouge dans les équations ci-dessus seront utilisés pour la modélisation de la croissance de la microalgue.

#### II.5.4 Analyse de taille et de forme

La détermination de taille et forme de *Chlorella vulgaris* est reprise des travaux de (Souliès 2014). L'analyse de taille et de forme a été réalisée sur des clichés obtenus en microscopie droite à transmission (microscope AxioScope A.1 muni d'une caméra couleur AxioCam MRC, ZEISS) à l'aide du logiciel Imagej. Ce dernier donne des valeurs des rayons Ferret minimal et Ferret max. Environ 2871 cellules ont été analysés manuellement par détermination de leurs diamètres de Ferret (minimum et maximum). A partir de ces données, les caractéristiques de forme et de distribution ont été calculées, le rayon équivalent ayant été calculé selon Dauchet et al. (2015). Concernant la forme, l'approximation de la géométrie des cellules par des sphères équivalentes en volume a été considérée : cette approximation considère la forme des cellules parfaitement sphérique. Dans ce cas, la résolution des équations du transfert radiatif au sein de la culture est plus simple et plus rapide puisqu'il est possible d'utiliser la solution de Lorenz-Mie des équations de Maxwell (Mie 1908).

Pour une forme donnée, la distribution de taille (rayon) peut être déterminée. Trois cas types sont classiquement utilisés:

- 1) Traitement statistique pour une distribution gaussienne : dans ce cas, la distribution de taille est approximée par une loi de Gauss (ou loi normale).
- 2) Traitement statistique pour une distribution log-normale : la loi log-normale ou loi de Galton est une loi de probabilité où le logarithme de la variable aléatoire suit une loi normale.
- 3) Cas monodisperse : ce cas, le plus simple, représente le cas où toutes les cellules auraient la même taille (ce qui est loin de la réalité).

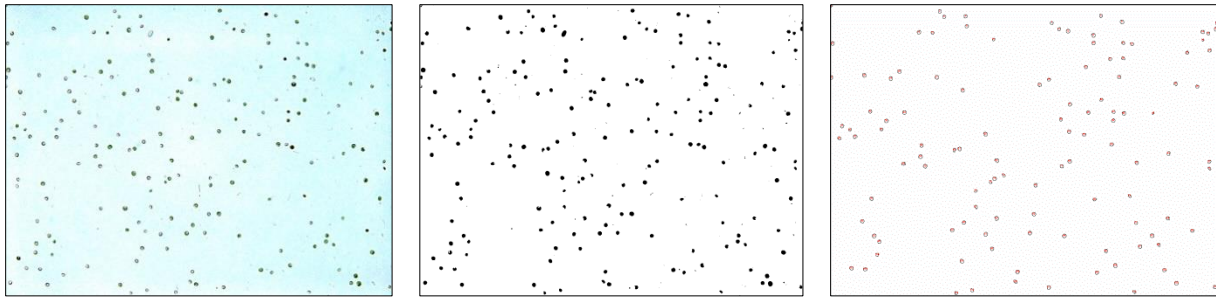


Figure II-8: a : photo de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur à l'état stationnaire et sans pompe en agrandissement ( $\times 40$ ), b : photo « a » interprétée par imagej, c : photo « a » calculée par imagej.

Caractéristique de taille de <i>C.vulgaris</i> CCAP 211-19 Nombre de cellules étudiées : 2871			
Distribution gaussienne	$r_{\text{moy eq}} (\mu\text{m})$	1.916	Erreur commise
	écart-type	0.386	3.3%
Distribution log-normale	$r_{\text{moy eq}} (\mu\text{m})$	1.939	Erreur commise
	écart-type	0.218	2.28%

Tableau II-4 : Récapitulatif de l'analyse de taille et de forme de *C. vulgaris* (Souliès 2014).

Pour des conditions optimales, la distribution de taille de *Chlorella vulgaris* est donnée par le Tableau II-4. Elle est prise comme référence pour la comparaison dans différentes conditions dans les chapitres suivants. La distribution log-normale a été utilisée pour traiter les résultats.

### II.5.5 Détermination de l'activité photosynthétique $F_v/F_m$

La mesure du rendement photosynthétique  $F_v/F_m$  permet d'estimer la détérioration de l'appareil photosynthétique. Ce rendement, mesuré à partir de la fluorescence d'une suspension algale, permet d'estimer les capacités de transfert d'électrons à partir d'une intensité lumineuse reçue. On distingue ainsi différents termes de fluorescence :

- a)  $F_0$ : fluorescence minimale de la chlorophylle pour un centre ouvert (PSII). A l'état relaxé, c'est le rendement de la fluorescence à l'obscurité. En effet, les chloroplastes ne sont plus énergétisés et 95 à 99% des centres réactionnels sont ouverts.

- b)  $F_m$  : fluorescence maximale de la chlorophylle pour un centre fermé (PSII). A l'état relaxé, cette fluorescence est obtenue en utilisant un pulse saturant de lumière. Ce pulse va provoquer la réduction du pool de quinone  $Q_A$ , le premier accepteur d'électrons. Le passage du  $Q_A$  (oxydé) à  $Q_A$  (réduit) va donner le transfert maximal d'électrons possible. Le flux lumineux reçu et ne permettant pas le transfert de charge va entraîner l'émission d'un photon générant de la fluorescence.
- c)  $F_v$  : fluorescence variable  $F_v = F_m - F_0$ . C'est la fraction de l'énergie photonique absorbée convertible en énergie chimique.
- d)  $F_v/F_m$  : c'est la mesure du rendement quantique maximum de la réaction photochimique du PSII.  $F_v/F_m = F_m - F_0 / F_m$ . Chez les plantes supérieures,  $F_v/F_m = 0.83$  est la valeur théorique maximale.

Le rendement photosynthétique  $F_v/F_m$  a été déterminé en utilisant un fluorimètre WaterPam (Walz, Allemagne). Un volume d'échantillon microalgal est introduit dans la cuve d'analyse après une dilution permettant d'atteindre une fluorescence proche de 500 (unité arbitraire). Après une période d'adaptation au noir (15 min), un pulse saturant de lumière est envoyé sur la culture. Le rendement maximal photosynthétique à l'obscurité est alors mesuré.

### II.5.6 Carbone inorganique total (CIT)

La concentration en CIT est déterminée grâce à un analyseur de carbone total (Shimadzu TOC 5000) sur les surnageants de culture filtrés et dilués pour être compris dans les gammes d'étalonnage de l'appareil. L'échantillon est introduit via un injecteur dans un tube à combustion. Tout le carbone et l'échantillon est brûlé et décomposé en  $CO_2$  ensuite mesuré par l'analyseur. La concentration de carbone inorganique est donnée en mg/L, ensuite convertie en mol/L.

## II.6 Bacs expérimentaux

### II.6.1 Photobioréacteur Airlift plan avec fraction sombre

Le but de cette étude sera de i) souligner, d'une manière générale, l'effet d'une fraction sombre  $f_d$  (sa valeur mais également le temps de séjour des microalgues en partie sombre) d'un photobioréacteur sur la productivité en biomasse, ii) de mettre en évidence l'effet de la concentration en oxygène dissous sur la productivité du PBR (avec ou sans boucle sombre) et

iii) mettre en évidence l'impact éventuel des différentes sources d'azote (ammonium et nitrate), sur la production d'oxygène et la croissance associée.

Afin de comprendre comment cette fraction sombre affecte la productivité, un banc d'essai spécifique a été développé. Trois valeurs de fraction sombre ( $f_d$ ) seront étudiées :  $f_d=0.1$  (10% du volume de culture du photobioréacteur passe en zone sombre),  $f_d=0.2$  et  $f_d=0.3$ .

Le banc est composé d'un photobioréacteur Airlift de 1 litre de volume. La boucle sombre connectée au photobioréacteur par la plaque inox, est composée d'une pompe péristaltique (Masterflex PUMP DRIVE 20650 RPM), d'un débitmètre (ROSEMOUNT Magnetic flowtube) et d'un tuyau de recirculation qui permet de générer la boucle sombre. La longueur des tuyaux est calculée de façon à avoir des volumes de 100 ml, 200 ml et 300 ml pour obtenir des  $f_d=0.1, 0.2$  et  $0.3$  respectivement.

Dans un premier temps, une culture de *Chlorella vulgaris* est lancée en continu, une fois l'état stationnaire atteint, la biomasse est caractérisée. Dans un deuxième temps, la fraction sombre est connectée ; la pompe péristaltique soutire un volume de culture à un débit précis donné par le débitmètre. Ce volume passe dans le tuyau représentant la fraction sombre pour être réinjecté dans la partie éclairée du photobioréacteur. La Figure II-9 ci-dessous décrit le fonctionnement du banc.

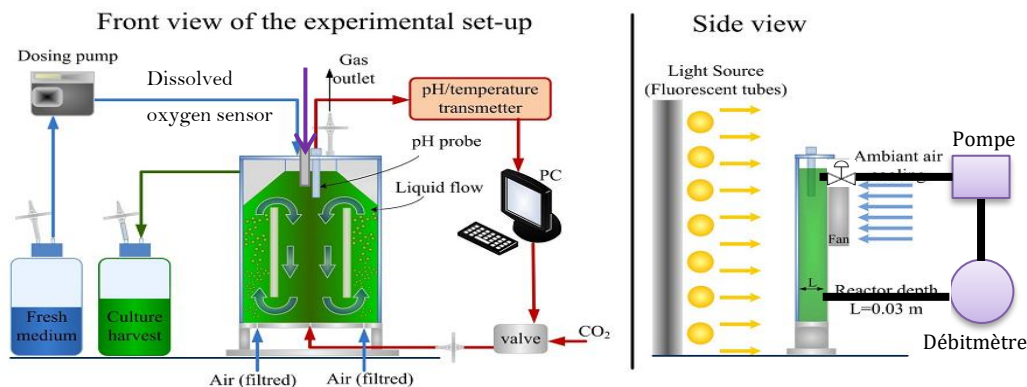


Figure II-9 : à gauche ; vue en face du montage expérimentale. Le photobioréacteur fonctionne en continu : le pH, la température, la lumière et le taux de dilution sont réglés. A droite, le montage expérimentale vue en profil ; une boucle sombre est mise en place (comportant une pompe péristaltique, un débitmètre et un tuyau de recirculation).

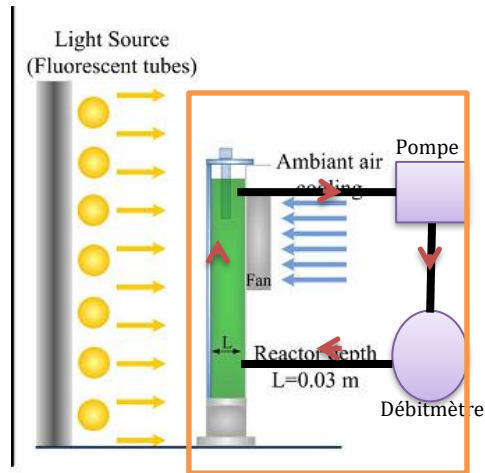


Figure II-10 : Schéma de la boucle sombre pour un  $f_d=0.1$ , la culture est recirculée dans un tube opaque de 100 ml pour passer pendant un temps  $t_d$  (s) variable obtenu en ajustant le débit ( $Q_d$ ) ( $cm^3/min$ ) de la pompe péristaltique. Idem pour  $f_d=0.2$  (200ml) et  $f_d=0.3$  (300ml)

### Calcul de longueur des tuyaux pour différents $f_d$



Tuyau vert : diamètre  $D_v = 1cm$ , Longueur fixe  $L_v = 90cm$ .

Le volume sombre est obtenu à partir du diamètre et de la longueur des tuyaux, ainsi que du débitmètre qui présente une longueur  $L' = 13cm$  et diamètre  $D' = 0.8cm$ , pris en compte dans le calcul.

Ainsi en prenant un tuyau noir de diamètre  $D_n = 0.8cm$ , la longueur variable  $L_n$  a été ajoutée selon le volume  $f_d$  voulu.

- $f_d = 0.1$  :  $L_n = 75cm$
- $f_d = 0.2$  :  $L_n = 250cm$
- $f_d = 0.3$  :  $L_n = 445cm$

La pompe péristaltique a permis de générer différents débits ce qui génère différents temps de résidence en fraction sombre. On a ainsi :

$$\text{Aire du tuyau } A = \frac{\pi D^2}{4} (\text{cm}^2)$$

Équation II-7

$$\text{vitesse de soutirage } v \left(\frac{\text{cm}}{\text{s}}\right) = \frac{q\left(\frac{\text{cm}^3}{\text{min}}\right)}{A(\text{cm}^2)} / 60$$

Équation II-8

$$\text{temps de residence en zone sombre } t_d (\text{s}) = \frac{L_p + L' + L_n}{v}$$

Équation II-9

### II.6.2 Pilote de l'étude de l'effet de l'oxygène dissous sur les performances des PBRs

Afin de bien quantifier l'effet direct de la concentration d'oxygène dissous sur la productivité en biomasse de la microalgue *Chlorella vulgaris*, un pilote dédié a été mis en place. Il est formé d'un photobioréacteur torique en PMMA. La platine (partie supérieure du PBR) permet l'insertion d'une sonde pH, d'un piquage pour l'alimentation de culture, une sonde d'oxygène dissous « Pyroscience », d'un septum et un évent (Figure II-11)

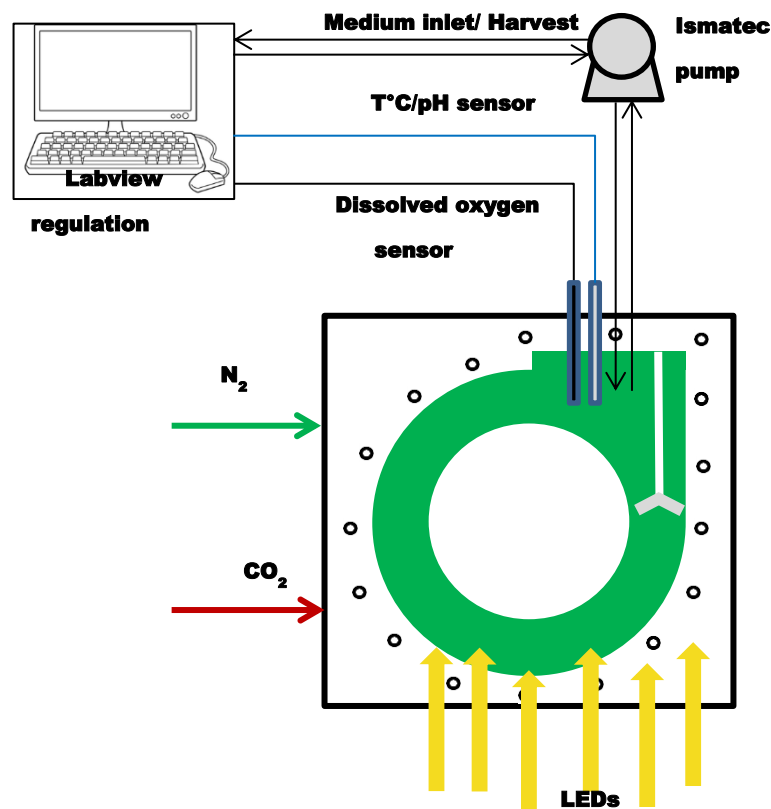


Figure II-11 : Schéma du pilote pour l'étude de l'effet de la concentration d'oxygène dissous

Les paramètres (température, pH) ont été contrôlés grâce à la sonde de mesure d'oxygène dissous (Pyroscience, partie II.4.4 et II.4.3). La concentration d'oxygène dissous a été modifiée en modulant le débit de l'azote gazeux entrant dans le PBR. Le Tableau II-5 représente la concentration d'oxygène dissous obtenue en fonction du débit de N<sub>2</sub> pour la culture de *Chlorella vulgaris* à 250 µmol/m<sup>2</sup>/s.

débit N <sub>2</sub> (ml/min)	DO mg/L
3	31,4
10	27,5
20	22
50	15,71
100	10,6
200	8,25

Tableau II-5 : Concentration d'oxygène dissous correspondante à chaque débit d'azote dans les conditions de culture.

Notons que pour des débits élevés (100ml/min et 200ml/min), des problèmes de limitation en carbone sont apparus, dus à une décarbonatation élevée par le bullage. Pour cette raison, un suivi de la concentration en carbone inorganique a été appliqué afin de vérifier l'absence de limitation.

### II.6.3 PBR torique pour l'étude du transfert de gaz

Le pilote développé pour cette expérience (Figure II-12) est similaire au précédent sauf qu'il a été complété par un suivi gaz poussé. A noter qu'il pourra servir pour des expériences ultérieures en cycles jours/nuit où la mesure de gaz permet d'accéder à la dynamique biologique avec précision.

Dans ce manuscrit, ce pilote a servi pour approfondir la réponse des microalgues lors d'une phase obscure prolongée. La croissance des microalgues a donc été suivie par une analyse gaz afin de caractériser l'évolution de la vitesse de consommation d'oxygène dans ces conditions. L'analyse gaz par spectromètre de masse est détaillée dans les paragraphes suivants. Le contrôleur pour le pH et l'oxygène dissous (PID) a été mis en place sur ce pilote.



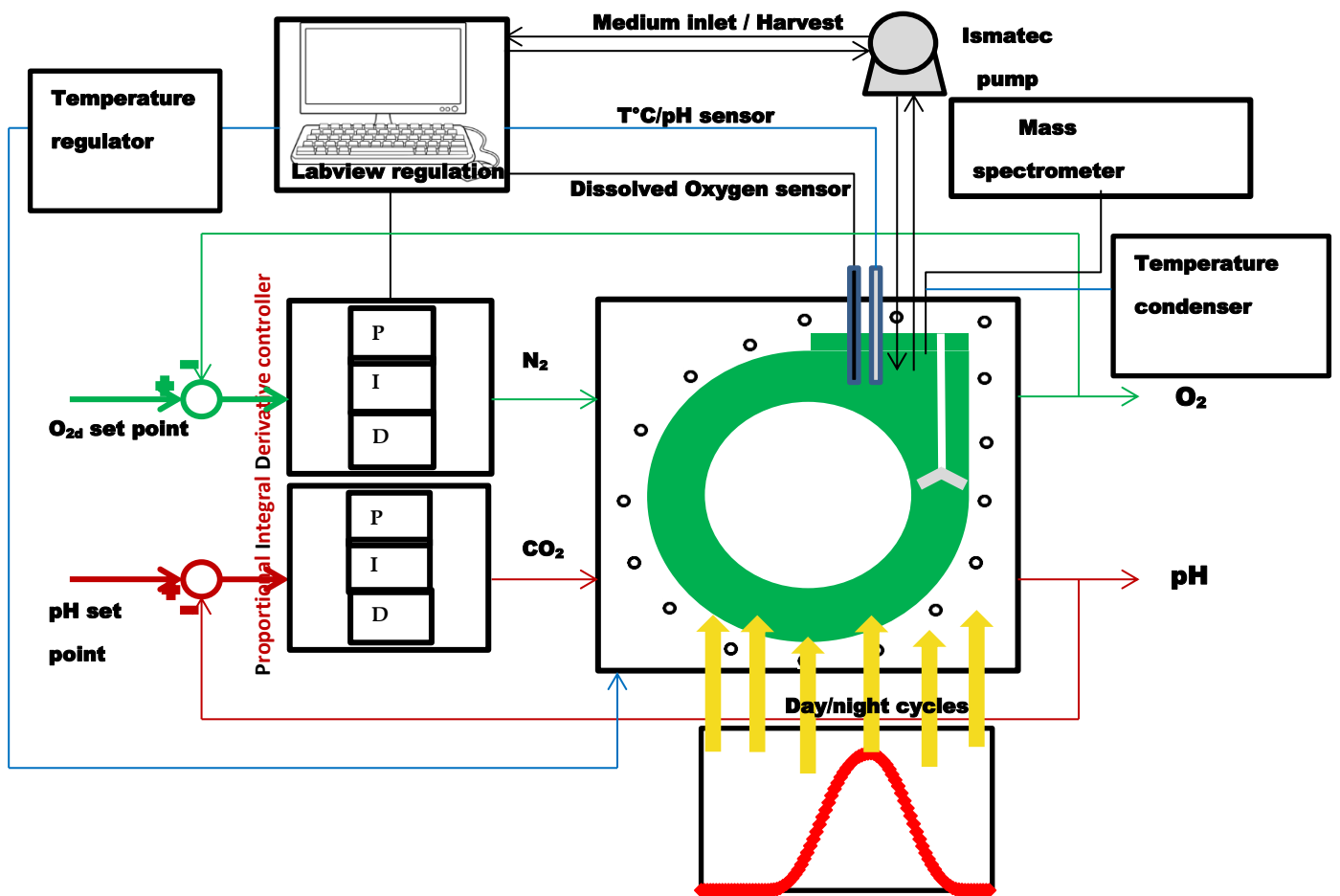


Figure II-12 : Pilote d'étude de l'activité respiratoire pour des phases sombres prolongées.

### Mesure des débits gazeux

Afin de déterminer la consommation en oxygène durant les expériences, la détermination des débits gazeux en entrée et en sortie du photobioréacteur est nécessaire. Le banc expérimental comporte trois débitmètres massiques (Bronkhorst HIGH TECH). Deux débitmètres sont utilisés en entrée du photobioréacteur. Le premier sert pour le passage de l'air permettant à la fois l'analyse des gaz en sortie par un spectromètre de masse et la régulation de la concentration d'oxygène dissous dans le milieu par dégazage. Ce débitmètre possède une gamme comprise entre 0 et 200ml/min d'air. Le second est utilisé pour la régulation du pH et est raccordé à une bouteille de CO<sub>2</sub>. La gamme de ce débitmètre est de 0 à 11 ml/min. Le troisième débitmètre massique est situé en aval du PBR et est utilisé pour la mesure du débit total des gaz en sortie. Ce débitmètre a une gamme de 0 à 300 mL/min

(équivalent air et CO<sub>2</sub>). La mesure et la régulation des débits sont indépendants de la température et de la pression à laquelle les gaz pénètrent ou sortent du PBR.

Une interface informatique (FlowDDE, Bronkhorst HIGH TECH) établit la liaison entre les débitmètres massiques et l'ordinateur. Les signaux sont directement lus par ce logiciel et exprimés en pourcentage de la gamme d'utilisation du débitmètre. Le programme LabVIEW qui communique avec le logiciel FlowDDE, effectue l'acquisition des différents débits de gaz. Les valeurs de consignes pour les débitmètres régulateurs sont directement saisies depuis l'interface LabVIEW.

### **Mesure de la composition molaire des gaz par spectrométrie de masse**

La composition molaire des gaz en sortie de PBR est mesurée à l'aide d'un spectromètre de masse (QMS 200 PFEIFFER VACCUUM France). Ce dernier est calibré et destiné à mesurer l'azote (N<sub>2</sub>), le dioxygène (O<sub>2</sub>) et le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Les échantillons gazeux sont mesurés toutes les secondes permettant ainsi une bonne résolution dans l'acquisition des données. Cette fréquence d'acquisition nécessite une quantité relativement importante en gaz vecteur (3 à 4 mL/min). Un bullage fort peut entraîner des vapeurs d'eau nuisibles au fonctionnement du spectromètre de masse. Un condenseur a donc été installé et est maintenu à une température de 5°C grâce à un régulateur de température. Une cartouche de sulfate de calcium anhydre est placée en amont du spectromètre afin de capter l'humidité du gaz sortant du photobioréacteur.

### **Détermination des débits massiques de gaz en sortie de PBR**

Le montage expérimental permet l'acquisition en continu des débits volumiques totaux en entrée et en sortie du photobioréacteur, et des fractions molaires du gaz en sortie du photobioréacteur. L'utilisation combinée de ces mesures permet de calculer le débit massique et volumique de chaque gaz en sortie de PBR ainsi que le débit massique de gaz entrant dans le photobioréacteur en connaissant la composition molaire du gaz vecteur et du dioxyde de carbone en entrée du PBR.

Les fractions molaires des gaz en entrée et en sortie du réacteur mesurées par le spectromètre de masse ont été converties en fractions massiques selon l'équation suivante (Fouchard et al. 2008) :

$$x_j(\text{massique}) = \frac{x_j(\text{molaire}) \times M_j}{\sum_{i=1}^n x_i(\text{molaire}) \times M_i} \quad \text{Équation II-10}$$

$x_j$  : fraction massique ou molaire du constituant j

$x_i$  : fraction molaire du constituant i dans le mélange gazeux

$M_j$  : masse molaire du constituant j

$M_i$  : masse molaire du constituant i dans le mélange gazeux

Les débits volumiques délivrés par les débitmètres massiques sont également convertis en débits massique. Dans ce cas, le calcul n'est pas direct. Si le gaz vecteur utilisé est différent de celui avec lequel le débitmètre a été étalonné, il est nécessaire de réaliser une correction de la mesure effectuée. Un coefficient de correction, noté C, est ainsi à calculer :

$$C = \frac{c_p(N_2)}{\sum_{i=1}^n x_i(\text{massique}) \cdot c_p(i)} \quad \text{Équation II-11}$$

Le débit massique total en sortie ( $Qm_s$ ) qui en résulte est donc :

$$Qm_s = Qm_{max} \cdot C \cdot \%lecture \quad \text{Équation II-12}$$

La gamme maximale du débitmètre est exprimée par le constructeur en volume (200ml/min). Elle peut être réexprimée en massique en la divisant par la masse volumique du mélange prise aux conditions de mesure (25°C et 1 atm). Le débit massique de chaque gaz est déterminé en prenant la fraction massique  $x_i$  du gaz considéré par rapport au débit massique total :

$$Qm_i = Qm_s \cdot x_i \quad \text{Équation II-13}$$

### **Le contrôleur PID**

Grâce au contrôleur PID décrit dans la partie (II.4.3 et II.4.5), la concentration d'oxygène dissous peut être maintenue ainsi que le pH aux valeurs qui nous intéressent pour une étude en cycle jour/nuit avec contrôle de la concentration en oxygène dissous par exemple. Ceci est illustré sur la Figure II-13 et la Figure II-14.

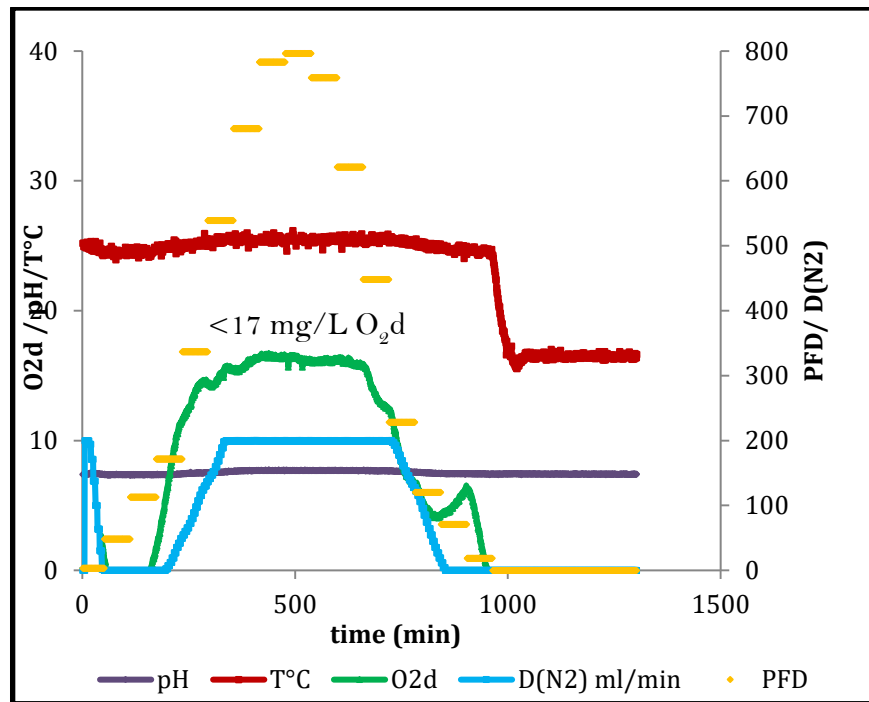


Figure II-13 : Graphe représentant l'évolution de la concentration en  $O_2$  dans la PBR en cycle J/N. Ici la valeur consigne de  $O_2$  était 15mg/L en phase jour.

On observe qu'en cas de non-régulation par le contrôleur, la concentration en oxygène dissous pourra atteindre des valeurs supérieures à 40mg/L dans le torique (courbe verte de la Figure II-14), or en présence de la régulation, la concentration en oxygène dissous a été maintenue inférieure à 20mg/L (Figure II-13).

A noter que la Figure II-13 et la Figure II-14 présentent des résultats des expériences en cycles J/N avec régulation PID de la concentration en oxygène dissous par injection de diazote comme gaz entrant. Cette configuration a été utilisée pour valider le comportement dynamique de la régulation appliquée. Pendant la journée, les cellules effectuent la photosynthèse, dont l'activité augmente avec les flux lumineux reçus. La nuit, les microalgues effectuent la respiration. On observe dans nos exemples que la concentration en oxygène dissous chute alors rapidement pour devenir nulle, ce qui est expliqué ici par le bullage de gaz entrant qui est de l'azote. Ceci peut être néfaste pour les cellules qui seront alors en anoxie (Le Borgne 2011). Si cela n'est pas souhaité, l'injection de  $N_2$  peut être remplacée par une injection d'air. Ceci est alors fait grâce à une électrovanne TOR pilotée et implémentée sur LabVIEW.

Ainsi, une concentration en oxygène dissous proche à l'équilibre avec l'air la nuit pourra être maintenue.

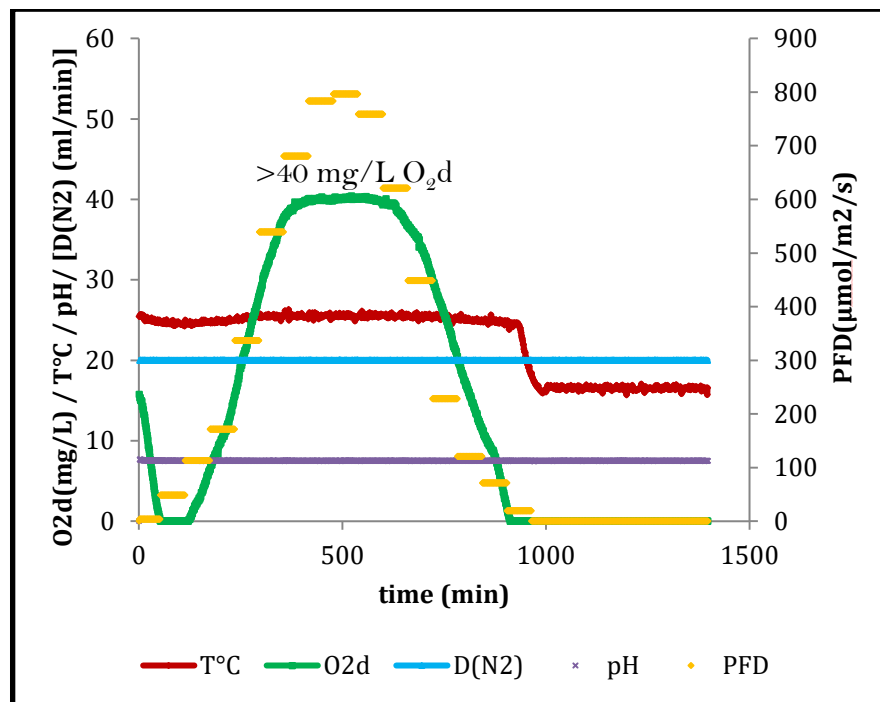


Figure II-14 : Graphe représentant l'évolution de la concentration en O<sub>2</sub> dans la PBR en cycle J/N. Ici la valeur consigne de O<sub>2</sub> était 40mg/L

### Détermination du coefficient de transfert gaz-liquide K<sub>L</sub>a (Roustan 2003)

Le coefficient de transfert gaz-liquide K<sub>L</sub>a est le coefficient volumique de transfert de matière utilisé pour caractériser le transfert entre deux phases liquide et gaz. Cette donnée est donc nécessaire pour réaliser le bilan sur l'oxygène précédent. La méthode classique de détermination de ce paramètre est basée sur le bilan matière établi sur l'oxygène en régime transitoire sur la phase liquide. Elle est très couramment utilisée et peut s'appliquer sur toute géométrie de photobioréacteurs.

La méthode consiste en premier lieu à oxygéner de façon complète le milieu grâce à une alimentation d'air dans le PBR. La concentration en oxygène dissous tend alors vers une valeur de saturation C\* correspondant à l'équilibre thermodynamique entre la phase gaz et la phase liquide. En deuxième lieu, une désoxygénation préalable de la phase liquide est faite. Elle est obtenue par bullage d'azote et mène à l'obtention d'une valeur nulle de concentration

en oxygène dissous mesurée par une sonde à oxygène placée dans le réacteur. L'étape suivante associée au régime transitoire, consiste à remettre l'aération et à suivre au cours du temps l'évolution de la concentration en oxygène dissous dans l'eau. Le transfert d'oxygène se fait donc sous l'action du gradient de concentration en oxygène, en l'absence de réaction chimique, et sous l'hypothèse d'un réacteur parfaitement mélangé. L'expression de la variation au cours du temps de la concentration d'oxygène devient :

$$K_L a (C^* - C) = \frac{dC}{dt} \quad \text{Équation II-14}$$

Par l'intégration de cette équation différentielle sur la période transitoire, il est possible d'exprimer l'évolution de la concentration d'oxygène dissous en fonction du temps :

$$C(t) = C^* - C^* \exp(-K_L \cdot a \cdot t) \quad \text{Équation II-15}$$

Avec :

$C(t)$  : teneur en oxygène dans le liquide à l'instant  $t$  ( $\text{Kg}/\text{m}^3$ )

$K_L a$  : coefficient volumique en l'absence de réaction chimique ( $\text{h}^{-1}$ )

Pour une condition opératoire donnée de débit de gaz, la détermination du  $k_L a$  est obtenue en calculant la pente de la droite d'équation :

$$\ln(C^* - C) = \ln C^* - K_L \cdot a \cdot t \quad \text{Équation II-16}$$

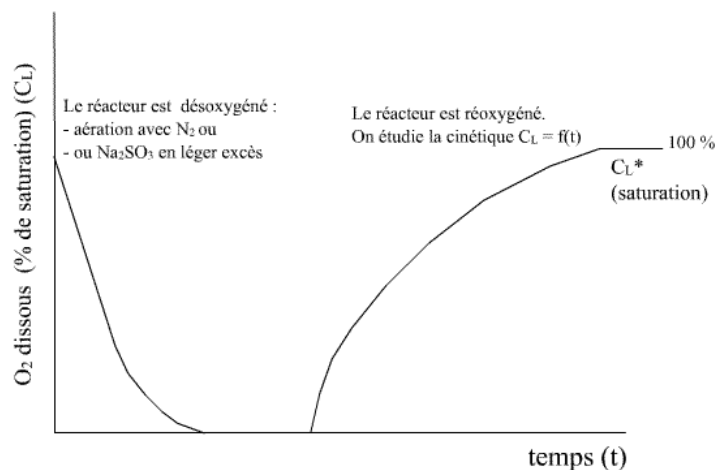


Figure II-15 : figure décrivant la méthode désoxygénation/ré oxygénation pour la détermination de  $K_{La}$

La détermination de  $K_{La}$  a ainsi été faite pour différents débits de gaz dans le photobioréacteur torique et le PBR airlift plan. Les résultats sont donnés ci-dessous.

Airlift plan (1litre)	
débit air (mL/min)	$K_{La}$ (h <sup>-1</sup> )
20	0.8
50	1.9
100	3.1
400	9.9
612	13.2

Tableau II-6 : Valeur de  $K_{La}$  pour différents débit en PBR Airlift plan

Photobioréacteur torique	
débit air (mL/min)	$K_{La}$ (h <sup>-1</sup> )
30	1.13
50	1.7
100	2.7
500	9.03
1200	29.2

Tableau II-7 : Valeur de  $K_{La}$  pour différents débit en PBR torique

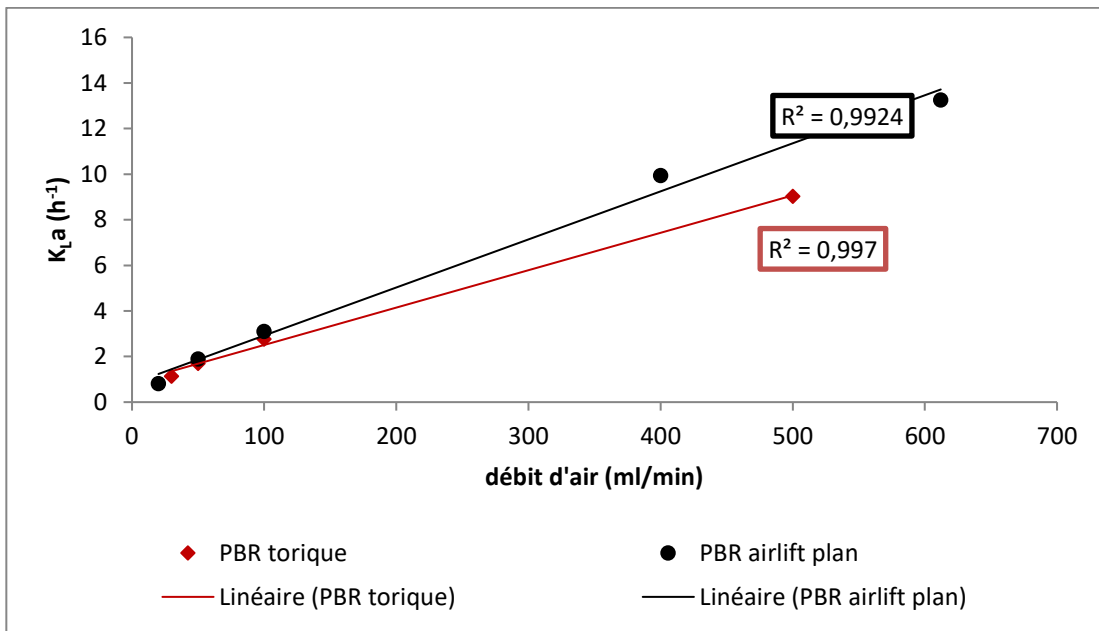


Figure II-16 : Graphe représentant les valeurs de  $K_{La}$  pour le torique et l'airlift plan

On observe que l'évolution du coefficient  $K_{La}$  est relativement linéaire dans la gamme de mesure appliquée (3ml/min  $\rightarrow$  600ml/min). Ainsi ce coefficient pourra être défini facilement pour un débit de gaz donné dans les deux géométries utilisées.



---

# Chapitre 3

---

## *Etude de l'effet de la concentration en oxygène dissous sur la performance des photobioréacteurs.*

Ce chapitre étudie l'effet de la concentration en oxygène dissous sur la productivité obtenue en culture. Pour cela, la microalgue *Chlorella vulgaris* est cultivée dans un photobioréacteur torique à des concentrations en oxygène dissous allant de 8 g/m<sup>3</sup> à 31 g/m<sup>3</sup>. Une perte de 30% de productivité est observée à partir de 30g/m<sup>3</sup>, ce qui est en accord avec la littérature. Il est également confirmé, en accord avec les principes de la photolimitation stricte (Cornet et Dussap 2009), que les performances cinétiques en surface des photobioréacteurs sont constantes si la concentration en oxygène dissous est équivalente. Différentes géométries de PBR sont finalement comparées vis-à-vis de leur capacité de transfert gaz-liquide afin d'identifier leur capacité à accumuler l'oxygène dissous, et donc être susceptibles ou pas aux effets négatifs d'une suraccumulation d'oxygène dissous. A noter que ce chapitre est rédigé sous forme de publication pour soumission dans un journal scientifique.

### III. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors

---

#### III.1 Introduction and objectives

During phototrophic growth, microalgae consume carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) and produce oxygen. The evolved oxygen can easily build up to high concentrations in closed photobioreactors (PBRs) and this can have a negative effect on biomass productivity by inhibiting growth of the microalga cells. The main processes that can occur at high oxygen concentration are photorespiration, the Mehler reaction (water-water cycle) and photoinhibition (Kliphuis, et al. 2011). Photorespiration is defined as the light-dependent consumption of oxygen and production of  $\text{CO}_2$  (Moroney et al. 2013). It results from the oxygenase reaction catalyzed by ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) (Maurino et Peterhansel 2010; Bauwe et al. 2012). In the other hand, photoinhibition occurs when microalgae are exposed to high light intensities for a long duration. This process leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) that can damage cellular components (Torzillo et Vonshak 2013). In these conditions, high concentrations of dissolved oxygen concentration can present a positive role by dissipating excessive energy through Mehler reactions (Mehler 1951; Badger et al. 2000).

In sub-saturating light intensities, Raso et al. (2012) demonstrated that a loss of productivity was observed for *Nannochloropsis sp* at 250% air saturated dissolved oxygen concentration ( $C_{O_2}$ ). Their study showed also a decrease in the photosynthetic efficiency while increasing  $C_{O_2}$ , which was a result of a photorespiration activity. Same conclusions have been drawn by Sousa et al. (2013); loss in biomass productivity was only explained by photorespiration activity of the RubisCO since light was in subsaturating values. Pigment concentration was not affected by the  $C_{O_2}$  indicating therefore no significant photooxydative damage. Costache et al. (2013) investigated effect of dissolved oxygen concentration on the growth of *Neochloris oleoanbudans* at high light intensities: the loss of microalgae biomass productivity was the result of both photooxydative (photoinhibition) and photorespiration activities.

The excessive concentration of dissolved oxygen could be avoided by an effective air stripping that can evacuate oxygen from the system. A special attention has however to be

paid to maintain a sufficiently high concentration of dissolved carbon dioxide in the culture medium by injecting simultaneously CO<sub>2</sub> for example. In fact, according to Genkov and Spreitzer (2009), RubisCO has 17-fold higher affinity to CO<sub>2</sub> than to O<sub>2</sub> for the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Maintaining a high concentration of CO<sub>2</sub> in PBRs can then reduce the impact of O<sub>2</sub>-dependent photorespiration on microalgal photosynthesis. Results of some older publications (Lloyd et al. 1977; Birmingham et al. 1982; A. Richmond 2004) confirm this hypothesis.

Besides this, dissolved oxygen concentration is the function of the design of the photobioreactor, and more precisely, it is function of the gas-liquid mass transfer efficiency of the culture system (Posten 2009; Molina Grima et al. 1999). Tubular photobioreactors and raceways can accumulate high concentrations of dissolved oxygen (Chisti 2012, Weissman et al. 1988; Marquez et al. 1995). This is because of the low gas-liquid mass transfer efficiency in these two geometries. Carefully designing and optimizing culture systems to maintain optimum dissolved CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration is then mandatory.

Considerable advances in culture system engineering have been made in recent years to optimize biomass productivities. Mathematical modeling is useful in that regards to optimize and scale photobioreactors. Co-authors have developed for that purpose a knowledge model for predicting biomass productivity of light-limited microalgae cultures (Takache et al. 2012; Pruvost et al. 2012; Souliès et al. 2016). It combines radiative transfer and photosynthetic growth models. By describing the light attenuation within the PBR bulk as a function of parameters affecting the light transfer such as biomass concentration and microalgal radiative properties, a coupling can be made with a kinetic model of photosynthetic growth, allowing us to calculate the resulting mean volumetric biomass production rate  $\langle r_x \rangle$ , and ultimately the biomass concentration ( $C_X$ ) and PBR biomass productivity ( $P_X$ ).

This study aims to quantify the negative effect of dissolved oxygen concentration  $C_{O_2}$  on photobioreactor kinetic performances (i.e productivity), and to relate its impact on growth model parameters. This was conducted for the eukaryotic microalgae *Chlorella vulgaris* at a light intensity PFD= 250 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s. To investigate effect of PBR design, experiments were conducted in an airlift PBR and a torus shaped PBR. The latter system combines indeed both mechanical stripping and aeration. This allowed controlling gas-liquid mass transfer rate independently of the need to guarantee a sufficient mixing in the culture volume (Fouchard et

al. 2008). This study was concluded by analyzing the role of the gas-liquid mass transfer in various geometries of photobioreactors, in order to underline the capability of those geometries in accumulating dissolved oxygen.

## III.2 Methodology

### III.2.1 Experimental setup

#### Selected strain

The strain used in this study is the eukaryotic microalgae *Chlorella vulgaris* (211/19/SAG collection). The autotrophic Sueoka medium was used. It contains in (g/L) :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.45,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.281,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.609,  $\text{NaHCO}_3$  1.68 and 1 mL of Hutners trace element solutions (Sueoka 1960). Nutrient concentrations were adjusted to avoid mineral limitation and so as to guarantee that growth was only light-limited (Souliès et al. 2016).

#### Cultivation system

Two PBR geometries were used, namely the torus-shaped PBR and a flat panel airlift system. The torus-shaped PBR has been designed for lab-scale experiments requiring a tight control of culture conditions. One of its main feature is to allow varying gas-liquid mass transfer efficiency in a wide extend; in fact, culture is mechanically circulated thanks to the rotation of a marine impeller and to a low air bubbling. As mixing is mainly provided by mechanical stirring, this was found valuable for studies requiring accurate gas analysis (Fouchard et al. 2008; Le Gouic 2013). If necessary, gas bubbling could obviously be applied, so as to increase the gas-liquid mass transfer rate. Because of the accurate control of culture conditions, the torus photobioreactor has been used widely in recent years for in-depth studies and kinetic model setting. We can cite for example the optimization of microalgal biomass productivity (Takache 2010; Souliès et al. 2016) and the investigation of light/dark cycles effect on microalgal growth (Takache et al. 2015). Its use will be then extended in this study to investigate the effect of dissolved oxygen concentration on microalgal growth.

The torus PBR is managed in PMMA (polymethyl methacrylate) and is thus fully transparent; the front surface is plane and the torus channel is square-sectioned with a depth of culture  $L_z = 0.04\text{m}$ , leading to a reactor volume  $V_{\text{PBR}} = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$  and a specific illuminated

area  $a_{\text{light}} = S/V_{\text{PBR}}$  of  $25 \text{ m}^{-1}$  (Pruvost et al. 2004). The PBR can receive a complete loop of common sensors and automations, namely, temperature, pH, dissolved oxygen concentration sensor and flowrate control of gas injection ( $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2$ ).

The flat panel airlift photobioreactor has a volume  $V_{\text{PBR}} = 10^{-3} \text{ m}^3$  and a depth of culture  $L_z = 0.03\text{m}$ , giving a specific illuminated area  $a_{\text{light}} = S/V_{\text{PBR}}$  of  $33.3 \text{ m}^{-1}$ . Mixing was only obtained by air injection (Pruvost et al. 2011; Ndiaye 2016).

For both photobioreactor geometries, temperature and pH were regulated at  $25^\circ\text{C}$  and 7.5 respectively. The temperature was regulated by a heating plate in the back of the PBRs and pH was regulated by an automatic injection of  $\text{CO}_2$ .

Torus and Airlift PBRs were exposed to a photon flux density  $\text{PFD} = 250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  thanks to a LED panels designed to produce homogeneous white light (Souliès et al. 2016). Dissolved oxygen concentration was modulated by bubbling gaseous nitrogen ( $\text{N}_2$ ) at a given flowrate. The latter was regulated by a flowmeter Bronkhorst HIGH-TECH (Bronkhorst France). Experiments were conducted in continuous chemostat mode for the same dilution rate ( $D=0.02\text{h}^{-1}$ ). For each dissolved oxygen concentration ( $C_{O_2}$ ), biomass concentration ( $C_X$ ), pigment concentration and inorganic carbon were measured. The volumetric gas-liquid mass transfer  $K_{L,a}$  for each flowrate was measured also (see next section).

## Analysis

**Biomass Dry weight:** Depending on the cell concentration, 0.4–10 mL of algal suspension was filtered through a pre-dried pre-weighed glass fiber filter (Whatman GF/F,  $0.7 \mu\text{m}$ ). Biomass concentrate was washed with distilled water to eliminate minerals. The filter was dried at  $110^\circ\text{C}$  for 24 h, cooled in a desiccator and reweighed. The final value was the average of three replicates. Biomass concentrations were used to deduce biomass productivities from residence dilution rate  $D$  (i.e. volumetric biomass productivity ( $P_X = C_X \cdot D$ )).

**Pigment contents:** Culture samples of volume  $V_1$  were centrifuged (13,400 rpm, 10min). The pellet was then suspended in a volume  $V_2$  of methanol and then stored in darkness at  $44^\circ\text{C}$  during 45 to 180 mn to allow complete extraction. The cell fragments were then separated by centrifuging (13,400 rpm, 10 min) and the optical density of the supernatant containing

the pigments dissolved in methanol was measured with a spectrophotometer at 480, 652, 665 and 750 nm (Jenway, England or Safas MC2, Monaco). Three replicates were prepared, and the chlorophyll a, b and photoprotective carotenoids (PPC) were determined using the following relationships (Ritchie 2006):

$$C_{Chla} = [-8.0962(DO_{652} - DO_{750}) + 16.5169 (DO_{665} - DO_{750})] \times V_{methanol}/V_{culture} \quad Eq III-1$$

$$C_{Chlb} = [27.4405(DO_{665} - DO_{750}) + 12.1688 (DO_{665} - DO_{750})] \times V_{methanol}/V_{culture} \quad Eq III-2$$

$$C_{PPC} = [4(DO_{480} - DO_{750})] \times V_{methanol}/V_{culture} \quad Eq III-3$$

**Inorganic carbon determination:** Inorganic carbon concentration was determined offline by using a COTmeter (SHIMADZU TOC5000A, Japan). 10 mL of a culture sample were taken and filtered with a Minisart® Syringe Filter 0.2µm. The sample was introduced via an injector into a combustion tube. Then inorganic carbon concentration was measured by the analyzer. The inorganic carbon concentration is given in mg / L.

**Dissolved oxygen concentration:** Dissolved oxygen concentration was obtained online from an optical oxygen sensor (Pyroscience FireSting O<sub>2</sub>-Mini). This robust oxygen probe is based on optical detection of dissolved oxygen in photobioreactors. It is connected to a FireSting O<sub>2</sub> fiber-optic oxygen meter and it is PC- controlled (<http://www.pyro-science.com>).

### III.2.2 Theoretical consideration

#### Predicting photobioreactor kinetic performances

Algal biomass productivity is the net result of photosynthesis and endogenous respiration. Predicting the rate of these mechanisms is challenging because of many parameters affecting biomass growth rate such as temperature, pH, light intensity, nutrient availability and dissolved oxygen concentration (Mata et al. 2010).

Cornet et Dussap (2009) have developed a predictive engineering formula for the assessment of kinetic and energetic performances of a photobioreactors as a function of their design. This formula gives the maximum volumetric and surface biomass productivities by

assuming (i) that only light is the limiting factor, and (ii) that the culture system is operated at an optimal biomass concentration leading to optimal light attenuation conditions. This leads to the simplified engineering formulas giving maximal surface ( $P_{S_{max}}$ ) and volumetric biomass productivity ( $P_{X_{max}}$ ) respectively:

$$P_{S_{max}} = (1 - f_d) \overline{\varphi}'_X \cdot \rho_M \cdot M_X \frac{2\alpha}{1+\alpha} K \ln \left[ 1 + \frac{q_0}{K} \right] \quad \text{Eq III-4}$$

$$P_{X_{max}} = P_{S_{max}} \times \frac{S_{light}}{V_R} = P_{S_{max}} \times a_{light} \quad \text{Eq III-5}$$

where  $P_{S_{max}}$  is the maximum surface productivity,  $f_d$  the dark fraction (representing an unilluminated volume of the photobioreactor due to its design),  $\overline{\varphi}'_X$  is the mean mass quantum yield of the Z-scheme of photosynthesis ( $\overline{\varphi}'_X = \frac{M_X \cdot \overline{\varphi}'_{O_2}}{v_{O_2-X}}$ ),  $\rho_M$  is the energy yield for photon conversion of maximum value,  $K$  is the half saturation constant for photosynthesis,  $M_X$  represent the molar mass of the strain used in the study,  $q_0$  is the total collected flux density and  $\alpha$  the linear scattering modulus relating to the microorganisms radiative properties.  $a_{light}$  is the specific illuminated surface as given by the surface to volume ratio ( $m^{-1}$ ).

### ***Mass balance in a perfectly mixed continuous PBR***

$$\frac{dC_X}{dt} = \langle r_X \rangle - D \cdot C_X \quad \text{Eq III-6}$$

where  $\langle r_X \rangle$  is the biomass growth rate,  $D$  is the dilution rate in and  $C_X$  the biomass concentration giving in  $kg/m^3$ . Once steady state is reached,  $\frac{dC_X}{dt} = 0$ , thus,

$$\langle r_X \rangle = D \cdot C_X = P_X \quad \text{Eq III-7}$$

This equation was used to determine experimentally biomass productivity  $P_X$  from biomass concentration measurement ( $C_X$ ).

### **Overview of the light-limited kinetic growth model**

Previous engineering relations (Eq III-4, Eq III-5) only allow to calculate the maximal performance of a culture system as a function of its design ( $f_d$ ,  $a_{light}$ ), light received ( $q_0$ ) and

cultivated strains characteristics. In practice, this corresponds to specific culture conditions, i.e light limited growth with full light attenuation and no dark volumes. Based on the same modeling corpus, this approach can be extended to any light attenuation conditions (Pruvost et al. 2012; Takache et al. 2012). This is then necessary to couple light attenuation conditions that are predicted by a radiative transfer model, to a kinetic growth model predicting photosynthetic growth rate. To be able to represent effects of dark volume as obtained in large light attenuation conditions, this kinetic growth model has to represent both respiration and photosynthetic activities. Photosynthetic reactions produce ATP and NADPH<sub>2</sub> accompanied by production of biomass and oxygen (Cornet et Dussap 2009). Kinetic formulation of this term reveals sufficient for cyanobacteria, because their respiration activity at light remains negligible. However, this is not the case for eukaryotic microorganisms as microalgae, because they present a respiratory activity in the light, leading to the production of ATP and NADH<sub>2</sub>. A respiration term has then to be added (Takache et al. 2012). Such kinetic formulation was validated by authors in several cases (Pruvost et al. 2015; Souliès et al. 2016; Pruvost et al. 2016).

A full description of the model is found in section I.7.1 chapter 1. The model expresses the local rate of oxygen production as a function of the rate of photon absorption  $\mathcal{I}$ :

$$J_{O_2} = J_{O_{2,photo}} - J_{O_{2,resp}} = \left[ \rho_M \bar{\Phi}'_{O_2} \frac{K_{\mathcal{I}}}{K + \mathcal{I}} - \frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2}} \frac{K_r}{K_r + \mathcal{I}} \right] \quad Eq III-8$$

where  $(\rho_M \bar{\Phi}'_{O_2} \frac{K_{\mathcal{I}}}{K + \mathcal{I}})$  represents the photosynthetic term ( $J_{O_{2,photo}}$ ) and  $(\frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2}} \frac{K_r}{K_r + \mathcal{I}})$  represents the respiration term ( $J_{O_{2,resp}}$ ). Please note that terms related to respiratory activity were not considered in the engineering formulae (i.e that is in accordance with their aim to predict maximal performances, with then neglectation of the negative respiration influence).  $J_{NADH_2}$  is the specific rate of cofactor regeneration on the respiratory chain, linked to oxygen consumption by the stoichiometric coefficient  $v_{NADH_2-O_2}$  (the stoichiometric coefficient of cofactor regeneration on the respiratory chain), and  $K_r$  is a saturation constant describing the inhibition of respiration in light. As proposed by Takache et al. (2012) and Souliès et al. (2016),  $K_r$  constant can be related to the model parameters as follow:

$$K_r = \frac{\mathcal{I}_c}{\frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2} \rho_M \bar{\Phi}'_{O_2}} \left[ \frac{1}{\mathcal{I}_c} + \frac{1}{K} \right] - 1} \quad Eq III-9$$



where  $\mathcal{A}_c$  represents the specific rate of photon absorption at the compensation point ( $J_{O_2} = 0$  for  $\mathcal{A} = \mathcal{A}_c$ ).

As a direct result of the light distribution within the culture, this kinetic relation is of a local type (i.e the rate of photon absorption is space dependent). This implies calculating the corresponding mean value by averaging over the total culture volume  $V_R$ :

$$\langle J_{O_2} \rangle = \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} J_{O_2} \cdot dV \quad \text{Eq III-10}$$

Finally, once  $\langle J_{O_2} \rangle$  is known, the mean volumetric biomass growth rate could be retrieved directly using the stoichiometry relating oxygen and biomass productions:

$$\langle r_x \rangle = \frac{\langle J_{O_2} \rangle c_X M_X}{v_{O_2-x}} \quad \text{Eq III-11}$$

This relation combined with Eq III-7 allows predicting PBR productivity ( $\langle r_x \rangle = P_x$ ). Please note that same approach of Eq III-10 can be used to obtain averaged photosynthetic ( $\langle J_{O_2,photo} \rangle$ ) or respiration ( $\langle J_{O_2,resp} \rangle$ ) contributions.

### **Kinetic growth model for *Chlorella vulgaris***

Following Takache et al. (2012) who modeled *Chlamydomonas reinhardtii* growth, the kinetic growth model for *Chlorella vulgaris* was established by Souliès et al. (2016). Experiments were performed in 1.5 L torus photobioreactor in continuous mode, for a constant photon flux density (PFD=200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) and for different dilution rates. For each experiment, the dry biomass  $C_x$  and the volumetric productivity  $P_x$  were determined at steady state (Eq III-6). This allowed determining the kinetic growth model parameters of *Chlorella vulgaris* which are summarized in Table III-1.

Parameter	Value	Unit
$\rho_M$	0.8	-
$J_{NADH_2}$	$1.8 \times 10^{-3}$	$mol_{NADH_2}/kg/s$
$v_{O_2-X}$	1.13	$mol_{O_2}/\mu mol_{lv}$
$\bar{\phi}'_{O_2}$	$1.1 \times 10^{-7}$	$mol_{O_2}/\mu mol_{lv}$
$M_X$	0.024	$Kg_x C-mol^{-1}$
$v_{NADH_2-O_2}$	2	-
$K$	40000	$\mu mol_{lv}/kg/s$
$K_r$	500	$\mu mol_{lv}/kg/s$
$\mathcal{S}_c$	2800	$\mu mol_{lv}/kg/s$

Table III-1 : Summary of kinetic model parameters of *Chlorella vulgaris* (Souliès et al. 2016)

**Prediction of biomass productivities for the conditions investigated in this study.**

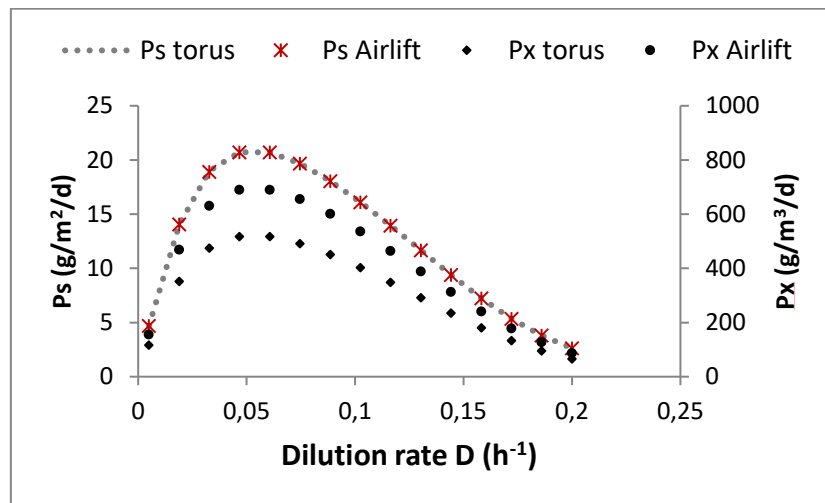


Figure III-1: Model prediction of biomass surface and volumetric productivities as a function of dilution rate for two PBR geometries operated at  $q_0 = 250 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ .

Figure III-1 represents the prediction of volumetric and surface productivities by the kinetic growth model, as obtained for the two geometries of PBR used in this study. This was obtained for a PFD  $q_0 = 250 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ . It shows a basis statement of PBR performances in

light-limited regime, which indicates that volumetric productivity is dependent on PBR depth, in the opposite of surface productivity which remains independent of PBR depth for a given light intensity and given species.

### Experimental Determination of $J_{NADH_2}$

$J_{NADH_2}$ , is the specific rate of the cofactor regeneration, is directly related to respiratory activity. It was retrieved in our study from both kinetic growth model and experimental measurements. Dry weight biomass concentration in steady state was used to determine biomass productivity (Eq III 7). Experimental productivity rate allows us to calculate then the experimental rate of oxygen production  $J_{O_2}$  using Eq III-11.

By assuming that parameters of the photosynthetic term,  $J_{O_2,photo}(\rho_M, \overline{\Phi'}_{O_2}, K)$  were the same as determined by Souliès et al. (2016), the oxygen consumption rate due to respiration,  $J_{O_2,resp}$  can thus be calculated using Eq III 8. In this equation, the parameters  $K_r$  (Eq III-9) is not independent and can be linked to the specific rate of cofactor regeneration on the respiratory chain by the definition of the compensation point of photosynthesis. This compensation point is obtained for a value of rate of photon absorption  $\mathcal{L}$  leading to null net oxygen production (i.e  $J_{O_2} = 0$ ). In our case, we considered the compensation point the same as determined by previous authors ( $\mathcal{L} = 2800 \mu\text{mol}_{hv}/\text{kg}/\text{s}$ ). Thus,  $J_{NADH_2}$  was determined as follow:

$$\langle J_{NADH_2} \rangle = \langle J_{O_2,resp} \rangle \cdot v_{NADH_2-O_2} \left[ \frac{1}{\left\langle \frac{K_r}{K_r + \mathcal{L}} \right\rangle} \right] \quad \text{Eq III-12}$$

In this way,  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  is then finally retrieved for each dissolved oxygen concentration.

### Estimation of photorespiration activity

Photorespiration occurs when high concentrations of oxygen and/or low concentrations of  $\text{CO}_2$  are present (Kliphuis et al. 2011; Maurino and Peterhansel 2010). In this condition, Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) reacts with oxygen instead of  $\text{CO}_2$ . When RubisCO fixes  $\text{CO}_2$ , two molecules of Glycerate 3-phosphate are formed (Bauwe et al. 2010), then converted in the central carbon metabolism to form biomass components.

However, if only oxygen is fixed, one Glycerate 3-phosphate is formed and one molecule of Glycolate 2-phosphate are formed. This last compound synthesis dissipates energy in the form of ATP. This costs additional ATP and NADPH which are generated in the light reaction of photosynthesis. As a result, less energy is available for growth, decreasing the yield of microalgal biomass production.

Photorespiration activity can be represented by  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  concentrations ratio denoted by  $r$ . It is the ratio between the molar concentration of dissolved  $\text{CO}_2$ , and the molar concentration of dissolved  $\text{O}_2$  (Eq III-15).

When inorganic carbon is provided in the culture in the form of  $\text{HCO}_3^-$ , carbon dioxide concentration is determined depending on the pH of the culture medium, by introducing a constant  $K$  proportional to the pH value:

$$r = \frac{C_{\text{CO}_2}}{C_{\text{O}_2}} = \frac{C_{\text{ID}}/K}{C_{\text{O}_2}} \quad \text{Eq III-13}$$

where  $K = 14$  at a  $\text{pH} = 7.5$ , with  $C_{\text{CO}_2}$  the molar concentration of dissolved carbon dioxide in  $\text{mol}_{\text{CO}_2}/\text{L}$  and  $C_{\text{O}_2}$  the molar concentration of dissolved oxygen in  $\text{mol}_{\text{O}_2}/\text{L}$ . Based on this definition, Urbain (2017) estimated photorespiration activity and its influence on relative biomass productivity. This is given in Figure III-2. It is shown that photorespiration activity can occur for ratio value less than 0.4. For a ratio  $> 0.6$ , a negligible effect of photorespiration activity on biomass productivity ( $< 10\%$ ) could occur. It clearly shows that the effects of the photorespiratory pathway might often be neglected under usual operating conditions in photo bioreactors (i.e sufficient  $\text{CO}_2$  supply).

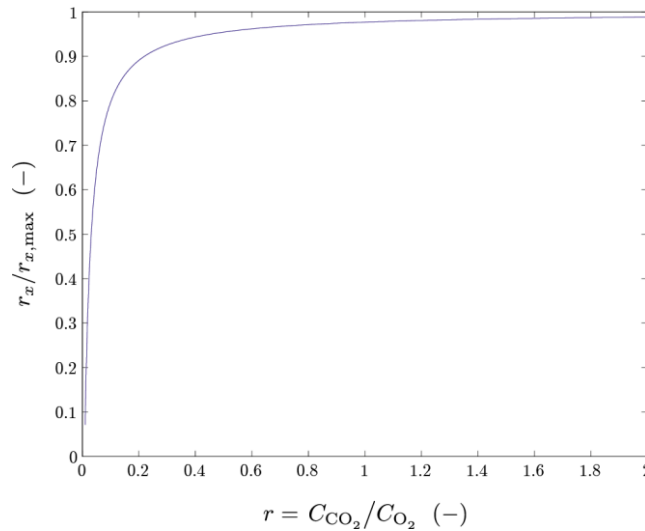


Figure III-2 : Growth rate loss as induced by photorespiration activity (Urbain 2017).

Assuming that affinity of RubisCO to  $\text{CO}_2$  is 17-fold higher than affinity to  $\text{O}_2$  as shown for *Chlamydomonas reinhardtii* by Genkov et Spreitzer (2009), and that the carbon concentrating mechanisms (CCM) could keep the  $\text{CO}_2$  concentration near RubisCO high enough to reduce the oxygenase flux, photorespiration should not present an important inhibition on microalgal growth. To guarantee this condition, 20mM of  $\text{NaHCO}_3$  was added to the medium. As shown later, this was found sufficient to obtain a ratio “r” in a range where photorespiration presents a negligible effect ( $r > 0.6$ ).

### III.2.3 Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer

#### Gas-liquid mass transfer determination

Gas-liquid mass transfer in the cultivation system has a direct influence on the dissolved oxygen concentration obtained in the bulk of culture (Rubio et al. 1999). It is characterized by the volumetric mass transfer coefficient  $K_{\text{La}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ). Its experimental determination was obtained by using a de-oxygenation/re-oxygenation method (Roustan 2003). It consists in removing dissolved oxygen from the liquid phase by injecting gaseous nitrogen ( $\text{N}_2$ ), and then monitoring the increase in dissolved oxygen concentration when switching back to air injection.

During the re-oxygenation phase, mass balance on dissolved oxygen yields the following equation Pruvost et al. (2017):

$$N_{O_2} = \frac{dc_L}{dt} = K_L \cdot a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad \text{Eq III-14}$$

with  $N_{O_2}$  ( $\text{g}_{O_2}/\text{m}^3/\text{h}$ ) the oxygen mass transfer rate,  $C_{O_2}$  the dissolved oxygen concentration, and  $C_{O_2}^*$  the dissolved oxygen concentration at equilibrium with the gas phase ( $8.25 \text{ g}/\text{m}^3$  with air at  $25^\circ\text{C}$ ). By integrating this equation, assuming time-constant conditions of mass transfer (i.e. constant  $k_{LA}$  over the experiment), the following equation is obtained, which allows the volumetric mass transfer coefficient  $k_{LA}$  to be calculated from the time course of the dissolved oxygen concentration:

$$\ln \frac{(C_L^* - C_L)}{(C_L^* - C_{L0})} = -K_L \cdot a \cdot t \quad \text{Eq III-15}$$

with  $C_{L0}$  the initial dissolved oxygen concentration, as obtained before air injection ( $C_{L0} = 0$  in air condition).

Measurements of volumetric mass transfer coefficient in oxygen were made in deionized water. Dissolved oxygen concentration was measured using an oxygen probe (Pyroscience, P-FSO<sub>2</sub>-MINI-ST, Germany). The gas phase flow rate was controlled and regulated by a mass flow meter (Bronkhorst HIGH-TECH, France).

### Theoretical determination of dissolved oxygen concentration

In order to investigate the gas-liquid mass transfer performance of different photobioreactor geometries, an approach based on the comparison between the oxygen production during photosynthetic growth and the oxygen physically transferable from liquid to gas phases, was used (Loubière et al. 2009). This approach was also applied by Pruvost et al. (2017) to investigate the transfer performance of an intensified PBR, namely Algofilm© PBR. Oxygen production ( $P_{O_2}$ ) is proportional to growth rate and volumetric productivity ( $P_V$ ). In steady state, we obtain then:

$$P_{O_2} = Y_{O_2/X} \cdot P_V \quad \text{Eq III-16}$$

with  $Y_{O_2/X}$  the specific yield of oxygen production ( $1.5 \text{ Kg}$  of oxygen per  $\text{Kg}$  of biomass for *Chlorella vulgaris*, (Pruvost et al. 2017). This value has to be compared with the aeration

performance of the PBR, given by Eq III-13. At steady state, a mass balance for oxygen leads to:

$$N_{O_2} = P_{O_2} \quad \text{Eq III-17}$$

This enables us to calculate the oxygen concentration in the culture medium at steady-state:

$$C_{O_2} = \frac{Y_{O_2/X} P_X}{K_L a} + C_{O_2}^* \quad \text{Eq III-18}$$

### III.3 Results and discussion

#### III.3.1 Experimental investigation of the effect of dissolved oxygen concentration on the growth of *Chlorella vulgaris*

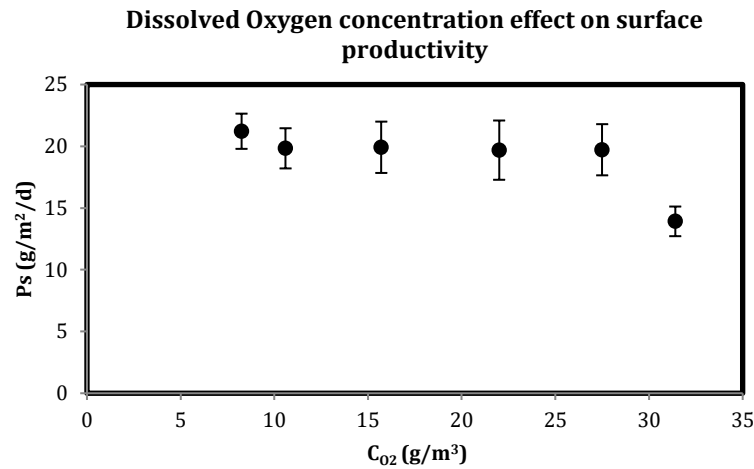
##### *Biomass productivity as a function of dissolved oxygen concentration.*

The torus PBR was used to characterize the impact of different dissolved oxygen concentration  $C_{O_2}$  on biomass productivity. It consisted of continuous culture in chemostat mode for constant dilution rate  $D = 0.02\text{h}^{-1}$  and photon flux density  $\text{PFD} = 250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Dissolved oxygen concentrations were varied by modulating  $\text{N}_2$  gaseous flowrate. Figure III-3 shows surface productivity of *Chlorella vulgaris* obtained as a function of  $C_{O_2}$ .

In a range of  $C_{O_2}$  between  $8 \text{ g}/\text{m}^3$  and  $25 \text{ g}/\text{m}^3$  influence on surface productivity was found negligible. 30% loss on productivity was observed for a  $C_{O_2} = 31 \text{ g}/\text{m}^3$ .

Our results confirm several studies highlighting the effect of a high dissolved oxygen concentration on microalgal growth (Raso et al. 2012, Costache et al. 2013, Sousa et al. 2013). Those authors have shown that a  $C_{O_2} > 25 \text{ g}/\text{m}^3$  can inhibit eukaryotic microalgae growth. This inhibition could be the result of many metabolic processes. Kliphuis et al. (2011) demonstrated that when photoinhibition was avoided (i.e at sub-saturating light intensities), photorespiration was proved to be the main process leading to a photosynthetic deficiency. However, in high light intensities, the accumulation of dissolved oxygen concentration, lead to photochemical damage of the photosynthetic apparatus. This also resulted in a decrease in pigment concentrations in microalgal cells (Ugwu et al. 2007). In our case, pigment content

was found almost constant (5-7%), confirming that no significant photoinhibitory effect was obtained (see next paragraph).



*Figure III-3: Evolution of the surface productivity ( $P_s$ ) of *Chlorella vulgaris* for different dissolved oxygen concentration in the torus PBR ( $C_{O_2}$ ).  $PFD = 250\mu\text{mol}_m/m^2/s$  and  $D=0.02h^{-1}$*

#### ***Estimation of the ratio of photorespiration activity***

Table III-2 presents the different photorespiration ratios obtained for each experiment as calculated by Eq III-15.  $C_{O_2}$  was obtained thanks to a dissolved oxygen concentration sensor and  $C_{CO_2}$  was obtained thanks to measurements of inorganic carbon by COTmeter (SHIMADZU TOC5000A, Japan). Results show that for a  $C_{O_2} \approx 30\text{g}/\text{m}^3$  where a decrease of biomass productivity occurs, the ratio was 0.67, corresponding to the lower value achieved in our experiments. Regarding Figure III-2, a negligible effect of photorespiration can be expected (<5%). In fact, the photorespiration process was in our case overcome by adding extra  $CO_2$ .

Furthermore, we applied sub-saturating PFD, with then negligible photoinhibition phenomenon. This tends to indicate that oxygen mainly inhibited the algae growth via high respiration activity (Sousa et al. 2013). In fact, as described by Martzoff (2013), the metabolic behavior of cells at a high dissolved oxygen concentration is actually different from the behavior at optimum growth conditions ; a decrease in the photosynthetic growth activity is observed. This study on metabolic flows shows that futile mechanisms could occur at high



oxygen concentration. These mechanisms are accompanied by an increase in respiratory flow with then the need of an increase in incoming photon flux to maintain the same biomass productivity (i.e growth rate). Thus, a part of energy is dissipated by other mechanisms instead of producing biomass.

$C_{O_2}$ (mg/L)	$C_{O_2}$ (mol/L)	$C_{CO_2}$ (mol/L)	R (ratio)
8.25	0.23	11	3.42
11	0.29	9.21	2.23
16	0.43	11.86	1.94
22	0.61	26.25	3.06
27	0.76	20.1	1.87
<b>31</b>	<b>0.87</b>	<b>8.17</b>	<b>0.67</b>

Table III-2: ratio of photorespiration for each DO

### ***Pigment concentration as a function of dissolved oxygen concentration***

Figure III-4 presents total pigments and carotenoids content of *Chlorella vulgaris* measured for the different dissolved oxygen concentration. No significant effect of high dissolved oxygen concentration was observed. PPC (carotenoids) were found around 1% DW (dry weight) for all  $C_{O_2}$  and total pigment percentage was between 5.5% DW and 7.5% DW. This result confirms that light stress remains negligible, as it should have resulted in a significant loss or damage in pigment apparatus due to photoacclimation process (Souliès et al. 2016). In addition, there is no significant photooxydative damage on the photosynthetic apparatus. In fact, Carotenoids (PPC) are formed, normally, when an extra formation of oxygen radicals and singlet oxygen occur. The accumulation of oxygen in the photobioreactor could indeed induce the extra formation of oxygen radicals, consequently leading to damage the photosynthetic apparatus inducing therefore extra carotenoids production to protect the cells. This is confirmed by fluorescent measurement. In our experiments, the measurements of photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* represented by  $F_v/F_m$  (II.5.5, chapter 2) give values around 0.7 for all dissolved oxygen concentrations. For green algae this ratio is between 0.7-0.8 (Richmond 2004). Same conclusions were obtained for *Neochloris oleoabundans* where it has been shown that Chlorophyll and carotenoids were not affected by  $C_{O_2}$  for sub saturating and near saturating light intensities (Sousa et al. 2013).

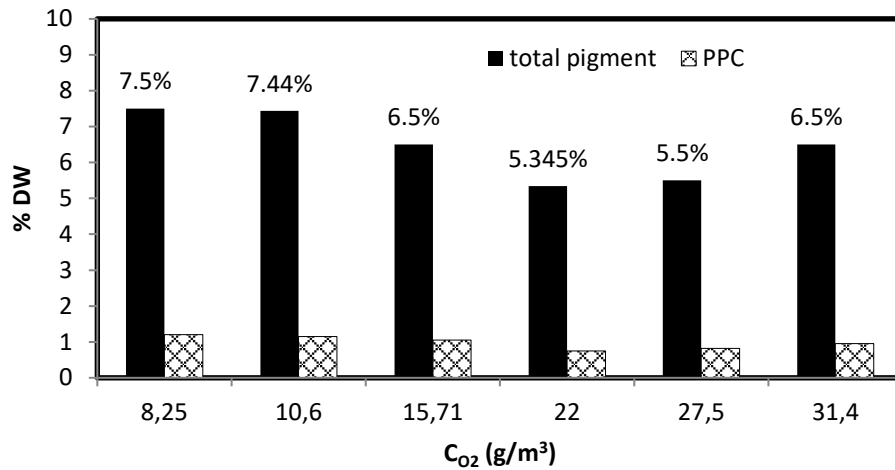


Figure III-4: Pigment concentration as a function of dissolved oxygen concentration.

### III.3.2 Determination of $J_{NADH_2}$ as a function of dissolved oxygen concentration

Because loss of productivity at high dissolved oxygen concentration was not the result of a photorespiration activity, one can suppose that energy dissipation is due to a variation of respiratory activity. Therefore, by assuming that  $C_{O_2}$  influences the respiration rate,  $J_{NADH_2}$  that represents the respiration activity in the kinetic growth model (Eq III-8), can be a function of  $C_{O_2}$ .  $J_{NADH_2}$  was then retrieved from the growth model (Eq III12).

Figure III-5 presents  $J_{NADH_2}$  values retrieved from experimental productivities obtained for the different dissolved oxygen concentrations. When inhibition did not occur ( $C_{O_2} < 30g/m^3$ ), the specific rate of respiratory cofactor regeneration was around 2 mol<sub>NADH<sub>2</sub></sub>/kg<sub>biomass</sub>/h with a progressive increase from 1.8 to 3 mol<sub>NADH<sub>2</sub></sub>/kg<sub>biomass</sub>/h. However, for a higher  $C_{O_2}$ , the rate increases to reach around 10 mol<sub>NADH<sub>2</sub></sub>/kg<sub>biomass</sub>/h, emphasizing the sudden increase of respiration activity for such high dissolved oxygen concentration.

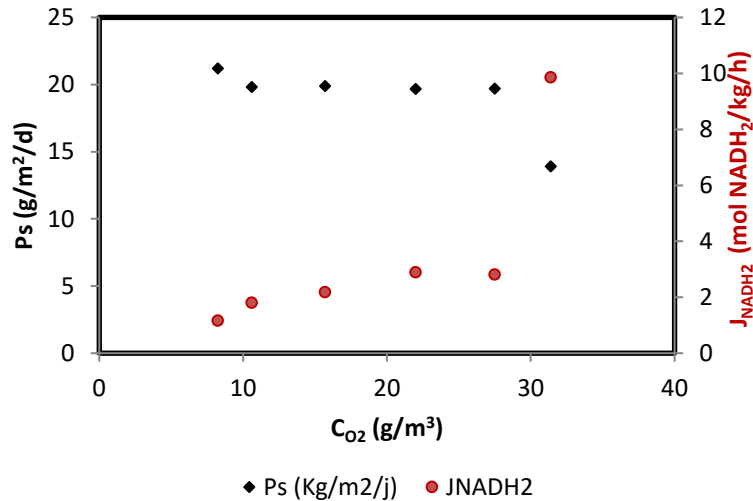


Figure III-5: Evolution of  $J_{NADH_2}$  (rate of production of the respiratory cofactor  $NADH_2$ ) as a function of dissolved oxygen concentration.

### III.3.3 Modeling of the influence of dissolved oxygen concentration on kinetic growth

#### *Modeling biomass productivity as a function of dissolved oxygen concentration*

As explained in section III.2.2, modeling requires the coupling between the growth and the physical phenomenon of light transfer inside the culture volume. For the determination of the light attenuation field, the two-flux approach was applied (Pottier et al. 2005). The model requires the determination of the radiative properties of the microalgae strain. Only pigment content, size distribution and shape of cultivated microalgae need to be measured for that purpose. The approach described by Kandilian et al. (2016) was here applied. By applying the Lorenz-Mie theory, radiative properties were calculated. Please note that such parameters could be validated by transmittance measurement using an integrated sphere photometer and by comparing results with predictive theoretical values (Kandilian et al. 2016).

In this study, Figure III-4 and Table III-3 show that in all cases, dissolved oxygen concentration presents no significant influence in the size of the microalgae or its pigment contents. This allows us to consider that the database described in Souliès et al. (2016), which was obtained from the procedure described by Kandilian et al. (2016), could be used to retrieve the radiative properties of the cells. According to this database obtained for *Chlorella vulgaris*,

a single measurement of pigment concentration was then sufficient to retrieve corresponding radiative properties. Examples of results are given in Figure III-6. (please see Souliès et al. (2016) to have all spectral values).

$C_{O_2}$ (g/m <sup>3</sup> )	$r_{eq}$ (nm)
8.25	2.13 +/- 0.23
10.6	2.32 +/- 0.34
15.71	2.25 +/- 0.40
22	2.26 +/- 0.35
27.5	1.82 +/- 0.43
31.4	1.76 +/- 0.43

Table III-3: Equivalent radius (Dauchet et al. 2015) of *Chlorella vulgaris* for each dissolved oxygen concentration

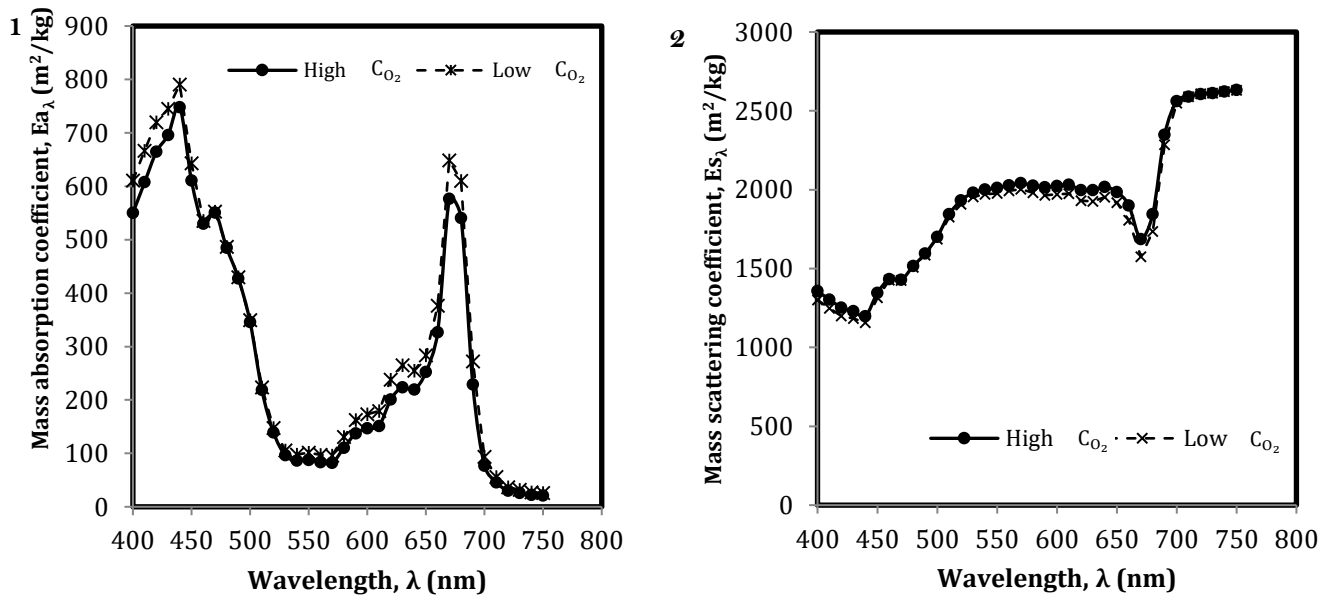


Figure III-6: Examples of spectral mass absorption  $Ea_\lambda$  (1) and scattering coefficients  $Es_\lambda$  of *Chlorella vulgaris* grown in two dissolved oxygen concentrations (high dissolved oxygen concentration, i.e.  $C_{O_2} > 30\text{mg/l}$  and Low dissolved oxygen concentration, i.e.  $C_{O_2} < 30\text{mg/L}$ ),  $PFD = 250\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ .

Since pigment content was only slightly affected, photosynthetic apparatus of the cells was supposed to be not damaged. Thus, we supposed that parameters of the model related to photosynthetic term ( $\rho_M, \overline{\phi'}_{O_2}, K$ ) were the same as determined by previous authors. As a result, only  $J_{NADH_2}$  was modified as a function of dissolved oxygen concentration. By introducing  $J_{NADH_2}$  calculated from the previous section, surface productivity for each dissolved oxygen concentration was calculated using Eq III 8 and Eq III 11.

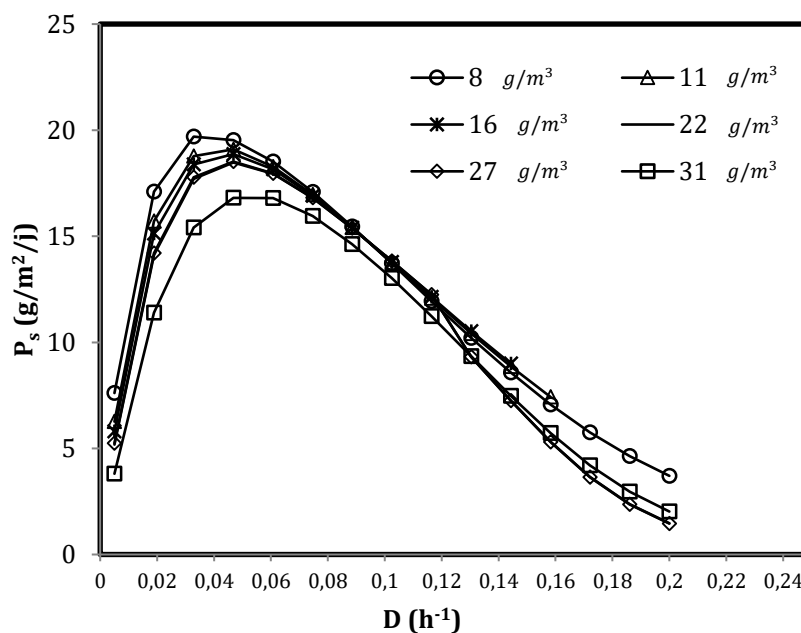
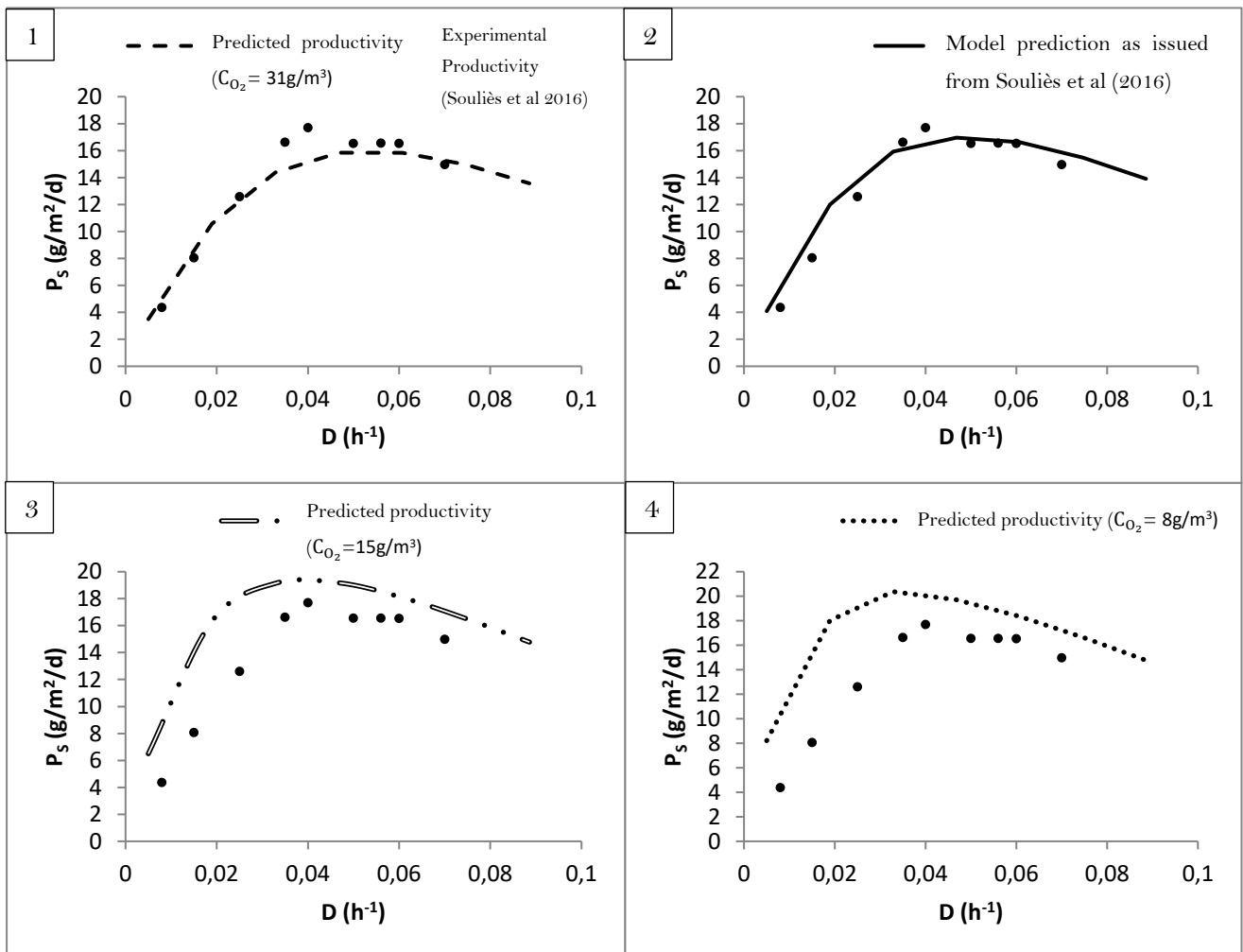


Figure III-7: Prediction of biomass surface productivity for different dissolved oxygen concentrations.

Figure III-7 shows prediction of surface productivities as a function of dilution rate for different dissolved oxygen concentration ( $q_0 = 200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). We can note that in each case, maximal surface productivity was obtained for a different optimal value of the dilution rate. In a range of non-inhibitory dissolved oxygen concentration for  $8\text{g}/\text{m}^3 < C_{O_2} < 27\text{g}/\text{m}^3$ , optimal dilution rate was around  $0.035\text{-}0.045 \text{ h}^{-1}$ . In the other hand, in a range of inhibitory dissolved oxygen concentration (i.e  $C_{O_2} = 31 \text{ g}/\text{m}^3$ ), optimal dilution rate was  $0.06\text{h}^{-1}$ . We can note that model predicts an increase of 25% more surface productivity at low dissolved oxygen concentration, than in a case of excess dissolved oxygen.

***Validation of the light limited kinetic growth model in different dissolved oxygen concentrations***

Souliès et al. (2016) have established the kinetic growth model of *Chlorella vulgaris* in the same PBR geometry as used in this study, but without monitoring  $C_{O_2}$ , so with an unknown dissolved oxygen concentration. By comparing their results to our model prediction for different dissolved oxygen concentrations ( $8\text{g/m}^3$ ,  $15\text{g/m}^3$  and  $31\text{g/m}^3$ ), the oxygen environment applied in Souliès et al. (2016) can be estimated.



*Figure III-8: Comparison between experimental surface productivity and theoretical surface productivity for different dissolved oxygen concentrations.*

Figure III-8 shows a good agreement between the model and experiments for the first 2 graphs representing predictions for high dissolved oxygen concentration values ( $31\text{g/m}^3$ ),

while the last graphs (3 and 4) obtained for lower  $C_{O_2}$  values (8 and 15  $g/m^3$ ) show higher productivities than the experimental ones.

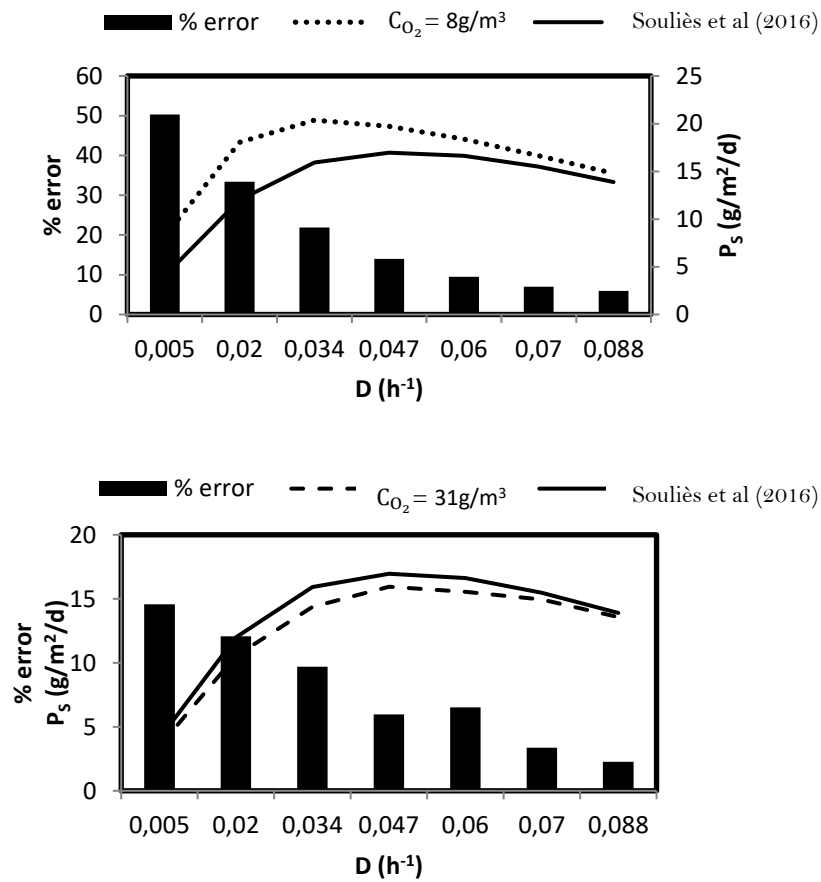


Figure III-9: Percentage error for each dilution rate by comparing surface productivity predicted by Souliès et al.(2016) and surface productivity predicted by the same model but with  $J_{NADH_2}$  adjusted for  $C_{O_2} = 8g/m^3$  and  $C_{O_2} = 31g/m^3$ .

The discrepancy between model prediction and experimental values are given in Figure III-9, for both high  $C_{O_2}$  (31g/m<sup>3</sup>) and low  $C_{O_2}$  (8g/m<sup>3</sup>). This tends to show that model parameters from Souliès et al. (2016) were obtained in the range of inhibitory dissolved oxygen concentrations (31g/m<sup>3</sup>) where errors did not indeed exceed 15% for the different dilution rates. At lower oxygen concentrations, error could reach 50% for low dilution rates. This emphasizes the relevance to control dissolved oxygen concentration for accurate determination of biomass productivity in well controlled conditions of low dilution rate values. We can also note that in both cases, error increased when lowering the dilution rate. This has

to be related with some of the the conclusions of Souliès et al. (2016) and Takache et al. (2012), who observed that the kinetic growth model was less accurate in such conditions. This was already attributed to the formulation of the terms related to the respiration activity. Our analysis tends to confirm this remark, while providing a new insight in its direct relation to dissolved oxygen concentration. Indeed, the decrease in dilution rate results in an increase in light attenuation conditions. This decreases photosynthetic activity while increasing the contribution of respiratory activity. As a consequence, an inaccurate representation of  $J_{NADH_2}$  term leads to a higher discrepancy in model prediction for lower dilution rates. As a result, the kinetic growth modeling, as previously formulated (constant  $J_{NADH_2}$  value) was not able to represent accurately the full range of dilution rate values. This hypothesis will be confirmed in the following sections.

### **III.3.4 Analysis for various lab scale and industrial photobioreactors**

#### ***Surface productivity for torus and Airlift photobioreactors***

Surface productivity has been determined for three microalgae species in two different geometries of photobioreactors, with the final aim to generalize our conclusion on dissolved oxygen concentration effect. *Porphyridium cruentum* (PC) was cultivated in chemostat mode (PFD=270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  and  $D = 0.015\text{h}^{-1}$ ). Surface productivity obtained in Airlift PBR was around 30  $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ , although in the torus PBR the productivity was around 17  $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  for the same illumination conditions. For *Parachlorella kessleri* (PK), a surface productivity of 6.3  $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  in torus PBR for a PFD = 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  and a dilution rate  $D = 0.02\text{h}^{-1}$ . In the case of Airlift PBR, biomass productivity was 35% higher for same conditions of photon flux density and dilution rate (10  $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ ). Same tendency was observed for *Chlorella vulgaris* (CV) where productivity in airlift PBR was 30% higher than torus PBR for the same conditions (250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  and  $D = 0.02\text{h}^{-1}$ ) (Figure III-10). This discrepancy between the two PBR geometries contradict one important statement of PBR performances in light-limited conditions, that is surface productivity is only affected by the PFD for a given species (EqIII-4 and Eq III-5) (Lee et al. 2014). It was then further analyzed regarding a possible effect of dissolved oxygen concentration.

In fact, by calculating the capacity of each photobioreactor to accumulate dissolved oxygen as a function of its gas-liquid mass transfer (Figure III-11), we can remark that the two



geometries present different gas-liquid transfer efficiency. As already explained, the torus PBR allows modulating gas-liquid mass transfer performances in a wide range, but in our experiments, the typical range of aeration in torus PBR was around 30mL/min air flow rate. This is a rather low value where in practice the dissolved oxygen concentration can accumulate up to values presenting an inhibitory activity ( $>30\text{g/m}^3$ ). On the other hand, in the typical range of aeration of the Airlift PBR (400mL/min air flow rate), dissolved oxygen concentration is always at near air saturated values.

To assess the hypothesis that airlift PBR presents a  $C_{O_2}$  near saturating values, and in contrasts the torus PBR presents  $C_{O_2}$  near inhibitory values, same experiments for *Chlorella vulgaris* were repeated in torus PBR by changing the aeration rate. A value of 200mL/min was necessary in order to obtain  $C_{O_2}$  in near air saturated values. Results show (Figure III-10) that surface productivity for *Chlorella vulgaris* was then similar in both geometries. This validates then our statement of the direct influence of  $C_{O_2}$  on biomass growth, while confirming that a surface productivity is independent of the photobioreactor design when only light-limited conditions occur (Figure III-1).

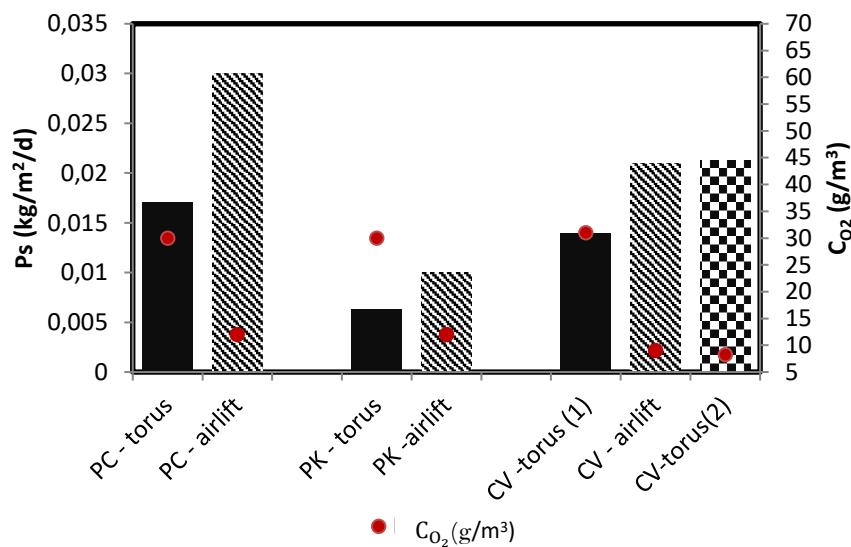


Figure III-10: Surface productivity in Airlift and torus PBR for different microalgae strain at different dissolved oxygen concentrations

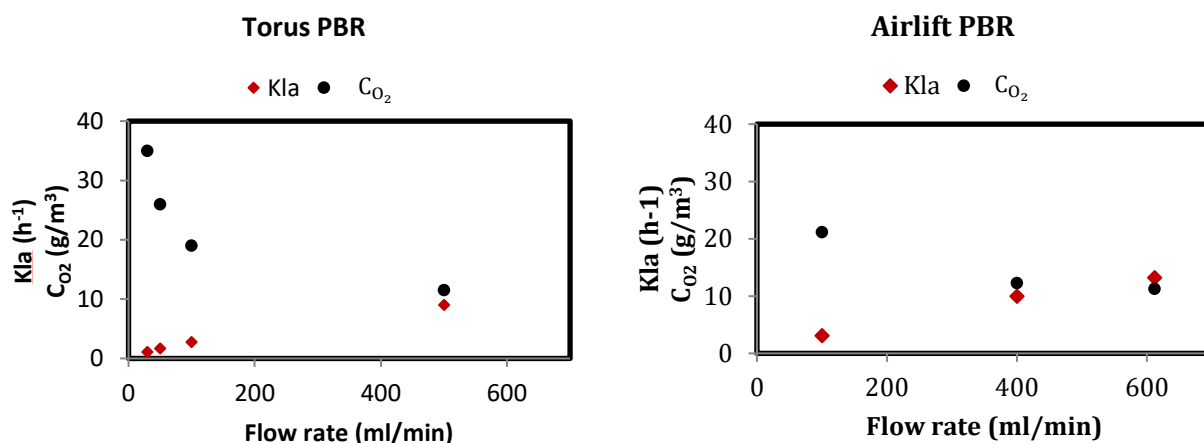


Figure III-11: Gas-liquid mass transfer and dissolved oxygen concentration in torus and Airlift photobioreactor as a function of different air flowrates.

### Practical recommendations

For lab-scale PBRs, experiments in the torus PBR showed that a minimal gas flow of 50 mL/min should be maintained in order to maintain a healthy environment for the microalgae ( $C_{O_2} < 30 \text{ g/m}^3$ ). A maximal gas flowrate of 100 mL/min should also be retained. Beyond this value, carbon dioxide limitation can indeed occur due to excessive degassing (data not shown). In the case of the 1L airlift PBR, a minimum gas flowrate of 100 ml/min is recommended to maintain good mixing conditions. In practice, gas flow rate used is in general near 400 ml/min. With this flowrate, accumulation of dissolved oxygen is negligible. Airlift system remains then efficient in terms of oxygen stripping.

Our analysis was extended to other typical PBR geometries. Considering that surface productivity of a microalgae strain remains the same for any photobioreactor design, the gas-liquid mass transfer efficiency of different industrial PBR were collected from literature in order to estimate the dissolved oxygen concentration using Eq III-20. Table III-4 summarizes different dissolved oxygen concentration ( $C_{O_2}$ ) and  $K_{La}$  for different PBRs geometry. Thereby, comparing results, we could notice that tubular photobioreactors and raceway photobioreactors present a greater capability to accumulate dissolved oxygen concentration than airlift system photobioreactors. Please note that this was already shown experimentally by many authors (Posten 2009; Hall et al. 2003; Borowitzka et Moheimani 2013; Weissman, et al. 1988; Reyna-Velarde et al. 2010).

PBR geometry	Flow rate	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	$C_{O_2}$ ( $g/m^3$ )	Reference
<b>Tubular Airlift 6L</b>	30 ml/min	5.1	<b>20</b>	(Loubiere et al. 2011)
	100 ml/min	10.6	13.9	
	500 ml/min	27.8	10.4	
	1200 ml/min	47.1	9.5	
<b>Raceway</b>	6 rpm	0.2377	<b>59</b>	(Le Gouic 2013)
	16 rpm	0.75	24	
	20 rpm	0.97	20	
<b>Tubular horizontal PBR</b>	---	3.6	<b>48.2</b>	(Molina Grima et al. 1999)
<b>Near horizontal PBR</b>	---	$K_{La_{min}}=3$	<b>68.2</b>	(Babcock, et al. 2002)
	---	$K_{La_{max}}=7$	<b>33.9</b>	
<b>Tubular Helical</b>	---	12.8	<b>30.7</b>	(Hall et al. 2003)
<b>Flat panel Airlift 50L</b>	---	$K_{La_{min}}=1$	<b>16.6</b>	(Reyna-Velarde et al. 2010)
	---	$K_{La_{max}}=29$	8.5	

*Table III-4: Gas-liquid mass transfer and resulting estimated dissolved oxygen concentrations for different photobioreactor geometries.*

Those results were combined to our model to estimate effects of aeration performances of PBR geometries on resulting kinetic performances. This was obtained for *Chlorella vulgaris* for constant PFD ( $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Results are given in Figure III-12 emphasizing the effect of aeration performances on biomass productivity, with a potential loss of 30% for technologies such as raceways or tubular PBRs where inhibitory  $C_{O_2}$  values could be achieved.

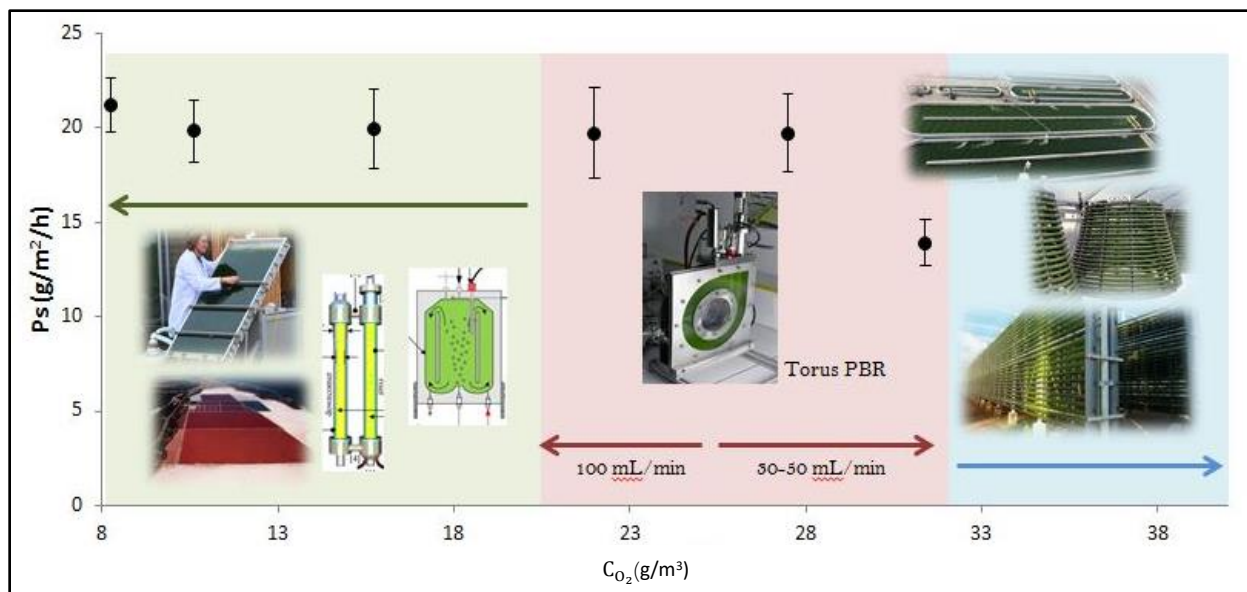


Figure III-12 : of different PBRs geometry towards dissolved oxygen concentration.

### III.4 Conclusion

Dissolved oxygen concentration was found to have a negative effect on microalgal growth. A concentration over  $30\text{g/m}^3$  equivalent to 370% air saturation at  $25^\circ\text{C}$  causes 30% loss in biomass productivity on *Chlorella vulgaris*. Since pigment content and microalgae size was not affected, this loss was mainly explained by futile mechanisms occurring at high dissolved oxygen concentrations. Consequently, loss of productivity was explained by higher respiratory activity of the mitochondria.

It was then proposed to calculate the effect on  $J_{NADH_2}$  values, which were determined as a function of  $C_{O_2}$  values. This was then introduced in a kinetic growth model, and used to explain the discrepancy in performances observed between two different PBR geometries (torus and flat panel airlift PBR). This was explained as a result of the difference in aeration performances. By maintaining similar dissolved oxygen concentration, equivalent surface productivity were observed, in agreement with the light limited growth principles. Finally, our analysis was extended to various geometries of microalgae culture systems, emphasizing the capacity of different PBR geometries to accumulate dissolved oxygen concentrations.

---

# Chapitre 4

---

## *Etude de l'impact d'une fraction sombre dans un photobioréacteur.*

Ce chapitre étudie l'influence pour la microalgue *Chlorella vulgaris* de la présence d'une fraction sombre dans un PBR sur la productivité en biomasse. Un PBR Airlift de 1 litre a ainsi été modifié afin d'obtenir une fraction sombre allant de 0 à 30% du volume total du PBR. Le PBR a été utilisé en mode chémostat pour une intensité lumineuse égale à  $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Pour *Chlorella vulgaris*, deux milieux contenant des sources d'azote différentes ont été utilisés, à savoir le milieu Sueoka contenant l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et le milieu Bold Basal Medium (BBM) contenant du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Pour chaque cas, une analyse détaillée des termes liés à la production et à la consommation d'oxygène dissous a été menée. Les résultats montrent que le volume de la fraction sombre et le temps de séjour de la biomasse dans la fraction sombre affectent la productivité de la biomasse. La concentration d'oxygène dissous dans le PBR n'a cependant pas présenté une influence significative sur la productivité en biomasse dans ce genre de PBR. Par contre, l'activité respiratoire est modifiée selon les paramètres appliqués, et notamment le temps passé en partie sombre du PBR. Un modèle dynamique permettant de représenter l'influence sur l'activité respiratoire du passage entre les parties éclairées et sombres du système a donc été proposé.

## IV. Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors

---

### IV.1 Introduction and objectives

Photosynthetic microalgae growth is based on the assimilation of inorganic carbon source ( $\text{CO}_2$ ) and mineral nutrients under illumination. These microorganisms are present in the nature (lagoon, lake), and they can be cultivated in open culture systems such as raceway and closed systems such as photobioreactors. The latter have been widely studied vastly in literature. A wide variety of photobioreactor (PBR) designs exist including tubular, cylindrical and flat panel systems (section I.5). The general aim is to maximize biomass productivity by optimizing light capture while satisfying other practical constraints related to microalgae strain (temperature, pH, medium, biological contamination ...).

Optimizing performances of a given microalgae culture system consist of enhancing operation parameters such as pH, temperature, dissolved oxygen concentration, residence time, mixing and light attenuation conditions. The engineering itself plays also a key-role (section I.4). Pruvost et al. (2016) studied in detail the effect of relevant engineering parameters on PBR performances. In their study, they emphasized the role of engineering parameters affecting the ability of the PBR to collect light, like its specific illuminated area  $a_{\text{light}}$ . The role of the design dark fraction  $f_d$  that can be encountered in some cases was also mentioned. The design dark fraction reflects here to unlit fractions of a culture system, as obtained when adding for example, a dark tank in the hydraulic loop for temperature or pH regulation, or for mixing purposes. AlgoFilm<sup>®</sup> technology (Pruvost et al. 2017), and several industrial systems like horizontal photobioreactors (Algatechnologies, Israel and A4f, Portugal) present in their design a design dark fraction (Figure IV-1). In some cases, this could represent more than 20% of the PBR illuminated volume. In Pruvost et al. (2016), it has been hypothesized that a design dark fraction has a high influence in biomass productivities; a dark fraction volume of 20% can decrease PBR productivities by a factor of 2 for *Chlorella vulgaris*. Nevertheless, these results were preliminary estimations, and were found dependent of the impact on the engineering itself (i.e: decrease of light-activated volume) and also of the metabolic response that could occur in the dark loop leading to biomass loss by respiration activity for example.

PBR modeling is useful in that regard, as it allows relating engineering and operating parameters to culture system performances. One of the key element is to have a kinetic growth model to predict biomass growth rate as a function of culture conditions (Takache et al. 2012; Pruvost et al. 2012; Souliès et al. 2016). This is well-known that for microalgae cells, photosynthetic activity is highly related to the light received, which is not homogeneously distributed in the culture volume due to the light attenuation that can occur. These authors presented then a formulation for the lighted part of the PBR, including prediction of dark zones that can be generated by high biomass concentration and then light attenuation conditions. But this was not validated for geometries presenting design dark volumes, where full darkness occur and where cells can spend several minutes. In the lit part of the PBR, even if a dark zone occurs due to light attenuation along the culture depth, a low light absorption is still present (Souliès et al. 2016). In addition, due to mixing, the residence time in that zone is below 1 minute (few seconds in general) (Janssen 2002). As a result, the heterogeneous light radiation field in the PBR can be related to a local photosynthetic growth rate, as represented for example by the local specific rate of oxygen production or consumption  $J_{O_2}$  (Takache et al. 2012).



*Figure IV-1: Photos of lab scale and industrial photobioreactor presenting a design dark fraction.*

This study investigates the impact of design dark fraction on PBR productivity of the eukaryotic microalgae *Chlorella vulgaris* by introducing a dark recirculation loop in an airlift PBR. The effect of the volume of the dark loop and the residence time spent in this dark loop is investigated. Because of its direct influence on respiration activity, the influence of different

nitrogen source on *Chlorella vulgaris* growth is also characterized. The global effect of the dissolved oxygen concentration on PBR performance is also underlined. Finally, in order to establish a kinetic model for such operating conditions, the specific rate of oxygen consumption due to respiration activity  $\langle J_{O_{2resp}} \rangle$  is calculated. This allows us highlighting the effect of various conditions on the respiratory activity, opening also the possibility of the setting of a mathematical model able to predict biomass productivity loss in photobioreactors presenting dark fraction.

## IV.2 Methodology

### IV.2.1 Photobioreactor setup

A 1 liter airlift photobioreactor has been modified in order to add a dark recirculation loop with known volume and circulation velocity. Experimental setup is explained in details in chapter 2.

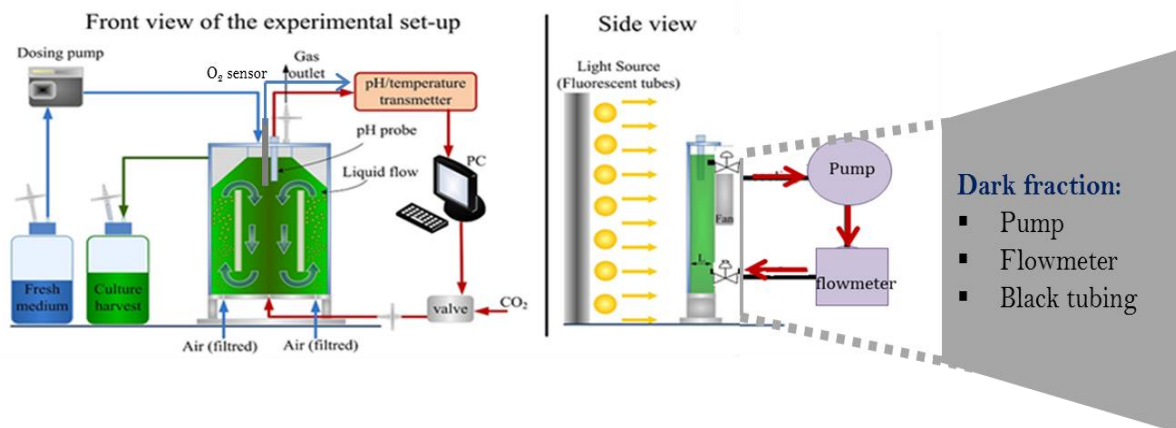


Figure IV-2: Experimental setup of the photobioreactor presenting a design dark fraction

The system is composed of 2 parts: i) the airlift photobioreactor which is always illuminated with continuous light ( $V_L = 10^{-3}m^{-3}$ ) and ii) the dark fraction (not illuminated volume) constituted of plastic insets in the back of the photobioreactor connected to a black tube to generate a dark loop. The volume of the dark loop was modified by changing the length of the tube leading to different values of the dark fraction ( $f_d$ ). Mixing in the airlift part was ensured by the airlift system (air bubbled in the system). A pump was used for tricking out microalgae from the PBR to the dark loop. The flowrate in the dark recirculation loop was modified to make microalgae experienced different residence time ( $t_d$ ) in the dark fraction.



As a first step, microalgae were grown in continuous mode with a photon flux density (PFD) of  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and a dilution rate  $D$  of  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . Once steady state was reached, samples were taken and dry biomass concentration was determined in addition of pigment contents. Inorganic carbon was also measured. Then the dark loop was connected. In this case, microalgae experience an illuminated period (in the PBR illuminated volume) for a while and dark period (in the dark loop) for a known residence time ( $t_d$ ). Once steady state was again reached, same measurements as described above were done.

#### **IV.2.2 Validation of the dark recirculation loop on cells mechanical integrity**

In the experimental setup presented in Figure IV-2, the peristaltic pump was used in order to modify the recirculation time of the microalgae in the design dark fraction. This pump was found to have a negligible shear stress effect in *Arthrospira platensis* (Le Borgne 2011). Because species present different sensitivity to shear stress, its effect was preliminary investigated for *Chlorella vulgaris*, to verify that results were only related to the effect of time spent in the dark volume. For that purpose, three microalgae samples were analyzed: i) one sample taken from the photobioreactor before connecting the dark fraction (i.e microalgae are not exposed to pumping yet), ii) a second sample taken from the photobioreactor after connecting the dark loop (i.e microalgae were exposed to the pump) and finally iii) a third sample taken after grinding the microalgae (this case is taken as an extreme case helping us to compare results between the first two samples). Pictures were obtained thanks to a microscope (Zeiss Axio scope A1) and image analyses was done thanks to Imagej software (Image Processing and Analysis in Java, Wayne Rasband NIH). The latter gives the minimal and maximal Ferret radius of the microalgae enabling to calculate the equivalent radius ( $r_{eq}$ ) as described in Dauchet et al. (2015). Results are presented in Figure IV-3. No significant shear stress effect of this pump on *Chlorella vulgaris* strain was observed.

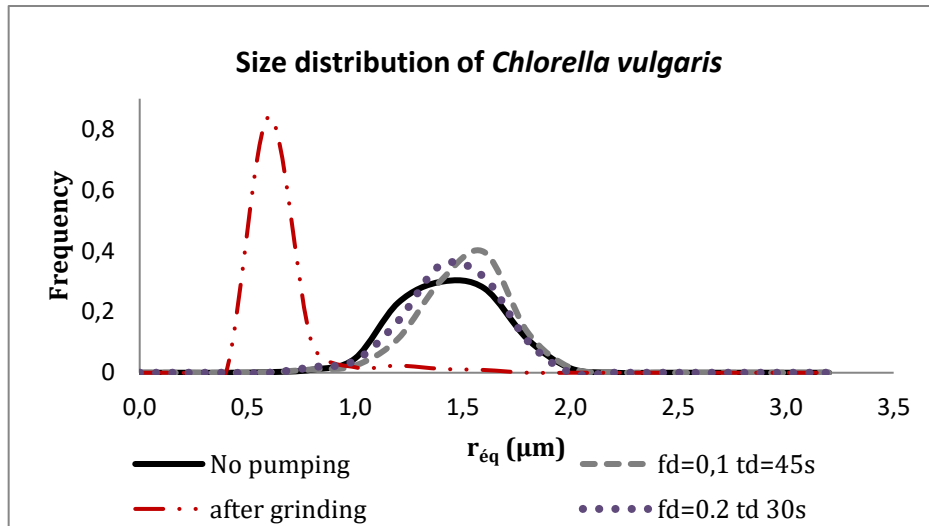


Figure IV-3: Size distribution of *Chlorella vulgaris* while exposed to the peristaltic pump, after grinding and for different exposure to pump flows (different design dark fraction cases)

#### IV.2.3 Strains and culture medium:

*Chlorella vulgaris* CCAP 211-19 is the eukaryotic microalgae cultivated in this study. Its optimal culture parameters are well known and vastly studied (A. Richmond 2004). It can be cultivated in different media with different nitrogen source. In this study, *Chlorella vulgaris* was cultivated in two different autotrophic media: the Sueoka medium using  $\text{NH}_4^+$  as nitrogen source and BBM (Bold Basal Medium) using  $\text{NO}_3^-$  as a nitrogen source. Sueoka medium was composed of (g/L) :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.45,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.281,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.609,  $\text{NaHCO}_3$  1.68 and 1 mL of Hutner's trace element solutions. BBM (Bold Basal Medium) was composed of g/L:  $\text{NaNO}_3$  0.75,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.225,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.025,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.123,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.014,  $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{NaHCO}_3$  1.68 and 2 ml of oligoelements solutions.

#### IV.2.4 Biomass analysis

##### 1. Biomass Dry weight concentration

Depending on the cell concentration, 0.4–10 mL of algal suspension was filtered through a pre-dried pre-weighed glass fiber filter (Whatman GF/F, 0.7  $\mu\text{m}$ ). Biomass concentrate was washed with distilled water to eliminate minerals. The filter was dried at 110°C for 24 h, cooled in a desiccator and reweighed. The final value was the average of three replicates.

## 2. Pigment contents

Culture samples of volume  $V_1$ , were centrifuged (13400 rpm, 10min, 4 °C). The pellet was then suspended in  $V_2$  mL of methanol and then stored in darkness at 44 °C during 45 to 180 mn to allow complete extraction. The cell fragments were then separated by centrifuging (13400 rpm, 10 min, 4 °C) and the optical density of the supernatant containing the pigments dissolved in methanol was measured with a spectrophotometer at 480, 652, 665 and 750 nm (Jenway, England or Safas MC2, Monaco). Three replicates were prepared, and the chlorophyll a, b and photoprotective carotenoids (PPC) were determined using the following relationships (Ritchie 2006) :

$$C_{Chla} = [-8.0962(DO_{652} - DO_{750}) + 16.5169 (DO_{665} - DO_{750})] \times V_{methanol}/V_{culture} \quad Eq IV-1$$

$$C_{Chlb} = [27.4405(DO_{665} - DO_{750}) + 12.1688 (DO_{665} - DO_{750})] \times V_{methanol}/V_{culture} \quad Eq IV-2$$

$$C_{PPC} = [4(DO_{480} - DO_{750})] \times V_{methanol}/V_{culture} \quad Eq IV-3$$

Inorganic carbon concentration was determined in the medium thanks to a COTmeter (SHIMADZU TOC5000A, Japan) and dissolved oxygen concentration was measured thanks to an oxygen sensor located in the top of the photobioreactor (Pyro science FirestingO<sub>2</sub>-Mini, Pyro science sensor technology GmbH, Germany).

### IV.3 Theoretical consideration

#### IV.3.1 Dark fraction and residence time

Figure IV-4 gives an overview of the experimental setup. Dark fraction ( $f_d$ ) and residence time ( $t_d$ ) are calculated as following:

$$f_d = \frac{V_d}{V_d + V_L} \quad Eq IV-4$$

$$t_d = \frac{V_d}{Q} \quad Eq IV-5$$

$$t_L = \frac{V_L}{Q} \quad Eq IV-6$$

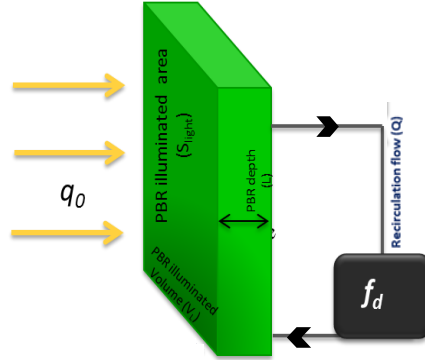


Figure IV-4: Schematic representation of the pilot used in this study

$f_d$  is a ratio expressed in this study in percentage of the photobioreactor volume.  $t_d$  (s) is the residence time spent by the microalgae in the dark volume  $V_d$  ( $m^3$ ), and is proportional to the dark volume itself and dependent on the recirculation flow rate  $Q$  ( $m^3/s$ ).  $t_L$  is the time spent by the microalgae in the light fraction. It is proportional to the illuminated volume (the volume of the PBR) and dependent on the recirculation flow. Note however that this was not possible to determine accurately  $t_L$ . The illuminated volume can indeed be considered as a well-mixed volume, with then a large set of residence time. This was not the case in the dark volume, where the tubing flow can be considered in first instance as a plug flow with then homogeneous residence time, corresponding to  $t_d$ , the time spent in the dark loop.

This is also of interest to introduce the specific illuminated surface to volume ratio ( $a_{light}$ ) given as follow:

$$a_{light} = \frac{S_{light}}{V_L} = \frac{1}{L} \quad Eq IV-7$$

where  $S_{light}$  represents the illuminated area of the PBR ( $m^2$ ) and  $V_L$ , the volume of the illuminated photobioreactor ( $m^3$ ).  $L$  represents the depth of the photobioreactor (m) (Figure IV-4).

### IV.3.2 Volumetric and surface productivity

In the case of a culture system operated in continuous mode and with constant light, a steady state can be achieved. Thus, the biomass volumetric productivity ( $P_X$ ) is equal to the biomass growth rate ( $\langle r_X \rangle$ ):

$$\frac{dC_X}{dt} = 0 \rightarrow \langle r_X \rangle = D \cdot C_X = \frac{1}{\tau} \cdot C_X = P_X \quad \text{Eq IV-8}$$

where  $D$  is the dilution rate ( $\text{h}^{-1}$ ) and  $\tau$  the residence time (h),  $C_X$  is the biomass concentration in  $\text{kg}/\text{m}^3$  and  $P_X$  is the volumetric productivity in  $\text{Kg}/\text{m}^3/\text{h}$ .

The volumetric productivity ( $P_X$ ) is related to surface productivity by the illuminated surface to volume ratio  $a_{\text{light}}$  as follow:

$$P_S = \frac{P_X}{a_{\text{light}}} \quad \text{Eq IV-9}$$

The effect of design dark fraction was introduced by Cornet et Dussap (2009) who introduce an engineering formulae to calculate maximal performances of any PBR:

$$\overline{P_{X_{max}}} = a_{\text{light}}(1 - f_d)\overline{\phi}'_X \cdot \rho_{MAX} \cdot M_X \frac{2\alpha}{1+\alpha} K \ln \left[ 1 + \frac{q_0}{K} \right] \quad \text{Eq IV-10}$$

In this equation,  $\overline{\phi}'_X, \rho_{MAX}, K, \alpha$  represent parameters related to the cultivated species (details in these parameters are given in the next section).  $a_{\text{light}}, f_d$  represents parameters related to PBR geometry. The influence of the design dark fraction  $f_d$  is then considered. According to this rule, a productivity loss directly proportional to the non-productive dark volume can be assumed (i.e a value  $f_d = 30\%$  for example should lead to 30% loss in productivity). Note that, even if an additional loss of performance is induced by for example increasing respiration rates (as shown later), this equation is still valid. By definition, its aim is indeed to estimate maximal performance of any culture system.

### IV.3.3 Light-limited growth and the concept of working illuminated volume fraction

Many authors introduced the concept of illuminated volume fraction  $\gamma$  as a simple way to relate the light absorption conditions to resulting PBR biomass productivity (Cornet et Dussap 2009; Takache et al. 2012). It is a dimensionless quantity that can be expressed as:

$$\gamma = \frac{z(\mathcal{A}_c)}{L}$$

Eq IV-11

where  $z(\mathcal{A}_c)$  is the depth at which the rate of photon absorption ( $\mathcal{A}$ ) in the PBR is equal to the one achieved at the compensation point of photosynthesis of the species, named  $\mathcal{A}_c$ . The latter corresponds to the minimum amount of energy that is necessary to balance cell respiration or cell maintenance (i.e  $J_{O_2} = 0$ ). For information, Souliès et al. (2016) reported  $\mathcal{A}_c = 1200 \mu mol_{hv}/kg/s$  for *Chlorella vulgaris*.

An illumination fraction  $\gamma = 1$  corresponds to the case where the minimum value of RPA corresponds to  $\langle \mathcal{A}_c \rangle$  (which is generally achieved at the backwall of a flat panel PBR for example). This is the most efficient case as all the culture volume received sufficient light energy for positive growth, without dark zone where respiration activity prevails. As a consequence, this corresponds then to an average growth rate (or biomass productivity in continuous steady state) of the culture at its maximum (Pruvost et al. 2012).

On the other hand,  $\gamma < 1$  indicates the appearance of the so-called dark zone in the culture volume where  $\mathcal{A}_c(z) < \mathcal{A}_c$ , with then negative values of the local growth rate. Moreover,  $\gamma > 1$  corresponds to the hypothetical case where the photosynthesis compensation point is situated outside the PBR. In practice, this case is also associated with a loss of productivity, due to the underutilization of the incident PFD which is lost by light transmission and to excessive dissipation of light energy in antennae because of too large values of local photon absorption rates. All those conditions are summarized in Figure IV-5.

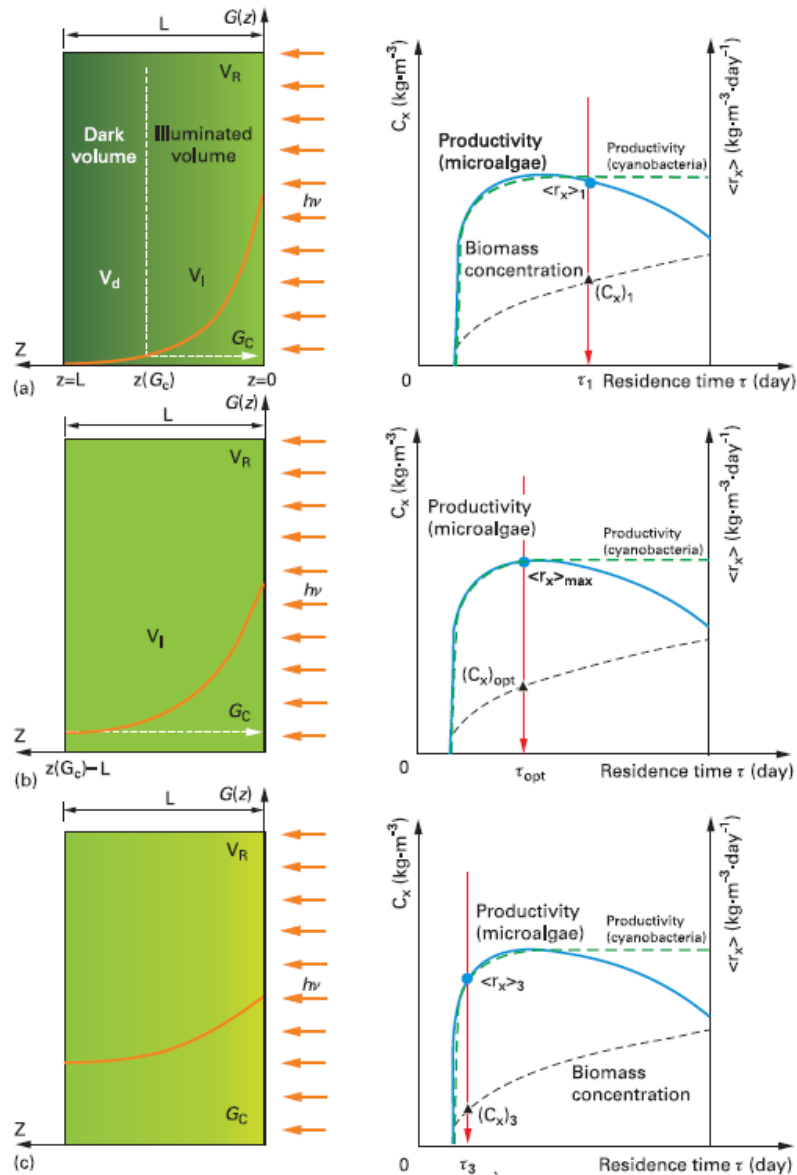


Figure IV-5: Schematic of the three regimes of illumination in microalgae cultures as a function of microalgae residence time  $\tau$  (Pruvost et Cornet 2012)

#### IV.3.4 Overview of the Kinetic growth model

Modelling photosynthetic microalgal growth has been widely studied (Béchet et al. 2013). Pruvost et al. (2012) proposed a model that relates light attenuation conditions to photosynthetic growth. It allows predicting photobioreactor performance or productivity variation for operating parameters affecting light-limited cultures (residence time, PFD...). This model is based on the determination of the local oxygen production rate ( $J_{O_2}$ ) that

requires the RPA (rate of photon absorption) field to be known. This RPA field is a function of PBR geometry, light source, cell optical properties and biomass concentration. In our case, light attenuation in the culture volume occurs mainly in one direction. It can then be modeled using the two-flux radiative model (Pottier et al. 2005; Pruvost et al. 2012). This allows predicting the irradiance field by:

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_{\lambda,0}} = 2 \frac{[\rho(1+\alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L} - (1-\alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L}]e^{\delta_\lambda L} + [(1+\alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L} - \rho(1-\alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L}]e^{-\delta_\lambda L}}{(1+\alpha_\lambda)^2 e^{\delta_\lambda L} - (1-\alpha_\lambda)^2 e^{-\delta_\lambda L} - \rho(1-\alpha_\lambda^2)e^{\delta_\lambda L} + \rho(1-\alpha_\lambda^2)e^{-\delta_\lambda L}} \quad \text{Eq IV-12}$$

In this equation,  $\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{Ea_\lambda}{Ea_\lambda + 2b_\lambda \cdot Es_\lambda}}$  is the linear scattering modulus, and  $\delta_\lambda = C_X \sqrt{Ea_\lambda (Ea_\lambda + 2b_\lambda \cdot Es_\lambda)}$  is the two-flux extension coefficient. These values are obtained from radiative properties of the cultivated cells, namely  $E_{a\lambda}$ ,  $E_{s\lambda}$  and  $b_\lambda$ , which are respectively the mass absorption coefficient, the mass scattering coefficient and the back scattered fraction here expressed for a given wavelength. Requested radiative properties could be predicted theoretically using pigment content and cell shape and size distribution (Pottier et al. 2005) or by experimental measurements (Kandilian et al. 2016).

The determination of the irradiance field enables us to calculate light absorbed by biomass, as represented by the specific rate of photon absorption  $\mathcal{A}$  (RPA). That represents the light effectively absorbed by the cells and it is then the combination of the light received as represented by the irradiance  $G$  ( $\mu\text{mol}_{\text{h}\nu}/\text{m}^2/\text{s}$ ) and the ability of the cells to absorb light, as represented by the mass absorption coefficient  $E_a$  ( $\text{m}^2/\text{kg}$ ). The specific RPA is then given by:

$$\mathcal{A} = E_a G \quad \text{Eq IV-13}$$

Note that the mean rate of photon absorption MRPA noted  $\langle \mathcal{A} \rangle$  could be also determined. This represents the value of RPA averaged over the culture volume. It can be obtained by a simple averaging of local value of RPA, or by performing a balance on the photonic phase onto the reaction volume (Pruvost et al. 2008). This balance leads to the following equation:

$$\langle \mathcal{A} \rangle = \frac{S}{V C_X} (q_0 - q_L) = \frac{a_{\text{light}}}{C_X} (q_0 - q_L) \quad \text{Eq IV-14}$$



where  $a_{light}$  represents the illuminated surface to volume ration in ( $m^{-1}$ ),  $C_X$  the biomass concentration in ( $kg/m^3$ ) and  $q_0, q_L$  the incident PFD received on the illuminated surface of the PBR and the one leaving the culture volume on PBR backside respectively ( $\mu mol/m^2/s$ ).

When all photons are absorbed in the PBR ( $q_L \approx 0$ ), previous equation can be simplified by :

$$\langle \mathcal{A} \rangle \approx \frac{q_0 a_{light}}{C_X} \quad Eq IV-15$$

We can note that this relation enables to calculate the MRPA from data which can be easily obtained in practice ( $q_0, a_{light}, C_X$ ).

Determining the local RPA makes it possible to predict the corresponding photosynthetic growth rate, here expressed as a rate of oxygen production  $J_{O_2}$  :

$$J_{O_2} = \rho_M \frac{K_A}{K_A+A} \bar{\Phi}'_{O_2} \mathcal{A} - \frac{J_{NADH_2}^l}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \frac{Kr}{Kr+A} \quad Eq IV-16$$

where  $\rho$  is the energy yield for photon conversion of maximum value  $\rho_M$ ,  $\bar{\Phi}'_{O_2}$  ( $mol_{O_2}/\mu mol_{hv}$ ) is the molar quantum yield for the Z-scheme of photosynthesis as deduced from the structured stoichiometric equations,  $K_A$  ( $\mu mol_{hv}.kg^{-1}.s^{-1}$ ) is the half saturation constant for photosynthesis,  $J_{NADH_2}^l$  ( $mol_{NADH_2}.kg^{-1}.s^{-1}$ ) is specific rate of cofactor regeneration on the respiratory chain in the light, here linked to oxygen consumption by the stoichiometric coefficient  $v_{NADH_2-O_2}$  (the stoichiometric coefficient of cofactor regeneration on the respiratory chain),  $K_r$  ( $\mu mol_{hv}.kg^{-1}.s^{-1}$ ) is the half saturation constant describing the inhibition of respiration in light.

As a direct result of the light distribution inside the culture volume, the kinetic relation is of local type. This implies calculating the corresponding mean value ( $\langle J_{O_2} \rangle$ ) by averaging over the total culture volume  $V_R$ :

$$\langle J_{O_2} \rangle = \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} J_{O_2} dV_R \quad Eq IV-17$$

Consequently, the mean volumetric biomass growth rate  $\langle r_X \rangle$  can be deduced by:

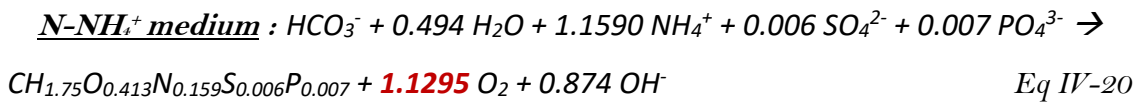
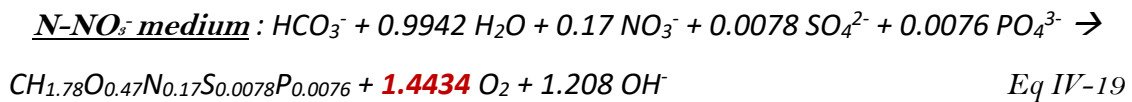
$$\langle r_X \rangle = \frac{\langle J_{O_2} \rangle C_X M_X}{v_{O_2-x}} \quad \text{Eq IV-18}$$

where  $M_X$  is C-molar mass of the biomass (kg/mol) and  $v_{O_2-x}$  the stoichiometric coefficient of oxygen production.

Finally, once the mean volumetric growth rate is known, the resolution of the mass balance equation for biomass lets us calculate the biomass concentration and productivity as a function of operating parameters (PFD, D) (Eq IV-8).

#### IV.3.5 Parameters of the kinetic growth model in different Nitrogen source media

As described in Takache et al. (2012), parameters in Eq IV-16 are divided into two groups: parameters that can be determined by using a fully predictive methodology, and parameters that have to be determined experimentally. Moreover, this study investigates the influence of nitrogen source on the biomass productivity in photobioreactors with design dark fraction. For ammonium based medium N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, kinetic growth model parameters were determined for *Chlorella vulgaris* by Souliès et al. (2016). For nitrate based medium N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, the parameter related to the stoichiometric equation ( $\overline{\varphi'_{O_2}}$ ) was recalculated. As determined in chapter 2, section II.5.3, the stoichiometric equations of biomass synthesis in nitrate based medium and ammonium N-source medium are the following:



Eq IV-19 and Eq IV-20 show that for different nitrogen source the coefficient of oxygen production ( $v_{O_2-x}$ ) was not the same. In the case of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> medium, *Chlorella vulgaris* produce more oxygen (1.44 mol<sub>O<sub>2</sub></sub>/mol<sub>biomass</sub>) than in the case of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> medium (1.13 mol<sub>O<sub>2</sub></sub>/mol<sub>biomass</sub>). As a result, the quantum yields for the Z-scheme of photosynthesis ( $\overline{\Phi'_{O_2}}$ ) for both media were different, and are given as follow:

**N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> medium:** ( Cornet et Dussap 2009)

$$\bar{\phi}'_{O_2} = 1.1 \cdot 10^{-7} \text{ mol}_{O_2}/\mu\text{mol}_{hv} \quad \text{Eq IV-21}$$

$$\bar{\phi}'_{O_2} = \frac{1.1 \cdot 10^{-7}}{\nu_{O_2-x}} = 9.73 \cdot 10^{-8} \text{ mol}_X/\mu\text{mol}_{hv} \quad \text{Eq IV-22}$$

$$\bar{\phi}'_{O_2} = 9.73 \cdot 10^{-8} \times M_X = 2.33 \cdot 10^{-9} \text{ Kg}_X/\mu\text{mol}_{hv} \quad \text{Eq IV-23}$$

Following the same approach described by authors for N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> medium, the quantum yields for N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> medium are the following:

**N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> medium:**

$$\bar{\phi}'_{O_2} = 1.1 \cdot 10^{-7} \text{ mol}_{O_2}/\mu\text{mol}_{hv} \quad \text{Eq IV-24}$$

$$\bar{\phi}'_{O_2} = \frac{1.1 \cdot 10^{-7}}{\nu_{O_2-x}} = 7.14 \cdot 10^{-8} \text{ mol}_X/\mu\text{mol}_{hv} \quad \text{Eq IV-25}$$

$$\bar{\phi}'_{O_2} = 7.14 \cdot 10^{-8} \times M_X = 1.71 \cdot 10^{-9} \text{ Kg}_X/\mu\text{mol}_{hv} \quad \text{Eq IV-26}$$

According to these equations, one absorbed photon in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> medium is converted to 25% more biomass (2.33 · 10<sup>-9</sup> Kg<sub>X</sub>/μmol<sub>hv</sub>) than in N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> medium (1.71 · 10<sup>-9</sup> Kg<sub>X</sub>/μmol<sub>hv</sub>). This theoretical estimation will be verified experimentally in next sections.

#### **IV.3.6 Adaptation of the model to photobioreactors presenting a design dark fraction**

In the case of photobioreactors presenting design dark fraction, the overall volume of the PBR  $V_R$  can be divided into two different volumes, with namely the volume of the illuminated PBR ( $V_L$ ) and the volume of the dark fraction ( $V_D$ ). Both are related to the design dark fraction  $f_d$  and total culture volume  $V_R = V_D + V_L$ , with  $V_L = (1 - f_d) \cdot V_R$  and  $V_D = f_d \cdot V_R$ .

In the illuminated volume  $V_L$ , local values of the photosynthetic growth rate are calculated following Eq IV 16. Therefore,

$$J_{O_2}^l = J_{O_2 photo}^l - J_{O_2 resp}^l \quad \text{Eq IV-27}$$

where local values of the oxygen production rate due to photosynthesis are given by

$$J_{O_2 photo}^l = \rho_M \frac{K_A}{K_{A+}} \overline{\phi'_{O_2}} \quad \text{and the oxygen consumption rate due to respiration at light is}$$

given by  $J_{O_2 resp}^l = \frac{J_{NADH_2}^l}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \frac{Kr}{K_{r+}}$  (Eq IV 16).

The corresponding averaged value on the illuminated volume is then given by:

$$\langle J_{O_2} \rangle_L = \frac{1}{V_L} \iiint_{V_L} J_{O_2}^l dV_L = \langle J_{O_2 photo}^l \rangle_L - \langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L \quad \text{Eq IV-28}$$

In the dark volume, no photosynthesis will occur with then only a contribution of respiration activity. We can also assume in first instance an homogenous value of this respiration activity noted  $\langle J_{O_2 resp} \rangle_D$  (with  $\langle J_{O_2 resp} \rangle_D > 0$ ). Note that this value could be different as the one achieved in the light  $\langle J_{O_2 resp} \rangle_L$ , as full darkness is here applied. This would be then related to a different value of  $J_{NADH_2}$ , noted  $J_{NADH_2}^D$  ( $J_{NADH_2}^l$  for the illuminated volume).

Finally, Eq IV-17 can be rewritten to represent overall oxygen production rate in the total culture system  $V_R = V_D + V_L$ .

$$\langle J_{O_2}^t \rangle = (1 - f_d) \cdot \langle J_{O_2} \rangle_L - f_d \cdot \langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D = (1 - f_d) \cdot (\langle J_{O_2 photo}^l \rangle_L - \langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L) - f_d \langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D \quad \text{Eq IV-29}$$

### IV.3.7 Calculation of respiration terms in Ammonium Medium N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

As shown in the previous section, respiration activity can have different contributions in the dark and illuminated and dark volume. The kinetic growth model allows calculating corresponding respiration terms. We denote by respiration terms the specific rate of oxygen consumption i) in the light so in the illuminated PBR  $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$ , ii) in the dark fraction  $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  and iii) on the overall culture system  $\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$ .

Similarly to Eq IV-17, those terms are related by:

$$\langle J_{O_2 resp}^t \rangle = (1 - f_d) \langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L - f_d \langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D \quad Eq IV-30$$

where  $\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$  is the total respiratory activity on the overall system, that is the result then of a respiratory activity in the illuminated volume ( $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$ ) and of a respiratory activity in the dark fraction ( $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$ ).

$\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$  is calculated from the kinetic model using Eq IV 27. It corresponds to the average value in the illuminated volume  $J_{O_2 resp}^l = \frac{J_{NADH_2}^l}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \frac{Kr}{Kr+A}$  in the equation (Eq IV 28) .  $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  cannot be determined directly, but it can be deduced from experimental data. In steady state, while dark fraction is connected, experimental volumetric productivity  $P_X$  is measured and corresponding rate of net oxygen production  $\langle J_{O_2} \rangle$  can then be deduced by using Eq IV 18 ( $\langle r_X \rangle = P_X$  at steady state). Once  $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$  is known,  $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  could then be retrieved from Eq IV-30. This leads to:

$$\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D = \frac{1}{f_d} \left[ (1 - f_d) \langle J_{O_2} \rangle_L - \frac{P_X \cdot v_{O_2-x}}{C_X \cdot M_X} \right] \quad Eq IV-31$$

As described in the kinetic growth model formulation (Eq IV-16), respiration rates are directly related to the rate of cofactor regeneration  $J_{NADH_2}$ . In fact, this term could be affected by a change in cell energetics, as it could be induced by environmental conditions, namely light in the illuminated volume, and dark in the design dark fraction. It was then retained to express in the kinetic formulation the possible effect of the dark/illuminated fraction on this term. Following kinetic formulation, this rate  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  is directly related to respiration rate:

$$\langle J_{O_2 resp} \rangle = \frac{1}{V} \cdot \frac{\langle J_{NADH_2} \rangle}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \left\langle \frac{Kr}{Kr+A} \right\rangle \quad Eq IV-32$$

In the dark fraction, the photon rate absorption  $\mathcal{A} = 0$ , leading to:

$$\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D = \frac{\langle J_{NADH_2}^d \rangle}{v_{NADH_2-O_2}} \quad Eq IV-33$$

In the illuminated system,  $\mathcal{A}(z) \neq 0$ . In this case:

$$\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L = \frac{1}{V_L} \cdot \frac{\langle J_{NADH_2}^l \rangle}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \int \frac{Kr}{Kr + \mathcal{O}_2} \cdot dV = \frac{\langle J_{NADH_2}^l \rangle}{v_{NADH_2-O_2}} \cdot \langle \frac{Kr}{Kr + \mathcal{O}_2} \rangle_{V_L} \quad Eq IV-34$$

Finally, on the overall volume we can obtain:

$$\langle J_{O_2 resp}^t \rangle = (1 - f_d) \frac{\langle J_{NADH_2}^l \rangle}{v_{NADH_2-O_2}} \langle \frac{Kr}{Kr + \mathcal{O}_2} \rangle + f_d \cdot \frac{\langle J_{NADH_2}^d \rangle}{v_{NADH_2-O_2}} \quad Eq IV-35$$

$$\langle J_{O_2 resp}^t \rangle = (1 - f_d) \langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L + f_d \langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D \quad Eq IV-36$$

$\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  is obtained by Eq IV-31, and  $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$  is obtained from Eq IV-27.

### IV.3.8 Experimental determination of respiration terms

As described in section IV.3.7, respiration terms can be calculated from the kinetic growth model. In this paper, these terms were calculated from experimental Data as follow:

$$\langle J_{O_2}^t \rangle = \langle J_{O_2 photo}^t \rangle - \langle J_{O_2 resp}^t \rangle \quad Eq IV-37$$

where  $\langle J_{O_2}^t \rangle$ , the total mean rate of oxygen production in all the system. It could be calculated once the mean volumetric growth rate was determined in steady state and continuous mode (Eq IV-8). Then following Eq IV-18,  $\langle J_{O_2}^t \rangle$  could be retrieved.  $\langle J_{O_2 photo}^t \rangle$ , the mean rate of oxygen production in all the system due to photosynthesis could be calculated as following:

$$\langle J_{O_2 photo}^t \rangle = (1 - f_d) \langle J_{O_2 photo}^l \rangle_L - f_d \langle J_{O_2 photo}^d \rangle_D \quad Eq IV-38$$

where  $\langle J_{O_2 photo}^l \rangle_L$ , the mean rate of oxygen production in the illuminated part of the system (the PBR). It could be calculated from the kinetic growth model ( $\langle J_{O_2 photo}^l \rangle_L = \rho_M \frac{K_A}{K_A + A} \bar{\Phi}'_{O_2} \mathcal{O}_2$ ).  $\langle J_{O_2 photo}^d \rangle_D$ , the mean rate of oxygen production rate in the dark part of the system (the dark fraction). In the letter, microalgae are in the total dark, so photosynthesis could not occur, as a result  $\langle J_{O_2 photo}^d \rangle_D$  is equal to zero.

$\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$  was deduced from Eq IV-37, and finally, if we assume that the global rate of cofactor generation  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  has a constant value over the total volume, it could be calculated as follow:

$$\langle J_{NADH_2} \rangle = \langle J_{O_2 resp}^t \rangle \cdot v_{NADH_2-O_2} \left[ \frac{1}{(1-f_d) \left( \frac{Kr}{Kr+} \right) + f_d} \right] \quad Eq IV-39$$

### IV.3.9 Analogy to light/dark cycles

#### Preliminary investigation of the possible interaction of light/dark cycles induced by the dark loop with respiration activity

The light/dark cycles effect has been discussed in the context of mixing influence on photosynthetic conversion (Janssen 2002; Takache et al. 2015; Pruvost et al. 2015). As a result of biomass concentration increase, a dark zone appears and due to mixing regime, algae travel through the dark and the illuminated zone, and will then experience a fluctuating light regime called light/dark cycle, that could interact with photosynthetic reaction time scales.

In our study, cells were circulated between an illuminated volume  $V_L$  and a dark volume  $V_D$ . They experienced then an alternance between two different conditions, with biological responses interpreted in terms of an evolution of the rate of respiratory factor regeneration  $J_{NADH_2}$ . One can suppose that those rates could change in the light ( $J_{NADH_2}^l$ ) and in full darkness ( $J_{NADH_2}^d$ ), since respiratory activity is the predominant process in the dark.

As a first attempt to see if such coupling could occur, in a simple and conventional manner, we can consider that this coupling occur if the phenomena involved have time constants of the same order of magnitude. Cornet. (2007) presented a detailed analysis based on the use of the generalized Damköhler number  $Da_I$  defined as a ratio of the time characteristics of advection on that of the reaction.

dynamic process considered within the metabolism	$Da_1 = \frac{\tau_{advection}}{\tau_{reaction}}$	Phenomenon governing the process
Biomass growth rate	$10^{-5}$	Reaction
Minimal time scale for the linear thermodynamic use	$10^{-3}$	Reaction
Electron transfer chain. Pools ATP and NAD(P)/NAD(P)H <sub>2</sub> and their coupling photosynthesis/respiration	1	Coupling
Limiting steps for the excitations transfer in the photosynthetic units (UPS)	$10^6$	Hydrodynamics
Water photolysis in Photosystem II (oxygen production)	$10^{11}$	Hydrodynamics

*Table IV-1: Orders of magnitude of Damköhler numbers encountered in PBR for different dynamic processes of metabolism (these values are for agitated vessels). The phenomenon characterizing the limiting step governing the process is mentioned also (Cornet 2007)*

Table IV-1 presents an estimation of Damköhler numbers in a mechanically stirred reactor for different characteristic times of photosynthetic metabolism. A hydrodynamic coupling can occur if the Damköhler number is about 1 (in practice a range between 0.1 and 20 is more often mentioned). Thus, if a coupling between hydrodynamic and photosynthetic conversion exists, it should concern the electron transport and associated energy metabolites (ATP and nucleotides cofactors), which serve in particular to define quantum yield efficiency and/or respiration activity. In this case, it would be phenomena involved in the membranes of thylakoids or chloroplasts for photosynthesis or in mitochondria for respiration activity that can occur during passages from light to dark volumes. In other words, this analysis shows that the rate of cofactor regeneration  $J_{NADH_2}$  could be influenced by the circulation of cells from illuminated volume to dark loop of the PBR. Then,  $J_{NADH_2}$  could be a function of time ( $J_{NADH_2}(t)$ ).

### **Representation of the ideal time response**

Takache et al. (2015) investigated the effect of light/dark cycles for *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor culture. Response of the microalgae to this light fluctuations was explained according to Terry (1986) by introducing two main ideal responses; with full integration and without integration.



Following Terry's definition, for a response with full integration, the cells are not sensitive to light variations and the culture only perceives an average light. In this case changing residence time in the dark should not affect microalgae culture. Thus, respiration rate remains constant in this condition. Therefore, we can write:

$$\langle J_{NADH_2}^D \rangle = \langle J_{NADH_2}^L \rangle = \langle J_{NADH_2} \rangle = \overline{J_{NADH_2}} \quad Eq IV-40$$

where  $\overline{J_{NADH_2}}$  denotes a time averaged value of  $J_{NADH_2}$  ( $\langle \rangle$  denotes spatial averaged value). Conversely, if the culture instantaneously responds when moving from illuminated to dark volume, the response is named without integration and the resulting cofactor regeneration rate ( $J_{NADH_2}$ ) will be the average of the rates obtained for each volume with:

$$\overline{J_{NADH_2,wi}} = \frac{T_L}{T_L+T_D} \langle J_{NADH_2}^L \rangle + \frac{T_D}{T_L+T_D} \langle J_{NADH_2}^d \rangle \quad Eq IV-41$$

where  $T_L$  is the time spent by the microalgae in the illuminated zone and  $T_D$  represent the time spent by the microalgae in dark fraction. If we assume long circulation time, we can approximate residence time in each part of the PBR by its corresponding volume. Then, we obtain:

$$\overline{J_{NADH_2,wi}} = (1 - f_d) \langle J_{NADH_2}^L \rangle + f_d \langle J_{NADH_2}^d \rangle \quad Eq IV-42$$

Note that the distribution of residence time (DTS) in the system should be ideally considered to determine  $T_L$  and  $T_D$ . Our system can indeed be represented by two sub-systems; a plug-flow reactor representing the dark fraction and a continuous well-mixed stirred tank reactor representing the illuminated photobioreactor. In an ideal plug-flow reactor, all the microalgae cells will leave the dark fraction after exactly the same duration. In the opposite, in an ideal stirred reactor, cells will experience an infinite range of residence times. Moreover, when connecting the dark fraction to the PBR, this modifies then the overall hydrodynamics in the illuminated photobioreactor. For example, when pumped out from the photobioreactor to the dark fraction, all microalgae cells spent the same amount of time in this dark fraction. But when they will come back into the illuminated part, they will be completely mixed and some of the cells will leave it almost immediately, while others will remain in the illuminated part of the PBR for a larger time. Thus, if we assume that the successive displacement of each

cell from light to dark can have an impact on its photosynthetic conversion, the hydrodynamics as represented by the distribution of residence time (DTS) in each sub-part of the culture system could lead to a modification of the light used for growth. However, in our study, such detailed analysis was not conducted. This was considered in first instance a unique residence time in each of the subpart of the culture system, namely  $T_D$  for the dark loop and  $T_L$  for the illuminated part.

#### **IV.4 Results and discussion**

The global aim of the study was to investigate the impact of a design dark fraction on the biomass productivity of microalgae growth in PBR. For these reasons, different volumes of design dark fraction were investigated with different range of residence time in these dark volumes. Experiments were done for two different media with different nitrogen sources in order to underline the additional possible impact of this parameter, because of its direct effect on oxygen biological production. Dissolved oxygen ( $C_{O_2}$ ) concentration, as demonstrated in chapter 3, can lead to a growth inhibition for a certain concentration ( $C_{O_2} > 30\text{g/m}^3$ ). Those conclusions were taken into consideration in our experiments, as it could directly interact with the metabolic response in the dark fraction (i.e respiration activity). For each case, respiration activity was calculated to determine its possible modification due to the addition of the design dark fraction. First, results for ammonium medium in normal dissolved oxygen concentration ( $C_{O_2} < 30\text{g/m}^3$ ) will be presented; it will gather the impact of the volume of the design dark fraction on resulting PBR performance. The study will be next extended on a nitrate medium. The impact of high concentration of dissolved oxygen will be then presented for both media. Finally, an analogy with transient metabolic responses as obtained with light/dark cycles will be presented.

##### **IV.4.1 Effect of dark fraction on the growth of *Chlorella vulgaris* on ammonium medium and for low dissolved oxygen concentration ( $C_{O_2} < 30\text{g/m}^3$ ).**

###### ***Effect of Dark fraction on the biomass loss of Chlorella vulgaris***

For this study, the two dark fraction volumes investigated were 10% and 30% of the total volume of the photobioreactor.

Figure IV-6 shows a clear effect of the dark fraction on the surface biomass productivity of *Chlorella vulgaris* in Sueoka medium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). A loss of 28% and 40% on productivity was obtained for the same residence time in the dark loop ( $t_d = 45s$ ) and for  $f_d=10\%$  and 30% respectively (Table IV-2). For a  $t_d = 300s$ , 37% of productivity was lost for a  $f_d = 10\%$ , and 47% for an  $f_d = 30\%$ . In all cases, a high loss of biomass productivities was then obtained, higher than the one related to the only decrease of the photosynthetically active part of the total culture volume. Increasing the dark fraction leads indeed to an increase in the loss of productivity, with  $P_{X\ loss} > P_{X(f_d=0)}(1 - f_d)$  (Table IV-2). Our results confirm then that a design dark fraction leads to a negative impact on the microalgae growth due to the decrease of the illuminated part of the PBR (i.e  $1-f_d$ , Eq IV-10) with an additional metabolic process leading to a more important loss. This process could be an increase of the respiratory activity. This hypothesis will be further investigated in next section.

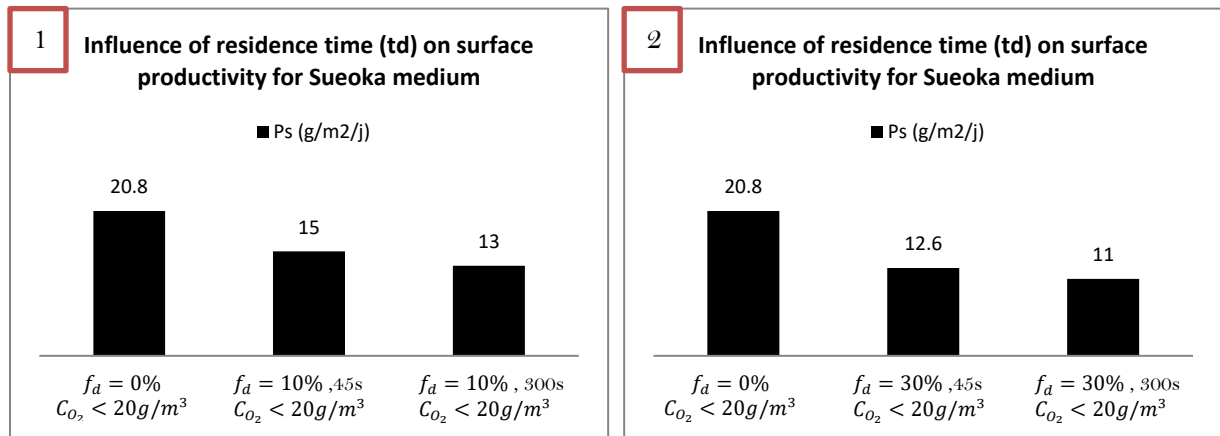


Figure IV-6 : Effect of dark fraction on photobioreactor productivity for *Chlorella vulgaris* in Sueoka (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) medium. PFD = 250 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s, D = 0.02h<sup>-1</sup>. (1) represents results for a dark fraction  $f_d = 10\%$  and (2) represents results for  $f_d = 30\%$ .

$f_d, t_d$	Nitrogen source	Condition of design dark fraction due to the only decrease of illuminated volume (Eq IV-10)	Experimental productivity loss
10%, 45s	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10%	28%
30%, 45s	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30%	40%
10%, 300s	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10%	37%
30%, 300s	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30%	47%

Table IV-2: Productivity loss for different conditions of design dark fraction.

**Respiratory activity for different dark fractions**

Respiration rates were calculated for each experiment.  $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$  was obtained from Eq IV 27,  $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  was obtained from Eq IV-31 and  $\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$  was obtained from Eq IV-36. These rates were determined for each design dark fraction volume  $f_d$  and residence time in the dark  $t_d$ .

$f_d$	$t_d$ (s)	Nitrogen source	$\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$ (moleO <sub>2</sub> /kg/h)	$\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$ (moleO <sub>2</sub> /kg/h)	$\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$ (moleO <sub>2</sub> /kg/h)	$P_s$ (g/m <sup>2</sup> /d)
0	0	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.2671	-	0.2671	21
30%	45	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.1315	1.0122	0.3957	12.6
30%	300	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.1618	1.4338	0.5434	11

Table IV-3: Respiratory activity of *Chlorella vulgaris* for a dark fraction  $f_d = 30\%$  in Sueoka medium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).  $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$  represents the respiratory activity in the illuminated photobioreactor,  $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  represents the respiratory activity in the dark fraction and  $\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$  the respiratory activity in the all system.

Table IV-3 shows a clear relation between the increase of respiration activity ( $\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$ ) and the loss of biomass productivity ( $P_s$ ). Increasing the residence time in the dark fraction leads to an increase of the respiration rates, leading to a decrease in surface productivity. Regarding the respiratory activity in light ( $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$ ), we can observe a decrease of respiration rate when adding a dark fraction. This is explained by a modification of light attenuation conditions because of the change in biomass concentration, as explained by the direct effect of both  $f_d$  and  $t_d$  on resulting productivity. Larger biomass concentration increase indeed light attenuation and then resulting respiration rates. So, when the design dark fraction was connected, the biomass concentration decrease resulted in a lower contribution of respiration activity in the illuminated part. This modification of attenuation light condition is also confirmed when calculating the illuminated fraction  $\gamma$  by Eq IV-11 (Table IV-4). The illuminated fraction also increases when the design dark fraction was connected.

But even if there is a decrease in  $\langle J_{O_2 resp}^l \rangle_L$ , the increase of  $\langle J_{O_2 resp}^d \rangle_D$  in the dark fraction was large, with a resulting contribution around 3 times higher than the one in the illuminated volume. This leads to an overall increase in respiration activity on the entire system  $\langle J_{O_2 resp}^t \rangle$  when the dark fraction was connected, explaining the loss of productivity then obtained.

$f_d$	$t_d$ (s)	Nitrogen source	$\gamma$	$P_s$ (g/m <sup>2</sup> /d)
0	0	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.5	21
30%	45	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.7	12.6
30%	300	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.8	11

Table IV-4: Determination of the illuminated fraction  $\gamma$  for  $f_d = 30\%$  for two dark residence times (45s and 300s).

#### IV.4.2 Effect of nitrogen source under non-inhibitory dissolved oxygen concentration

Figure IV-7 presents results obtained with nitrate-based medium (i.e BBM). Results show that in the case of photobioreactors without dark fraction, a higher productivity for ammonium medium was reached (Figure IV-6). Surface productivity  $P_s$  was around 20% higher in ammonium medium than in nitrate medium. This is indeed well known that ammonium uptake and assimilation request less cellular energy for its uptake (Podevin et al. 2015). When nitrate is used as a nitrogen source, the former is indeed first reduced to nitrite by an energy requiring reaction catalyzed by nitrate reductase followed by the reduction to ammonium by ATP-dependent or energy-dependent nitrite reductase where it is finally synthesized into amino-acids (Podevin et al. 2015; Kim et al. 2016, Sanz-Luque et al. 2015). This requests then more cellular energy than the direct assimilation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, resulting finally in a decrease in biomass productivity of around 20% when compared to a nitrate source for same illumination conditions. When adding the design dark fraction, we can observe that with  $f_d = 10\%$ , only a limited effect on the growth of *Chlorella vulgaris* was obtained. Initial productivity, where dark fraction was not connected was 17 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> and with the design dark fraction, the loss did not exceed 4%. We can note however that for a  $f_d = 20\%$ , 28% loss occurred for same duration in the design dark fraction.

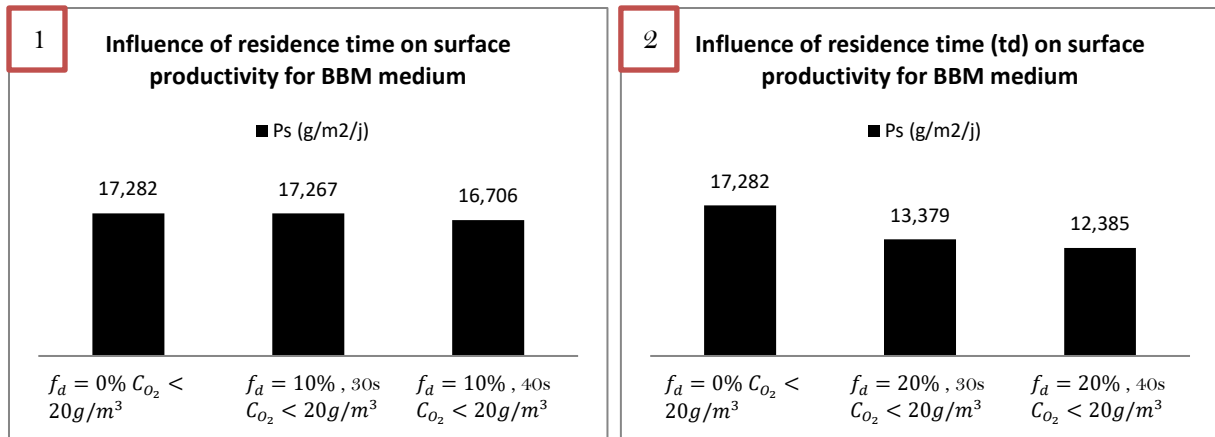


Figure IV-7: Effect of the dark fraction on photobioreactor productivity for *Chlorella vulgaris* in BBM (Nitrate) medium.  $PFD = 250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D = 0.02 \text{h}^{-1}$ . (1) represents results for a dark fraction  $f_d = 10\%$  and (2) represents results for  $f_d = 20\%$ .

In general manner, we can note that once the dark loop was connected, productivity loss in ammonium medium was found larger than with nitrate medium. At this stage this result is difficult to explain. One hypothesis should be a modification of the cellular energetics that could affect directly, or indirectly, the respiration activity. This is indeed also known that the N-source changes the yield of oxygen production per unit of biomass. So, this could also result in a different influence of the dark fraction on the overall metabolic response.

#### IV.4.3 Influence of dissolved oxygen concentration

Because of its direct effect on respiratory activity, two different DO concentrations were studied in order to investigate its possible effect in photobioreactors presenting design dark fraction. Following results obtained in chapter 3, a dissolved oxygen concentration  $C_{O_2} < 20 \text{g}/\text{m}^3$  was considered as non-inhibitory concentration while  $C_{O_2} > 20 \text{g}/\text{m}^3$  was considered as inhibitory concentration (Chapter 3). Note that experimental conditions were the same for each dark fraction: the only modified parameter was dissolved oxygen concentration which was varied by modulating the airflow in the input gas flow. For each case, the respiration activity as represented  $\langle J_{NADH_2} \rangle$ , was calculated as described in Eq IV-39.

Figure IV-8 presents surface productivities in ammonium medium for  $f_d = 0$  and  $f_d = 30\%$ , and for two dissolved oxygen concentrations.

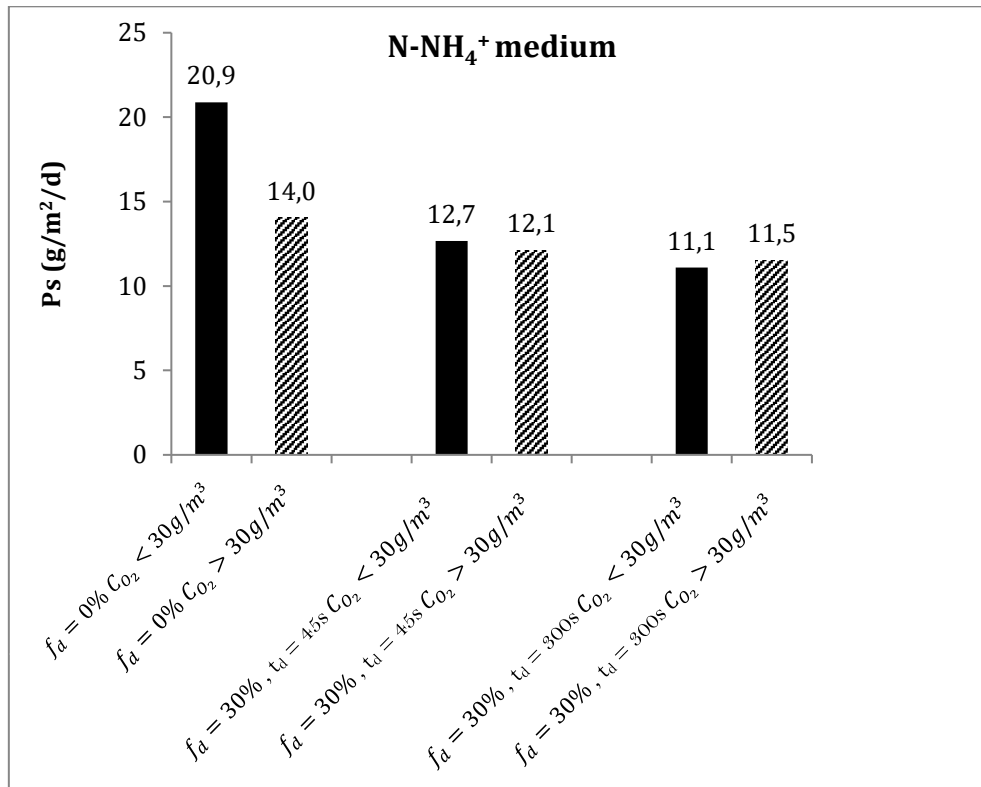


Figure IV-8: Surface productivity for  $f_d = 0$  and  $f_d = 30\%$  for two dissolved oxygen concentrations in ammonium N-source medium for *Chlorella vulgaris*.  $PFD = 250\mu mol/m^2/s$  and  $D = 0.02 h^{-1}$ .

**Results without dark fraction ( $f_d=0\%$ ):** Surface productivity at high dissolved oxygen concentration was lower than surface productivity for a dissolved oxygen concentration near air saturation;  $20.8 g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$  and  $14 g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$  for low  $C_{O_2}$  and high  $C_{O_2}$  were obtained respectively. This is in agreement with the negative impact of dissolved oxygen concentration observed in Chapter 3, where 30% loss of productivity in the torus photobioreactor was obtained. Repeating experiments in flat panel airlift PBR confirm that a similar loss is reached for the same dissolved oxygen concentration, and in the same conditions for the same microalgae strain. We can note that in the case of Nitrate N-source medium (BBM), this percentage of loss in the same conditions and same dissolved oxygen concentration was lower (15% loss) (Figure IV-9).

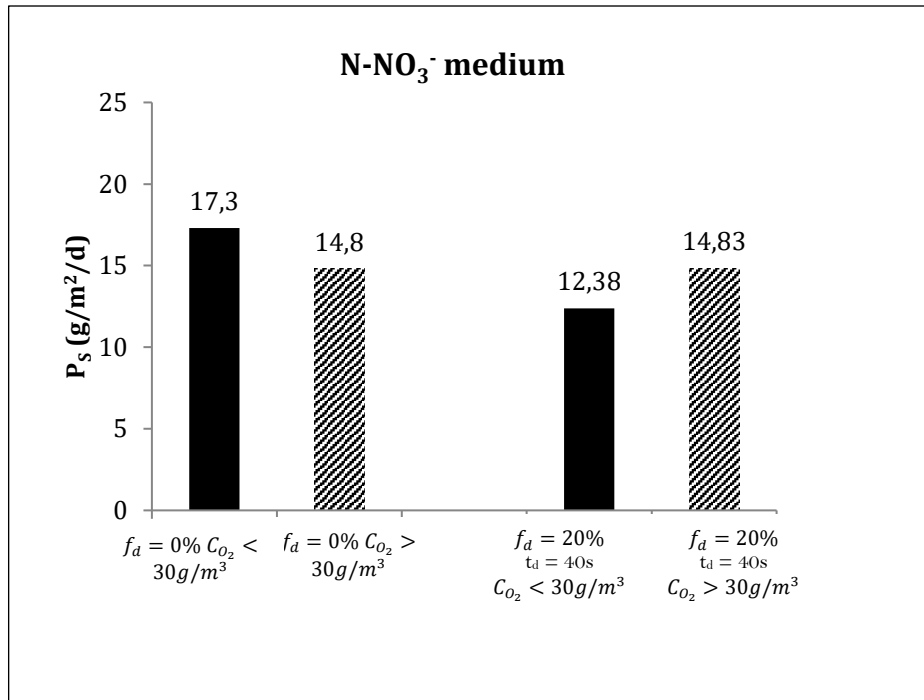


Figure IV-9: Surface productivity for  $f_d = 0$  and  $f_d = 20\%$  for two dissolved oxygen concentration in nitrate N-source medium for *Chlorella vulgaris*.  $PFD = 250\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  and  $D = 0.02\text{ h}^{-1}$ .

**Results with the dark fraction ( $f_d \neq 0\%$ ):** When the dark fraction was connected, a productivity loss occurred: in ammonium as N-source medium, and for a low dissolved oxygen concentration, the loss of productivity was significant (40% for  $f_d = 30\%$   $t_d = 45\text{s}$ ) as shown in Figure IV-8. In contrast, for a high dissolved oxygen concentration, productivity loss remained negligible (13% for  $f_d = 30\%$  and  $t_d = 45\text{s}$ ). Same observations could be drawn for the residence time  $t_d = 300\text{s}$ . For nitrate N-source medium (BBM), there was almost no loss in productivity while connecting the dark fraction at high dissolved oxygen concentration (Figure IV-9).

An important statement is that, whatever the media, high dissolved oxygen concentration did not show a significant negative influence on the PBR performance when connecting the dark fraction, in contrary to the case where the volume was fully illuminated. The loss of productivity was here mainly explained by the dark fraction itself, which increases respiration activity contribution onto the culture system, but with only a limited effect of dissolved oxygen concentration.



#### IV.4.4 Analogy to Light/Dark cycles

In photobioreactors with dark fraction, cells will circulate between an illuminated and a dark volume of the system. As shown previously with the time scale analysis (i.e Damköhler number), this can interact with the growth metabolism and especially respiratory activity. This observation tends to be confirmed by the variations in  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  values observed. A time evolution of  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  could then be expected when cells circulated from illuminated to dark volume of the PBR. To investigate this, we proposed an analogy to light/dark cycles effects. This phenomenon is usually applied to represent the effect of rapid variation in light as received by cells flowing along the light gradient in a dense culture, as induced by the mixing. Here, we applied the same concept but we considered that cells experienced a light period in the illuminated part of the system and then a dark period in the dark loop. The aim was to investigate if the loss of productivity could be determined by predicting time evolution of respiratory activity during those cycles (i.e. cells pass from light region to dark fraction). This was represented by introducing a dynamic formulation, as represented by  $J_{NADH_2}(t)$ . Note that spatially averaged values were known:  $\langle J_{NADH_2}^D \rangle$  was obtained using Eq IV-33 and  $\langle J_{NADH_2}^L \rangle$  was obtained using Eq IV-34 when dark fraction was not connected. The aim was then here to predict the averaged value  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  obtained in the total culture system, those values being also determined from experimental measurements Eq IV-37, by time averaging the time evolution of  $J_{NADH_2}(t)$  as obtained by assuming a cell displacement in each part of the culture system.

$f_d$	$t_d$ (s)	$Da_I$	$\langle J_{NADH_2} \rangle$
0	0	-	1.81
30%	45	0.32	4
30%	300	0.3	6
10%	45	0.16	2
10%	300	0.27	3

Table IV-5: Damköhler number and

$\langle J_{NADH_2} \rangle$  calculated for different  $f_d$  for *Chlorella vulgaris*.  $PFD = 250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  and  $D = 0.02 \text{h}^{-1}$ .

Table IV-5 summarizes the results obtained from previous measurements (spatial averaging over the cell culture volume). In all cases,  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  value differ for each dark fraction volume and residence time. In a first assumption, we can propose that the dynamic variation  $J_{NADH_2}(t)$  follow a kinetic law of first order described as follow (partial time integration):

$$\frac{dJ_{NADH_2}}{dt} = \frac{1}{\tau} \left( J_{NADH_2}^{eq} - J_{NADH_2}(t) \right) \quad Eq IV-43$$

with  $\tau$  the carachteristic time of response of respiratory activity, and  $J_{NADH_2}^{eq}$  the steady state value of  $J_{NADH_2}$ , as obtained when applying constant environmental conditions for a sufficiently long period ( $T \rightarrow \infty$ ).

In the illuminated part of the system:

$$\tau = \tau_L \quad with \quad J_{NADH_2}^{eq} = J_{NADH_2,L}^{eq} \quad Eq IV-44$$

$J_{NADH_2,L}^{eq}$  represents the steady-state value of  $J_{NADH_2}(t)$  at light. This value represents the respiration rate in the light where  $T_L \rightarrow \infty$ . It can be retrieved from the results of Chapter 3 obtained in continuous mode (Figure III-5). We have then  $J_{NADH_2,L}^{eq} \approx 1.8 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ .

In the dark, if we apply the same approach:

$$\tau = \tau_D \quad with \quad J_{NADH_2}^{eq} = J_{NADH_2,D}^{eq} \quad Eq IV-45$$

$J_{NADH_2,D}^{eq}$  represents the respiration rate in the dark where  $T_D \rightarrow \infty$ . As presented in chapter 3 -Figure III-5, one can consider that this can be the maximal value of  $\langle J_{NADH_2} \rangle$ . We assumed then that  $J_{NADH_2,D}^{eq} \approx 10 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ .

To predict the time evolution of  $J_{NADH_2}(t)$ , this is necessary to determine respiration characteristic times  $\tau_L$  and  $\tau_D$ . Those values were obtained from a global fitting on experimental results. Experiments with  $t_d = 45s$  and  $300s$  were used for that purpose.

The time evolution of  $J_{\text{NADH}_2}(t)$  was used to calculate a time averaged value  $\overline{J_{\text{NADH}_2}(t)}$ . For a sufficiently long duration, can then assume that  $\overline{J_{\text{NADH}_2}(t)} = \langle J_{\text{NADH}_2}^t \rangle$  (i.e the value averaged on the total culture volume is equal to the time averaged value). Then, this value can be used to predict corresponding rate of oxygen production (Eq IV-35).

Finally, predicted values were then compared to experimental data during the fitting procedure (“fmins.m” in Matlab). This leads to  $\tau_L=571\text{s}$  and  $\tau_D=213\text{s}$ . We can note that those characteristic times are in the range of residence time encountered in each sub-part of the culture system, indicating a possible interaction with respiratory metabolism.

An example of model predictions, obtained with those two-time scales, is given in Figure IV-10. Results assuming no time integration were added. Following definition of Terry (1986), this leads to:

$$\overline{J_{\text{NADH}_2,wi}} = (1 - f_d)\langle J_{\text{NADH}_2}^{eq} \rangle_L + f_d\langle J_{\text{NADH}_2}^{eq} \rangle_D \quad \text{Eq IV-46}$$

Time averaged values of  $J_{\text{NADH}_2}$  as obtained from the dynamic model are summarized in Table IV-6.

Figure IV-10 shows the time evolution of  $J_{\text{NADH}_2}(t)$  for  $f_d = 10\%$  and  $t_d = 45\text{s}$  and  $300\text{s}$  and  $f_d = 30\%$  and  $t_d = 45\text{s}$  and  $300\text{s}$ . We can observe that the introduction of a dynamic representation of  $J_{\text{NADH}_2}(t)$  lead to a better prediction of  $\overline{J_{\text{NADH}_2}(t)}$  than when assuming no integration, that supposes instantaneous adaptation of respiration activity from light to dark, and dark to light. Our results tend then to confirm that a partial time integration should occur on respiratory activity when adding such a dark loop is added in a PBR.

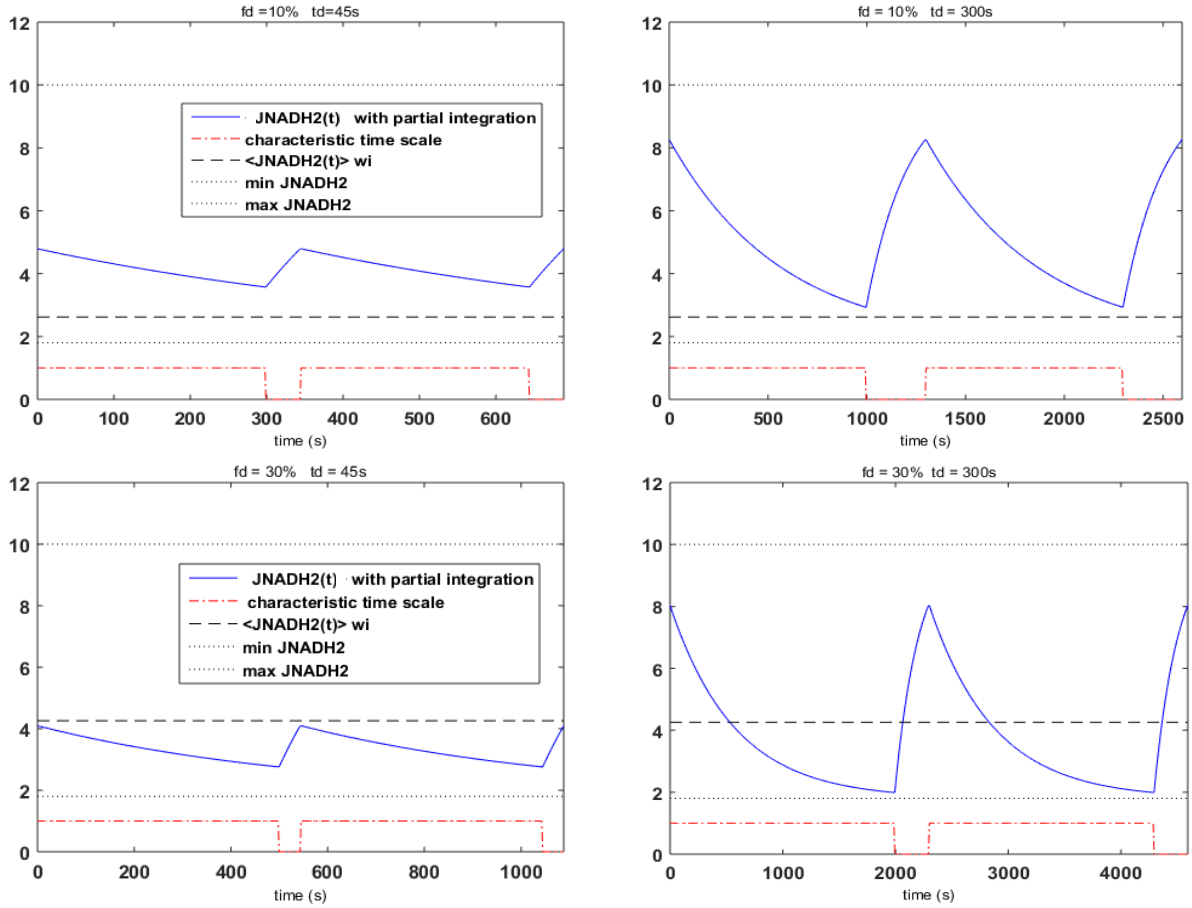


Figure IV-10: Predicted time evolution of  $J_{NADH_2}(t)$  when assuming a dynamic response due to cell displacement from the illuminated part of the system to the dark loop as calculated following Eq IV-46.

In the light:  $J_{NADH_2,L}^{eq} \approx 1.8 \text{ mol}_{NADH_2} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . In the dark:  $J_{NADH_2,D}^{eq} \approx 10 \text{ mol}_{NADH_2} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

$f_d, t_d$	$\langle J_{NADH_2}^t \rangle$	$\overline{J_{NADH_2}(t)}$	$\overline{J_{NADH_2}(t)}$
	Experimental	predicted with partial integration	predicted without time integration
30%, 45s	4.14	4.14	5.26
30%, 300s	6.57	5.17	5.26
10%, 45s	2.02	3.34	2.62
10%, 300s	2.94	3.82	2.62

Table IV-6: comparison between experimental  $\langle J_{NADH_2}^t \rangle$  and predicted  $\overline{J_{NADH_2}(t)}$  with partial integration and  $\overline{J_{NADH_2}(t)}$  without time integration.

## IV.5 Conclusion

A design dark fraction represents a non-illuminated part of a photobioreactor because of its design. It is included in the design of some PBRs for degassing or recirculation purposes. This study proves that there is a negative impact of this volume on the global performance of the PBR; while increasing the volume of a dark fraction, the biomass productivity loss increased. This was due to the decrease of photosynthetically active volume in the PBR, but also to a significant increase of respiratory contribution on the overall growth kinetics. A loss of productivity of around 40% could be encountered for a dark fraction  $f_d$  of 30%.

Residence time in the dark fraction revealed also to have an influence on the productivity; increasing the residence time in the dark increases the rate of respiratory activity in the dark, leading to a higher loss of biomass productivity. Dissolved oxygen concentration that is known to affect photosynthetic metabolism and respiration showed however a negligible impact. Investigating the different responses toward nitrogen sources, results showed that metabolic interactions and energy dissipation was mainly influenced by the nitrogen assimilation, rather than the dark fraction itself.

The calculation of the respiration activity of the biomass in the design dark fraction and in the illuminated PBR as represented by  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  showed that this term was not constant. It increases when increasing the residence time of the microalgae in the dark. The study on the respiration response of microalgae for different residence time in the dark showed that characteristic timescales of metabolic response could be in the range of those induced by cells circulation from illuminated to dark part of the PBR. A dynamic formulation of  $J_{NADH_2}$  was then proposed, allowing to represent its time evolution when cells move from dark to illuminated part of the PBR.

Further studies should be necessary for a better identification of characteristic time  $\tau_L$  and  $\tau_D$  used in this model. More experiments in an extended dark duration would be also necessary in order to characterize  $\langle J_{NADH_2} \rangle$  in these conditions. In our experiments, we supposed indeed an arbitrary value of  $\langle J_{NADH_2}^{eq} \rangle_D$  that should be further identified. Other experiments with different dark loop characteristics ( $f_d, t_d$ ) should be also of interest to improve and validate our model of dynamic respiratory activity.



---

# Conclusions et perspectives

---

## I Bilan de la thèse

Le travail présenté dans ce manuscrit a permis d'étudier et de mieux comprendre des problématiques associées à des travaux menés depuis plus de 10 ans au sein du laboratoire GEPEA. Cela vient en effet en prolongement des premières observations sur l'effet des concentrations élevées en oxygène dissous sur la productivité en biomasse au sein des photobioréacteurs (thèse d'Urbain 2017). Des travaux sont d'ores et déjà engagés en ce sens, avec notamment une meilleure représentation du terme de photorespiration dans la modélisation métabolique de croissance des microalgues dans un environnement concentré en dioxygène dissous (Cogne 2017). Cette thèse a également permis de tirer quelques conclusions qui auront un impact direct en ingénierie des photobioréacteurs. Elles sont détaillées ci-après.

### I.1 Effet de la concentration en oxygène dissous sur la performance cinétique des photobioréacteurs

Le chapitre 3 étudie l'effet de concentration élevée sur la productivité en biomasse dans les photobioréacteurs. Une culture de la microalgue *Chlorella vulgaris* a été lancée en chemostat pour un flux lumineux constant de  $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  et des conditions de limitation physique stricte par la lumière. Différentes concentrations en dioxygène dissous ont été abordées allant de  $8 \text{g}/\text{m}^3$  (saturation avec l'air) jusqu'à  $31 \text{g}/\text{m}^3$ . Une différence non significative a été observée pour des concentrations en oxygène dissous plus faibles que  $30 \text{g}/\text{m}^3$ . Par contre, pour des concentrations plus élevées, 30% de perte en productivité en biomasse a été observée. Ceci a été interprété par une dissipation de l'énergie utilisée par la cellule pour sa croissance vers d'autres mécanismes futiles impliquant une activité respiratoire plus importante.

Le modèle cinétique de croissance associé à la modélisation du transfert radiatif développé par les co-auteurs, a montré une robustesse de l'approche théorique apte à prendre en compte l'influence de la concentration en oxygène dissous sur la productivité en biomasse. En effet, dans ce modèle, l'activité respiratoire des microalgues a été exprimée par  $J_{NADH_2}$ . Ce terme

représente la vitesse spécifique de régénération du cofacteur dans la chaîne respiratoire des cellules. Il a été recalculé suivant les données expérimentales obtenues pour différentes concentrations en oxygène dissous. Il a été observé une augmentation progressive des valeurs de ce terme pour des valeurs inférieures à  $30\text{g/m}^3$  (aux alentours de  $2\text{-}3\text{ mol}_{\text{NADH}_2}/\text{kg/h}$ ). Par contre, pour des concentrations en oxygène dissous plus élevées, ce terme tend à augmenter brusquement pour atteindre  $10\text{ mol}_{\text{NADH}_2}/\text{kg/h}$ . Cette dernière valeur s'est révélée proche de la valeur théorique prédite par le modèle de croissance cinétique de *Chlorella vulgaris* établi par Souliès et al. (2016). Dans sa conclusion, ainsi que dans la conclusion de Takache (2010), ces auteurs ont observé que le modèle cinétique ne permettait pas de prédire très précisément les cas avec une concentration en biomasse élevée atteinte pour des taux de dilution faible. Selon leur observation, ceci était lié à un défaut de la représentation du terme de respiration lié à  $J_{\text{NADH}_2}$ . Cette hypothèse, avancée il y a plusieurs années, a été confirmée ici.

En recalculant  $J_{\text{NADH}_2}$ , le modèle a en effet été capable de prédire l'effet sur la productivité en biomasse de la concentration en oxygène dissous. En combinant le modèle aux résultats de Souliès et al. (2016), il s'est révélé que l'inexactitude de la prédiction du modèle pour des taux de dilution faible était liée aux conditions opératoires, elles-mêmes liées à la concentration en dioxygène dissous alors atteintes en PBR torique.

Cela a permis d'illustrer que, pour la conception d'un photobioréacteur, plusieurs paramètres opératoires et géométriques sont à considérer. Pour évacuer une suraccumulation en oxygène dissous, une aération efficace doit ainsi être ajoutée. Ceci est représenté par le terme de transfert gaz-liquide. Ce dernier peut être limitant comme pour les photobioréacteurs tubulaires qui ont donc tendance à accumuler l'oxygène dissous jusqu'à des concentrations néfastes pour la croissance des microalgues. Cela peut être le cas également pour les raceways, ces derniers pouvant accumuler plus que 400% en oxygène dissous par rapport à l'équilibre avec l'air. Des systèmes d'aération en plus de la roue à aubes pourraient donc être bénéfiques.

Le paramètre de transfert gaz-liquide pour des photobioréacteurs à échelle laboratoire s'est révélé également un paramètre important. Pour un photobioréacteur torique et un airlift plan par exemple, en respectant le régime de limitation stricte par la lumière, une productivité surfacique maximale devrait être indépendante du type du PBR. Or, comme cela a été montré, ceci n'est plus vérifié si les conditions de transfert gaz-liquide ne sont pas respectées. Ainsi il a été montré qu'une même productivité surfacique était atteinte seulement si des



concentrations en oxygène dissous similaires étaient atteintes dans les deux géométries. Ceci montre qu'une régulation de ce paramètre serait pertinente pour éviter le risque d'inhibition de la croissance des microalgues, notamment dans le PBR torique, agité mécaniquement.

En lumière continue, la régulation de la concentration en oxygène dissous à des états stationnaire est simple ; il suffit d'une modulation du débit d'air ou d'azote servant comme gaz pour l'aération afin d'atteindre la concentration en oxygène dissous souhaitée. Par contre, en cycle jour/nuit, compte-tenu la dynamique du flux lumineux, cette régulation devra certainement faire l'objet d'un régulateur spécifique pour réagir aux variations en concentrations en oxygène dissous obtenus lors de cycles lumineux. Ceci a été l'objet d'un développement, au sein de notre laboratoire (Titica 2017). Un régulateur PID associé à un pilote permettant un suivi online de l'oxygène produit par les microalgues ainsi que la régulation de l'O<sub>2</sub> dissous a été mis en place et validé. Ce pilote est présenté dans le chapitre 2. Il servira au Laboratoire GEPEA pour compléter l'étude de l'effet de l'oxygène dissous sur la croissance des microalgues en cycles jours/nuits, avec notamment un suivi de la vitesse de production de dioxygène ( $r_{O_2}(t)$ ) pour des concentrations en oxygène variables.

## **I.2 Effet de la présence d'une fraction sombre sur la productivité en biomasse des photobioréacteurs**

L'étude a été ensuite étendue au cas particulier des photobioréacteurs présentant une fraction sombre par conception. En premier temps, l'impact de la présence de cette fraction sur la croissance des microalgues a été montré, puis un modèle cinétique prenant en compte la présence de cette fraction sombre a été utilisé. Celui-ci est basé sur le modèle cinétique déjà développé par les co-auteurs, en redéterminant l'activité respiratoire obtenue dans chaque configuration testée.

En effet, une fraction sombre représente une partie d'un système de culture qui est non illuminée. Elle est caractérisée par une boucle de recirculation où les microalgues passent donc pendant un temps défini dans une zone obscure. Dans cette étude, plusieurs volumes de fraction sombre ont été testés, avec plusieurs temps de résidence dans chaque cas. L'influence de la concentration en oxygène dissous ainsi que la source d'azote (ammonium ou nitrate) du milieu de culture a été étudié. Ceci a été mené pour la microalgue *Chlorella vulgaris* cultivée

dans un photobioréacteur modifié (avec une fraction sombre), pour une lumière incidente de  $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Le régime de limitation stricte par la lumière a été respecté.

Les résultats ont confirmé l'influence importante de la présence d'une fraction sombre dans un PBR, ayant donc tendance à faire diminuer la productivité en biomasse à la fois parce que cela diminue la portion éclairée du PBR, mais également parce que cela augmente la contribution globale de l'activité respiratoire. Cette dernière diminue pour les deux sources d'azote utilisé pour différents volumes de fraction sombre. Le modèle cinétique proposé a permis de calculer la vitesse de consommation d'oxygène dans la fraction sombre ( $\langle J_{O_2 \text{ resp}}^d \rangle_D$ ) ainsi que sa consommation dans la partie illuminée du PBR ( $\langle J_{O_2 \text{ resp}}^l \rangle_L$ ).

Le calcul des vitesses de consommation de dioxygène dans le système a montré une activité respiratoire qui augmente en augmentant le temps de résidence des microalgues dans la fraction sombre. En effet, en supposant que la fraction sombre d'un système de culture est une boucle de recirculation, différents temps de résidences dans cette boucle peuvent apparaître selon le débit de recirculation appliqué. Ainsi, la perte de la productivité en biomasse s'est retrouvée liée à ces différents temps de séjour.

Afin d'aller plus loin, une analyse de la réponse des microalgues vis-à-vis de différents temps de séjour dans la fraction sombre a donc été développée. Cette caractérisation est basée sur une analogie à des cycles lumières/obscurité (L/D). Pour cela, grâce à un modèle dynamique simple, la vitesse spécifique de régénération du cofacteur dans la chaîne respiratoire des cellules  $J_{NADH_2}$  a été calculée pour les différentes conditions appliquées. Cette représentation dynamique de la variation de  $J_{NADH_2}$  a montré qu'une réponse instantanée (sans intégration) totale n'est pas atteinte. Les résultats ont montrés que l'activité respiratoire varie certainement lors des passages entre partie éclairée et boucle sombre, avec un temps caractéristique d'adaptation proche du temps de séjour dans chaque partie du PBR. Néanmoins, il a été fixé dans ce modèle une valeur maximale de  $J_{NADH_2}$  atteinte à l'équilibre de  $8 \text{ mol}_{NADH_2}/\text{m}^2/\text{s}$ . Pour valider cette hypothèse, une étude avec un temps prolongé à l'obscurité serait nécessaire. Ceci sera possible par exemple grâce à un suivi de l'évolution de la vitesse de production en oxygène  $r_{O_2}(t)$  à l'obscurité.  $J_{NADH_2}$  pourrait alors être calculé

grâce au modèle cinétique et les valeurs expérimentales de  $r_{O_2}(t)$  obtenues. Elle pourra ensuite être comparée avec la valeur obtenue ici ( $8 \text{ mol}_{\text{NADH}_2}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

Concernant les différentes sources d'azote, les résultats ont montré que les interactions métaboliques et la dissipation d'énergie sont influencées principalement par l'assimilation de l'azote plutôt que par la fraction sombre. Pour la source d'azote ammonium par exemple, la perte en biomasse était plus importante qu'en milieu nitrate, bien que la productivité en biomasse de ce dernier soit de 25% moins élevée qu'en milieu ammonium. Ici, plus d'expériences seraient nécessaire afin de conforter ces résultats.

Finalement, bien qu'au chapitre 3, la concentration en oxygène dissous a été démontrée comme paramètre affectant la productivité en biomasse, dans un PBR avec fraction sombre, aucune influence significative n'a été observée. Pour deux concentrations en oxygène dissous (proche de la saturation avec l'air et  $31\text{g}/\text{m}^3$ ), la perte en productivité en biomasse était principalement due à la fraction sombre seule.

## II. Perspectives

### II.1 Effet de la concentration en oxygène dissous sur la productivité

Du point de vue optimisation des protocoles de culture, bien que l'effet de la concentration en oxygène ait été étudié, les études ont été limitées au cas de la lumière continue (Raso. 2012) comme cela a été également mené dans cette thèse. Une étude en cycle jours/nuits sera donc intéressante pour différentes concentrations en oxygène (avec ou sans régulation le jour). En effet, de fortes dynamiques en oxygène dissous peuvent alors être rencontrées, dont l'effet reste à approfondir. Cela peut entrer en interactions avec les conditions particulières rencontrées en cycle jours/nuits, comme des périodes d'obscurité prolongées où la respiration domine (la nuit), ou au contraire des conditions d'exposition à des intensités lumineuses élevées où certaines publications tendent à montrer un effet marqué de l'oxygène dissous sur l'activité photosynthétique.

Du point de vue métabolique, dans notre cas, le phénomène de photorespiration n'a pas été expliqué comme la cause directe de la perte de productivité en biomasse pour des concentrations en oxygène dissous élevées. Afin de comprendre comment l'énergie est dissipée, une détermination de la teneur en sucres, protéines et lipides serait intéressante. De

cette façon, il serait possible éventuellement d'identifier l'effet métabolique lié à la concentration élevée en O<sub>2</sub>.

Du point de vue économique, augmenter le transfert gaz-liquide pour éviter l'accumulation d'oxygène dissous augmente les coûts opératoires et consomme de l'énergie (Acién et al. 2012). Malgré cela, on pourrait conclure qu'il est important d'appliquer un transfert suffisant pour évacuer l'oxygène. Cependant, les microalgues répondent différemment vis-à-vis de la concentration en oxygène dissous :

- En cycle jours/nuit, une aération élevée la nuit tend à augmenter la perte en productivité (Ogbonna et Tanaka 1996; Edmundson et Huesemann 2015).
- La production d'astaxanthine par la microalgue *Haematococcus lacustris* dans un milieu limité en azote est proportionnelle à la concentration en oxygène dissous (Lee et Ding 1995).
- La composition pigmentaire de Spiruline change en fonction de la concentration en oxygène dissous (Vonshak et al. 1996).

On peut tirer de ces points que l'oxygène dissous joue donc également sur la production de certaines molécules d'intérêt par exemple. Au final, améliorer un système sur ce critère est donc fonction de la technologie, mais aussi de la microalgue étudiée et du produit final visé.

## **II.2 Effet de la fraction sombre**

Les fractions sombres présentes dans un photobioréacteur, sont rencontrées usuellement. Notre étude a démontré que ces fractions affectent négativement la croissance des microalgues, avec une perte due principalement à la respiration. Une étude approfondie sur ce qui se passe métaboliquement dans la boucle sombre serait intéressante. En effet, les résultats présentés couvrent le comportement de la microalgue dans tout le système (i.e la partie illuminée plus la fraction sombre). Le prélèvement des échantillons étaient dans la partie illuminée. Un échantillonnage dans la zone sombre pourrait être utile. De cette façon, selon la composition de la microalgue avant et après passage en boucle sombre, la réponse métabolique pourrait être mieux comprise (i.e s'il s'agit d'une respiration dans la boucle sombre, une concentration en sucres totaux sera plus élevée qu'en absence de la boucle par exemple). A noter que pour être mesurée, il faudrait peut être augmenter les temps de séjour en boucle sombre.

Finalement, la perte de productivité en biomasse s'est révélée significative pour un flux lumineux de  $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Une étude pour des flux lumineux plus élevés (proche ou au-dessus de la saturation) serait intéressante. L'effet d'une surexposition à la lumière par exemple, peut être atténué par le passage des microalgues en boucle sombre, avec dans ce cas un effet positif possible.



---

# Bibliographie

---

- Ación, F. G., J. M. Fernández, J. J. Magán, et E. Molina. 2012. « Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it ». *Biotechnology Advances*, Special issue on ACB 2011, 30 (6):1344-53. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>.
- Artu, Arnaud. 2016. « Etude et optimisation de la culture de microalgues en photobioréacteurs solaires ». Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Badger, M R, S von Caemmerer, S Ruuska, et H Nakano. 2000. « Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355 (1402):1433-46.
- Barsanti, Laura, et Paolo Gualtieri. 2006. « Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second Edition ». CRC Press. 2006. <https://www.crcpress.com/Algae-Anatomy-Biochemistry-and-Biotechnology-Second-Edition/Barsanti-Gualtieri/p/book/9781439867327>.
- Bauwe, Hermann, Martin Hagemann, et Alisdair R. Fernie. 2010. « Photorespiration: players, partners and origin ». *Trends in Plant Science* 15 (6):330-36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.006>.
- Bauwe, Hermann, Martin Hagemann, Ramona Kern, et Stefan Timm. 2012. « Photorespiration Has a Dual Origin and Manifold Links to Central Metabolism ». *Current Opinion in Plant Biology* 15 (3):269-75. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.008>.
- Béchet, Quentin, Andy Shilton, et Benoit Guieysse. 2013. « Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation ». *Biotechnology Advances* 31 (8):1648-63. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>.
- Benemann, John R., David M. Tillett, et Joseph C. Weissman. 1987. « Microalgae biotechnology ». *Trends in Biotechnology* 5 (2):47-53. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90037-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90037-0).
- Beyenrick, M.W. 1890. « Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. » *ISES annual meeting. Tel-Aviv*. <http://img.algaebase.org/pdf/AC100CF003338161AAoHt43C4207/35049.pdf>.

- Birmingham, B. C., J. R. Coleman, et B. Colman. 1982. « Measurement of Photorespiration in Algae ». *Plant Physiology* 69 (1):259-62.
- Bold, Harold C. 1949. « The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov. ». *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 76 (2):101-8. <https://doi.org/10.2307/2482218>.
- Borowitzka, Michael Armin, et Navid Reza Moheimani. 2013. « Sustainable Biofuels from Algae ». *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18 (1):13-25. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9271-9>.
- Burris, John E. 1980. « Respiration and Photorespiration in Marine Algae ». In *Primary Productivity in the Sea*, édité par Paul G. Falkowski, 411-32. Environmental Science Research 19. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3890-1\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3890-1_23).
- Cardol, Pierre, Giorgio Forti, et Giovanni Finazzi. 2011. « Regulation of electron transport in microalgae ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Regulation of Electron Transport in Chloroplasts*, 1807 (8):912-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.004>.
- Chaumont, Daniel. 1993. « Biotechnology of Algal Biomass Production: A Review of Systems for Outdoor Mass Culture ». *Journal of Applied Phycology* 5 (6):593-604. <https://doi.org/10.1007/BF02184638>.
- Chen, Meng, Haiying Tang, Hongzhi Ma, Thomas C. Holland, K. Y. Simon Ng, et Steven O. Salley. 2011. « Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta* ». *Bioresource Technology* 102 (2):1649-55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>.
- Chisti, Yusuf. 2016. « Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds ». In *Algae Biotechnology*, 21-40. Green Energy and Technology. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_2).
- Christenson, Logan B., et Ronald C. Sims. 2012. « Rotating Algal Biofilm Reactor and Spool Harvester for Wastewater Treatment with Biofuels By-Products ». *Biotechnology and Bioengineering* 109 (7):1674-84. <https://doi.org/10.1002/bit.24451>.
- Cogne, Guillaume. 2003. « A biochemically structured model for the autotrophic growth of eukaryotic microalgae in photobioreactors ». Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal.
- Contreras, A., F. García, E. Molina, et J. C. Merchuk. 1998. « Interaction between CO<sub>2</sub>-Mass Transfer, Light Availability, and Hydrodynamic Stress in the Growth of *Phaeodactylum Tricornutum* in a Concentric Tube Airlift Photobioreactor ». *Biotechnology and Bioengineering* 60 (3):317-25. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<317::AID-BIT7>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<317::AID-BIT7>3.0.CO;2-K).
- Converti, Attilio, Alessandro A. Casazza, Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, et Marco Del Borghi. 2009. « Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and



- lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production ». *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48 (6):1146-51. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>.
- Cornet, Jean-François. 2007. « Procédés limités par le transfert de rayonnement en milieu Hétérogène. Étude des couplages cinétiques et énergétiques dans les photobioréacteurs par une approche thermodynamique ». HDR, Université Blaise Pascal.
- Cornet, Jean-François. 2010. « Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach ». *Chemical Engineering Science* 65 (2):985-98. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.09.052>.
- Cornet, Jean-François, et Claude-Gilles Dussap. 2009. « A Simple and Reliable Formula for Assessment of Maximum Volumetric Productivities in Photobioreactors ». *Biotechnology Progress* 25 (2):424-35. <https://doi.org/10.1002/btpr.138>.
- Cornet, J.-F., C. G. Dussap, et J.-B. Gros. 1998. « Kinetics and Energetics of Photosynthetic Micro-Organisms in Photobioreactors ». In *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*, 153-224. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0102299>.
- Costache, T. A., F. Gabriel Acién Fernández, M. M. Morales, J. M. Fernández-Sevilla, I. Stamatina, et E. Molina. 2013. « Comprehensive Model of Microalgae Photosynthesis Rate as a Function of Culture Conditions in Photobioreactors ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (17):7627-37. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5035-2>.
- Dauchet, Jérémie. 2012. « Analyse radiative des photobioréacteurs ». Theses, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00914315>.
- Dauchet Jérémie, Stéphane Blanco, Jean-François Cornet, et Richard Fournier. 2015. « Calculation of the radiative properties of photosynthetic microorganisms ». *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 161 (août):60-84. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2015.03.025>.
- Eberhard, Stephan. 2008. « The Dynamics of Photosynthesis ». *Annual Review of Genetics* 42 (1):463-515. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>.
- Edmundson, Scott J., et Michael H. Huesemann. 2015. « The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. ». *Algal Research* 12 (novembre):470-76. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012>.
- Falkowski, P. G., et T. G. Owens. 1978. « Effects of Light Intensity on Photosynthesis and Dark Respiration in Six Species of Marine Phytoplankton ». *Marine Biology* 45 (4):289-95. <https://doi.org/10.1007/BF00391815>.

- Falkowski, Paul G. 1980. « Light-Shade Adaptation in Marine Phytoplankton ». In *Primary Productivity in the Sea*, édité par Paul G. Falkowski, 99-119. Environmental Science Research 19. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3890-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3890-1_6).
- Falkowski, Paul G., et Yi-Bu Chen. 2003. « Photoacclimation of Light Harvesting Systems in Eukaryotic Algae ». In *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*, 423-47. Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2087-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2087-8_15).
- Ferreira, Livia S., Mayla S. Rodrigues, Attilio Converti, Sunao Sato, et João Carlos M. Carvalho. 2010. « A New Approach to Ammonium Sulphate Feeding for Fed-Batch *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis* Cultivation in Tubular Photobioreactor ». *Biotechnology Progress* 26 (5):1271-77.
- Finazzi, Giovanni, Fabrice Rappaport, Alberto Furia, Mark Fleischmann, Jean-David Rochaix, Francesca Zito, et Giorgio Forti. 2002. « Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *EMBO Reports* 3 (3):280-85. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf047>.
- Fouchard, Swanny, Jérémy Pruvost, Benoit Degrenne, et Jack Legrand. 2008. « Investigation of H<sub>2</sub> production using the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in a fully controlled photobioreactor fitted with on-line gas analysis ». *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (13):3302-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.03.067>.
- Foyer, Christine H., et Graham Noctor. 2000. « Tansley Review No. 112 ». *New Phytologist* 146 (3):359-88. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00667.x>.
- Fritsch, F.E. 1935. *The Structure and Reproduction of the Algae*. Vol. 1.
- Genkov, Todor, et Robert J. Spreitzer. 2009. « Highly Conserved Small Subunit Residues Influence Rubisco Large Subunit Catalysis ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (44):30105-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044081>.
- Grima, E. Molina, F. García Camacho, J. A. Sánchez Pérez, J. M. Fernández Sevilla, F. G. Acién Fernández, et A. Contreras Gómez. 1994. « A Mathematical Model of Microalgal Growth in Light-Limited Chemostat Culture ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 61 (2):167-73. <https://doi.org/10.1002/jctb.280610212>.
- Grobbelaar, Johan U., et N. Kurano. 2003. « Use of Photoacclimation in the Design of a Novel Photobioreactor to Achieve High Yields in Algal Mass Cultivation ». *Journal of Applied Phycology* 15 (2-3):121-26. <https://doi.org/10.1023/A:1023802820093>.
- Grobbelaar, Johan U., Carl J. Soeder, et Eberhard Stengel. 1990. « Modeling algal productivity in large outdoor cultures and waste treatment systems ». *Biomass* 21 (4):297-314. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(90\)90079-Y](https://doi.org/10.1016/0144-4565(90)90079-Y).
- Hall, David O., F. G. Acién Fernández, E. Cañizares Guerrero, K. Krishna Rao, et E. Molina Grima. 2003. « Outdoor Helical Tubular Photobioreactors for Microalgal Production:

- Modeling of Fluid-Dynamics and Mass Transfer and Assessment of Biomass Productivity ». *Biotechnology and Bioengineering* 82 (1):62-73. <https://doi.org/10.1002/bit.10543>.
- Henley, William J. 1993. « Measurement and Interpretation of Photosynthetic Light-Response Curves in Algae in the Context of Photoinhibition and Diel Changes ». *Journal of Phycology* 29 (6):729-39. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00729.x>.
- Higbie, Ralph. 1935. *The Rate of Absorption of a Pure Gas into Still Liquid during Short Periods of Exposure*. University of Michigan.
- Hoefnagel, Marcel H. N, Owen K Atkin, et Joseph T Wiskich. 1998. « Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1366 (3):235-55. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00126-1).
- Hu, Qiang. 2003. « Environmental Effects on Cell Composition ». In *Handbook of Microalgal Culture*, édité par Amos Richmond, 83-94. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch5>.
- Hutner, S. H., L. Provasoli, Albert Schatz, et C. P. Haskins. 1950. « Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms ». *Proceedings of the American Philosophical Society* 94 (2):152-70.
- Janssen, Marcel. 2002. « Cultivation of microalgae: Effect of light/dark cycles on biomass yield ». 2002. Thèse de Doctorat. Université de Wageningen
- Jimenez, Mélanie. 2013. *Etude du transfert de matière gaz/liquide en milieux complexes: quantification du transfert d'oxygène par techniques optiques*. Thèse de doctorat, INSA.
- Joliot, Pierre, et Giles N. Johnson. 2011. « Regulation of Cyclic and Linear Electron Flow in Higher Plants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32):13317-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110189108>.
- Kandilian, Razmig, Jérémy Pruvost, Arnaud Artu, Camille Lemasson, Jack Legrand, et Laurent Pilon. 2016. « Comparison of experimentally and theoretically determined radiation characteristics of photosynthetic microorganisms ». *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 175 (mai):30-45. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2016.01.031>.
- Karemore, Ankush, Dineshkumar Ramalingam, Geetanjali Yadav, Ganeshan Subramanian, et Ramkrishna Sen. 2015. « Photobioreactors for Improved Algal Biomass Production: Analysis and Design Considerations ». In *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, 103-24. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_5).

- Kim, Garam, Ghulam Mujtaba, et Kisay Lee. 2016. « Effects of Nitrogen Sources on Cell Growth and Biochemical Composition of Marine Chlorophyte *Tetraselmis* Sp. for Lipid Production ». *ALGAE*, 31 (3):257-66. <https://doi.org/2016.31.3.257>.
- Kliphuis, Anna M. J., Marcel Janssen, Evert J. van den End, Dirk E. Martens, et René H. Wijffels. 2011. « Light Respiration in *Chlorella Sorokiniana* ». *Journal of Applied Phycology* 23 (6):935-47. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9614-7>.
- Kliphuis, Anna M.J., Dirk E. Martens, Marcel Janssen, et René H. Wijffels. 2011. « Effect of O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> Ratio on the Primary Metabolism of *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *Biotechnology and Bioengineering* 108 (10):2390-2402. <https://doi.org/10.1002/bit.23194>.
- Kula, M., H. M. Kalaji, et A. Skoczowski. 2017. « Culture density influence on the photosynthetic efficiency of microalgae growing under different spectral compositions of light ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 167 (février):290-98. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.01.013>.
- Le Borgne, François. 2011. « Développement d'un photobioréacteur solaire intensifié en vue de la production à grande échelle de biomasse microalgale ». thèse de doctorat. Université de Nantes.
- LE Gouic, Benjamin. 2013. « Analyse et optimisation de l'apport de carbone en photobioréacteur ». Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Lee, Euntaek, Jérémy Pruvost, Xing He, Ramakanth Munipalli, et Laurent Pilon. 2014. « Design tool and guidelines for outdoor photobioreactors ». *Chemical Engineering Science* 106 (mars):18-29. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.11.014>.
- Lee, Yuan-Kun, et Sun-Yeun Ding. 1995. « Effect of Dissolved Oxygen Partial Pressure on the Accumulation of Astaxanthin in Chemostat Cultures of *Haematococcus Lacustris* (Chlorophyta) ». *Journal of Phycology* 31 (6):922-24. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00922.x>.
- Lewis, W. K., et W. G. Whitman. 1924. « Principles of Gas Absorption. » *Industrial Engineering Chemistry* 16 (12):1215-20. <https://doi.org/10.1021/ie50180a002>.
- Li, Tingting, Yubin Zheng, Liang Yu, et Shulin Chen. 2013. « High Productivity Cultivation of a Heat-Resistant Microalga *Chlorella Sorokiniana* for Biofuel Production ». *Bioresource Technology* 131 (mars):60-67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.121>.
- Liao, Qiang, Lin Li, Rong Chen, et Xun Zhu. 2014. « A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation ». *Bioresource Technology* 161 (juin):186-91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.119>.
- Lloyd, N. D., D. T. Canvin, et D. A. Culver. 1977. « Photosynthesis and Photorespiration in Algae ». *Plant Physiology* 59 (5):936-40.

- Loubière, Karine, Erell Olivo, Gael Bougaran, Jérémy Pruvost, René Robert, et Jack Legrand. 2009. « A New Photobioreactor for Continuous Microalgal Production in Hatcheries Based on External-Loop Airlift and Swirling Flow ». *Biotechnology and Bioengineering* 102 (1):132-47. <https://doi.org/10.1002/bit.22035>.
- MacIntyre, Hugh L., Todd M. Kana, Tracy Anning, et Richard J. Geider. 2002. « Photoacclimation of Photosynthesis Irradiance Response Curves and Photosynthetic Pigments in Microalgae and Cyanobacteria ». *Journal of Phycology* 38 (1):17-38. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x>.
- Marquez, Facundo J., Ken Sasaki, Naomichi Nishio, et Shiro Nagai. 1995. « Inhibitory Effect of Oxygen Accumulation on the Growth of *Spirulina Platensis* ». *Biotechnology Letters* 17 (2):225-28. <https://doi.org/10.1007/BF00127993>.
- Martzoff, Arnaud. 2013. « analyse systémique du métabolisme carboné et énergétique de *Chlamydomonas reinhardtii* ». Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Masojídek, Jiří, Giuseppe Torzillo, et Michal Koblížek. 2013. « Photosynthesis in Microalgae ». In *Handbook of Microalgal Culture*, édité par Amos Richmond Ph.D. Emeritus et Qiang Hu Ph.D, 21-36. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>.
- Mata, Teresa M., António A. Martins, et Nidia. S. Caetano. 2010. « Microalgae for biodiesel production and other applications: A review ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (1):217-32. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- Maurino, Veronica G, et Christoph Peterhansel. 2010. « Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering ». *Current Opinion in Plant Biology* 13 (3):248-55. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.01.006>.
- Mehler, Alan H. 1951. « Studies on reactions of illuminated chloroplasts ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33 (1):65-77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90082-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90082-3).
- Mendoza, J. L., M. R. Granados, I. de Godos, F. G. Acien, E. Molina, S. Heaven, et C. J. Banks. 2013. « Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways ». *Bioresource Technology* 137 (juin):188-95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.127>.
- Mie, Gustav. 1908. « Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen ». *Annalen Der Physik* 330 (3):377-445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.
- Molina, E., J. Fernández, F. G. Acien, et Y. Chisti. 2001. « Tubular photobioreactor design for algal cultures ». *Journal of Biotechnology, Biochemical Engineering: Trends and Potentials*, 92 (2):113-31. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00353-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00353-4).

- Molina Grima, E., F. G. Acién Fernández, F. García Camacho, et Yusuf Chisti. 1999. « Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup ». *Journal of Biotechnology, Biotechnological Aspects of Marine Sponges*, 70 (1):231-47. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00078-4).
- Moroney, James V., Nadine Jungnick, Robert J. DiMario, et David J. Longstreth. 2013. « Photorespiration and Carbon Concentrating Mechanisms: Two Adaptations to High O<sub>2</sub>, Low CO<sub>2</sub> Conditions ». *Photosynthesis Research* 117 (1-3):121-31. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9865-7>.
- Moseley, Jeffrey L., Chiung-Wen Chang, et Arthur R. Grossman. 2006. « Genome-Based Approaches to Understanding Phosphorus Deprivation Responses and PSR1 Control in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Eukaryotic Cell* 5 (1):26-44. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.26-44.2006>.
- Murata. 1969. « Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum* ». 1969. [https://www.researchgate.net/publication/247234533\\_Control\\_of\\_excitation\\_transfer\\_in\\_photosynthesis\\_I\\_Light-induced\\_change\\_of\\_chlorophyll\\_a\\_fluorescence\\_in\\_Porphyridium\\_cruentum](https://www.researchgate.net/publication/247234533_Control_of_excitation_transfer_in_photosynthesis_I_Light-induced_change_of_chlorophyll_a_fluorescence_in_Porphyridium_cruentum).
- Ndiaye, Mbalo. 2016. « Transfert de CO<sub>2</sub> et stratégies d'apport du carbone inorganique en photobioréacteur ». Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Nixon, P. J. 2000. « Chlororespiration. » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355 (1402):1541-47.
- Ogawa, Takahira, Takao Fujii, et Shuichi Aiba. 1980. « Effect of Oxygen on the Growth (Yield) of *Chlorella Vulgaris* ». *Archives of Microbiology* 127 (1):25-31. <https://doi.org/10.1007/BF00414351>.
- Ogbonna, James C., et Hideo Tanaka. 1996. « Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* ». *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (6):558-64. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81252-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81252-4).
- Ogbonna, James C., Hirokazu Yada, et Hideo Tanaka. 1995. « Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells ». *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80 (3):259-64. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)90826-L](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)90826-L).
- Olivieri, Giuseppe, Piero Salatino, et Antonio Marzocchella. 2014. « Advances in Photobioreactors for Intensive Microalgal Production: Configurations, Operating Strategies and Applications ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89 (2):178-95. <https://doi.org/10.1002/jctb.4218>.
- Payne, W. J. 1973. « Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. » *Bacteriological Reviews* 37 (4):409-52.

- Peltier, Gilles, et Laurent Cournac. 2002. « Chlororespiration ». *Annual Review of Plant Biology* 53:523-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135242>.
- Phillips, J. Neal, et Jack Myers. 1954. « Growth Rate of Chlorella in Flashing Light. 1 ». *Plant Physiology* 29 (2):152-61.
- Podevin, Michael, Davide De Francisci, Susan L. Holdt, et Irini Angelidaki. 2015. « Effect of Nitrogen Source and Acclimatization on Specific Growth Rates of Microalgae Determined by a High-Throughput in Vivo Microplate Autofluorescence Method ». *Journal of Applied Phycology* 27 (4):1415-23. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0468-2>.
- Posten, Clemens. 2009. « Design Principles of Photo-Bioreactors for Cultivation of Microalgae ». *Engineering in Life Sciences* 9 (3):165-77. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>.
- Pottier, L., J. Pruvost, J. Deremetz, J.-F. Cornet, J. Legrand, et C. G. Dussap. 2005. « A Fully Predictive Model for One-Dimensional Light Attenuation by Chlamydomonas Reinhardtii in a Torus Photobioreactor ». *Biotechnology and Bioengineering* 91 (5):569-82. <https://doi.org/10.1002/bit.20475>.
- Pruvost, J., J. F. Cornet, F. Le Borgne, V. Goetz, et J. Legrand. 2015. « Theoretical investigation of microalgae culture in the light changing conditions of solar photobioreactor production and comparison with cyanobacteria ». *Algal Research* 10 (juillet):87-99. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.005>.
- Pruvost, J., J. -F. Cornet, et J. Legrand. 2008. « Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis ». *Chemical Engineering Science* 63 (14):3679-94. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.04.026>.
- Pruvost, J., F. Le Borgne, A. Artu, et J. Legrand. 2017. « Development of a thin-film solar photobioreactor with high biomass volumetric productivity (AlgoFilm©) based on process intensification principles ». *Algal Research* 21 (janvier):120-37. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.012>.
- Pruvost, J., L. Pottier, et J. Legrand. 2006. « Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor ». *Chemical Engineering Science* 61 (14):4476-89. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.02.027>.
- Pruvost, J., G. Van Vooren, B. Le Gouic, A. Couzinet-Mossion, et J. Legrand. 2011. « Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application ». *Bioresource Technology*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells, 102 (1):150-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.153>.
- Pruvost, Jérémy, et J. Cornet. 2012. « Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors ». *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*, janvier, 181-224.

- Pruvost, Jeremy, J. F. Cornet, Vincent Goetz, et Jack Legrand. 2012. « Theoretical Investigation of Biomass Productivities Achievable in Solar Rectangular Photobioreactors for the Cyanobacterium *Arthrospira Platensis* ». *Biotechnology Progress* 28 (3):699-714. <https://doi.org/10.1002/btpr.1540>.
- Pruvost, Jeremy, Francois Le Borgne, Arnaud Artu, Jean-François Cornet, et Jack Legrand. 2016. « Chapter Five - Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts ». In *Advances in Chemical Engineering*, édité par Jack Legrand, 48:257-310. Photobioreaction Engineering. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065237715000150>.
- Ramanna, Luveshan, Abhishek Guldhe, Ismail Rawat, et Faizal Bux. 2014. « The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources ». *Bioresource Technology*, 168 (septembre):127-35. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.064>.
- Raso, Sayam, Bernard van Genugten, Marian Vermuë, et René H. Wijffels. 2012. « Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity ». *Journal of Applied Phycology* 24 (4):863-71. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9706-z>.
- Reyna-Velarde, Rodolfo, Eliseo Cristiani-Urbina, Dulce Jazmin Hernández-Melchor, Frédéric Thalasso, et Rosa Olivia Cañizares-Villanueva. 2010. « Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path ». *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49 (1):97-103. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.11.014>.
- Richmond, A. 2004. in: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, *Blackwell science*, 2nd Edition .
- Ritchie, Raymond J. 2006. « Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents ». *Photosynthesis Research* 89 (1):27-41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>.
- Roopnarain, Ashira, Stuart Sym, et Vincent Myles Gray. 2015. « Effect of Nitrogenous Resource on Growth, Biochemical Composition and Ultrastructure of *Isochrysis Galbana* (Isochrysidales, Haptophyta) ». *Phycological Research* 63 (1):43-50. <https://doi.org/10.1111/pre.12070>.
- Roustan, Michel. 2003. « Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux ». Edition TEC & DOC ed.
- Ruangsomboon, Suneerat. 2015. « Effects of Different Media and Nitrogen Sources and Levels on Growth and Lipid of Green Microalga *Botryococcus Braunii* KMITL and Its Biodiesel Properties Based on Fatty Acid Composition ». *Bioresource Technology* 191 (septembre):377-84. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.091>.



- Rubio, F. Camacho, F. G. Ación Fernández, J. A. Sánchez Pérez, F. García Camacho, et E. Molina Grima. 1999. « Prediction of Dissolved Oxygen and Carbon Dioxide Concentration Profiles in Tubular Photobioreactors for Microalgal Culture ». *Biotechnology and Bioengineering* 62 (1):71-86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990105\)62:1<71::AID-BIT9>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990105)62:1<71::AID-BIT9>3.0.CO;2-T).
- Salvucci, Michael E., et Steven J. Crafts-Brandner. 2004. « Inhibition of Photosynthesis by Heat Stress: The Activation State of Rubisco as a Limiting Factor in Photosynthesis ». *Physiologia Plantarum* 120 (2):179-86. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x>.
- Sander, Rolf. 1999. *Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry*. Max-Planck Institute of Chemistry, Air Chemistry Department.
- Sanz-Luque, Emanuel, Alejandro Chamizo-Ampudia, Angel Llamas, Aurora Galvan, et Emilio Fernandez. 2015. « Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae ». *Frontiers in Plant Science* 6 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>.
- Scoma, Alberto, Luca Giannelli, Cecilia Faraloni, et Giuseppe Torzillo. 2012. « Outdoor H<sub>2</sub> Production in a 50-L Tubular Photobioreactor by Means of a Sulfur-Deprived Culture of the Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *Journal of Biotechnology* 157 (4):620-27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.040>.
- Slade, Raphael, et Ausilio Bauen. 2013. « Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects ». *Biomass and Bioenergy*, 20th European Biomass Conference, 53 (Supplement C):29-38. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>.
- Souliès, Antoine. 2014. « Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique ». Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Souliès, Antoine, Jack Legrand, Hélène Marec, Jérémy Pruvost, Cathy Castelain, Teodor Burghelea, et Jean-François Cornet. 2016. « Investigation and Modeling of the Effects of Light Spectrum and Incident Angle on the Growth of *Chlorella Vulgaris* in Photobioreactors ». *Biotechnology Progress* 32 (2):247-61. <https://doi.org/10.1002/btpr.2244>.
- Sousa, Claudia, Ana Compadre, Marian H. Vermuë, et Rene H. Wijffels. 2013. « Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans* ». *Algal Research* 2 (2):122-26. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.007>.
- Sueoka, Noboru. 1960. « Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *chlamydomonas reinhardtii* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46 (1):83-91.

- Takache, Hosni. 2010. Caractérisation, modélisation de la croissance photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur et mise en évidence du couplage à l'hydrodynamique. Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Takache, Hosni, Jérémy Pruvost, et Jean-François Cornet. 2012. « Kinetic Modeling of the Photosynthetic Growth of *Chlamydomonas Reinhardtii* in a Photobioreactor ». *Biotechnology Progress* 28 (3):681-92. <https://doi.org/10.1002/btpr.1545>.
- Takache, Hosni, Jérémy Pruvost, et Hélène Marec. 2015. « Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation ». *Algal Research* 8 (mars):192-204. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.009>.
- Taleb, A., J. Pruvost, J. Legrand, H. Marec, B. Le-Gouic, B. Mirabella, B. Legeret, et al. 2015. « Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis* ». *Bioresource Technology* 177 (février):224-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.068>.
- Taleb, L, S Kandilian, S Touchard, S Montalescot, S Rinaldi, L Taha, L Takache, L Marchal, J LEGRAND, et J Pruvost. 2016. « Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production ». *Bioresource Technology* 218:480-90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.086>.
- Tamburic, Bojan, Supriya Guruprasad, Dale T. Radford, Milán Szabó, Ross McC Lilley, Anthony W. D. Larkum, Jim B. Franklin, et al. 2014. « The Effect of Diel Temperature and Light Cycles on the Growth of *Nannochloropsis oculata* in a Photobioreactor Matrix ». *PLOS ONE* 9 (1):e86047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086047>.
- Terry, Kenneth L. 1986. « Photosynthesis in Modulated Light: Quantitative Dependence of Photosynthetic Enhancement on Flashing Rate ». *Biotechnology and Bioengineering* 28 (7):988-95. <https://doi.org/10.1002/bit.260280709>.
- Titica, Mariana. 2017. « Online estimation of microalgae growth in photobioreactor based on oxygen in situ measurements ».
- Torzillo, G., L. Giovannetti, F. Bocci, et R. Materassi. 1984. « Effect of Oxygen Concentration on the Protein Content of *Spirulina* Biomass ». *Biotechnology and Bioengineering* 26 (9):1134-35. <https://doi.org/10.1002/bit.260260920>.
- Torzillo, G., A. Sacchi, et R. Materassi. 1991. « Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors ». *Bioresource Technology, Algal biotechnology*, 38 (2):95-100. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90137-9](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90137-9).
- Torzillo, Giuseppe, et Avigad Vonshak. 2013. « Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures ». In *Handbook of Microalgal Culture*, édité par Amos

- Richmond Ph D. Emeritus et Qiang Hu Ph.D, 90-113. John Wiley & Sons, Ltd.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118567166.ch6/summary>.
- Ugwu, C. U., H. Aoyagi, et H. Uchiyama. 2007. « Influence of Irradiance, Dissolved Oxygen Concentration, and Temperature on the Growth of *Chlorella Sorokiniana* ». *Photosynthetica* 45 (2):309-11. <https://doi.org/10.1007/s11099-007-0052-y>.
- Ugwu C.U, H.Aoyagi, H.Uchiyama. 2008. « Photobioreactors for mass cultivation of algae ». *Bioresource Technology* 99 (10):4021-28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>.
- Ugwu, C U., et Hideki Aoyagi. 2012. « Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operation and Applications ». *Biotechnology(Faisalabad)* 11 (3):127-32. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.127.132>.
- Urbain, Briec. 2017. « Elaboration d'un modèle biochimiquement structuré de la croissance d'une microalgue eucaryote en PBRs: *chlamydomonas reinhardtii* ». thèse de doctorat; Université de Nantes.
- Valiorgue, P., H. Ben Hadid, M. El Hajem, L. Rimbaud, A. Muller-Feuga, et J. Y. Champagne. 2014. « CO<sub>2</sub> mass transfer and conversion to biomass in a horizontal gas-liquid photobioreactor ». *Chemical Engineering Research and Design, Green Processes and Eco-technologies*, 92 (10):1891-97. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.02.021>.
- Verdelho Vieira, Vítor. 2017. « contribution for the nomenclature of microalgae production systems ».
- Vonshak, Avigad. 1997. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. CRC Press.
- Vonshak, Avigad, Giuseppe Torzillo, Paola Accolla, et Luisa Tomaselli. 1996. « Light and Oxygen Stress in *Spirulina Platensis* (Cyanobacteria) Grown Outdoors in Tubular Reactors ». *Physiologia Plantarum* 97 (1):175-79. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00494.x>.
- Weissman, J. C., R. P. Goebel, et J. R. Benemann. 1988. « Photobioreactor Design: Mixing, Carbon Utilization, and Oxygen Accumulation ». *Biotechnology and Bioengineering* 31 (4):336-44. <https://doi.org/10.1002/bit.260310409>.
- Wollman, Francis-André. 2001. « NEW EMBO MEMBER'S REVIEW ». *The EMBO Journal* 20 (14):3623-30. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3623>.
- Wu, J., S. Neimanis, et U. Heber. 1991. « Photorespiration Is More Effective than the Mehler Reaction in Protecting the Photosynthetic Apparatus against Photoinhibition ». *Botanica Acta* 104 (4):283-91. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1991.tb00231.x>.
- Xin, Li, Hu Hong-ying, et Zhang Yu-ping. 2011. « Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature ».

Yang, Xiao-e, Xiang Wu, Hu-lin Hao, et Zhen-li He. 2008. « Mechanisms and assessment of water eutrophication ». *Journal of Zhejiang University. Science. B* 9 (3):197-209. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710626>.

Y. S. HII; C. L. SOO , T. S. CHUAH , A. MOHD-AZMI AND A. B. ABOL-MUNAFI. 2011. «Interactive effect of Ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp». *Journal of Sustainability Science and Management* Volume 6 Number 1, June 2011: 60-68

Zittelli, Graziella Chini, Liliana Rodolfi, Niccoló Bassi, Natascia Biondi, et Mario R. Tredici. 2013. « Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production ». In *Algae for Biofuels and Energy*, 115-31. *Developments in Applied Phycology*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_7).

---