

**ANALYSE COMPARATIVE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS
CARBONÉS POUR LA CROISSANCE EN HÉTÉROTROPHIE
DE TROIS ESPÈCES DE MICROALGUES**

Thèse soumise par Pablo Perez Saura

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Sciences

UNIVERSITÉ DE LIÈGE – FACULTÉ DES SCIENCES – DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE DES MICROALGUES

PROMOTRICE : Pr. CLAIRE REMACLE

CO-PROMOTEUR : Dr. PIERRE CARDOL

Année académique 2024 — 2025

ANALYSE COMPARATIVE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS CARBONÉS POUR LA CROISSANCE EN HÉTÉROTROPHIE DE TROIS ESPÈCES DE MICROALGUES

Thèse soumise par Pablo Perez Saura

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Sciences

UNIVERSITÉ DE LIÈGE – FACULTÉ DES SCIENCES – DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE DES MICROALGUES

PROMOTRICE : Pr. CLAIRE REMACLE

CO-PROMOTEUR : Dr. PIERRE CARDOL

Membres du Jury

Pr. Claire PÉRILLEUX (Présidente - ULiège)

Dr. Annick WILMOTTE (Secrétaire - ULiège)

Pr. Aurore RICHEL (ULiège)

Pr. Anne-Lise HANTSON (UMons)

Dr. Jean-François SASSI (CEA Tech – Saint-Paul-Lez-Durance)

REMERCIEMENTS

Durant ces quatre années de thèse, j'ai eu l'immense chance d'être entouré de nombreuses personnes brillantes et bienveillantes qui m'ont permis de mener à bien ce travail, tant d'un point de vue intellectuel et scientifique, que psychologique. Chacune à sa manière, toutes les personnes que je remercie auront eu un impact sur mon parcours et sur le plaisir que j'ai éprouvé durant cette période si spécifique de ma vie. Je ne sais pas si trouver un épanouissement en tant que doctorant est chose facile, mais grâce à un entourage unique, je peux clairement dire que ça a été mon cas. Dans un premier temps viennent les promoteurs et promotrices, qui, tout à coup, deviennent pour le jeune chercheur un pilier indispensable au bon déroulement des opérations futures. Pour ma part, et je le dis en toute sincérité, mes promoteurs ont simplement été incroyables.

Ma promotrice, Claire Remacle, m'a montré depuis le premier jour beaucoup de considération, tant sur le plan professionnel que personnel. Le parcours d'un doctorant peut parfois être malheureusement très solitaire. Grâce à Claire, à sa bienveillance, à son écoute et à ses conseils, j'ai toujours eu le sentiment de faire partie d'une équipe, travaillant de concert pour mener à bien un objectif commun. Je tiens à souligner particulièrement ses principes pédagogiques vis-à-vis de ses étudiants, basés sur le renforcement positif, toujours là pour les encourager et souligner leurs qualités plutôt que de les blâmer pour leurs défauts. Grâce à toi (oserais-je enfin le tutoiement ?), mon expérience de doctorat a été exceptionnelle, et je me sens heureux que l'on ait pu créer une telle relation, que je qualifierais tant d'amicale que de professionnelle. Pour tout cela, je te remercie de tout cœur.

Je tiens également à chaleureusement remercier mon co-promoteur, Pierre 'la grande antenne' Cardol, pour sa sympathie, sa bonne humeur et son humour sarcastique. Lui qui, même quand ils lui étaient envoyés en dernière minute, a toujours su donner un regard attentif et éclairé sur nos travaux, et ce dans des conditions dignes des meilleurs scénarios catastrophe hollywoodiens, notamment un départ de vacances en voiture avec deux ados sur la banquette arrière. Je n'oublierai pas non plus les moments passés à discuter autour d'un verre, ou mes promenades avec la merveilleuse Oki, qui a toujours su faire preuve de plus calme et de maturité que moi lors de certaines réunions de labo dont la fin semblait relever davantage du rêve que de la réalité.

Bien sûr, quelle aurait été cette expérience sans tous mes collègues adorés, qui n'ont cessé d'embellir mon quotidien, et pour qui l'envie de partager est devenue un besoin. Merci à Steph et Amélie, mes encadrantes de la première heure, grâce à qui j'ai découvert les joies de la vie au sein de l'institut de botanique. Elles ont été, grâce à leur humanité, leurs enseignements, et la complicité de leur chef de labo, Fabrice Franck, les premières personnes à m'avoir donné goût à la recherche, me donnant envie d'évoluer dans ce domaine à leurs côtés.

Merci également à tous les anciens : Anna, Fabrizio, Félix, Gwen, pour votre accueil chaleureux et le soutien que l'on a pu recevoir de votre part lorsqu'on était encore les bébés du labo. Merci à Tommy et Edmouille, avec qui j'ai eu la chance de commencer mon doctorat, mais aussi une amitié qui

a dépassé toutes mes espérances. Je pense que je n'ai même pas besoin de vous dresser une liste de ce que j'aime chez vous ou de ce que vous m'avez apporté, et continuerez longtemps de m'apporter.

Un tout grand merci également à tous les autres que j'ai pu croiser lors de mon parcours : Issou, pour la confiance réciproque que l'on a su construire, et les moments délirants que j'ai pu vivre grâce à toi quand tu t'incrustais à nos soirées arrosées ; Lain-lain, pour ta capacité à me rassurer en toutes circonstances et toujours voir mes problèmes comme des défis à résoudre, mais aussi pour avoir donné naissance à nos trois merveilleux enfants, et pour avoir animé certains de mes mardis soirs grâce à tes lives Twitch (que je recommande vivement, si jamais => « loodyme ») ; Damso, pour nos discussions politico-philosophiques enrichissantes dans la salle HPLC (sur lesquelles on est toujours d'accord), mais aussi pour tes blagues plus que douteuses, qui sont toujours les bienvenues ; Yayou, pour ton intérêt sincère envers les autres, ton humour, et pour le réconfort que ça a été pour moi de savoir qu'en venant le week-end, j'allais au moins retrouver un visage familier ; Hadri, Antoine, Flo et Lindsey, les anciens stagiaires, qui ont si bien réussi à s'intégrer qu'on n'imaginerait plus une journée sans les voir, et qui, j'en suis convaincu, sont la relève idéale pour maintenir cette précieuse harmonie qui rend notre environnement de travail unique ; Paulina et Nanou, avec qui j'ai eu la chance de partager de très bons moments de rire et de complicité, et pour qui la franchise est un mantra duquel beaucoup devraient s'inspirer.

Je remercie également chaleureusement Mimi et Nadine, qui ont été, pour bon nombre d'entre nous, un refuge dans nos journées. Leur bureau a toujours été un havre de paix, où l'on pouvait librement discuter, rire ou pleurer en toute confiance.

Merci également à tous les autres collègues du bâtiment ; Stéphane, Maud, Alice, Steven, Quentin, Chloé², Pauline, j'en passe et des meilleurs, qui ont fait partie de ma vie, et avec qui j'ai pu partager des moments d'évasion, de détente ou d'enrichissement, uniques et propres à chacun d'eux.

Je tiens enfin à remercier les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Charlotte, Amandine, Jean-Christophe, Pranita, Mathias et Clarisse, pour les efforts et l'intérêt qu'ils ont portés à notre projet, sans qui certains résultats n'auraient probablement jamais vu le jour.

Au-delà de l'environnement de travail, je tiens à remercier tous mes amis les plus proches, qui se reconnaîtront probablement (bien que je doute sincèrement qu'ils lisent ceci un jour), pour avoir été là toutes ces années durant, et qui resteront pour toujours et à jamais d'une importance capitale à mes yeux. Bien que nos chemins professionnels soient parfois très éloignés, vous arrivez comme personne à faire semblant de vous intéresser à mes recherches, mais surtout, vous avez toujours été là pour moi sans concessions, dans la plus belle des bienveillances et dans l'amour le plus sincère. J'ai la chance de faire partie de votre famille, vous ne m'avez jamais déçu, et je vous dois en grande partie d'être la personne que je suis aujourd'hui. Parmi eux se trouve la personne avec qui je partage ma vie, et qui a été en première ligne dans mes périodes de doute, de stress et de remise en question par rapport à mon travail. Merci à ma Juju d'être là chaque jour pour moi : ta confiance, tes conseils, tes petits plats, mais aussi ton sourire d'arsouille et ton inlassable mot pour rire, m'ont permis de croire

en moi et m'ont chaque jour donné une motivation supplémentaire pour me lever le matin (enfin... me lever).

J'en viens maintenant à mes parents, Carlos et Sabine, que je ne sais même pas comment remercier pour leur soutien dans toutes les situations imaginables, leur dévotion sans limite, et, par-dessus tout, pour l'amour inconditionnel que j'ai pu recevoir. Plus que des parents, vous êtes des amis et des confidents, un pilier essentiel sur qui j'ai toujours pu compter. Je vous admire énormément, pour votre remise en question, votre acceptation de l'autre, votre liberté et vos valeurs, mais aussi pour vos rares défauts. J'ai une chance infinie de vous avoir. Merci pour tout.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude aux membres de mon jury de thèse, le Dr Jean-François Sassi, la Dr Annick Wilmotte, la Pr Anne-Lise Hantson et la Pr Aurore Richel, pour avoir accepté d'évaluer le fruit de mes quatre années de recherches. Leurs commentaires avisés et complémentaires ont apporté un regard enrichissant à ce travail. Je tiens particulièrement à remercier la Pr Claire Périlleux, qui m'a accompagné dans les dernières étapes de cette aventure, assumant pleinement son rôle de présidente du jury.

Cette thèse marque la fin d'un chapitre important de ma vie, et une fois de plus je vous dis à tous merci d'y avoir laissé une trace. Je ne vous dis pas au revoir, puisque je sens que je n'en ai pas encore terminé avec vous.

MENTION SUR L'USAGE DE L'INTELLIGENCE ARTIFICIELLE

Au cours de la préparation de ce travail, le logiciel d'intelligence artificielle ChatGPT (OpenAI) a pu être utilisé en soutien pour l'amélioration linguistique et grammaticale du manuscrit. L'utilisation de cet outil n'a en aucun cas servi à produire du contenu scientifique à proprement parlé, lequel relève entièrement de la responsabilité de l'auteur de cette thèse.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Notre travail s'est focalisé sur l'optimisation de la culture de microalgues en hétérotrophie, en exploitant des substrats carbonés non conventionnels issus de sous-produits industriels. Plus précisément, trois axes de recherche ont été explorés : l'adaptation cellulaire de *Galdieria sulphuraria* en hétérotrophie en présence de glucose ou de glycérol ; l'utilisation de xylose, de glucose et d'acétate pour la croissance de *G. sulphuraria*, *Euglena gracilis* et *Auxenochlorella protothecoides* ; et enfin, la capacité de *A. protothecoides* à assimiler le xylose et à produire du xylitol.

La première partie de ce travail s'est concentrée sur la capacité d'adaptation de *G. sulphuraria*, une microalgue extrémophile, à l'utilisation du glucose et du glycérol comme sources de carbone en hétérotrophie. Nous avons montré que, bien que la croissance et la composition globale de la biomasse soient similaires en présence des deux substrats, la pigmentation cellulaire était fortement affectée par la présence de glucose. En effet, les cellules cultivées en présence de glucose perdaient leur coloration, contrairement à celles cultivées en présence de glycérol. Cette dépigmentation s'est révélée réversible et accompagnée d'une répression marquée des gènes impliqués dans la photosynthèse et la biosynthèse des pigments. Nos résultats suggèrent donc que le glucose exerce un effet inhibiteur sur la synthèse des pigments, renforcé par la culture à l'obscurité.

La seconde partie de cette thèse s'est intéressée à la valorisation des hydrolysats d'hémicellulose du bois de peuplier, qui contiennent principalement du xylose, du glucose et de l'acétate. Nous avons évalué la croissance de trois microalgues issues de phylums différents, *G. sulphuraria*, *E. gracilis* et *A. protothecoides*, en présence de ces trois sources de carbone, individuellement et en combinaison. Il est apparu que *G. sulphuraria* utilisait efficacement le xylose comme source principale de carbone, atteignant des rendements élevés en biomasse et produisant principalement du phytylglycogène et des protéines. *E. gracilis*, quant à elle, ne métabolisait que l'acétate, tout en accumulant du paramylon pour près de la moitié de son poids sec. Enfin, *A. protothecoides* montrait une capacité à utiliser l'acétate et le glucose, mais pas le xylose seul. Cependant, en présence d'un mélange des trois substrats, *A. protothecoides* assimilait le xylose, suggérant une induction du métabolisme du xylose par le glucose et l'acétate. En outre, elle s'est révélée être l'espèce étudiée produisant le plus d'acides gras, avec un taux avoisinant les 20% de sa biomasse sèche.

Dans la dernière partie de notre étude, nous avons exploré le métabolisme du xylose chez *A. protothecoides*, et en particulier sa capacité à convertir ce sucre en xylitol, un polyol massivement utilisé dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Nous avons démontré que l'assimilation du xylose était fortement stimulée par la présence conjointe de glucose et d'acétate, ce qui se traduisait par une conversion quasi stœchiométrique du xylose en xylitol. Une stratégie en fed-batch a permis d'améliorer encore ce rendement, atteignant des valeurs comparables aux microorganismes industriels utilisés pour la bioproduction de xylitol. L'analyse bioinformatique du génome de *A. protothecoides* a permis d'identifier des transporteurs de xylose putatifs et une xylose réductase atypique, ouvrant la voie à d'éventuelles améliorations par ingénierie métabolique ou génétique.

Ce travail a mis en évidence le potentiel de *G. sulphuraria* et *A. protothecoides* pour la valorisation des sous-produits industriels en biomasse et en produits d'intérêt. *G. sulphuraria* s'est révélée être une candidate idéale pour la conversion du xylose en biomasse riche en acides gras saturés, tandis que *A. protothecoides* a montré une flexibilité métabolique remarquable permettant une valorisation efficace du xylose en xylitol. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de procédés durables de production de biocarburants et de biomolécules à partir de déchets industriels.

THESIS SUMMARY

Our work focused on optimizing the heterotrophic cultivation of microalgae by exploiting unconventional carbon substrates derived from industrial by-products. More specifically, three research axes were explored: the adaptation of *Galdieria sulphuraria* to heterotrophy in the presence of glucose or glycerol; the use of xylose, glucose, and acetate for the growth of *G. sulphuraria*, *Euglena gracilis*, and *Auxenochlorella protothecoides*; and finally, the ability of *A. protothecoides* to assimilate xylose and produce xylitol.

The first part of this study focused on the adaptation capacity of *G. sulphuraria*, an extremophilic microalga, to the use of glucose and glycerol as carbon sources under heterotrophic conditions. We showed that, while growth and overall biomass composition were similar in the two substrates, cellular pigmentation was strongly affected by the presence of glucose. Indeed, cells cultivated in the presence of glucose lost their coloration, unlike those grown with glycerol. This depigmentation was found to be reversible and was accompanied by a marked repression of genes involved in photosynthesis and pigment biosynthesis. Our results suggest that glucose exerts an inhibitory effect on pigment synthesis, further enhanced by cultivation in darkness.

The second part of this thesis focused on the valorization of hemicellulose hydrolysates from poplar wood, which primarily contain xylose, glucose, and acetate. We evaluated the growth of three microalgae from different phyla—*G. sulphuraria*, *E. gracilis*, and *A. protothecoides*—in the presence of these three carbon sources, individually and in combination. It was found that *G. sulphuraria* efficiently utilized xylose as its main carbon source, achieving high biomass yields while primarily producing phytylglycogen and proteins. *E. gracilis*, on the other hand, metabolized only acetate while accumulating paramylon, which accounted for nearly half of its dry weight. Finally, *A. protothecoides* demonstrated the ability to use acetate and glucose but not xylose alone. However, in the presence of a mixture of the three substrates, *A. protothecoides* assimilated xylose, suggesting an induction of xylose metabolism by glucose and acetate, in addition to show the highest amount of fatty acids in this study.

In the third part of our study, we explored xylose metabolism in *A. protothecoides*, particularly its ability to convert this sugar into xylitol, used in food and pharmaceuticals. We demonstrated that xylose assimilation was strongly stimulated by the simultaneous presence of glucose and acetate, resulting in an almost stoichiometric conversion of xylose into xylitol. A fed-batch strategy further improved this yield, reaching values comparable to industrial microorganisms used for xylitol bioproduction. A bioinformatics analysis of the *A. protothecoides* genome identified putative xylose transporters and an atypical xylose reductase, paving the way for potential metabolic and genetic engineering improvements.

This work highlights the potential of *G. sulphuraria* and *A. protothecoides* for the valorization of lignocellulosic residues into biomass and industrially relevant products. *G. sulphuraria* emerged as an ideal candidate for converting xylose into biomass rich in saturated fatty acids, while *A. protothecoides* demonstrated remarkable metabolic flexibility, enabling the efficient valorization of xylose into xylitol. These findings open new perspectives for the development of sustainable processes for biofuel and biomolecule production from industrial waste.

PUBLICATIONS

- Martinez-Villarreal S, Breitenstein A, Nimmegeers P, Perez Saura P, Hai B, Asomaning J, Alizadeh Eslami A, Billen P, Van Passel S, Bressler D C, Debecker D P, Remacle C, Richel A. (2022) Drop-in biofuels production from microalgae to hydrocarbons: Microalgal cultivation and harvesting, conversion pathways, economics and prospects for aviation. *Biomass and Bioenergy*. 165:106555. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106555>
- Perez Saura P, Chabi M, Corato A, Cardol P and Remacle C. (2022) Cell adaptation of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* to the availability of carbon sources. *Front. Plant Sci.* 13:978246. doi: 10.3389/fpls.2022.978246. **CHAPITRE III**
- Perez Saura P, Gérin S, Cardol P and Remacle C. (2024) Xylose, glucose and acetate as feedstock for three microalgal species cultivated in heterotrophy. *Algal Research*. Volume 83:103689. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103689>. **CHAPITRE IV**
- Perez Saura P, Cardol P, and Remacle C. Xylose uptake in heterotrophic *Auxenochlorella protothecoides*: Unlocking the potential of microalgae for xylitol bioproduction, en revision : **CHAPITRE V**

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

- 21^e congrès du Groupe Français de Bioénergétique (GFB) (*En ligne – 21-24 septembre 2021*). *Galdieria sulphuraria* heterotrophic metabolism in the presence of different carbon sources. (*Communication poster*). <http://hdl.handle.net/2268/319249>
- Séminaire à portée internationale du projet ADV_BIO (Anvers – 3 mai 2022) Optimization of the growth of microalgae in the presence of organic carbon sources by genetic and physiological approaches. (*Communication orale*).
- 5^e édition du InBios Day (Liège, BE – 15 juin 2022). Glycerol and glucose are efficient carbon sources for heterotrophic growth and influence pigment composition of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria*. (*Communication orale et poster*). <http://hdl.handle.net/2268/319278>
- International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts (AlgalBBB) (Waikoloa Beach, HI, USA – 12-14 juin 2023) et 7^e édition de l'Annual Meeting on Plant Ecology and Evolution (AMPEE) (Liège, BE – 14 novembre 2023). Hemicellulose valorization for biofuel production from microalgae grown in heterotrophy. (*Communication poster*). <http://hdl.handle.net/2268/319349>
- 8^e édition du congrès de l'International Society of Applied Phycology (ISAP) (Porto, Portugal – 16-21 juin 2024). Hemicellulose valorization from three microalgal species grown in heterotrophy for biofuel production. (*Communication orale*). <http://hdl.handle.net/2268/324943>

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

α -KG : α -cétoglutarate	DAGAT : diacylglycérol acyltransférase
AAT : Aspartate aminotransférase	DBE : Enzyme débranchante
ACADs : Acyl-CoA déshydrogénases	DEG : Gène différentiellement exprimé
ACCase : Acétyl-CoA carboxylase	DHA : Dihydroxyacétone
ACL : ATP-citrate lyase	DHA-(P) : dihydroxyacétone-(phosphate)
ACO : Aconitase	DHAK : Dihydroxyacétone kinase
ACP : protéine porteuse d'acyle	ECH : Énoyl-coa hydratase
ACS : Acétyl-CoA synthétase	EgGCE : Enzyme du cycle du glyoxylate de <i>Euglena gracilis</i>
AKR : Aldocéto réductase	ENG : endo- β -1:3-glucanase
AKR2 : Aldocéto réductase de type II	ENO : Énolase
AMT : Transporteur de l'ammonium	ENR : Énoyl-ACP réductase
Amy α / β : α -amylase et β -amylase	EPA : Acide eicosapentaénoïque
AOX : Oxydase alternative	ER : Réticulum endoplasmique
ATPS : ATP synthase	EXG : Exo- β -1,3-glucanase
BE : Enzyme de branchement de l'amidon	FA : Acide gras
BPGA : 1,3-bisphosphoglycérate	FAD : Cofacteur flavine adénine dinucléotide
CCM : Mécanisme de concentration du carbone	FAME : Ester méthylique d'acide gras
CI : Complexe I, NADH:ubiquinone oxydoréductase	FAS : Fatty acid synthase
CIC : antiport citrate-malate	FAT : Thioestérase d'acyle-ACP
CII : Complexe II, Succinate déshydrogénase	FAX : Fatty-acid export proteins
CIII : Complexe III, Ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase	FBA : Fructose biphosphate aldolase
CIV : Complexe IV, cytochrome c oxydase	FBPase : Fructose-1:6-bisphosphatase
CS : Citrate synthase	FH : Fumarase
Cyt c : cytochrome c	FID : Détecteur à ionisation de flamme
	G6Pase : Glucose-6-phosphatase

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase	LC-FACS : Acyl-CoA synthase à longue chaîne
GAA : Antiport glutamate/aspartate	LPAAT : Lyso-phosphatidate acyltransférase
GAPDH : Glycéraldéhyde déshydrogénase	LPAT : Lyso-phosphatidylcholine acyltransférase
GBSS : Granule-Bound Starch Synthase	Mase : maltase
GC : Chromatographie en phase gazeuse	MAT : Malonyl-CoA:ACP transacylase
GDH : Glycérol déshydrogénase	MCT : Transporteur de monocarboxylates
GDP : Guanosine diphosphate	MDH : Malate déshydrogénase
GK : Glycérol kinase	MES : Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
GLDH : Glutamate déshydrogénase	MFS, MSF : Major Facilitator Superfamily
GLUT : Transporteur du glucose	MKA : Antiport malate/ α -cétoglutarate
GOGAT : Glutamate synthase	MOS : Navette malate-oxaloacétate
GPAT : Glycérol-3-phosphate acyltransférase	MPC : Transporteur mitochondrial du pyruvate
GPDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	MS : Malate synthase
GPI : Glucose-6-Phosphate Isomérase	MUFA : Acide gras monoinsaturé
GS : Glutamine synthétase	NDH : NAD(P)H déshydrogénase de type II
GSII : β -1,3-glucane synthase	OD800 : Densité optique à 800nm
HADH : 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase	OGDC : α -cétoglutarate décarboxylase
HADHB : Acétyl-CoA acyltransférase	OGDH : α -cétoglutarate déshydrogénase
HD : 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase	PAP : phosphatidate phosphatase
HGT : Transfert horizontal de gène	PC : Pyruvate carboxylase
HK : Hexokinase	PCA : Principal component analysis
HMF : Hydroxyméthylfurfural	PCR : Réaction en chaîne de la polymérase
HPLC : Chromatographie à haute performance	PDA : Détecteur à photodiode
ICL : Isocitrate lyase	PDH : Pyruvate déshydrogénase
IDH : Isocitrate Déshydrogénase	PEP : Phosphoénolpyruvate
KAR : 3-Cétoacyl-ACP Réductase	
KAS : 3-Cétoacyl-ACP Synthase	

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase	SDS-EB : Tampon sodium dodécyl sulfate, EDTA
PFK-1 : Phosphofructokinase-1	SFA : Acide gras saturé
PGAM : Phosphoglycérate mutase	SS : Starch synthase
PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase	STP10 : Sugar transporter 10
PGK : Phosphoglycérate kinase	TA : Transaldolase
PGLase : 6-phosphogluconolactonase	TCA : Cycle des Acides Tricarboxyliques ou Cycle de Krebs
PGM : Phosphoglycérate mutase	TGA : Triacylglycérol
PNO : pyruvate:NADP oxydoréductase	TK : Transcétolase
PPDK : Pyruvate phosphate dikinase	TMP : Tris-minimal Phosphate
PUFA : Acide gras polyinsaturé	TPI : Triose-phosphate isomérase
PYK : Pyruvate Kinase	UQ : Ubiquinone
RID : Détecteur à indice de réfraction	UQH ₂ : Ubiquinol
ROS : Espèce réactive de l'oxygène	UV-VIS : De l'ultra-violets au visible
RPE : Ribulose-5-phosphate 3-épimérase	XDH : Xylitol Déshydrogénase
RPI : Ribulose-5-phosphate isomérase	XK : Xylulokinase
SBH : Hydrolysat de bagasse de canne à sucre	XR : Xylose réductase
SCS : Succinyl-CoA synthétase	
SD : Déviation standard par rapport à la moyenne	
SDH : Succinate déshydrogénase	

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I

FIGURE 1 : Représentation de l'arbre des eucaryotes de la vie.	p1
FIGURE 2 : Acquisition du chloroplaste dans les différentes lignées d'eucaryotes photosynthétiques.	p3
FIGURE 3 : Photos prises au microscope de <i>G. sulphuraria</i> , <i>A. protothecoides</i> , et <i>E. gracilis</i>	p7
FIGURE 4 : Représentation schématique du chloroplaste et de la réaction de photosynthèse.	p11
FIGURE 5 : Représentation schématique des différentes voies métaboliques associées à l'assimilation de diverses sources de carbone et de l'ammonium chez les microalgues en hétérotrophie.	p14-16
FIGURE 6 : Schéma de la chaîne de transport d'électron mitochondriale.	p21
FIGURE 7 : Voie de biosynthèse des acides gras chez <i>E. gracilis</i> par le procédé β -oxydation inverse, lié à la synthèse d'ATP par respiration anaérobie.	p24
FIGURE 8 : Représentation de polymères linéaires naturels du glucose se différenciant par la nature de leurs liaisons osidiques.	p26
FIGURE 9 : Équilibre du couple ammonium (NH_4^+)/ammoniac (NH_3) en fonction du pH (A) et représentation schématique du métabolisme de l'ammonium chez les microalgues (B).	p28
FIGURE 10 : Production d'ester méthyliques d'acide gras (FAME, Fatty Acid Methyl Ester) avec libération de glycérol comme sous-produit de la réaction.	p33
FIGURE 11 : Représentation schématique des composants de la matière lignocellulosique.	p34

CHAPITRE III

FIGURE 1 : Densité cellulaire et concentration en nutriments dans le milieu de culture de <i>G. sulphuraria</i> cultivée à l'obscurité en présence de glucose ou de glycérol.	p50
TABLEAU 1 : Tableau comparatif des paramètres de croissance de <i>G. sulphuraria</i> cultivée sur différents substrats en hétérotrophie.	p51
FIGURE 2 : Composition de la biomasse de cellules de <i>G. sulphuraria</i> cultivée à l'obscurité en présence de glucose ou de glycérol.	p52
FIGURE 3 : Photo des cultures de <i>G. sulphuraria</i> en phototrophie ou en hétérotrophie.	p53
FIGURE 4 : Corrélation de Pearson (PC) and analyse des composants principaux (PCA) de la base de donnée RNA-seq de neuf échantillons indépendants récoltés en phase exponentielle.	p53
FIGURE 5 : Vulcano plot des résultats RNA-seq.	p54
FIGURE 6 : Représentation schématique des étapes de la glycolyse et du cycle de Krebs avec indications des enzymes différenciellement exprimées en fonction des conditions étudiées.	p56
FIGURE 7 : Représentation schématique du mécanisme de concentration du carbone (CCM) et de la photorespiration avec indications des enzymes différenciellement exprimées en fonction des conditions étudiées.	p57
FIGURES S1 : Contenu pigmentaire de <i>G. sulphuraria</i> cultivée en phototrophie et en hétérotrophie (glucose ou glycérol).	p63
FIGURE S2 : GO terms et voies métaboliques KEGG d'après l'analyse des gènes différenciellement exprimés en fonction des conditions.	p64
TABLEAU S1 : Profile et quantification des acides gras accumulés par <i>G. sulphuraria</i> cultivée en hétérotrophie en présence de glucose ou de glycérol.	p65

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

TABLEAU S2 : Abondance et qualité des reads d'ARN utilisée pour l'analyse RNA-Seq.....	p65
---	-----

CHAPITRE IV

FIGURE 1 : Représentation schématique de l'absorption et du métabolisme du glucose, du xylose, de l'acétate et de l'ammonium (NH ₄ ⁺) chez les microalgues.....	p75
---	-----

TABLEAU 1 : Comparaison des concentrations des molécules et des éléments entre les milieux 2xGS Allen et TMP.....	p77
--	-----

FIGURES 2 : Courbes de croissance et évolution de la concentration des sources de carbone et du pH dans les milieux de culture de <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> et <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence de glucose, de xylose ou d'acétate.....	p84
--	-----

FIGURE 3 : Courbes de croissance et évolution de la concentration des sources de carbone et du pH dans les milieux de culture de <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> et <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence d'un mélange de glucose, xylose et acétate.....	p83
---	-----

TABLEAU 2 : Paramètres de croissance de <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> ou <i>A. protothecoides</i> en présence de différents substrats.....	p84
--	-----

FIGURE 4 : Acides gras totaux, polysaccharides de réserve et teneur en protéines des cultures de <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> et <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence de glucose, xylose, acétate ou d'un mélange des trois sources de carbone.....	p91
---	-----

TABLEAU 3 : Profile des acides gras lors des phases exponentielle et stationnaire lorsque la croissance a été observée en présence de glucose, xylose, acétate ou d'un mélange des trois sources de carbone pour <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> ou <i>A. protothecoides</i>	p94
--	-----

FIGURE S1 : Concentrations d'ammonium (NH ₄ ⁺) et de phosphate (PO ₄ ³⁻) au cours du temps dans les milieux de culture de <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> et <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence de glucose, xylose, acétate ou d'un mélange des trois sources de carbone.....	p107
--	------

TABLEAU S1 : Teneur et répartition des pigments lors des phases exponentielle et stationnaire lorsque la croissance a été observée en présence de glucose, xylose, acétate ou d'un mélange des trois sources de carbone pour <i>G. sulphuraria</i> , <i>E. gracilis</i> ou <i>A. protothecoides</i>	p108
--	------

TABLEAU S2 : Densité cellulaire, concentration en source de carbone et pH après 7 jours de culture de la souche <i>E. gracilis</i> Z cultivée dans un milieu KH ou TMP en présence de glucose ou d'acétate (50 mMC) à différentes valeurs de pH initiales.....	p109
---	------

CHAPITRE V

TABLEAU 1 : Sources de carbone fournies dans chaque condition de culture (GX, AX, AGX ou 2x-AGX).	p117
---	------

FIGURE 1 : Courbes de croissance et concentrations des sources de carbone dans le milieu de culture des cellules de <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence de xylose, glucose et/ou acétate.....	p120
--	------

FIGURE 2 : Consommation et de production de xylose et/ou de xylitol calculés à partir des cellules de <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence de xylose et : glucose (GX, acétate (AX) ou les deux sources de carbone en culture batch (AGX) ou en culture fed-batch (2x-AGX).	p122
--	------

FIGURE 3 : Modèle hypothétique de conversion du xylose en xylitol chez <i>A. protothecoides</i> cultivé en hétérotrophie en présence de xylose et de glucose (GX), d'acétate (AX) ou des deux sources de carbone, glucose et acétate (AGX), lors des phases de croissance exponentielle et stationnaire.	p122
--	------

FIGURE 4 : Courbes de croissance et concentrations des sources de carbone dans le milieu de culture des cellules de <i>A. protothecoides</i> cultivées en hétérotrophie en présence de xylose, glucose et acétate dans la condition 2x-AGX.....	p124
--	------

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 5 : Alignement global des transporteurs de xylose de <i>E. coli</i> , <i>C. intermedia</i> et <i>A. thaliana</i> avec deux transporteurs putatifs de xylose de <i>A. protothecoides</i>	p126
FIGURE 6 : Prédiction de la structure 3D de la xylose réductase putative de <i>A. protothecoides</i> comparée à la xylose réductase de <i>D. nepalensis</i> et alignement global des xylose réductases de <i>S. stipitis</i> , <i>C. tenuis</i> et <i>C. sorokiniana</i> avec les domaines N- et C-terminaux de la xylose réductase putative de <i>A. protothecoides</i>	p128
FIGURE S1 : Chromatogrammes HPLC montrant la concentration des sources de carbone dans le milieu de culture de <i>A. protothecoides</i> sous la condition AGX (acétate, glucose et xylose).....	p136
FIGURE S2 : Prédiction de la structure 3D des deux transporteurs putatifs de xylose de <i>A. protothecoides</i>	p137
FIGURE S3 : Alignement global de la xylose réductase putative de <i>A. protothecoides</i> avec les xylose réductases de <i>P. soloecismus</i> et <i>S. obliquus</i>	p138
TABLEAU S1 : Comparaison des transporteurs du xylose chez <i>E. coli</i> et <i>C. intermedia</i> avec des transporteurs putatifs de <i>A. protothecoides</i> et d'un transporteur du glucose chez <i>A. thaliana</i>	p139
TABLEAU S2 : Comparaison de la xylose réductase de <i>Debaryomyces nepalensis</i> , <i>Scheffersomyces stipitis</i> , de la XR putative de <i>C. sorokiniana</i> et de la XR putative de <i>A. protothecoides</i>	p140

CHAPITRE VI : CONCLUSION

FIGURE 12 : Croissance hétérotrophe de <i>G. sulphuraria</i> (pH=2) en présence des sources de carbone présentes dans l'hydrolysate acide d'hémicellulose de peuplier.	p142
TABLEAU 1 : Récapitulatif de résultats concernant l'utilisation de xylose pour la croissance de microalgues en hétérotrophie et en mixotrophie.	p144
TABLEAU 2 : Production de xylitol par divers organismes, modifiés génétiquement ou non.....	p146
FIGURE 13 : Analyse d'hydrolysate d'hémicellulose et culture séquentielle de <i>A. protothecoides</i> et <i>G. sulphuraria</i>	p153
TABLEAU 3 : Composition de la phase aqueuse issue de la liquéfaction hydrothermale et méthode de détection.	p156
FIGURE 14 : Évolution de la densité cellulaire et taux de croissance spécifique de <i>A. protothecoides</i> cultivé en présence de HTL-AP dilué de 5X à 2000X dans un milieu TMP supplémenté en glucose, acétate et xylose.....	p147
ANNEXE 1 : Alignement de différentes enzymes à activité xylitol déshydrogénase (XDH) putative chez <i>A. protothecoides</i> UTEX25 (Ap 1550-148-3715) et <i>C. sorokiniana</i> (Cs1602 6420), avec des XDH caractérisées de <i>Pichia stipitis</i> (Ps xyl2) et <i>Aspergillus flavus</i> (Af XDH).....	p159

TABLE DES MATIERES

1	CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1	Les microalgues.....	1
1.1.1	Endosymbiose et phylogénie.....	2
1.1.2	Pourquoi étudier les microalgues plutôt que les plantes terrestres ?	4
1.1.3	Applications des microalgues	5
1.1.4	Les microalgues étudiées et pourquoi	7
1.2	Le métabolisme du carbone chez les microalgues	10
1.2.1	La photosynthèse oxygénique	10
1.2.2	Le carbone en hétérotrophie.....	12
1.2.3	La glycolyse et gluconéogenèse.....	13
1.2.4	Cycle des pentoses phosphates.....	17
1.2.5	Cycle de Krebs (TCA cycle) et cycle du glyoxylate	19
1.2.6	Respiration cellulaire et phosphorylation oxydative.....	21
1.2.7	Synthèse des lipides et β -oxydation des acides gras.....	22
1.2.8	Polysaccharides de réserve	26
1.2.9	Métabolisme de l'ammonium	28
1.3	Les microalgues en hétérotrophie	30
1.3.1	Avantages de l'hétérotrophie chez les microalgues.....	30
1.3.2	Substrats atypiques pour la croissance en hétérotrophie.....	33
2	CHAPITRE II : Contexte et objectifs de la thèse	39
2.1	Contexte de la thèse	39
2.2	Objectifs de la thèse	41
2.2.1	Adaptation cellulaire de la microalgue rouge extrémophile <i>Galdieria sulphuraria</i> face à la disponibilité en sources de carbone	41
2.2.2	Utilisation du xylose, du glucose et de l'acétate comme nutriments pour la croissance de trois espèces de microalgues cultivées en hétérotrophie.....	41
2.2.3	Assimilation du xylose en hétérotrophie par <i>Auxenochlorella protothecoides</i> : Une avancée vers la production de xylitol par une microalgue	41

TABLE DES MATIÈRES

3	CHAPITRE III : Adaptation cellulaire de la microalgue rouge extrémophile <i>Galdieria sulphuraria</i> face à la disponibilité en sources de carbone	43
3.1	Résumé de l'article.....	43
3.2	Figures et tableau supplémentaires	63
4	CHAPITRE IV : Utilisation du xylose, du glucose et de l'acétate comme nutriments pour la croissance de trois espèces de microalgues cultivées en hétérotrophie	67
4.1	Résumé de l'article.....	68
4.2	Supplemental files.....	107
5	CHAPITRE V : Assimilation du xylose en hétérotrophie par <i>Auxenochlorella protothecoides</i> : Une avancée vers la production de xylitol par une microalgue	111
5.1	Résumé de l'article :.....	112
5.2	Supplementary Files.....	136
6	CHAPITRE VI : EXPÉRIENCES COMPLÉMENTAIRES, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 141	
6.1	Conclusion générale.....	141
6.1.1	Conclusions sur le métabolisme du glycérol, du glucose, de l'acétate et du xylose chez les trois espèces de microalgues étudiées	141
6.1.2	Les microalgues comme alternative aux végétaux pour la production d'huiles ou de biopétrole	147
6.1.3	Les microalgues comme alternative à la production industrielle de xylitol	150
6.2	Perspectives visant à la valorisation du xylose en utilisant les espèces étudiées	151
6.2.1	Ingénierie métabolique	151
6.2.2	Culture mixotrophe	151
6.2.3	Co-culture ou cultures séquentielles.....	152
6.3	Recyclage d'autres nutriments que le carbone	155
6.4	Conclusion.....	158
7	Bibliographie de l'introduction (CHAPITRE I) et de la conclusion (CHAPITRE VI)	161

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Les microalgues

Le terme "algue" ne possède aucune définition claire et, selon les auteurs, peut représenter différents ensembles d'organismes, qui la plupart du temps partagent tout de même certaines caractéristiques communes. Parmi celles-ci, on compte surtout la photosynthèse oxygénique, et une préférence marquée pour les environnements aquatiques. Actuellement, plus de 45 000 espèces d'algues ont été recensées, réparties au sein de cinq clades (ou super-groupes

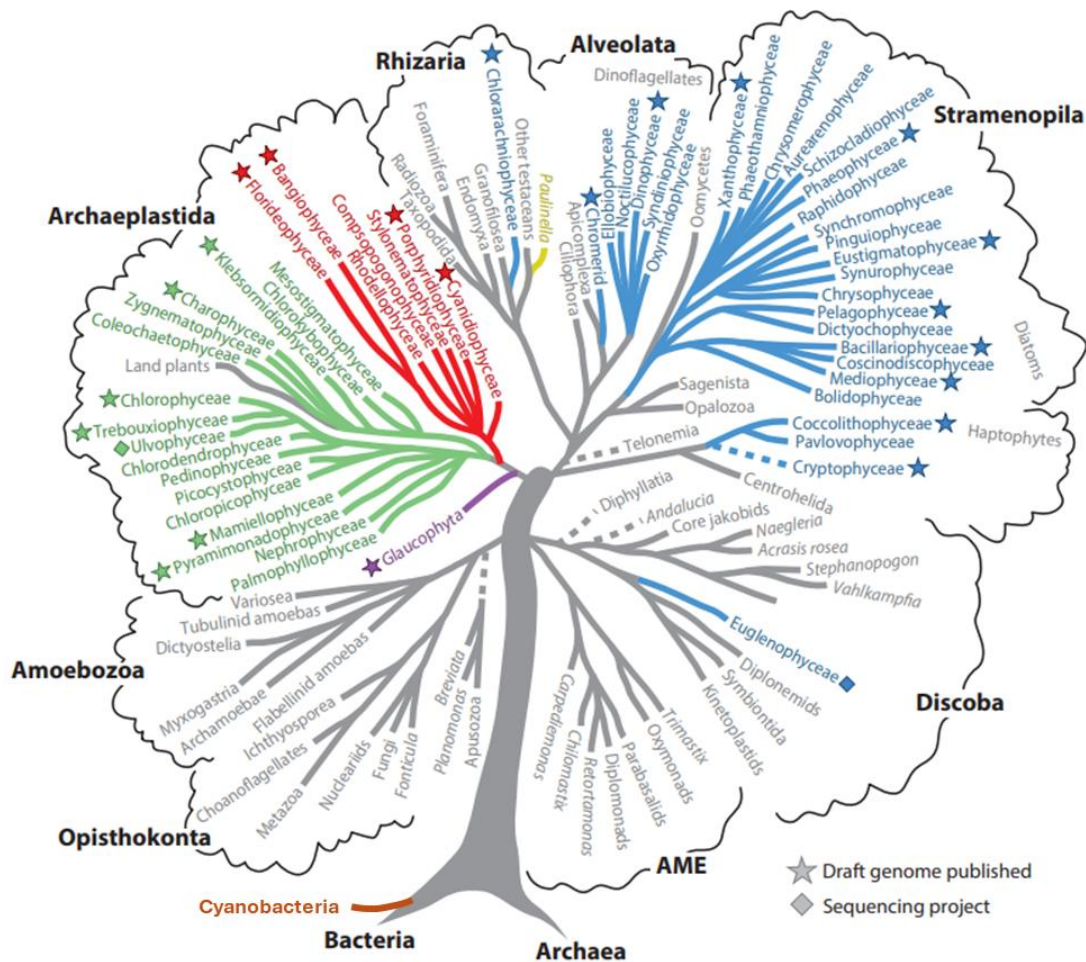


FIGURE 1: Représentation de l'arbre phylogénétique des eucaryotes basé sur des données phylogénétiques consensus rassemblées et mises en forme graphique par (Blaby-Haas & Merchant, 2019). Les branches contenant des microalgues sont colorées en vert pour les Chlorophytes et Streptophytes, en rouge pour les Rhodophytes, mauve pour les Glaucophytes, en jaune pour le genre *Paulinella* (endosymbiose primaire divergeant de celle des Archaeplastida), et en bleu pour les genres de microalgues ayant acquis leur plaste par endosymbiose d'un eucaryote (secondaire ou tertiaire). Les cyanobactéries, qui ne sont pas considérées comme des microalgues par les auteurs de ce schéma, ont été rajoutées via une branche orange. Les étoiles à côté des genres marquent les génomes déjà séquencés tandis que les losanges font référence à des projets de séquençage en cours. Les lignes en pointillés montrent des branches pour lesquelles l'emplacement est encore incertain au moment de cette étude.

phylogénétiques) du domaine des eucaryotes : les Archaeplastida, Rhizaria, Alveolata, Stramenopila, et Discoba. Bien que certains auteurs limitent la dénomination d'algue à des organismes eucaryotes, d'autres, comme Michael D. Guiry, fondateur d'une importante base de données taxonomiques « AlgaeBase », y incluent également des procaryotes photosynthétiques, les cyanobactéries (Guiry, 2024) (**Fig. 1**). Lors de la rédaction de ce travail, nous avons décidé de suivre cette définition, regroupant parmi les algues tant les organismes eucaryotes que procaryotes. Quoiqu'il en soit, la désignation d'« algue » est paraphylétique, car elle exclut certains organismes appartenant à ces mêmes clades mais étant soit dépourvus de photosynthèse, soit l'ayant secondairement perdue. Lorsqu'elles sont pluricellulaires, on va parler de macroalgues, et contrairement aux plantes (Embryophytes), elles ne possèdent généralement pas de racines, de branches, de feuilles différenciées et montrent des organes de reproduction simples (Graham, 2022).

A l'instar des cyanobactéries, de nombreuses espèces d'algues eucaryotes sont unicellulaires, évoluant seules ou en colonies, et sont communément qualifiées de "microalgues" (Graham, 2022). Les microalgues sont retrouvées dans des environnements humides et au moins partiellement lumineux. Elles peuvent vivre en eau douce ou salée, être benthiques ou pélagiques, mais aussi être présentes dans des milieux extrêmes à des intervalles de pH ou de température très variés tels que dans les régions polaires ou les déserts chauds. De manière surprenante, elles peuvent aussi être observées dans des environnements inattendus comme à la surface de plantes ou d'animaux ou en symbiose avec ces derniers (p. ex. Symbiodiniaceae) (Graham, 2022). À elles-seules, elles contribuent à environ 40 à 50% de la production d'oxygène mondiale et constituent la totalité du phytoplancton qui est la base de la chaîne alimentaire aquatique, elle-même indispensable à la vie terrestre (Benoiston et al., 2017; Graham, 2022).

1.1.1 Endosymbiose et phylogénie

Les premiers organismes photosynthétiques à voir le jour sur Terre sont des cyanobactéries, dont l'âge des premiers fossiles connus pourraient remonter à environ 3,5 milliards d'années, bien que cette découverte soit controversée car il pourrait en fait s'agir un artéfact minéral (Demoulin et al., 2019). Les microfossiles de cyanobactéries les plus anciens pour lesquelles il n'existe aucune ambiguïté, auraient environ 1,9 milliard d'années (Demoulin et al., 2019). Avec l'apparition de cette nouvelle stratégie énergétique, de grandes quantités d'oxygène ont rapidement été produites favorisant alors la phosphorylation oxydative et le développement d'organismes eucaryotes 1 à 2 milliards d'années plus tard (Brocks et al., 1999). Ces derniers ont partagé leur habitat avec les cyanobactéries. Il y a environ 1 milliard d'années, des organismes de ces deux domaines du vivant ont donné naissance à un événement d'endosymbiose durant lequel une cellule eucaryote hétérotrophe a intégré en son sein une cellule procaryote phototrophe, donnant ainsi naissance à un organelle, le chloroplaste (Oborník, 2019; Shih & Matzke, 2013). Cet événement, appelé endosymbiose primaire, va alors permettre l'expansion de la diversité des organismes photosynthétiques à travers le monde et donner vie à trois lignées distinctes du clade des Archaeplastida (**Fig. 1**) : les Glaucophytes, les Rhodophytes, et les Chlorophytes (lignée verte) (Blaby-Haas & Merchant, 2019; Oborník, 2019). A l'instar des cyanobactéries, les Glaucophytes et les Rhodophytes absorbent la lumière par le biais de

complexes extrinsèques à la membrane thylakoïdale appelés phycobilisomes et composés de phycobiliprotéines. Ces deux groupes se distinguent notamment l'un de l'autre par la présence chez les Glaucophytes d'un chloroplaste (ou cyanelle) ayant conservé une paroi cyanobactérienne. Les Chlorophytes, eux, qui sont à l'origine des plantes terrestres (Embryophytes) (Oborník, 2019), ont remplacé leurs phycobilisomes par des complexes collecteurs de lumière (LHC pour light-harvesting

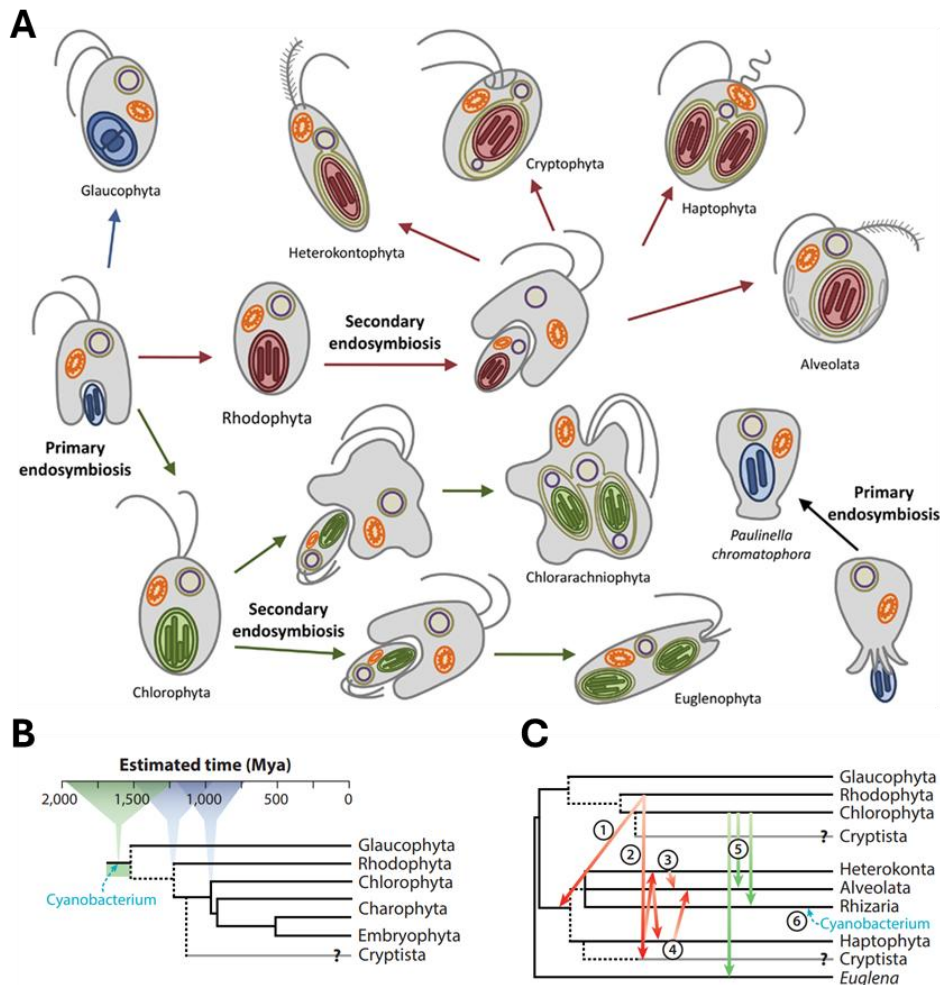


FIGURE 2 : Acquisition du chloroplaste dans les différentes lignées d'eucaryotes photosynthétiques. (A) : Illustration de (Facchinelli & Weber, 2011). L'endosymbiose primaire d'une cyanobactérie par un eucaryote a amené à l'apparition des trois lignées qui ont donné leur plaste à toutes les autres par endosymbiose secondaire, à l'exception du genre *Paulinella* qui aurait subi un événement d'endosymbiose à part. (B) et (C): Illustrations de (Blaby-Haas & Merchant, 2019) avec en (B) l'intervalle de temps (en million d'années) durant lequel les différentes lignées majeures des Archaeplastida auraient pu acquérir leur plaste. La figure (C) représente les différentes théories ayant pu permettre l'endosymbiose secondaire : 1. L'hypothèse Chromalvéolote de Cavalier-Smith selon laquelle un seul événement d'endosymbiose secondaire est à l'origine de toutes les algues de la lignée rouge possédant de la chlorophylle c (hypothèse finalement remplacée par des événements indépendants d'endosymbioses secondaires) ; 2. L'hypothèse « Cryptophyte-first » de Stiller et al. suggère qu'un Cryptophyte aurait initialement acquis un plaste dérivé d'une algue rouge, puis l'aurait transmis aux Ochrophytes (Heterokonta) et ensuite aux Haptophytes; 3. Une variante de cette hypothèse propose que le plaste de *Vitrella brassicaformis* dériverait d'un Ochrophyte; 4. Chez les dinoflagellés *Karenia* spp., le plaste actuel proviendrait d'un Haptophyte, remplaçant l'ancien plaste contenant de la péridinine, présent chez d'autres dinoflagellés; 5. Les plastides des Euglénophytes (*Euglena*), des Chlorarachniophytes (*Rhizaria*) et de *Lepidodinium* (*Alveolata*) viendraient d'algues vertes distinctes; 6. Enfin, les chromatophores de *Paulinella* sont issus d'une endosymbiose primaire avec une cyanobactérie indépendante comme décrit dans l'illustration (A).

complex) composés de chlorophylles *a* et *b* et de caroténoïdes (Engelken et al., 2010). L'acquisition du chloroplaste et de son génome a été un processus complexe dans lequel l'endosymbionte a perdu une partie de ses gènes et en a transmis au génome de la cellule hôte. Ces derniers sont nécessaires au bon fonctionnement du chloroplaste (Martin & Herrmann, 1998; Oborník, 2019).

À la suite de l'endosymbiose primaire, d'autres événements similaires, qualifiés d'endosymbioses secondaires, ont eu lieu. Cependant, cette fois-ci, contrairement au premier cas, plusieurs événements indépendants impliquant l'endosymbiose d'un eucaryote photosynthétique par un eucaryote hétérotrophe se sont produits (Blaby-Haas & Merchant, 2019; Oborník, 2019). L'acquisition des caractères photosynthétiques issus de la lignée verte des Chlorophytes a conduit à l'apparition des embranchements des Euglenozoa (Discoba) et des Chlorarachniophytes (Rhizaria), tandis que de nombreux organismes ont acquis la photosynthèse via la lignée rouge, notamment les Bacillariophyta (diatomées), Heterokontophyta (Stramenopila), Cryptophytes (Stramenopila), Haptophytes (Stramenopila), Dinoflagellés (Alveolata), Apicomplexes (Alveolata) ou encore les Chromerides (Alveolata) (Archibald, 2015; Blaby-Haas & Merchant, 2019; Oborník, 2019) (**Fig. 1&2**).

Parmi ces groupes, certaines espèces sont restées hétérotrophes, tandis que d'autres ont perdu leur capacité à réaliser la photosynthèse pour diverses raisons, comme la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS), pouvant gravement endommager la cellule (Oborník, 2019). L'origine hétérotrophe des microalgues eucaryotes explique, du moins en partie, pourquoi nombre d'entre elles ont conservé la capacité d'assimiler des sources de carbone exogènes pour la production d'énergie.

1.1.2 Pourquoi étudier les microalgues plutôt que les plantes terrestres ?

Par rapport aux plantes, la biomasse issue des microalgues présente de nombreux avantages. Premièrement, il est important de souligner que les microalgues ne nécessitent pas de terres arables pour leur culture, permettant ainsi de préserver ces espaces pour l'agriculture destinée à l'alimentation humaine ou animale, tout en évitant les problèmes liés à la déforestation. Pouvant être cultivées en eaux douces, salées, et même, pour certaines espèces, en eaux usées et polluées (Mata et al., 2010; Pittman et al., 2011), elles offrent la possibilité d'être exploitées même dans les régions du monde où les ressources en eau potable sont limitées.

En outre, elles affichent généralement un rendement photosynthétique supérieur à celui de la plupart des plantes agricoles C3, notamment en raison de l'absence de structures complexes telles que les tiges et racines (Melis, 2009). De plus, certaines espèces possèdent un mécanisme de concentration du carbone (*Carbon Concentrating Mechanism*, CCM) qui permet d'élever localement la concentration en CO₂ autour de la RubisCO (Moroney, 2001), principal facteur limitant de la photosynthèse (voir section 1.2.1 : **La photosynthèse oxygénique**).

Dans ce contexte, certaines espèces de microalgues, comme les cyanobactéries, les Rhodophytes ou les algues brunes, possèdent, en plus des pigments habituellement présents chez les algues vertes, des pigments spécifiques (phycobilines, chlorophylles *c*, *d*, *f*, caroténoïdes), élargissant

leur spectre d'absorption de la lumière. Cela permet aux microalgues de capter des photons peu valorisés par d'autres organismes photosynthétiques et donc disponibles lorsqu'elles se trouvent sous leur « ombre » (Brunet et al., 2011; Larkum & Kühl, 2005).

Grâce à ces avantages, les microalgues possèdent une capacité de croissance accrue. En plus de pouvoir être cultivées en croissance continue sur de longues périodes, certaines espèces peuvent ainsi doubler leur biomasse en moins d'une journée (Chisti, 2007).

1.1.3 Applications des microalgues

En plus des avantages précités par rapport aux végétaux terrestres, tels qu'une croissance accrue, les microalgues offrent un large éventail de possibilités d'exploitation pour l'homme dans des domaines variés, allant de la production de biocarburants aux applications pharmaceutiques, en passant par le traitement des eaux usées et la fertilisation des terres agricoles, comme mentionné précédemment (Yap et al., 2021).

L'une des applications les plus connues concerne l'alimentation humaine et animale. Selon les espèces, les microalgues constituent en effet une source potentielle de lipides, de glucides, de protéines, mais aussi d'acides gras essentiels (ω -3 et ω -6) (Ahmad & Ashraf, 2023). Un exemple bien documenté est celui d'*Arthrospira platensis*, plus communément appelée spiruline. Cette cyanobactérie est couramment utilisée comme complément alimentaire sous forme de poudre, de gélules ou de comprimés, et peut également être incorporée dans des barres énergétiques. Elle est particulièrement appréciée pour sa haute teneur en protéines (50-70 % de son poids sec) comprenant beaucoup d'acides aminés essentiels. On y trouve aussi de l'acide γ -linoléique (ω -6), des vitamines (B), du fer et de la phycocyanine, un pigment connu pour son pouvoir antioxydant et aux pouvoirs apoptotiques, retrouvé également chez *G. sulphuraria* (Ahmad & Ashraf, 2023; Mukherjee et al., 2024).

D'autres exemples incluent des algues vertes comme *Chlorella vulgaris*, également riche en protéines (50-60 %), en vitamines A, B, C et E, ainsi qu'en fer (Wang et al., 2024), ou encore *Dunaliella salina*, qui présente des taux élevés de caroténoïdes tels que le β -carotène (précurseur de la vitamine A) et d'acides gras essentiels (acides γ -linoléique et eicosapentaénoïque, ω -6 et ω -3). *Haematococcus pluvialis* est une autre espèce notable, capable d'accumuler jusqu'à 4-5 % d'astaxanthine dans sa biomasse sèche, un caroténoïde au puissant pouvoir antioxydant (Varela et al., 2015).

Comme illustré par les exemples précédents, les pigments jouent un rôle majeur dans l'intérêt que représente la biomasse algale pour certaines applications humaines, notamment dans l'industrie pharmaceutique. Les pigments caroténoïdes, tels que l'astaxanthine mentionnée ci-dessus, la lutéine, la fucoxanthine, la canthaxanthine et la zéaxanthine, possèdent un rôle antioxydant, mais se sont également vu attribuer des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses et immunorégulatrices (Mukherjee et al., 2024; Varela et al., 2015).

Cependant, toutes les applications potentielles des microalgues ne sont pas favorisées par la présence de pigments en quantité importante dans leur biomasse. Ces composés, contenant généralement des atomes d'oxygène et d'azote, peuvent en effet diminuer la qualité des biocarburants

générés à partir de leur biomasse, en raison de la production de NO_x lors de leur combustion (Kumar et al., 2015). Ainsi, leur capacité à produire des glucides et des lipides en grandes quantités ne représente pas uniquement un avantage pour l'alimentation mais peut-être également valorisée pour la production de biocarburants.

L'utilisation de microalgues pour la production de biocarburants

Alors que les glucides des microalgues sont principalement utilisés comme substrats pour des organismes hétérotrophes fermentatifs, tels que les levures ou les bactéries productrices d'éthanol, les lipides sont davantage exploités pour la production de fiouls plus lourds, comme le biodiesel ou le biokérosène. Certaines souches de microalgues peuvent accumuler plus de 80 % de leur biomasse sèche sous forme de lipides lorsqu'elles sont soumises à divers stress (Mata et al., 2010; Mutanda et al., 2011; Pittman et al., 2011), notamment la privation d'azote ou des températures inférieures à leurs conditions de croissance optimales (Wu et al., 2013). Grâce à cette haute teneur en lipides et à leur vitesse de croissance accrue, elles affichent des rendements pouvant atteindre 3 à 7,5 tonnes de lipides par an et par hectare, en fonction de la souche étudiée et des conditions de culture. À titre de comparaison, le soja et le colza ne produisent respectivement qu'environ 0,4 et 0,7 tonnes d'huile par hectare et par an (Raheem et al., 2018). En termes de contenu énergétique, l'huile brute issue des microalgues fournit environ 80 % de l'énergie délivrée par une quantité équivalente de pétrole brut, avec une valeur énergétique moyenne de 35,8 kJ/kg (Dasgupta et al., 2015).

Dans un contexte de décarbonation du transport routier et aérien, dans lequel s'inscrit cette thèse (voir section : **2.1 Contexte de la thèse**), les biocarburants dits « avancés », produits à partir de biomasse de microalgues, représentent une alternative prometteuse aux carburants fossiles. Cependant, la biomasse utilisée doit répondre à des critères de qualité stricte. En plus de devoir être les plus riches possible en lipides, les microalgues doivent particulièrement être capables de synthétiser des lipides neutres, principalement des triglycérides (TAG) contenant des acides gras saturés (SFA, comme le C14:0, C16:0 ou le C18:0), ou monoinsaturés (MUFA, comme le C18:1). Ces molécules permettent la production d'un biodiesel ou d'un biokérosène aux propriétés physico-chimiques compatibles avec les exigences du secteur du transport, notamment en termes de densité énergétique, de stabilité thermique et de performance à basse température (Chisti, 2007 ; Knothe, 2009 ; Hu et al., 2008). Alors que les SFAs offrent une grande stabilité oxydative et une bonne densité énergétique aux carburants, la présence de MUFAs est aussi recherchée pour fluidifier le mélange et lui permettre de supporter des températures plus faibles tout en gardant une viscosité adéquate. En revanche, les acides gras polyinsaturés (PUFAs) sont à éviter au maximum, à cause de leur propension élevée à s'oxyder rapidement, menant à une dégradation du carburant. Un profil lipidique idéal va donc, principalement dans un contexte de production de carburant pour le transport routier et aérien, présenter entre 30-40% de SFAs, 40-60% de MUFAs, et un minimum de PUFAs (<10%) (Chisti, 2007 ; Knothe, 2009 ; Hu et al., 2008).

En outre, une biomasse considérée comme idéale pour la confection de biocarburants de type diesel ou kérosène doit comporter le moins de composés additionnels comme les carbohydrates

(amidon, cellulose), ou les composé azotés (comme les protéines et les pigments). En effet, ces impuretés amènent à des rendements moins élevés (car traduisent une présence amoindrie en lipides), mais demandent aussi des étapes de purification, au risque de nuire à la qualité finale. En effet, lors de la conversion des acides gras en composés utilisables comme carburants, ces constituants présents dans la biomasse peuvent générer des impuretés, des résidus azotés ou oxygénés qui affectent la stabilité oxydative du carburant lors de son stockage, tout en augmentant la production de NOx ou de résidus solides (cendres), amenant un risque de corrosion et d'encrassement des moteurs lors de la combustion du carburant (Phusunti et al., 2020 ; Suutari et al., 2015).

1.1.4 Les microalgues étudiées et pourquoi

Galdieria sulphuraria

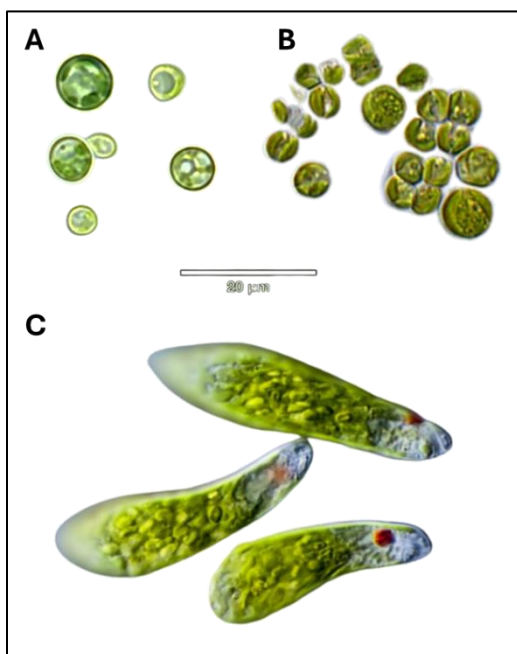


FIGURE 3 : Photos prises au microscope de *G. sulphuraria* (A), *A. protothecoides* (B), et *E. gracilis* (C).

G. sulphuraria appartient au supergroupe des Archaeplastida, et plus précisément à la classe des Cyanidiophyceae, elle-même dans la division des Rhodophyceae. Originnaire de sources acido-sulfureuses, cette espèce a développé des mécanismes physiologiques uniques, se classant parmi les seuls eucaryotes présents dans son environnement. Son génome compact (13,7-20 Mb) et dense en gènes (77 % codants) comporte une proportion notable de gènes acquis par transfert horizontal à partir de procaryotes (bactéries et archées), lui permettant de s'adapter à des conditions extrêmes (Schönknecht et al., 2013). Elle se distingue par son extrême tolérance aux environnements hostiles, notamment les milieux riches en soufre, à haute température (jusqu'à 56 °C) et à faible pH (<0). Elle est également extrêmement résistante à des concentrations élevées en métaux

lourds (Barbier et al., 2005; Schönknecht et al., 2013).

Son intérêt dans cette étude repose principalement sur sa capacité à croître en hétérotrophie grâce à un large éventail de transporteurs de sources de carbone et aux enzymes associées à leurs voies métaboliques d'assimilation (Barbier et al., 2005; Schönknecht et al., 2013). Ce panel de transporteurs (au moins 14 identifiés) lui permet d'assimiler des sucres classiques comme le glucose, mais aussi des sucres désoxy comme le rhamnose ou le fucose, des pentoses comme l'arabinose et le xylose (qui nous intéresse ici), ainsi que des polyols comme le glycérol.

Nous nous sommes intéressés à une souche particulière, *G. sulphuraria* 074W (white), isolée dans les fumerolles du mont Lawu en Indonésie, et dont le génome a été entièrement séquencé en 2018. Cette souche a la particularité de perdre une partie de ses pigments en hétérotrophie, contrairement à la souche 074G (green), qui les conserve (Schönknecht et al., 2013). Bien que *G.*

sulphuraria n'aie encore jamais été transformée à la l'heure actuelle, des modification génétiques ont pu être réalisée chez *Galdieria partita*. Cela a pu être réalisé l'aide d'une méthode en présence de polyéthylène glycol (PEG), servant à fragiliser ses membranes, et sur la recombinaison homologue, permettant une insertion ciblée de nouveaux gènes ou la modification de séquences spécifiques. Ce procédé est renforcé par la capacité de cette algue à subir une recombinaison méiotique naturelle, facilitant l'intégration et la stabilisation des mutations génétiques, mais n'a été envisagé qu'une seul fois à l'heure actuelle (Goold et al., 2024).

Euglena gracilis

E. gracilis est une microalgue unicellulaire appartenant au supergroupe des Discoba et plus précisément à la classe des Euglenophyceae, un groupe de protistes ayant acquis leur plaste par endosymbiose secondaire, lequel est entouré de trois membranes (Barsanti & Gualtieri, 2020; Oborník, 2019). Originaire d'eaux douces, cette espèce est capable de s'adapter à des environnements variés, notamment à de larges plages de pH (3-8). Elle possède un flagelle dorsal (un second flagelle, non fonctionnel pour le mouvement, est également présent) ainsi qu'un photorécepteur (*eyespot*), lui permettant de s'orienter vers ou à l'opposé de la lumière en fonction de ses besoins (Barsanti & Gualtieri, 2020).

E. gracilis peut croître en mixotrophie et en hétérotrophie, à condition d'avoir accès aux vitamines B1, B8 et B12 (Blum & Wittels, 1968; Danilov & Ekelund, 2001). Elle a en effet montré la capacité d'utiliser non seulement des sucres comme le glucose et le fructose, mais aussi des acides organiques comme le malate, le glutamate, le butyrate et l'acétate, ainsi que des alcools tels que l'éthanol et le propanol (Blum & Wittels, 1968; Farjallah & Guéguen, 2023; Hosotani et al., 1988).

En plus de sa capacité à croître à l'obscurité, *E. gracilis* accumule du paramylon dans son cytosol en conditions aérobies. Ce polymère du glucose présente de nombreuses applications industrielles (voir section 1.2.8 : **Polysaccharides de réserve**) et peut être presque entièrement converti en esters de cire lorsque l'algue est placée en anaérobiose grâce à un mécanisme fermentatif unique. Ces esters de cire sont d'un intérêt particulier pour l'industrie des biocarburants (voir section 1.2.7 : **Synthèse des lipides et β -oxydation des acides gras**). Un autre atout de *E. gracilis* est l'absence de paroi cellulaire, contrairement à la majorité des microalgues, ce qui facilite l'accès à son contenu cytoplasmique (Barsanti & Gualtieri, 2020; Cordoba et al., 2021).

Son génome est estimé à environ 500 Mb, avec une forte proportion de séquences répétitives et un taux de GC élevé (64 %). Il est composé d'environ 50 000 gènes codants non redondants (Chen et al., 2022). Dans cette étude, nous avons travaillé avec la souche Z de *E. gracilis*. *E. gracilis* a bénéficié de plusieurs approches de transformation génétique, incluant *Agrobacterium tumefaciens*, l'électroporation, la microinjection et système CRISPR/Cas9. Bien que la complexité de son génome soit un frein à sa mutagenèse, des avancées notables ont été réalisées, comme l'inactivation ciblée du gène Crtp1 (impliqué dans le métabolisme des caroténoïdes) avec l'outil d'édition CRISPR, pour un taux

de mutation atteignant 16,7 %. La transformation plastidiale a été également été possible par bombardement biolistique. En outre, des études exploitent l'interférence par ARN (RNAi) pour moduler des voies métaboliques clés, comme la biosynthèse du paramylon, des esters de cires et des caroténoïdes (Chen et al., 2022).

Auxenochlorella protothecoides

A. protothecoides (anciennement *Chlorella protothecoides*) est une microalgue verte oléagineuse appartenant au supergroupe des Archaeplastida, et plus précisément à la classe des Trebouxiophyceae, dans la division des Chlorophyceae. Originnaire de divers environnements, elle a développé une remarquable capacité d'adaptation à la croissance en hétérotrophie. Elle présente une capacité exceptionnelle de croissance sur glucose, atteignant des densités cellulaires pouvant atteindre 255 g L⁻¹ à partir de cultures à faible densité (De La Hoz Siegler et al., 2012; Ghidossi et al., 2017).

En plus du glucose, *A. protothecoides* peut assimiler d'autres sources de carbone, telles que des acides gras volatils comme l'acétate et le butyrate (Patel et al., 2021), ainsi que du glycérol (Cerón-García et al., 2013). Elle peut également croître sur des déchets issus de matière lignocellulosique provenant de l'industrie brassicole, agricole ou forestière (Chen & Walker, 2011; Wei et al., 2009).

Au-delà de ses capacités hétérotrophes et de sa forte densité cellulaire, *A. protothecoides* est largement étudiée dans le cadre de la production de biocarburants. Il a été démontré à plusieurs reprises qu'elle pouvait accumuler plus de 50 % de son poids sec en lipides, avec une accumulation encore plus importante en conditions hétérotrophes (De La Hoz Siegler et al., 2012). De plus, elle est capable d'accumuler une quantité significative d'acides gras saturés (SFAs), particulièrement recherchés pour la production de biocarburants (Patel et al., 2021).

Dans cette étude, nous avons travaillé avec la souche UTEX 25 d'*A. protothecoides*, isolée par W. Krüger en 1892 à partir de la sève de peuplier (« *sap of wounded Populus alba* »). Son génome, d'environ 23 Mb, a été entièrement séquencé et référencé, facilitant ainsi l'étude des voies métaboliques impliquées dans la valorisation de substrats atypiques, tels que le xylose (Vogler et al., 2018). Les modifications génétiques appliquées à *A. protothecoides* ont principalement ciblé l'amélioration de la production de lipides et de pigments à haute valeur ajoutée. Sa transformation est réalisée par la méthode lithium acétate/PEG, permettant une recombinaison homologue efficace d'un plasmide dans le génome nucléaire (Goold et al., 2024).

1.2 Le métabolisme du carbone chez les microalgues

La vaste majorité des microalgues sont photoautotrophes et dépendent directement de leur appareil photosynthétique pour satisfaire leurs besoins métaboliques. Dans cette réaction, la lumière du soleil est transformée en énergie chimique, permettant l'utilisation du CO₂ comme source de carbone pour la production de glucides et d'adénosine triphosphate (ATP).

En outre, de nombreuses espèces de microalgues sont également capables de puiser des sources de carbone organique dans leur environnement lorsqu'elles manquent de lumière ou lorsque ces sources sont énergétiquement plus favorables à leur croissance. Cela leur permet de répondre à leurs besoins énergétiques directement via la respiration cellulaire, tout en évitant la coûteuse synthèse de la machinerie photosynthétique (Graham, 2022). L'hétérotrophie passe, dans certains cas, par l'assimilation de sources de carbone présentes dans le milieu grâce à des transporteurs membranaires, tandis que dans d'autres cas, elle peut impliquer des mécanismes plus complexes, tels que la phagocytose (Graham, 2022).

Ces espèces sont toutefois également capables d'un métabolisme photoautotrophe, car les conditions extérieures peuvent rapidement évoluer (profondeur de l'eau, ombre, effet d'écran dû à la présence d'autres organismes, etc.). On parle alors de mixotrophie facultative lorsque les deux stratégies nutritionnelles sont utilisées pour pallier un déficit énergétique, et de mixotrophie stricte lorsque ces deux conditions doivent être réunies pour permettre la croissance (Graham, 2022). Ce dernier cas se rencontre principalement lorsque la microalgue dépend pour sa croissance de l'acquisition de certains nutriments essentiels qu'elle ne peut synthétiser elle-même, comme certaines vitamines ou acides gras (par exemple la vitamine B1 chez *Euglena* ou *A. protothecoides*) (Graham, 2022).

1.2.1 La photosynthèse oxygénique

La photosynthèse peut être divisée en deux phases : l'une dépendante de la lumière (la phase photochimique) et l'autre indépendante de la lumière (la phase non photochimique) (Blankenship, 2002) (Fig. 4).

La phase photochimique se déroule dans la membrane des thylakoïdes, situés dans le cytoplasme des cyanobactéries ou dans les chloroplastes des organismes eucaryotes photosynthétiques. Dans ces structures, des pigments tels que la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* ou le β -carotène s'organisent en photosystèmes (antennes collectrices de lumière attachées à un centre réactionnel) afin d'absorber des photons de lumière visible et d'initier une série de transferts d'électrons. Ce processus aboutit à la formation d'équivalents réducteurs sous la forme de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) ainsi qu'à l'établissement d'un gradient de protons dans le lumen des thylakoïdes, permettant la production d'ATP (à partir d'ADP et de phosphate inorganique) sous l'action d'une enzyme ATP synthétase (Blankenship, 2002; Taiz et al., 2023). Cette réaction constitue l'étape de la photosynthèse générant la production d'O₂ par photolyse de l'eau, dont les électrons sont ensuite transférés à la chaîne photosynthétique.

La phase non photochimique, qui se déroule directement dans le cytoplasme des cyanobactéries ou dans le stroma chloroplaste chez les organismes qui en possèdent, utilise le NADPH et l'ATP générés précédemment pour fixer le dioxyde de carbone atmosphérique et produire des molécules organiques plus complexes (Blankenship, 2002; Taiz et al., 2023). Cette étape repose sur un ensemble de réactions enzymatiques désigné globalement sous le nom de « cycle de Calvin ». Ce cycle est régulé par une enzyme clé de la photosynthèse, indispensable à la fixation du CO₂ : la RubisCO.

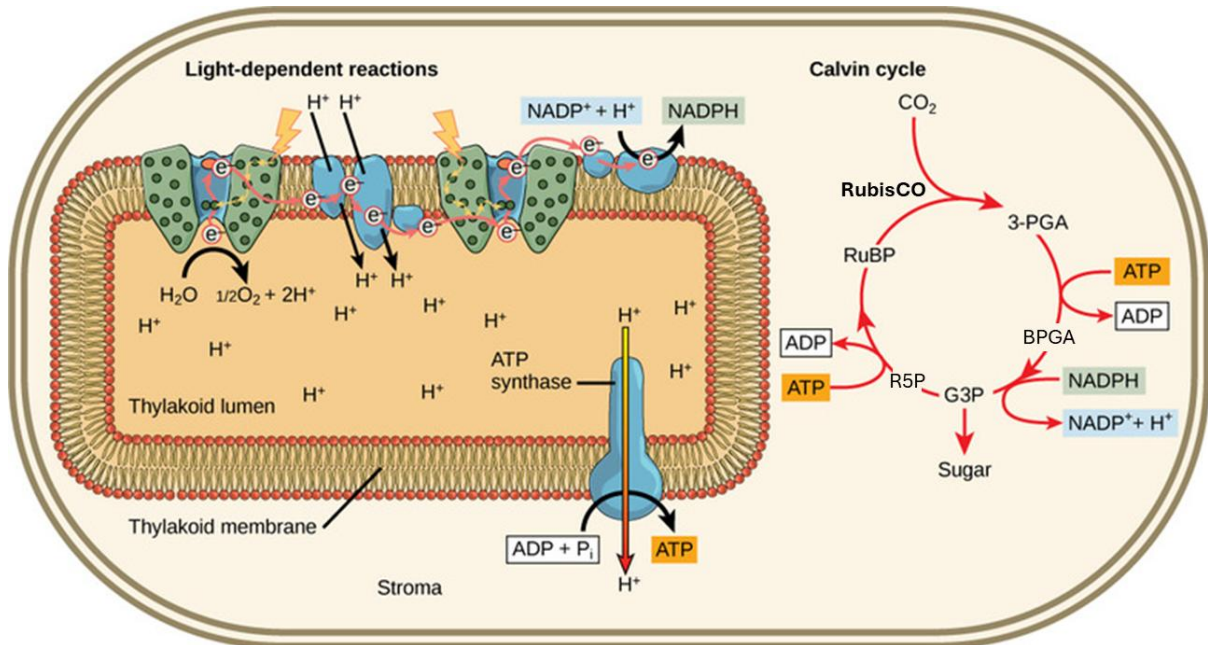


FIGURE 4 : Représentation schématique du chloroplaste où se déroulent les phases photochimiques (à gauche, dans les membranes thylakoïdiennes) et non-photochimiques (à droite, le Cycle de Calvin) de la photosynthèse. Illustration adaptée de VivaOpen (2023). Abréviations : 3-PGA, 3-phosphoglycérate ; BPGA, 1,3-bisphosphoglycérate ; G3P, glycéraldéhyde 3-phosphate ; R5P, ribulose-5-phosphate ; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate.

Le cycle de Calvin débute par une phase de carboxylation, au cours de laquelle une molécule de ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP, 5C) fixe une molécule de CO₂ sous l'action de la RubisCO, aboutissant à la formation de deux molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA, 3C). Ensuite, grâce à l'énergie fournie par l'ATP issu de la phase photochimique, ces molécules subissent une phosphorylation, conduisant à la formation de 1,3-bisphosphoglycérate (BPGA, 3C). Ce dernier est ensuite réduit en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P, 3C) par oxydation du NADPH, qui pourra être régénéré via la ferrédoxine lors de la phase photochimique. Diverses enzymes interviennent pour convertir le glycéraldéhyde-3-phosphate en ribulose-5-phosphate (R5P), qui est ensuite phosphorylé par l'ATP afin de régénérer la molécule initiale de ribulose-1,5-bisphosphate, permettant ainsi au cycle de se poursuivre (Blankenship, 2002; Taiz et al., 2023). Sur les six molécules de G3P synthétisées au total, une seule peut quitter le cycle pour servir à la production de composés organiques tels que le glucose, tandis que les cinq autres participent à la régénération du cycle (Blankenship, 2002; Taiz et al., 2023). La génération d'une molécule de G3P nécessite donc l'incorporation de 3 molécules de CO₂, 9 molécules d'ATP et 6 molécules de NADPH lors du cycle de Calvin.

1.2.2 Le carbone en hétérotrophie

Lorsque les organismes hétérotrophes assimilent des sources de carbone dans leur environnement, l'une des molécules les plus couramment utilisées est un monosaccharide à six atomes de carbone : le glucose ($C_6H_{12}O_6$). Ce sucre, sous sa forme isomérique D (aussi appelée dextrose), est en effet le plus abondamment synthétisé par les organismes photosynthétiques et constitue une part majeure de la biomasse végétale terrestre.

On le retrouve en faible quantité sous forme libre, mais surtout sous forme d'homopolymères composés exclusivement de molécules de D-glucose. L'amidon, qui constitue une forme de réserve énergétique chez la plupart des organismes photosynthétiques, est un polymère généralement insoluble formé de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ (liaison entre le carbone 1 d'une molécule et le carbone 4 de la suivante, dans le même plan), formant ainsi une chaîne principale. Cette chaîne peut être ramifiée (environ tous les 24 à 30 résidus) via des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$. Chez certaines espèces de microalgues (Rhodophytes, Glaucophytes), ces ramifications sont plus fréquentes (tous les 10 à 15 résidus), ce qui confère au polymère une plus grande solubilité, le rapprochant ainsi du glycogène animal.

Ce type de polysaccharide est alors désigné sous le nom de phytoglycogène, amidon floridéen (*floridean starch*) ou encore rhodamylon (Martinez-Garcia et al., 2017).

Un autre type de liaison osidique existe également : les liaisons β , où le groupe hydroxyle (-OH) du premier carbone est situé au-dessus du plan du cycle pyranose. Ces liaisons permettent la formation de chaînes de polymères de D-glucose rigides, branchées en $\beta(1\rightarrow6)$, et s'associant en fibres, formant ainsi la cellulose. Ce polymère est le principal constituant de la paroi cellulaire des végétaux et représente environ 50 % de la biomasse végétale terrestre, devant l'hémicellulose et la lignine (Petre & Petre, 2013).

D'autres formes de polymères β du glucose existent également dans la nature, comme la chitine (le deuxième polysaccharide le plus abondant après la cellulose), que l'on retrouve chez les arthropodes (exosquelette) et les champignons (paroi cellulaire), ainsi que le paramylon chez *E. gracilis*. Nous reviendrons sur ces composés plus tard dans cette introduction.

Étant donné son omniprésence, il n'est pas surprenant que le glucose constitue une source énergétique fondamentale pour les organismes vivants. Une fois transporté dans la cellule, il entre dans la voie biochimique de la glycolyse, où il est décomposé en molécules à trois atomes de carbone servant à fournir l'énergie nécessaire. Ces molécules alimentent ensuite le cycle de Krebs, qui génère des électrons transférés à la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, conduisant à la production d'ATP par phosphorylation oxydative (voir sections 1.2.3 et 1.2.5 : **Glycolyse et cycle de Krebs**).

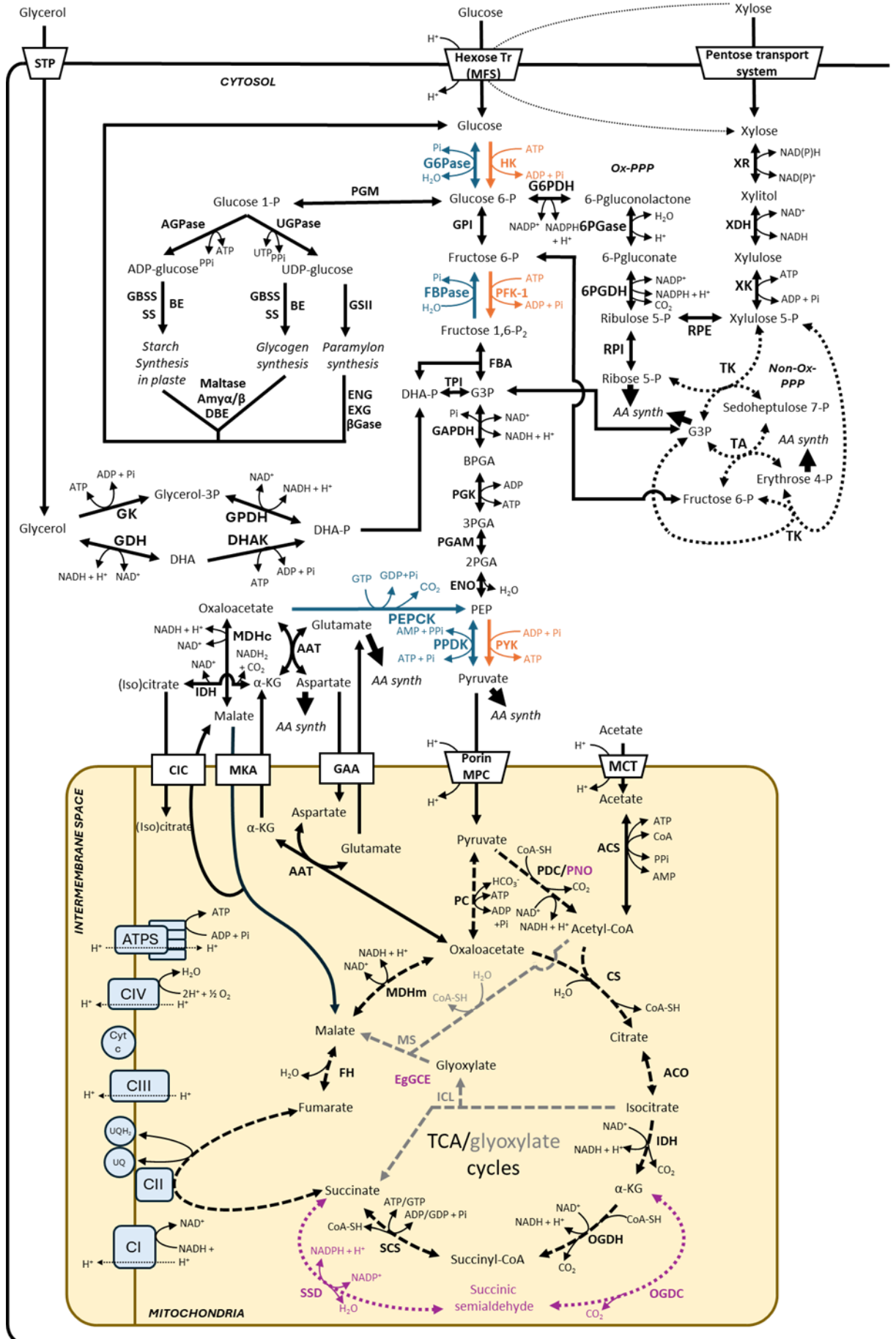
1.2.3 La glycolyse et gluconéogenèse

Qu'elles soient générées via la photosynthèse ou directement assimilées dans l'environnement, les sources de carbone comme le glucose permettent notamment la production d'énergie sous forme d'ATP ou d'équivalents réducteurs (NADH), nécessaires au métabolisme cellulaire, incluant la réplication et la transcription de l'ADN, la traduction des protéines, la production de nouvelles molécules, ainsi que la synthèse de composés de réserve comme l'amidon ou les triglycérides.

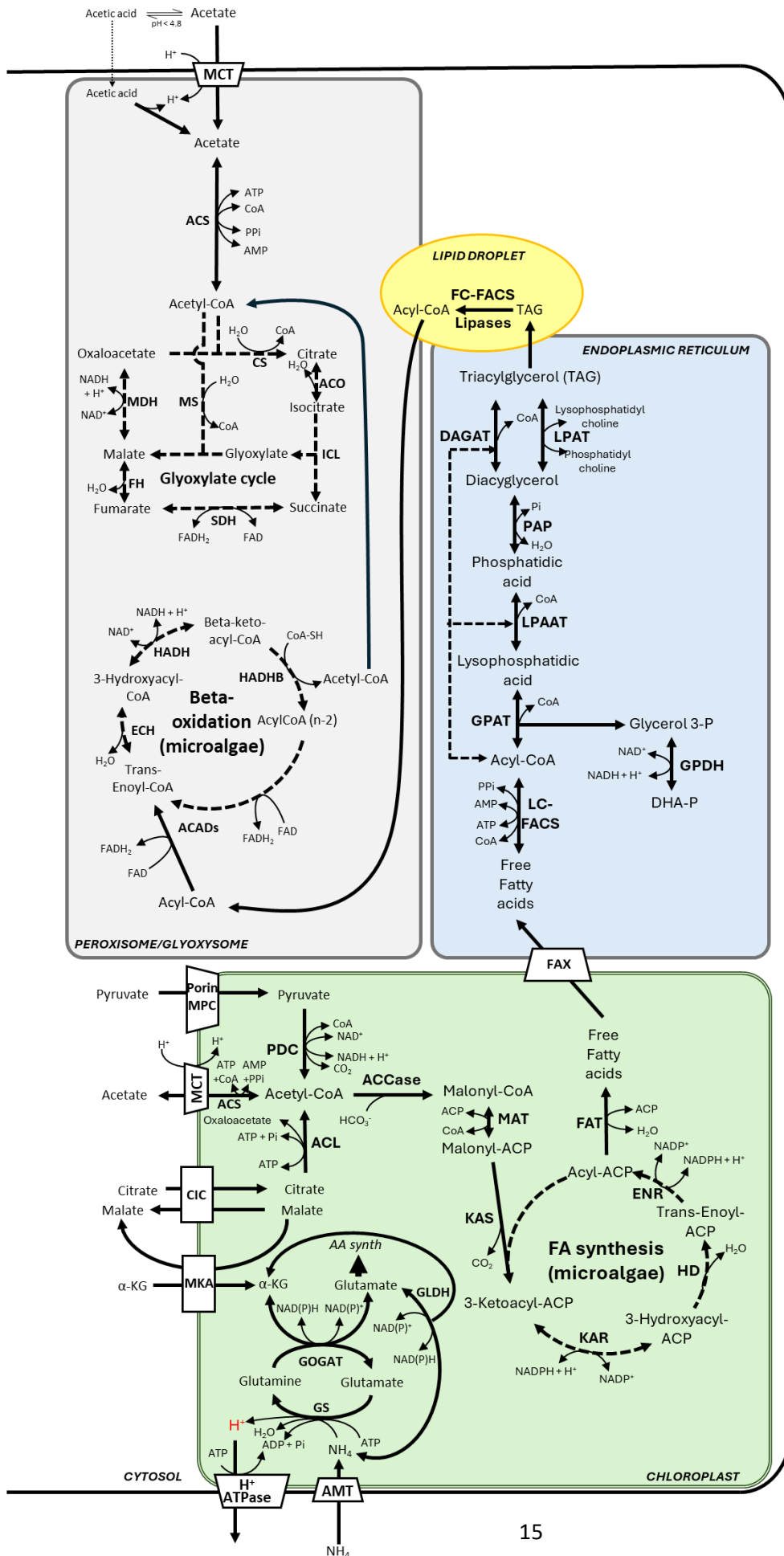
La glycolyse, ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, permet la conversion du glucose en pyruvate en plusieurs étapes impliquant de nombreux intermédiaires et enzymes différentes. Elle constitue la voie principale d'assimilation du glucose et permet la production d'ATP et de NADH. Le pyruvate ainsi formé pourra ensuite rejoindre la mitochondrie et le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques, TCA) pour produire davantage de NADH (Li et al., 2015) (**Fig. 5**).

La première étape consiste, en présence d'ATP, en l'ajout d'un groupement phosphate à une molécule de glucose pour former du glucose-6-phosphate. Cette réaction est catalysée par une enzyme clé dans la régulation du métabolisme du glucose, l'hexokinase (HK). Ensuite, le glucose-6-phosphate est converti par une glucose-6-phosphate isomérase (GPI) en fructose-6-phosphate. Ce dernier subit une seconde phosphorylation en présence d'ATP sous l'action de la phosphofructokinase-1 (PFK-1) pour former du fructose-1,6-bisphosphate. Jusqu'ici, les molécules impliquées comportaient six atomes de carbone. L'étape suivante, réversible, implique une aldolase (fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA), qui clive le fructose-1,6-bisphosphate en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) (Li et al., 2015). Cette enzyme a la particularité d'exister en deux classes distinctes qui ne sont pas homologues. La classe I, retrouvée chez les eucaryotes non photosynthétiques, les Embryophytes et les algues rouges (Rhodophytes), utilise une base de Schiff comme intermédiaire covalent. La classe II, présente chez les bactéries (et cyanobactéries), regroupe des métalloenzymes nécessitant un métal divalent (souvent Zn^{2+}) pour leur activité catalytique (Heron & Caprioli, 1975). Chez les organismes photosynthétiques, cette enzyme existe sous deux isoformes puisqu'elle intervient aussi bien dans la glycolyse (et la gluconéogenèse) dans le cytosol que dans le cycle de Calvin dans le plaste, où elle condense le G3P et l'érythrose-4-phosphate en sédoheptulose-1,7-bisphosphate (Gross et al., 1999; Heron & Caprioli, 1975). Puisque le chloroplaste est dérivé d'une cyanobactérie, on aurait tendance à penser que la FBA devrait y être de classe II. Mais les algues vertes, les plantes supérieures et les algues rouges possèdent deux isoformes cytosoliques et plastidiales d'une FBA de classe I (Gross et al., 1999; Heron & Caprioli, 1975). Cependant, cette enzyme diverge chez les chromalvéolés (issus d'une endosymbiose secondaire avec une algue rouge), où l'homologue plastidial appartient à la classe II et est donc probablement d'origine bactérienne (Patron et al., 2004). Outre les organismes dont le plaste dérive d'une algue rouge, on retrouve aussi les deux classes de l'enzyme chez *Euglena* dont le plaste est issu de l'endosymbiose secondaire d'une algue verte avec environ 78 % d'activité globale de la FBA de classe II (Heron & Caprioli, 1975).

CHAPITRE I : INTRODUCTION



CHAPITRE I : INTRODUCTION



CHAPITRE I : INTRODUCTION

FIGURE 5 : Représentation schématique des différentes voies métaboliques associées à l'assimilation de diverses sources de carbone et de l'ammonium chez les microalgues en hétérotrophie. Les flèches orange et bleues marquent respectivement les réactions spécifiques de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Le cytosol est en blanc, la mitochondrie en brun clair, le chloroplaste en vert, le peroxyosome/glyoxysome en gris, et le réticulum endoplasmique en bleu. Les enzymes sont mises en évidence et les métabolites intermédiaires sont indiqués en lettres normales. Les voies métaboliques en violet sont spécifiques à *Euglena gracilis*, tandis que la voie en gris (cycle du glyoxylate) n'est pas présente chez toutes les microalgues. Abréviations : **AAT**, aspartate aminotransférase; **ACO**, aconitase; **ACADs**, acyl-CoA déshydrogénases; **ACCase**, acétyl-CoA carboxylase; **ACS**, acétyl-CoA synthétase; **ACP**, protéine porteuse d'acyle; **ACL**, ATP-citrate lyase; **AMT**, transporteur d'ammonium; **Amy α/β** , α -amylase et β -amylase; **ATPS**, ATP synthase; **CI** (complexe I), NADH:ubiquinone oxydoréductase; **CII** (complexe II), succinate déshydrogénase; **CIII** (complexe III), ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase; **CIV** (complexe IV), cytochrome c oxydase; **CIC**, antiport citrate-malate; **CS**, citrate synthase; **Cyt c**, cytochrome c; **DAGAT**, diacylglycérol acyltransférase; **DBE**, enzyme débranchante; **DHA-(P)**, dihydroxyacétone-(phosphate); **DHAK**, dihydroxyacétone kinase; **ECH**, énoyl-CoA hydratase; **EgGCE**, enzyme du cycle du glyoxylate de *Euglena gracilis*; **ENR**, énoyl-ACP réductase; **ENO**, émolase; **ENG**, endo- β -1,3-glucanase; **EXG**, exo- β -1,3-glucanase; **FAT**, thioestérase d'acyle-ACP; **FBPA**, fructose-1,6-diphosphate aldolase; **FBPase**, fructose-1,6-bisphosphatase; **FH**, fumarase; **GPDH**, glycérol-3-phosphate déshydrogénase; **G6Pase**, glucose-6-phosphatase; **G6PDH**, glucose-6-phosphate déshydrogénase; **GAA**, antiport glutamate/aspartate; **GBSS**, granule-bound starch synthase; **GDH**, glycérol déshydrogénase; **GK**, glycérol kinase; **GLDH**, glutamate déshydrogénase; **GOGAT**, glutamate synthase; **GPAT**, glycérol-3-phosphate acyltransférase; **GPDH**, glycérol-3-phosphate déshydrogénase; **GPI**, glucose-6-phosphate isomérase; **GS**, glutamine synthétase; **GSII**, β -1,3-glucane synthase; **HADH**, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; **HADHB**, acétyl-CoA acyltransférase; **HD**, 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase; **HK**, hexokinase; **ICL**, isocitrate lyase; **IDH**, isocitrate déshydrogénase; **KAR**, 3-cétoacyl-ACP réductase; **KAS**, 3-cétoacyl-ACP synthase; **LC-FACS**, acyl-CoA synthase à longue chaîne; **LPAAT**, lyso-phosphatidate acyltransférase; **LPAT**, lyso-phosphatidylcholine acyltransférase; **MAT**, malonyl-CoA:ACP transacylase; **Mase**, maltase; **MCT**, transporteur de monocarboxylates; **MDH**, malate déshydrogénase; **MKA**, antiport malate/ α -cétoglutarate; **MOS**, navette malate-oxaloacétate; **MS**, malate synthase; **MPC**, transporteur mitochondrial du pyruvate; **MFS**, major facilitator superfamily; **OGDC**, α -cétoglutarate décarboxylase; **OGDH**, α -cétoglutarate déshydrogénase; **PAP**, phosphatidate phosphatase; **PC**, pyruvate carboxylase; **PEPCK**, phosphoénolpyruvate carboxykinase; **PFK-1**, phosphofructokinase-1; **PGDH**, 6-phosphogluconate déshydrogénase; **PGK**, phosphoglycérate kinase; **PGLase**, 6-phosphogluconolactonase; **PGAM**, phosphoglycérate mutase; **PGM**, phosphoglucomutase; **PNO**, pyruvate:NADP oxydoréductase; **PPDK**, pyruvate phosphate dikinase; **PYK**, pyruvate kinase; **UQ**, ubiquinone; **UQH₂**, ubiquinol; **RPE**, ribulose-5-phosphate 3-épimérase; **RPI**, ribulose-5-phosphate isomérase; **SCS**, succinyl-CoA synthétase; **SS**, starch synthase; **TA**, transaldolase; **TCA**, cycle de Krebs; **TK**, transcétolase; **TPI**, triose-phosphate isomérase; **XDH**, xylitol déshydrogénase; **XK**, xylulokinase. Les références associées aux différentes voies métaboliques sont reprises dans le texte principal.

Après cette étape, le DHAP est isomérisé en G3P par une triose-phosphate isomérase (TPI), aboutissant ainsi à la formation de deux molécules de G3P. Celles-ci sont alors conjointement phosphorylées et oxydées en présence de phosphate inorganique (Pi) et de NAD⁺ par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), produisant ainsi deux molécules de 1,3-bisphosphoglycérate (BPGA) et deux molécules de NADH. L'étape suivante conduit à la formation de deux molécules d'ATP et de 3-phosphoglycérate (3PGA), grâce au transfert d'un groupement phosphate de chaque molécule de BPGA à deux molécules d'ADP sous l'effet de la phosphoglycérate kinase (PGK). Le groupement phosphate du 3PGA est ensuite transféré sur le deuxième carbone de la molécule par une phosphoglycérate mutase (PGAM), formant ainsi du 2-phosphoglycérate (2PGA), qui est converti en phosphoénolpyruvate (PEP) par une émolase (ENO), avec libération d'une molécule d'eau. Finalement, les deux molécules de PEP issues de la dégradation d'une molécule de glucose permettent, au cours de la dernière étape irréversible de la glycolyse catalysée par une pyruvate kinase (PYK), la formation de pyruvate et de deux molécules d'ATP en présence d'ADP + Pi (X. Li et al., 2015).

Le bilan global de la glycolyse est donc la formation d'une molécule de pyruvate, de deux molécules d'ATP et de deux équivalents réducteurs NADH + H⁺ par molécule de glucose assimilée (X. Li et al., 2015). Bien que certaines étapes soient irréversibles, la glycolyse peut tout de même fonctionner en sens inverse pour convertir des molécules à trois ou quatre atomes de carbone

(oxaloacétate ou pyruvate, respectivement) en glucides à six atomes de carbone, selon les besoins de la cellule (par exemple, pour la synthèse de la paroi cellulaire ou de polysaccharides de réserve).

Les étapes irréversibles impliquant l'hexokinase (HK) et la phosphofructokinase-1 (PFK-1) doivent être contournées en sens inverse par la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), qui ne génèrent pas d'ATP mais libèrent du phosphate inorganique (Hatting et al., 2018). En revanche, la reconversion du pyruvate en PEP nécessite soit l'action d'une pyruvate phosphate dikinase (PPDK), qui consomme de l'ATP et du Pi pour produire de l'AMP et du P_i, soit une conversion mitochondriale via le cycle du malate-aspartate et la PEP carboxykinase (PEPCK) (Hatting et al., 2018; Hyskova & Ryslava, 2016) (**Fig. 5**).

Comme chez les eucaryotes hétérotrophes, ces voies métaboliques se déroulent généralement dans le cytosol. Cependant, chez de nombreuses espèces de microalgues, certaines enzymes clés de la glycolyse (ou de la gluconéogenèse) sont également présentes dans le chloroplaste, et parfois même absentes du cytosol, comme la phosphofructokinase (PFK-1) et la fructose-1,6-biphosotate aldolase chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Johnson & Alric, 2013). Cette localisation partagée entre 2 compartiments assure une flexibilité métabolique en fonction des sources de carbone disponibles (organiques ou inorganiques) et permet une régulation efficace du métabolisme du carbone dans le plaste, notamment en approvisionnant le cycle de Calvin en triose-phosphates (G3P, BPGA) (Facchinelli & Weber, 2011) et en participant à l'utilisation des sucres de réserve (Johnson & Alric, 2013). Des enzymes plastidiales de la glycolyse ont également été identifiées chez *E. gracilis* (Inwongwan et al., 2019). Néanmoins, aucune preuve de leur présence dans le plaste de *G. sulphuraria* n'a été rapportée, confirmant l'hypothèse que la glycolyse se déroule exclusivement dans le cytosol chez cette espèce (Curien et al., 2021).

1.2.4 Cycle des pentoses phosphates

La voie (ou cycle) des pentoses phosphates (PPP, pentose-phosphate pathway) est une voie de biosynthèse présente chez tous les eucaryotes et une grande partie des espèces bactériennes. Elle comporte une phase oxydative, considérée comme unidirectionnelle, et une phase non oxydative impliquée dans la production réversible d'intermédiaires métaboliques sous forme de carbohydrates contenant de 3 à 7 atomes de carbone (Stincone et al., 2015) (**Fig. 5**).

La phase oxydative permet la régulation du pool de NADPH, un agent réducteur clé pour la biosynthèse des lipides, fortement sollicité en cas de croissance rapide, mais aussi impliqué dans la réponse aux stress oxydatifs via le contrôle du ratio intracellulaire NADP⁺/NADPH. Au cours de cette phase, une molécule de glucose-6-phosphate (G6P) est convertie en une molécule de ribose-5-phosphate, une molécule de CO₂ et deux molécules de NADPH. Tout d'abord, le glucose-6-phosphate issu de la glycolyse est oxydé en 6-phosphogluconolactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), avec réduction de NADP⁺ en NADPH. Ensuite, le 6-phosphogluconolactone est hydrolysé et linéarisé par la 6-phosphogluconolactonase (PGLase) pour former du 6-phosphogluconate. Celui-ci, sous l'action de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH), subit une décarboxylation oxydative, libérant du CO₂ et une nouvelle molécule de NADPH, ce qui complète

la phase oxydative de la PPP et aboutit à la formation d'un pentose, le ribulose-5-phosphate (Stincone et al., 2015).

Cette première phase de la PPP a un impact significatif sur le métabolisme des lipides. Il a par exemple été démontré qu'une carence en azote dans le milieu des microalgues entraîne une surrégulation de la PPP, induisant ainsi une production accrue de NADPH et une accumulation de lipides (Nagappan et al., 2020). De plus, il a été observé que l'augmentation du NADPH et l'accumulation de lipides étaient fortement amplifiées en cas de surexpression de la G6PDH chez *Nannochloropsis oceanica*, *Chlorella pyrenoidosa* (Xue et al., 2020) ou encore *Phaeodactylum tricorutum* (Xue et al., 2017).

La phase non oxydative permet, à partir d'intermédiaires métaboliques tels que le fructose-6-phosphate ou le G3P, de produire du ribose-5-phosphate, essentiel à la synthèse des acides nucléiques et de l'histidine, ainsi que de l'érythrose-4-phosphate, précurseur des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane). En outre, cette phase favorise également l'intégration de certains carbohydrates, comme le xylose, dans la glycolyse via la formation de xylulose-5-phosphate. Nous allons aborder cette voie métabolique en partant du ribulose-5-phosphate, mais il est important de noter que toutes les réactions sont réversibles et régulées en fonction des besoins métaboliques en l'une ou l'autre forme de carbohydrate (Stincone et al., 2015).

Le ribulose-5-phosphate peut être isomérisé de deux manières : soit en ribose-5-phosphate par la ribulose-5-phosphate isomérase (ou phosphopentose isomérase, RPI), soit en xylulose-5-phosphate par une ribulose-5-phosphate 3-épimérase (RPE). Les deux molécules à 5 carbones nouvellement formées peuvent être utilisées pour la formation de G3P (3C) et de sédoheptulose-7-phosphate (7C) sous l'action d'une transcétolase (TK). Cette même enzyme catalyse également la formation conjointe de G3P et de fructose-6-phosphate (6C) à partir d'érythrose-4-phosphate (4C) et de xylulose-5-phosphate. Enfin, une dernière réaction implique une transaldolase (TA), catalysant l'association du G3P et du sédoheptulose-7-phosphate pour produire du fructose-6-phosphate et de l'érythrose-4-phosphate (Stincone et al., 2015).

La PPP se déroule dans le cytosol et le chloroplaste chez les Archaeplastida. En revanche chez beaucoup d'espèces à endosymbiose secondaire, comme *E. gracilis*, seule un isoforme cytosolique de la plupart des enzymes de la PPP existe, à l'instar des eucaryotes non photosynthétiques (Inwongwan et al., 2019). De plus, certaines enzymes liées à la PPP ont été localisées dans les peroxyosomes (ou des organites dérivant de celui-ci), le réticulum endoplasmique de certaines plantes et protistes (Stincone et al., 2015). Il a également été démontré que chez l'algue rouge *G. sulphuraria*, il existe des isoformes chloroplastiques de certaines enzymes clés de la PPP, comme la G6PDH (Oesterhelt et al., 2007).

1.2.5 Cycle de Krebs (TCA cycle) et cycle du glyoxylate

Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, aussi appelé cycle des acides tricarboxyliques (TCA cycle) ou cycle de l'acide citrique, a pour rôle principal de récupérer, au sein de la mitochondrie, des électrons par oxydation de molécules issues d'autres voies métaboliques, afin de produire du NADH, de réduire l'ubiquinone (UQ) en ubiquinol (UQH₂) et de former une molécule d'ATP ou de GTP. Les électrons ainsi transférés aux molécules à haut potentiel énergétique participent ensuite à la réaction de phosphorylation oxydative via la chaîne de transport d'électrons, permettant la formation d'ATP, principale source d'énergie utilisée par la cellule dans de nombreuses réactions enzymatiques (**Fig. 5**).

La plupart des composés impliqués dans ce cycle ont été mis en évidence par le biochimiste hongrois Albert Szent-Györgyi (prix Nobel de physiologie ou médecine 1937), mais sa nature cyclique ainsi que la plupart des réactions enzymatiques ont été caractérisées par le médecin allemand Hans Krebs en 1937 (prix Nobel de physiologie ou médecine 1953) (Y. Zhang & Fernie, 2023).

La première étape du cycle est la condensation irréversible de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate, formant une molécule à six carbones, le citrate, avec libération d'un coenzyme A (CoA). Cette réaction est catalysée par la citrate synthase (CS). Alors que l'oxaloacétate provient directement d'un cycle précédent du TCA, l'acétyl-CoA est principalement issu de la décarboxylation oxydative du pyruvate, catalysée par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC). Cette réaction irréversible permet la réduction d'une molécule de NAD⁺ en NAD(P)H et la libération de CO₂ (Y. Zhang & Fernie, 2023).

Le citrate subit ensuite une isomérisation en isocitrate par une aconitase (ACO), puis est décarboxylé en α -cétoglutarate (α -KG) sous l'action irréversible de l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Cette étape libère du CO₂ et une première molécule de NAD(P)H. Une seconde réaction irréversible de décarboxylation oxydative de l' α -KG a lieu en présence de coenzyme A et est médiée par le complexe α -KG déshydrogénase (OGDH), permettant la formation de succinyl-CoA, accompagnée de la libération d'une nouvelle molécule de CO₂ et de NAD(P)H (Y. Zhang & Fernie, 2023).

L'étape suivante implique l'hydrolyse du succinyl-CoA en succinate par la succinyl-CoA synthétase (SCS), avec phosphorylation d'ADP (majoritaire chez les plantes) ou de GDP en ATP ou en GTP (Studart-Guimarães et al., 2005), en présence de Pi. Le succinate transfère ensuite ses électrons à haut potentiel énergétique au groupe prosthétique FAD⁺ (cofacteur flavine adénine dinucléotide) de la succinate déshydrogénase (ou complexe II de la chaîne respiratoire, CII) fixée à la membrane interne mitochondriale, formant ainsi du FADH₂. Ces électrons permettent la réduction de l'UQ en UQH₂ dans la bicouche lipidique de cette membrane. Cette réaction entraîne également l'oxydation du succinate en fumarate (Y. Zhang & Fernie, 2023).

Le fumarate est ensuite hydraté par la fumarase (FH) en L-malate, une molécule clé pouvant être facilement transportée entre différents compartiments cellulaires et impliquée dans d'autres voies métaboliques (glycolyse et gluconéogenèse). Enfin, la dernière étape du cycle consiste en l'oxydation réversible du malate en oxaloacétate par la malate déshydrogénase (MDH), réaction qui

s'accompagne de la réduction d'une ultime molécule de NAD⁺ en NADH. Cette enzyme, dont il existe plusieurs isoformes localisées dans différents compartiments cellulaires, joue un rôle clé dans le transfert d'équivalents réducteurs vers le cytosol. L'oxaloacétate ainsi régénéré peut alors être utilisé pour un nouveau cycle (Zhang & Fernie, 2023).

Chez les eucaryotes, les différentes étapes du cycle de Krebs se déroulent dans la mitochondrie avec des enzymes aux fonctions identiques. Cependant chez certains organismes, certaines réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques, comme c'est le cas chez *E. gracilis*. Dans son cas, pour que la mitochondrie puisse fonctionner dans des conditions anaérobies, la production d'acétyl-CoA à partir du pyruvate ne repose pas sur le complexe pyruvate déshydrogénase, mais sur une pyruvate:NADP oxydoréductase (PNO) (Nakazawa et al., 2000). Toujours chez *E. gracilis*, le succinyl-CoA n'est pas formé par le complexe NAD⁺-dépendant α -KG déshydrogénase (OGDH), mais par deux enzymes catalysant successivement deux réactions réversibles, un mécanisme similaire à celui observé chez certains procaryotes. D'abord, une α -KG décarboxylase (OGDC) convertit l' α -KG en succinate semi-aldéhyde, qui est ensuite oxydé en succinate par une succinate semi-aldéhyde déshydrogénase (SSD) NAD(P)⁺-dépendante (Mayer & Beale, 1992) (**Fig. 5, violet**).

Le cycle du glyoxylate

Le cycle du glyoxylate est une voie métabolique alternative qui permet la production de succinate à partir d'acétyl-CoA, favorisant ainsi la gluconéogenèse pour satisfaire les besoins en monosaccharides (glucose, fructose) lorsque ceux-ci ne sont pas disponibles (Chew et al., 2019). Ce mécanisme intervient notamment lors de l'utilisation d'acides gras de réserve ou de composés à deux atomes de carbone, comme l'acétate. Une fois converti en acétyl-CoA par une acétyl-CoA synthase (ACS) en présence d'ATP et de CoA, l'acétate peut être intégré dans diverses voies métaboliques via le cycle du glyoxylate. Deux enzymes spécifiques de ce cycle, l'isocitrate lyase et la malate synthase, permettent d'éviter les étapes de décarboxylation oxydative de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et de l' α -KG déshydrogénase (OGDH) ainsi que l'étape de régénération d'ATP par la succinyl-CoA synthétase (SCS) (Syrett et al., 1963) (**Fig. 5**).

Dans un premier temps, l'isocitrate est clivé en succinate (4C) et en glyoxylate (2C) par l'isocitrate lyase (ICL). Ensuite, le glyoxylate est associé à une molécule d'acétyl-CoA sous l'action de la malate synthase (MS), formant du malate avec libération d'un CoA. Le succinate et le malate peuvent ensuite rejoindre le cycle de Krebs (Chew et al., 2019).

Le cycle du glyoxylate est quant à lui généralement localisé dans un compartiment spécifique dérivé des peroxysomes, le glyoxysome, où se déroule également la β -oxydation des acides gras et l'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle (Chew et al., 2019; Lauersen et al., 2016; Ono et al., 2003). Toutefois, certaines enzymes peuvent être cytosoliques, comme l'isocitrate lyase (ICL) chez *C. reinhardtii* (Kato et al., 2022; Lauersen et al., 2016). *E. gracilis* possède une enzyme unique exclusivement mitochondriale assemblée en quatre sous-unités identiques, la EgGCE (*E. gracilis glyoxylate Cycle Enzyme*), qui assure simultanément les fonctions de l'isocitrate lyase (ICL) et de la malate synthase (MS) (Ono et al., 2003). L'hypothèse de la localisation exclusivement mitochondriale

du cycle du glyoxylate est également soutenue par la localisation mitochondriale des enzymes de la β -oxydation, permettant la formation d'acétyl-CoA à partir d'acides gras (Ono et al., 2003). Cependant, une activité isocitrate lyase (ICL) et malate synthase (MS) a été observée dans des microbodies apparentés à des glyoxysomes, lorsque l'algue croît sur acétate (Inwongwan et al., 2019; Oda et al., 1981).

1.2.6 Respiration cellulaire et phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus se déroulant dans la membrane interne de la mitochondrie, permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à un gradient de protons généré par l'énergie libérée lors de l'oxydation de divers donneurs d'électrons présents dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Cette réaction permet également la réoxydation de cofacteurs comme le NADH ou le FADH₂ du complexe II, impliqués dans de nombreuses voies métaboliques telles que la glycolyse ou le cycle de Krebs.

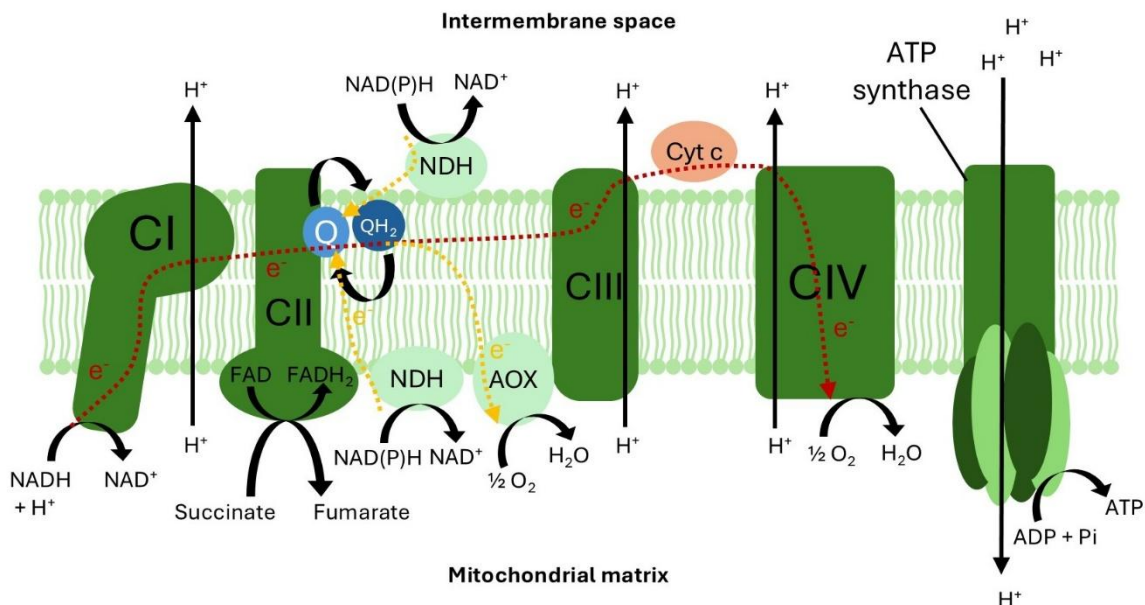


FIGURE 6 : Schéma de la chaîne de transport d'électron mitochondriale. Adapté de (Larosa & Remacle, 2018). Abréviations : CI, NADH:ubiquinone oxydoréductase ; CII, succinate déshydrogénase ; CIII, ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase ; CIV, cytochrome c oxydase ; AOX, oxydase alternative ; Cyt c, cytochrome c ; H⁺, proton ; Q, ubiquinone ; QH₂, ubiquinol ; NDH, NAD(P)H déshydrogénases de type II.

Quatre complexes protéiques sont impliqués dans le transport de ces électrons, ainsi qu'une petite hémoprotéine, le cytochrome c, et le coenzyme Q (ou ubiquinone, déjà abordé dans le cycle de Krebs, UQ). Un cinquième complexe est responsable de la phosphorylation de l'ADP en ATP (Larosa & Remacle, 2018). Tous ces transporteurs d'électrons fonctionnent de manière séquentielle pour assurer le transfert d'électrons et la dissipation de l'énergie libérée par l'oxydation du NADH, suivant un gradient croissant de potentiel redox (Fig. 6).

Deux électrons provenant du NADH et deux électrons issus de l'oxydation du succinate sont transférés à l'ubiquinone par les complexes I et II (NADH:ubiquinone oxydoréductase, CI, et succinate

déshydrogénase, CII), respectivement. Ensuite, les électrons sont transférés au complexe III (ubiquinol:cytochrome *c* oxydoréductase, CIII), puis au cytochrome *c*, et enfin au complexe IV (cytochrome *c* oxydase), où ils terminent leur parcours en réduisant le dioxygène en eau. Le passage des électrons à travers les complexes I, III et IV est couplé au transfert de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce processus permet le transfert d'un total de 10 protons pour les 4 électrons captés au niveau des complexes I et II. Le gradient de protons ainsi généré permet, lors de son retour dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase (ATPS), de fournir l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP (Larosa & Remacle, 2018).

Chez les animaux, il a été estimé que l'ATP synthase nécessite environ 2,7 protons pour phosphoryler une molécule d'ADP (Watt et al., 2010). Théoriquement, le bilan global de la respiration cellulaire, en intégrant la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, est de 36 à 38 molécules d'ATP par molécule de glucose. Cependant, cette valeur a été revue à la baisse en raison de divers facteurs, notamment la diffusion passive des protons à travers la membrane mitochondriale. Amthor (2023) estime que 27 à 28 molécules d'ATP sont produites par molécule de glucose, mais le sujet reste débattu et ces valeurs peuvent évoluer (Amthor, 2023).

Il existe également des voies alternatives de transfert d'électrons chez de nombreux microorganismes. Chez les microalgues, comme *E. gracilis* ou *A. protothecoides*, on retrouve par exemple une oxydase alternative (AOX), qui permet de régénérer l'ubiquinone en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, tout en contournant les complexes III et IV et en évitant ainsi la génération d'un gradient de protons (L. Zhang et al., 2015) (**Fig. 6**). Ce mécanisme permet notamment de réguler la production d'ATP au niveau cellulaire et chloroplastique, évitant ainsi la surproduction de ROS et le gaspillage des ressources en carbone lors de phases de croissance plus lentes ou en cas d'excès d'énergie lumineuse (Vanlerberghe et al., 2020).

Un autre mécanisme implique les NAD(P)H déshydrogénases de type II (NDH), présentes notamment chez les champignons et les microalgues (Jans et al., 2008) (**Fig. 6**). Cette enzyme permet au pool membranaire d'ubiquinone de recevoir des électrons directement du NAD(P)H depuis l'espace intermembranaire ou la matrice mitochondriale, en contournant le complexe I et en réduisant ainsi le transfert de protons. Ce processus favoriserait la plasticité métabolique, facilitant l'adaptation à divers stress environnementaux conduisant à une production excessive de NAD(P)H, ce qui pourrait inhiber le cycle de Krebs et générer des ROS, à l'instar de l'AOX (Jans et al., 2008).

1.2.7 Synthèse des lipides et β -oxydation des acides gras

Synthèse des lipides

Les lipides forment une large famille de molécules hydrophobes ou amphiphiles présentes chez tous les êtres vivants. Ils incluent notamment les triglycérides (triacylglycérols, TAGs), utilisés pour le stockage de l'énergie, les phospholipides et glycolipides, constituants principaux des membranes, ainsi que les stérols, qui jouent un rôle dans la stabilité membranaire et servent de précurseurs pour la synthèse de certaines hormones et vitamines. Tous ces lipides présentent un intérêt pour des

applications humaines, mais la biomasse des microalgues oléagineuses (>15 % de lipides en masse sèche) est principalement exploitée pour leur capacité à synthétiser des lipides neutres, les TAGs. Ceux-ci sont constitués d'une molécule de glycérol dont les trois groupes hydroxyles forment une liaison ester avec des acides gras.

La synthèse des lipides débute chez les microalgues dans le chloroplaste par la synthèse d'acides gras libres (Radakovits et al., 2010) (**Fig. 5**). L'acétyl-CoA, formé par décarboxylation oxydative du pyruvate via le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC), est carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase), qui transfère un groupement bicarbonate sur l'acétyl-CoA. Cette réaction consomme une molécule d'ATP et implique la biotine comme cofacteur. Le pyruvate servant à la formation d'acétyl-CoA peut être issu de carbohydrates générés par le cycle de Calvin en conditions phototrophes. En conditions hétérotrophes, il provient principalement de la glycolyse, puis peut être transporté dans le plaste via des transporteurs spécifiques, à l'instar d'autres molécules provenant du cycle de Krebs, comme le citrate, qui est clivé en acétyl-CoA et oxaloacétate par l'ATP-citrate lyase (ACL) (Oliver et al., 2009). Le malonyl-CoA est ensuite associé à un cofacteur sous la forme d'une protéine porteuse d'acyl (acyl carrier protein, ACP), qui transporte la chaîne d'acides gras pendant son élongation. Cette réaction, catalysée par la malonyl-CoA:ACP transacylase (MAT), libère une molécule de CoA. À partir de là, l'acide gras suit un cycle itératif d'élongation, dans lequel sa chaîne s'allonge de deux atomes de carbone à chaque cycle par l'action du complexe FASII, constitué de quatre enzymes associées (Radakovits et al., 2010).

Dans ce cycle, le malonyl-ACP est condensé à un acyl-ACP (à plus ou moins longue chaîne selon l'avancement du cycle) par une 3-ketoacyl-ACP synthase (KAS), formant un 3-ketoacyl-ACP et libérant du CO₂. Ce dernier est ensuite réduit en 3-hydroxyacyl-ACP en présence de NADPH par une 3-ketoacyl-ACP réductase (KAR). La molécule est ensuite déshydratée par une 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase (HD), formant un trans-énoyl-ACP, qui est réduit en acyl-ACP par une énoyl-ACP réductase en présence de NADPH (ENR). L'acyl-ACP ainsi produit peut soit poursuivre son élongation dans un nouveau cycle, soit être libéré par une thioestérase (fatty acyl-ACP thioesterase, FAT) après avoir atteint une longueur de 16 à 18 atomes de carbone, devenant alors un acide gras libre (Radakovits et al., 2010). Ces acides gras libres sont transportés hors du chloroplaste via des protéines spécifiques (fatty-acid export proteins, FAX), comme cela a été observé chez *C. reinhardtii* et *Cyanidioschyzon merolae* (Salvador López & Van Bogaert, 2021). Ils rejoignent ensuite le réticulum endoplasmique (ER), où ils peuvent être allongés, désaturés, incorporés dans des lipides membranaires ou utilisés pour la synthèse de TAGs (Salvador López & Van Bogaert, 2021).

La formation des TAGs commence par l'activation des acides gras sous l'action d'une acyl-CoA synthase à longue chaîne (LC-FACS), qui catalyse leur estérification avec un CoA en consommant une molécule d'ATP et en libérant de l'AMP et du PPI. L'acyl-CoA ainsi formé est ensuite transféré sur une molécule de glycérol-3-phosphate (issue de la dihydroxyacétone phosphate, DHA-P) par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT), formant un monoglycéride, l'acide lysophosphatidique. Une deuxième molécule d'acyl-CoA est ajoutée par une lyso-phosphatidate acyltransférase (LPAAT),

générateur de l'acide phosphatidique, structure de base des phospholipides membranaires tels que la phosphatidylcholine. L'acide phosphatidique est ensuite converti en diglycéride par la phosphatidate phosphatase (PAP), qui clive son groupement phosphate. Enfin, la formation des TAGs se fait sous l'action de deux enzymes associées à la membrane du réticulum endoplasmique : la lysophosphatidylcholine acyltransférase (LPAT), qui facilite l'incorporation des TAGs dans des gouttelettes lipidiques formées à partir des phospholipides membranaires, et la diacylglycérol acyltransférase (DAGAT), qui ajoute le dernier acyl-CoA à la molécule (Radakovits et al., 2010; Sharma et al., 2018). Une fois incorporées dans ces gouttelettes lipidiques, les réserves de TAGs peuvent être mobilisées comme source d'énergie selon les besoins cellulaires. Dans ce cas, sous l'action de lipases et de la acyl-CoA synthase à longue chaîne (LC-FACS), les acyl-CoA sont libérés et transportés dans le peroxysome via des transporteurs encore mal caractérisés (comme ABCD1, putatif chez *C. reinhardtii*), où ils subissent la β -oxydation pour produire de l'ATP (Salvador López & Van Bogaert, 2021).

La β -oxydation des acides gras

La β -oxydation est le processus inverse de la synthèse des acides gras. Elle consiste en la libération séquentielle d'acétyl-CoA à partir d'acyl-CoA. La première étape, irréversible, consiste en la formation d'une double liaison trans entre les carbones 2 et 3 de l'acyl-CoA sous l'action d'une acyl-CoA déshydrogénase (ACADs), avec réduction du FAD en FADH₂. Le trans-énoyl-CoA formé est ensuite hydraté en 3-hydroxyacétyl-CoA par une énoyl-CoA hydratase (ECH), puis oxydé en β -cétoacyl-CoA par une 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HADH), accompagnée de la réduction du NAD⁺ en NADH. Enfin, une acétyl-CoA acyltransférase (HADHB) catalyse la coupure du β -cétoacyl-CoA, produisant une molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci de deux atomes de carbone, qui peut poursuivre le

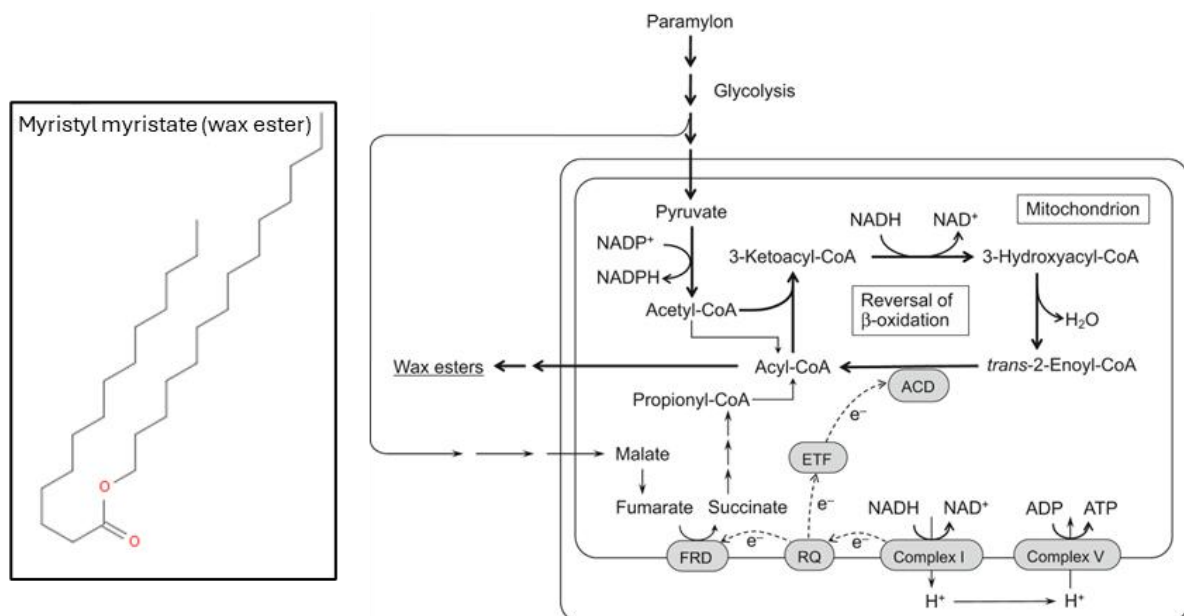


FIGURE 7 : Voie de biosynthèse des acides gras chez *E. gracilis* par le procédé β -oxydation inverse, lié à la synthèse d'ATP par respiration anaérobie. Schéma de (Nakazawa et al., 2018). A gauche, représentation d'une molécule de myristyl myristate, l'ester de cire majoritaire produit via de cette voie de biosynthèse. Abréviations : ACD, acyl-CoA déshydrogénase ; ETF, flavoprotéine de transfert d'électrons ; FRD, fumarate réductase (complexe II en sens inverse) ; RQ, rhoquinone.

cycle (Houten & Wanders, 2010). L'acétyl-CoA libéré peut entrer dans le cycle du glyoxylate dans le peroxyosome, permettant la production de carbohydrates utilisables par d'autres voies métaboliques, notamment le cycle de Krebs (**Fig. 5**).

Chez la plupart des microalgues, la synthèse des acides gras et la β -oxydation se déroulent respectivement dans le cytoplasme et le peroxyosome. Toutefois, chez *E. gracilis*, deux isoformes du complexe FAS ont été retrouvées dans le plaste et le cytosol. De plus, la perte du plaste n'affecte pas significativement la synthèse des acides gras en hétérotrophie, suggérant une synthèse cytosolique à l'obscurité et plastidiale en présence de lumière (Inwongwan et al., 2019). Quant à la β -oxydation, des activités enzymatiques comme la HADH et la HADHB ont été détectées dans la mitochondrie (Winkler et al., 2003), bien que d'autres indices suggèrent une localisation potentielle dans un compartiment similaire à un glyoxysome (Graves & Becker, 1974).

En parallèle, *E. gracilis* possède une voie unique de synthèse d'esters de cire à partir du paramylon accumulé en aérobie (**Fig. 7**). Privée d'oxygène, elle déclenche une fermentation spécifique conduisant à la formation d'esters de cire, principalement du myristyl myristate (deux chaînes carbonées de 14C assemblées par une liaison ester), tout en produisant de l'ATP. Contrairement aux produits de fermentation classiques, ces lipides restent stockés dans la cellule et peuvent être réutilisés en conditions aérobies pour reformer du paramylon. Leur synthèse, similaire à la β -oxydation mais en sens inverse, implique la production d'acyl-CoA à partir de *trans*-2-enoyl-CoA, étape catalysée par une *trans*-2-enoyl-CoA réductase. Cette enzyme utilise le potentiel énergétique d'une quinone particulière, la rholoquinone (RQ), qui reçoit son potentiel du complexe I de la chaîne respiratoire et peut être régénéré par le complexe II qui fonctionne en sens inverse en réduisant le fumarate (Iwasaki et al., 2019; Nakazawa et al., 2018).

Profile lipidique des microalgues

Les acides gras de stockage les plus fréquents chez les microalgues sont saturés, principalement l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0). Les chaînes plus courtes sont plus rares mais existent, comme l'acide myristique (C14:0) chez *Isochrysis* (Roncarati et al., 2004) et dans les esters de cire de *E. gracilis* (Iwasaki et al., 2019). Ces acides gras saturés à chaîne moyenne (C14–C18) sont prisés pour les biocarburants en raison de leur stabilité oxydative et de leur viscosité optimale (Martinez-Villarreal et al., 2022).

Enfin, outre les acides gras saturés, les microalgues accumulent sous forme de TAGs des acides gras mono- et polyinsaturés (MUFAs et PUFAs). Parmi eux, l'acide oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et α -linoléique (C18:3) sont communs, ainsi que des PUFAs à longue chaîne comme l'EPA (C20:5) et le DHA (C22:6), présents chez certaines diatomées et dinoflagellés (Yap et al., 2021). Tandis que les PUFAs sont valorisés en agroalimentaire et en pharmaceutique, les MUFAs améliorent la fluidité des biodiesels et rehaussent le point de congélation du biokérosène (C8-C16, devant rester liquide à -50°C) (Martinez-Villarreal et al., 2022; Raheem et al., 2018).

1.2.8 Polysaccharides de réserve

Même si certaines microalgues stockent des lipides comme réserve de carbone, comme c'est le cas pour *A. protothecoides* en hétérotrophie (Gao et al., 2014), la plupart d'entre elles stockent le carbone sous forme de polysaccharides, le plus répandu étant l'amidon (Busi et al., 2014). Il est généralement stocké dans le chloroplaste (ou dans l'amyloplaste) et est composé de polymères de glucose linéaires, liés en α -1,4 (voir section 1.2.2 : **Le carbone en hétérotrophie**), appelés amylose, ou de polymères de glucose liés en α -1,4 et ramifiés en α -1,6, appelés amylopectine (**Fig. 8**).

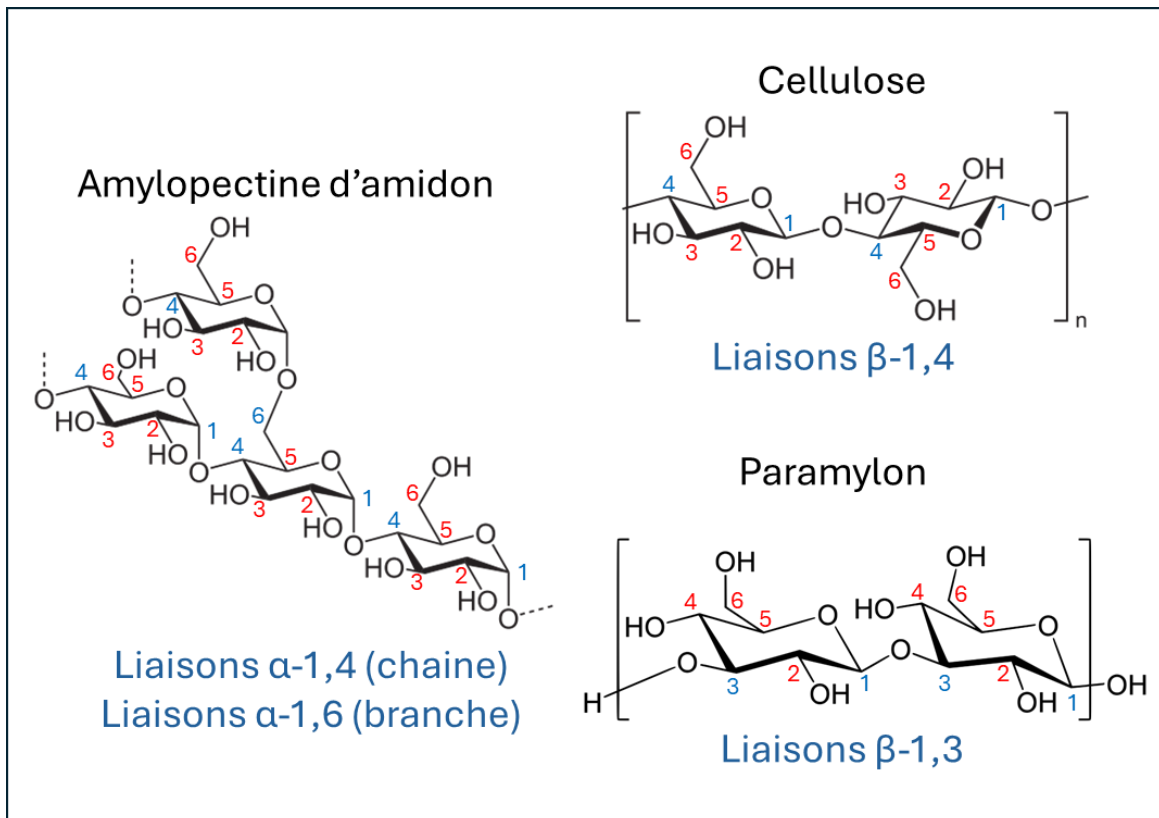


FIGURE 8 : Représentation de polymères linéaires naturels du glucose se différenciant par la nature de leurs liaisons osidiques. Adapté de (Feuzing et al., 2022).

Sa synthèse débute à partir du glucose-6-phosphate issu de la glycolyse, qui est converti en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase (PGM) (**Fig. 5**). Ensuite, une ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) catalyse la formation d'ADP-glucose à partir du glucose-1-phosphate et d'ATP, avec production de pyrophosphate (PPi) comme sous-produit. L'ADP-glucose est ensuite incorporé en α -1,4 à une molécule d'amylose par une enzyme de synthèse de l'amidon (starch synthase, SS) ou à une molécule d'amylopectine par une « Granule-Bound Starch Synthase » (GBSS). Il peut également être ajouté en α -1,6 sur une molécule d'amylopectine par une enzyme de branchement de l'amidon (branching enzyme, BE). Dans tous les cas, une molécule d'ADP est libérée au cours du processus. Lorsque la cellule a besoin de glucose pour la glycolyse, des amylases (Amy- α et Amy- β) hydrolysent l'amidon en α -1,4 pour former du maltose et des dextrines (résidus de l'amidon après clivage). Le maltose est ensuite hydrolysé en deux molécules de glucose par des maltases (Mase).

Les ramifications en α -1,6 sont libérées sous l'action d'une enzyme débranchante (DBE) (Busi et al., 2014).

Chez *G. sulphuraria*, le polysaccharide de réserve est similaire au glycogène, dont la structure est nettement plus ramifiée que celle de l'amidon, le rendant ainsi beaucoup plus soluble. Il est stocké dans le cytoplasme et est souvent qualifié de phytoglycogène ou d'amidon floridéen. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon floridéen chez les algues rouges ont globalement la même fonction que celles des algues vertes, bien que leur localisation et origine phylogénétique puisse varier (Busi et al., 2014). Globalement, les algues vertes et les plantes, qui synthétisent leur polysaccharide de réserve dans le plaste, tirent leurs enzymes de synthèse de l'amidon de leur symbionte procaryote. Á l'inverse, les microalgues qui stockent leurs glucanes dans le cytoplasme comme c'est le cas des algues rouges comme *G. sulphuraria* ou des Euglénophytes comme *E. gracilis*, ont généralement conservé des isoformes enzymatiques qui leur sont propre (de l'hôte). Cela permet d'expliquer la raison pour laquelle le donneur primaire de glucose pour la synthèse des sucres de réserve est l'ADP-glucose chez les Embryophytes, comme pour les procaryotes, et l'UDP-glucose chez *G. sulphuraria* et *E. gracilis*, comme c'est le cas chez la majorité des eucaryotes. Ce dernier est formé à partir du glucose-1-phosphate par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) en présence d'UTP (Busi et al., 2014; Jobling, 2004).

E. gracilis possède une forme très particulière de polymère du glucose présentant des liaisons β , similaires à la cellulose, mais branchées en β -1,3 plutôt qu'en β -1,4 : le paramylon (Gissibl et al., 2019) (**Fig. 8**). Contrairement à l'amidon, ce β -1,3-glucane est linéaire et forme des granules hautement cristallins stockés dans le cytoplasme sous forme de fibrilles. Comme chez les algues rouges, sa synthèse repose sur l'UDP-glucose, formé par une UGPase en présence d'UTP. L'enzyme β -1,3-glucane synthase (GSII) catalyse ensuite l'ajout de l'UDP-glucose aux chaînes de paramylon en formation (Tanaka et al., 2017).

Comme expliqué dans le chapitre sur la synthèse des lipides (voir section 1.2.7 : **Synthèse des lipides et β -oxydation des acides gras**), le paramylon assure principalement une réserve de carbone en conditions anaérobies pour la production d'esters de cire. En dehors de ces conditions, des molécules de glucose peuvent être libérées du paramylon sous l'action de deux enzymes : l'endo- β -1,3-glucanase (ENG), qui clive les liaisons β -1,3 à l'intérieur des chaînes pour produire des oligo- β -1,3-glucanes, et l'exo- β -1,3-glucanase (EXG), qui hydrolyse les extrémités pour libérer directement du glucose. Une β -glucosidase (β Gase) permet également d'hydrolyser directement les chaînes courtes en glucose (Tanaka et al., 2022; Vogel & Barber, 1968).

Les polymères α de glucose sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme épaississants et stabilisants, ainsi que dans les cosmétiques et la fabrication de bioplastiques (Do Val Siqueira et al., 2021; Jobling, 2004; Martinez-Garcia et al., 2017). De plus, ils peuvent servir de substrats pour la production de bioéthanol, étant riches en glucose fermentescible facilement dégradés par des α -amylases, couramment retrouvées chez les microorganismes (Busi et al., 2014; Jobling, 2004). Le paramylon, quant à lui, présente un intérêt principalement pharmaceutique. Ses sucres branchés en β

le rendent moins accessible et non digestible par l'homme. Il est étudié pour ses effets immunostimulants, ses propriétés antioxydantes naturelles, ainsi que comme matériau pour la confection de médicaments (Feuzing et al., 2022; Nakashima et al., 2018).

1.2.9 Métabolisme de l'ammonium

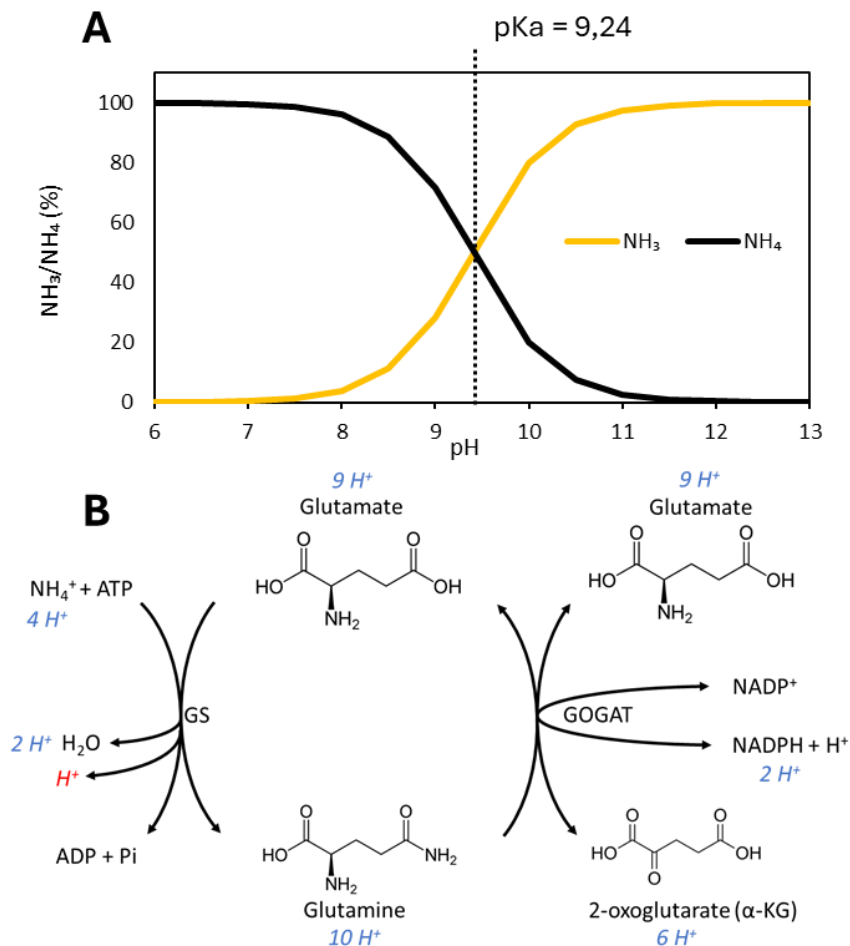


FIGURE 9 : Équilibre du couple ammonium (NH_4^+)/ammoniac (NH_3) en fonction du pH (A) et représentation schématique du métabolisme de l'ammonium chez les microalgues (B). En (A), les courbes représentent la variation du pourcentage (%) de chacune des espèces du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (respectivement en noir et en jaune) en solution aqueuse en fonction du pH (à 20°C). Elles ont été tracées sur base des données expérimentales de (Emerson et al., 1975). La figure en (B) est une représentation schématique de l'assimilation de l'ammonium via le cycle du GS/GOGAT (glutamine synthase/glutamate synthase) chez les microalgues, en présence d'ATP et de NADPH, H⁺, sur base des observations de (J. Wang & Curtis, 2016). La stœchiométrie des atomes d'hydrogène des substrats et produits de chaque réaction est précisée en bleu et en italique. On remarque que l'assimilation d'une molécule d'ammonium aboutit à la production nette d'un proton (en rouge) lors de son incorporation à une molécule de glutamate pour la formation de glutamine par la GS.

L'azote est indispensable à la croissance des microalgues, car il intervient dans la synthèse des acides aminés (et donc des protéines), des acides nucléiques et de certains pigments, comme la chlorophylle. L'ammonium (NH_4^+) est une source d'azote préférentielle pour la croissance des microalgues, car il est directement assimilable sans nécessiter de réduction préalable avant son incorporation dans des molécules organiques, contrairement au nitrate (NO_3^-) ou au nitrite (NO_2^-) (Kumar & Bera, 2020).

L'ammonium entre dans la cellule et dans le chloroplaste via des transporteurs spécifiques (Ammonium Transporters, AMT), dont l'expression peut être régulée par la disponibilité en sources d'azote dans l'environnement (Kumar & Bera, 2020) (**Fig. 5**). Une fois dans la cellule, l'ammonium est incorporé à des molécules organiques via la voie du GS/GOGAT (glutamine synthétase/glutamate synthase), principalement active dans le chloroplaste. La GS catalyse d'abord, en présence d'ATP, la fixation de l'ammonium sur une molécule de glutamate pour produire de la glutamine. Ensuite, la GOGAT transfère le groupement amine de la glutamine à une molécule d' α -KG pour former une deuxième molécule de glutamate (**Fig. 5&9**). Cette seconde réaction implique l'oxydation d'un NAD(P)H en NAD(P)⁺ et nécessite la disponibilité en α -KG provenant de la mitochondrie (Kumar & Bera, 2020).

Une voie d'assimilation alternative, utilisée en cas de forte concentration en ammonium, fait intervenir, chez la Chlorelle notamment, une glutamate déshydrogénase (GLDH), qui fixe directement l'ammonium sur l' α -KG pour former du glutamate, avec oxydation concomitante de NAD(P)H. Ensuite, sous l'action de transaminases (AAT), le groupement amine porté par le glutamate peut être transféré à l'oxaloacétate pour former de l'aspartate, ou au pyruvate pour former de l'alanine. Ces deux réactions régénèrent alors une molécule d' α -KG (Kumar & Bera, 2020).

Même si l'ammonium présente l'avantage, par rapport au nitrate, d'augmenter le taux de croissance et de favoriser la synthèse des lipides en influençant rapidement le métabolisme du carbone, son utilisation présente également plusieurs inconvénients. Le principal problème est sa potentielle toxicité à des concentrations élevées, causant un stress osmotique, une acidification intracellulaire et un stress oxydatif en favorisant la production d'oxygène singulet (Collos & Harrison, 2014). De plus, à des pH supérieurs à 9,25, l'équilibre $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$ est déplacé vers la formation d'ammoniac (NH_3) (**Fig. 9A**) (Emerson et al., 1975), une molécule liposoluble qui peut diffuser à travers les membranes. L'ammoniac devient alors toxique pour les microalgues, car il altère le fonctionnement du photosystème II et réduit le gradient de protons nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP (Collos & Harrison, 2014; Zhao et al., 2019).

Par ailleurs, sa métabolisation rapide peut également entraîner une baisse du pH extracellulaire, pouvant conduire à la mort des cellules en culture (Perez Saura et al., 2024). La cause de cette acidification en conditions neutres de pH n'est pas encore bien comprise, mais elle pourrait être liée au métabolisme du CO_2 (Collos & Harrison, 2014). Une autre hypothèse suggère que le transport actif de l'ammonium entraîne son entrée rapide dans la cellule, ce qui dépolariserait le potentiel électrique membranaire et augmenterait ainsi la libération passive de protons dans le milieu (Schubert & Yan, 1997). Enfin, l'ammonium pourrait aussi libérer des protons lors de son incorporation dans la synthèse des acides aminés et d'autres acides organiques via le cycle GS/GOGAT (détaillé dans la **Fig. 9B**) (J. Wang & Curtis, 2016). Ces protons doivent alors être rapidement évacués dans le milieu extracellulaire par des pompes à protons H^+ -ATPase (Schubert & Yan, 1997; J. Wang & Curtis, 2016).

Des sources d'azote organique, comme les acides aminés ou l'urée, peuvent être utilisées par certaines microalgues, mais elles ne seront pas abordées ici (Kumar & Bera, 2020).

1.3 Les microalgues en hétérotrophie

1.3.1 Avantages de l'hétérotrophie chez les microalgues

La culture de microalgues en hétérotrophie présente divers avantages par rapport à leur croissance phototrophe ou mixotrophe. Premièrement, elle permet un contrôle accru des conditions de culture par rapport à la stratégie de culture à grande échelle la plus couramment utilisée pour des raisons de coûts et d'infrastructure : les open-ponds (systèmes ouverts) (Abreu et al., 2022; Barros et al., 2019). Bien que les risques de contamination en bioréacteur ne soient pas inexistantes, tant que la stérilité du système est garantie, il n'y a pas de raisons d'y trouver des contaminants biologiques ou chimiques (Simonazzi et al., 2019). De plus, même en comparaison avec des photobioréacteurs tubulaires, fonctionnant en extérieur pour profiter de la lumière naturelle et ainsi réduire les coûts, les bioréacteurs fonctionnant à l'obscurité sont nettement plus faciles à entretenir et ne sont pas affectés par les variations de luminosité et de température liées aux saisons, en particulier dans les régions éloignées de l'équateur. Les systèmes de culture phototrophes, bien qu'ils ne nécessitent pas de terres arables et qu'il soit possible de maximiser l'espace en photobioréacteurs par rapport aux systèmes open-ponds, ont tendance à s'étendre sur de grandes surfaces afin d'éviter que les algues ne s'ombragent mutuellement (phénomène de *self-shading*). À l'inverse, les bioréacteurs utilisés pour la croissance hétérotrophe présentent un rapport surface/volume nettement réduit, optimisant ainsi l'espace utilisé (Fernandes et al., 2010; Martinez-Villarreal et al., 2022).

En ce qui concerne la production de biomasse, la croissance en hétérotrophie est nettement supérieure à celle en phototrophie, où l'apport en carbone provient uniquement du CO₂ dont l'assimilation est limitée par les conditions lumineuses et le métabolisme du cycle de Calvin, qui requiert une importante production d'ATP (Abreu et al., 2022; Fernandes et al., 2010; C. Yang et al., 2000). En considérant cela, et en ajoutant le fait que les algues n'ont pas à subir le phénomène de *self-shading*, les densités cellulaires maximales atteintes en hétérotrophie (>150 g L⁻¹ pour *A. protothecoides* d'après (De La Hoz Siegler et al., 2012; Ghidossi et al., 2017)) sont bien supérieures à celles observées en phototrophie (~40 g L⁻¹), à condition que la culture soit approvisionnée en sources de carbone (Fernandes et al., 2010; Ruiz et al., 2022). Cela s'ajoute à une productivité journalière jusqu'à 10X plus élevée en croissance à l'obscurité, comme cela a été montré pour des *Chlorelles* en présence de glucose atteignant près de 85 g L⁻¹ jour⁻¹ en fermenteur de 50 L (Doucha & Lívanský, 2012), contre 3.3 g L⁻¹ jour⁻¹ en phototrophie avec atmosphère enrichie en CO₂ sous le soleil espagnol (Doucha & Lívanský, 2006). En effet, la localisation du système de production en phototrophie a énormément d'impact sur le coût de production de la biomasse en raison de l'ensoleillement et de la température extérieure. Par exemple, il a été montré que la production de biomasse pour la confection de biocarburants dans les mêmes conditions de culture avec la même souche, était réduite de moitié dans une région comme celle d'Almeria (sud de l'Espagne), en comparaison avec la région d'Amsterdam (Pays-Bas) (1,48\$ L⁻¹ contre 2.79\$ L⁻¹, respectivement) (Roles et al., 2021). Cette constatation renforce donc l'intérêt de l'étude de microalgues en hétérotrophie dans des latitudes comme celles de la Belgique, où l'ensoleillement global est limité, en plus d'avoir un impact positif direct sur la production de lipides (Ruiz et al., 2022).

Enfin, certaines microalgues présentent une tolérance élevée aux milieux extrêmes, un avantage non négligeable par rapport à d'autres eucaryotes hétérotrophes. Par exemple, *G. sulphuraria* supporte des environnements très acides, des températures élevées et de fortes teneurs en métaux lourds (Barbier et al., 2005), tandis que *Dunaliella salina* est capable de croître dans des concentrations élevées en sel (Gladue & Maxey, 1994). En outre, de nombreuses espèces de microalgues ont la capacité de tolérer efficacement les eaux usées. Cet aspect leur confère l'avantage de ne pas dépendre d'eaux potables dans des régions où celles-ci sont précieuses, réduisant ainsi fortement l'impact environnemental lié à leur culture (Azari et al., 2018 ; Mata et al., 2010).

Impact économique et environnemental de la stratégie de croissance hétérotrophe

Un autre aspect environnemental positif de la culture de microalgues est leur capacité à séquestrer le CO₂ atmosphérique (également dissous dans l'eau sous forme de carbonate), transformé en hydrates de carbone utilisés comme source d'énergie lors de la respiration cellulaire aérobie. Toutefois, lorsqu'elles sont cultivées à l'obscurité, les microalgues utilisent les sources de carbone présentes dans leur milieu tout en produisant du CO₂, sans participer directement à la décarbonation de l'atmosphère. Malgré cela, ces composés carbonés organiques proviennent exclusivement de végétaux qui, quelle que soit leur origine, ont dû séquestrer pour leur croissance autant de carbone que ce que l'algue rejettera pour le maintien de son métabolisme ou incorporera dans sa biomasse.

À ce titre, une étude comparative d'Azari et al., portant sur l'analyse du cycle de vie de microalgues du genre *Chlorella* cultivées pour la production de biodiesel, montre que la stratégie hétérotrophe a un impact environnemental comparable, voire inférieur, à la stratégie phototrophe (Azari et al., 2018). L'étude en question compare l'impact environnemental en termes d'émissions de gaz à effet de serre, de consommation d'énergie et d'eau, ainsi que les dommages environnementaux globaux associés à la culture de microalgues pour produire 1 MJ d'énergie. Cinq stratégies de culture sont étudiées : la culture photoautotrophe en bassins ouverts utilisant de l'eau douce, de l'eau recyclée ou des eaux usées municipales, la culture photoautotrophe en photobioréacteur, et la culture hétérotrophe en fermenteur avec de la mélasse comme substrat (Azari et al., 2018).

Aussi surprenant que cela puisse paraître, les résultats attestent que les plus faibles niveaux d'émissions de gaz à effet de serre (légèrement inférieurs à ceux des énergies fossiles) sont observés dans les scénarios de culture photoautotrophe en eaux usées et de culture hétérotrophe, atteignant respectivement 67 et 89 g équivalent CO₂ par MJ d'énergie produite. À l'inverse, la culture en système ouvert utilisant de l'eau potable montre le taux d'émissions de gaz à effet de serre le plus élevé avec 149 g équivalent CO₂ par MJ (Azari et al., 2018).

Le principal facteur contribuant significativement aux émissions dans les cultures photoautotrophes en extérieur est l'apport indispensable en CO₂ pour maintenir une croissance élevée. Qu'il provienne de sources renouvelables (comme dans l'étude citée) ou d'énergies fossiles, le CO₂ est injecté directement dans le milieu sous forme gazeuse, et une partie s'échappe dans l'atmosphère, augmentant l'empreinte carbone du procédé. Néanmoins, Azari et al., mentionnent la possibilité d'envisager un scénario où le CO₂ injecté provient directement d'une activité émettrice à

proximité, avec une infrastructure permettant sa capture, réduisant ainsi considérablement les émissions associées (Azari et al., 2018).

Sans cet apport artificiel de dioxyde de carbone, l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse par les microalgues est si faible qu'elle impose des temps de culture longs, nécessitant davantage de ressources en eau et en énergie (notamment pour maintenir une agitation efficace et une culture homogène) (Azari et al., 2018; Smetana et al., 2017). Une solution pour pallier ce problème pourrait être l'utilisation d'une stratégie mixotrophe, où l'utilisation de substrats organiques favorise la production de CO₂, qui peut ensuite être recyclé en interne via la RubisCO ou la phosphoénolpyruvate carboxylase (PPC), réduisant ainsi la nécessité d'ajouter des sources de carbone exogènes (Abreu et al., 2022). Cependant, certaines microalgues voient leur capacité photosynthétique inhibée en présence de certains substrats tels que le glucose, ce qui accroît les contraintes de sélection des souches, mais aussi des substrats valorisables (Abreu et al., 2022).

Par ailleurs, les contraintes techniques précédemment évoquées concernant l'infrastructure nécessaire à la culture photoautotrophe sont également présentes (luminosité, température, risques de contamination, etc.). D'un point de vue énergétique, toujours en utilisant des coproduits issus du recyclage, la culture hétérotrophe s'impose également comme moins énergivore que la culture photoautotrophe ou mixotrophe en photobioréacteur, ou utilisant des sources lumineuses artificielles. Sur le plan hydrique, l'hétérotrophie requiert beaucoup moins d'eau que les systèmes ouverts, fortement sujets à l'évaporation (Azari et al., 2018).

Au vu de ces résultats, il semble aussi bénéfique pour l'environnement de cultiver les microalgues en photoautotrophie dans des eaux usées qu'en hétérotrophie, à condition de sélectionner des nutriments issus de sources renouvelables. Toutefois, au-delà de l'aspect écoresponsable, la croissance à l'obscurité nécessite un apport en substrats qui, selon leur origine, peut représenter un coût non négligeable.

L'inconvénient principal de leur croissance en hétérotrophie réside donc dans l'apport en carbone qu'il faut fournir au milieu. A cause du coût de ces dernières, les études montrent que la production de biomasse en hétérotrophie avec des sources de carbones raffinées comme le glucose a un impact significatif sur le prix de production total et rendent plus avantageuse la production en système phototrophe. Ruiz et al., (2022) ont calculé qu'à leur actuelle, le coût moyen de production de biomasse en hétérotrophie est de 4€ Kg⁻¹ en prenant en compte l'utilisation de glucose pur comme source de carbone et une productivité à grande échelle de 4,8 g L⁻¹ jour⁻¹. En opposition, la même biomasse en phototrophie dans des régions avec un ensoleillement important (sud de l'Espagne, en l'occurrence) coûterait 3.5€ Kg⁻¹ en photobioréacteurs de type « Flat-Panel ». En revanche, ils expliquent que le coût de la culture à l'obscurité pourrait être réduit en augmentant la productivité globale, en utilisant des souches avec un taux de conversion du substrat en biomasse élevé, et surtout en utilisant des substrats carbonés à coût réduits (27,5% d'économie totale pour l'utilisation de mélasse plutôt que de glucose, par exemple) (Ruiz et al., 2022).

C'est pourquoi l'utilisation de sources de carbone alternatives constitue un axe de recherche particulièrement important pour la production de biomasse algale en conditions d'obscurité.

1.3.2 Substrats atypiques pour la croissance en hétérotrophie

L'utilisation de sources de carbone entrant en compétition avec l'alimentation humaine, comme le glucose ou le saccharose, pour la croissance des microalgues en hétérotrophie, est sujette à débat pour des raisons éthiques évidentes. C'est pourquoi de nombreuses études portent sur la valorisation de substrats carbonés non conventionnels considérés comme des sous-produits de diverses industries. Parmi ceux-ci, on retrouve la mélasse ou la bagasse provenant de l'industrie sucrière, riches en saccharose, les déchets alimentaires tels que les épluchures de pommes de terre, riches en amidon, ou encore les effluents des brasseries et des usines de transformation des fruits et légumes, riches en sucres et en acides organiques (Scherhag & Ackermann, 2021).

Le glycérol

On retrouve également parmi ces déchets valorisables le glycérol. Ce polyol à trois carbones est un sous-produit de la transestérification des TAGs issus de graisses animales, d'huiles végétales ou de microalgues pour la production de FAMES destinés aux biocarburants (Ummalyma & Sukumaran, 2014). Malgré son intérêt industriel sous sa forme pure, le glycérol issu de la transestérification est considéré comme un déchet en raison de sa teneur plus ou moins élevée en méthanol et autres impuretés ; on parle alors de glycérol (ou glycérine) brut (Fig. 10). Cependant, certains

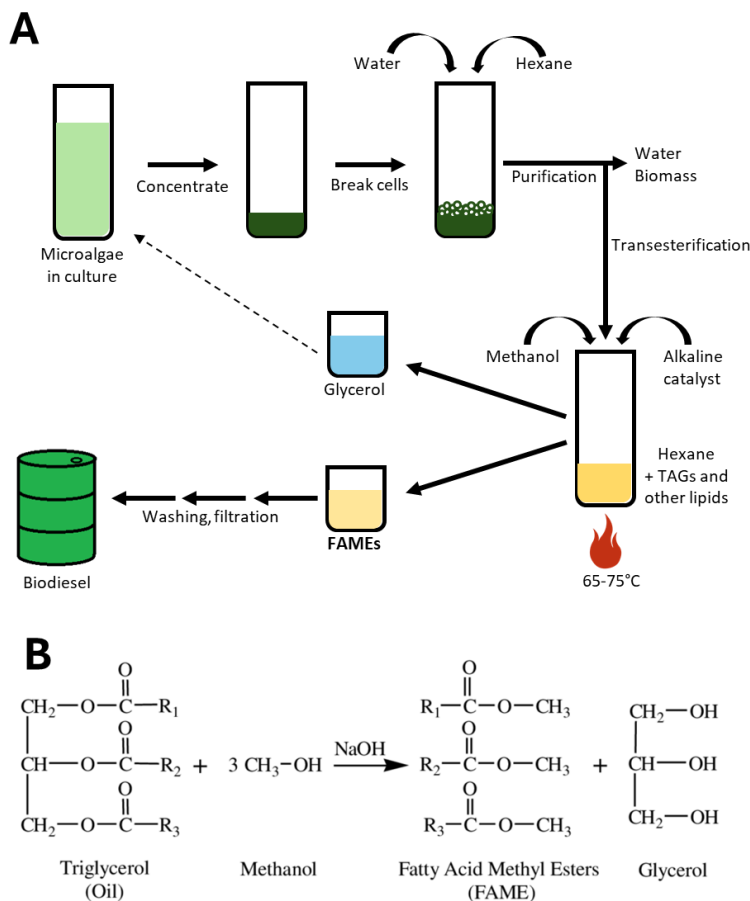


FIGURE 10 : Production d'ester méthylique d'acide gras (FAME, Fatty Acid Methyl Ester) avec libération de glycérol comme sous-produit de la réaction. Le schéma (A) montre les différentes étapes de production de biocarburants à base de biomasse algale, via conversion chimique des acides gras par transestérification à basse température. Le procédé passe par des étapes de concentration, de cassage des cellules, de purification des lipides en présence d'hexane, et de transestérification. La flèche en pointillé marque la réutilisation du glycérol, sous-produit de la production de FAMES, pour la culture de microalgues. Le schéma a été réalisé sur base des informations recueillies dans (Bhan & Singh, 2020)). Le schéma (B), montre, en présence de NaOH comme catalyseur, les différents réactifs (triglycérides et méthanol) et produits (FAME et glycérol) de la réaction de transestérification.

microorganismes ont montré une capacité à assimiler ce polyol, même lorsqu'il provient de la production de biocarburants. Cela a notamment été observé chez une microalgue du genre *Chlorococcum*, qui produit une biomasse accrue à l'obscurité lorsqu'on complète de 6 % de glycérol son substrat de base (Scherhag & Ackermann, 2021; Ummalyma & Sukumaran, 2014). *G. sulphuraria* peut croître sur glycérol et possède cinq transporteurs du glycérol ainsi que trois glycérol déshydrogénases, tous acquis par transfert horizontal de gènes (Schönknecht et al., 2013). D'un point de vue métabolique, le glycérol entre probablement dans la cellule chez *G. sulphuraria* via des transporteurs de la classe des STP1 (sugar and polyol transporter 1), même si ceux-ci n'ont pas été directement identifiés (Schilling & Oesterhelt, 2007). Il peut ensuite être converti en DHA-P par deux voies différentes, afin d'entrer dans la glycolyse (Kataoka et al., 2021) (**Fig. 5**). La première de ces voies consiste en sa phosphorylation en glycérol-3-phosphate (G3P) en présence d'ATP par une glycérol kinase (GK), suivi de son oxydation en DHA-P par une glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), formant au passage une molécule de NADH. L'autre voie passe d'abord par l'oxydation du glycérol en dihydroxyacétone (DHA) en présence de NAD⁺ par une glycérol déshydrogénase (GDH), puis par sa phosphorylation en DHA-P en présence d'ATP par une DHA kinase (DHAK). Il est difficile de déterminer quelle voie est privilégiée chez les microalgues, mais *G. sulphuraria* exprime à la fois la glycérol kinase et la glycérol déshydrogénase (Perez Saura et al., 2022).

L'hémicellulose

Une autre source de carbone atypique pour la croissance des microalgues en hétérotrophie est l'hémicellulose, issue de déchets verts lignocellulosiques agricoles ou de l'industrie forestière (Rao et al., 2023). Ce polysaccharide est présent dans les parois cellulaires des végétaux terrestres ainsi que de certaines micro- et macroalgues (jusqu'à 29,5 % en poids sec chez la macroalgue *Gelidium elegans*) (Yu et al., 2021). Son rôle est principalement structural, participant à la rigidification des parois cellulaires végétales en formant un réseau fibreux avec la cellulose (constituée de glucose) et la lignine, une macromolécule polyphénolique (**Fig. 11**). La lignine, très abondante dans le bois, confère rigidité,

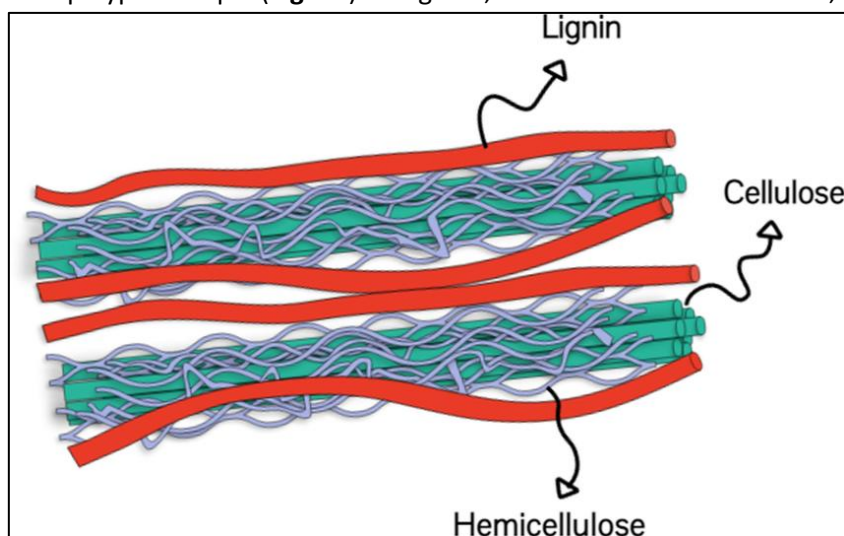


FIGURE 11 : Représentation schématique des composants principaux de la matière lignocellulosique (lignine, cellulose et hémicellulose). Schéma de (Vieira et al., 2023).

imperméabilité et résistance mécanique aux structures végétales. Contrairement à la cellulose, l'hémicellulose est ramifiée et contient un mélange de sucres autres que le glucose. Elle est principalement composée de xylose, de glucose, d'arabinose, de mannose, de galactose et plus rarement de rhamnose (Basera et al., 2024 ; Miazek et al., 2017; Rao et al., 2023).

Après la cellulose, l'hémicellulose est le second polymère naturel le plus abondant dans la biomasse végétale, représentant environ 15 à 35 % du poids sec de celle-ci. Sa proportion et sa composition varient selon le type de plante : les feuillus contiennent principalement des xylanes (polymères de xylose), tandis que les résineux présentent une proportion importante de galactoglucomannanes (polymères de galactose, glucose et mannose), et les graminées stockent des arabinoxylanes (xylanes ramifiés avec de l'arabinose) (Basera et al., 2024). Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes principalement intéressés à l'hémicellulose de bois dur, et plus particulièrement provenant du peuplier et du bouleau. Ces types d'hémicellulose contiennent comme monosaccharides principalement du xylose et du glucose (Gökkaya et al., 2020 ; Rao et al., 2023 ; Miazek et al., 2017). A titre d'exemple, il a été montré que l'hémicellulose de peuplier contient par rapport à son poids sec 50-60% de xylose et 30% de glucose à hauteur de 30%, contre environ 4% de rhamnose, 3% d'arabinose, et moins de 2% de mannose et galactose (Gökkaya et al., 2020).

À l'échelle industrielle, l'hémicellulose est utilisée comme revêtement alimentaire pour protéger certains fruits et légumes contre l'oxydation, dans l'industrie des édulcorants pour la production de xylitol à partir du xylose, ainsi que dans l'industrie papetière pour le renforcement du papier (Rao et al., 2023). Elle peut également être hydrolysée pour en extraire les sucres, qui sont ensuite utilisés pour la culture de microorganismes hétérotrophes.

De nombreuses techniques d'hydrolyse de la matière lignocellulosique existent, et leur mise en œuvre dépend de l'intérêt industriel de l'hydrolysate obtenu. En effet, au-delà de la provenance biologique de cette biomasse, la composition du mélange final varie selon la méthode utilisée pour récupérer les constituants de la lignocellulose. Dans un premier temps, la biomasse peut subir des prétraitements visant à maximiser l'efficacité de l'hydrolyse de l'hémicellulose. Ces prétraitements incluent des méthodes physiques (broyage mécanique, exposition à la chaleur ou à des radiations), chimiques (utilisation de bases, d'acides, de solvants organiques, ou d'eau/vapeur à haute température, entre 100 et 250 °C), ou biologiques, qui reposent principalement sur la dégradation de la lignine par des microorganismes ou des enzymes (notamment les laccases ou autres oxydases), avant de procéder à l'hydrolyse proprement dite permettant de libérer les monosaccharides constitutifs de cette biomasse (Basera et al., 2024 ; Jahnavi et al., 2016).

Parmi les méthodes d'hydrolyse, on retrouve notamment les hydrolyses acides, enzymatiques, ou encore les procédés en eau chaude pressurisée ou par explosion à la vapeur (*steam explosion*). Ce dernier, bien qu'utilisé principalement comme prétraitement, présente l'avantage de permettre une récupération relativement efficace des monosaccharides, sans nécessiter l'ajout de réactifs chimiques (Sharma et al., 2015). Cependant, il tend à entraîner la formation d'acide acétique, issu de l'hydrolyse des groupements acétyle de certains sucres de l'hémicellulose, ainsi que de furfural et

hydroxyméthylfurfural (HMF), produit par la déshydratation des pentoses et hexoses à haute température, connus pour leurs effets inhibiteurs sur la croissance microbienne (Sharma et al., 2015 ; Jahnavi et al., 2016).

Afin de limiter la formation de composés inhibiteurs dans ce contexte de valorisation de la lignocellulose, l'extraction des sucres peut être réalisée par hydrolyse enzymatique, à l'aide de cocktails spécifiques (xylanases, mannanases, glucuronidases, arabinofuranosidases, etc.) (Basera et al., 2024). Bien que très sélective, cette méthode reste coûteuse, et l'accès des enzymes à leur substrat peut être limité par la présence de lignine ou de groupements acétyles sur les chaînes latérales de l'hémicellulose (Basera et al., 2024). Pour surmonter ces obstacles, l'hydrolyse enzymatique est généralement précédée de prétraitements permettant d'affaiblir la structure lignifiée, ce qui facilite la saccharification mais entraîne également la libération de phénols, eux aussi inhibiteurs de la croissance de certains microorganismes (Basera et al., 2024 ; Jahnavi et al., 2016).

Les méthodes mentionnées ci-dessus présentent des rendements en monosaccharides et disaccharides relativement similaires, variant entre 50 et 80 %. Une hydrolyse quasi complète de la cellulose et de l'hémicellulose peut être obtenue par l'utilisation d'acides forts à haute concentration (HCl, H₂SO₄, 30–80 %) et à basse température (≤ 100 °C) (Wijaya et al., 2014 ; Jahnavi et al., 2016). Toutefois, cette approche est peu adaptée à la valorisation biologique, car elle conduit à la formation de nombreux inhibiteurs à des concentrations élevées, notamment le furfural, l'hydroxyméthylfurfural (HMF), l'acide formique et l'acide lévulinique (Wijaya et al., 2014).

En revanche, l'utilisation d'acides à plus faibles concentrations (1–2 %) et à température plus élevée (100–240 °C), pendant des durées généralement inférieures à deux heures, permet une hydrolyse quasi complète de l'hémicellulose, tout en limitant la dégradation de la lignine en phénols (Dominguez et al., 1997 ; Świątek et al., 2020 ; Dhabhai et al., 2012). La libération des sucres et la formation de composés inhibiteurs tels que le furfural et le HMF augmentent avec la température, la concentration en acide et la durée du traitement ; ces paramètres doivent donc être optimisés pour trouver un compromis entre rendement en sucres et production minimale d'inhibiteurs (Dominguez et al., 1997 ; Świątek et al., 2020 ; Dhabhai et al., 2012 ; Jahnavi et al., 2016). L'hydrolyse acide de la biomasse entraîne également la libération d'acide acétique en quantités variables selon les conditions (Dominguez et al., 1997), acide qui peut être métabolisé sous forme d'acétate par de nombreuses microalgues hétérotrophes (Lacroux et al., 2020). Ce composé constitue l'un des principaux produits de l'hydrolyse acide douce de l'hémicellulose de bois, cas étudié ici, représentant une des sources majeures de carbone dans l'hydrolysats, après le xylose, mais avant le glucose (Dominguez et al., 1997 ; Miazek et al., 2017 ; Świątek et al., 2020). Étant donné que cette méthode de traitement est couramment utilisée pour valoriser la biomasse lignocellulosique par voie microbienne (Jahnavi et al., 2016 ; Kumar et al., 2017), nous avons choisi d'évaluer la capacité de microalgues hétérotrophes à croître en présence de ces trois sources de carbone afin d'estimer leur potentiel d'exploitation des hydrolysats acides d'hémicellulose.

Le glucose

Le glucose est le premier sucre produit et consommé par tous les types d'êtres vivants. Il constitue le produit principal de la photosynthèse et est présent sous forme de polymères dans l'amidon, la cellulose, la chitine ou encore le paramylon (voir section 1.2.2 : **Le carbone en hétérotrophie**). Pour son assimilation, la cellule doit posséder des transporteurs passifs ou actifs lui permettant d'accéder au cytoplasme et d'être utilisé comme source d'énergie via la glycolyse.

Les transporteurs du glucose appartiennent généralement à la famille des *Major Facilitator Superfamily* (MFS), caractérisée par 12 hélices transmembranaires. Ils peuvent fonctionner en uniport (transport du glucose seul) ou en symport, où le transport du glucose est couplé au passage d'un proton (Carreón-Rodríguez et al., 2023). On retrouve aussi des systèmes PTS (*Phosphoenolpyruvate-dependent Phosphotransferase System*), où la translocation du glucose est directement couplée à sa phosphorylation, comme chez *Escherichia coli* (Carreón-Rodríguez et al., 2023). Chez *G. sulphuraria*, des transporteurs MFS de la classe des STPs (*Sugar and Polyol Transporters*) ont été identifiés, agissant en symports avec un proton (Schilling & Oesterhelt, 2007). *E. gracilis* a également montré à plusieurs reprises une capacité d'assimilation du glucose (Perez Saura et al., 2024). Bien que le mécanisme précis d'entrée du glucose dans cette microalgue n'ait pas été caractérisé, elle possède probablement des transporteurs MFS de type GLUT (uniport ou symport H⁺) ou de type SGLT (couplé au passage d'un ion sodium), comme la plupart des eucaryotes (Scheepers et al., 2004). Il en est de même pour *A. protothecoides* qui, comme d'autres espèces du genre *Chlorella*, exprime probablement des transporteurs MFS de type H⁺/hexose (Sauer & Tanner, 1989).

Le xylose

Comme expliqué précédemment, le xylose est le deuxième monosaccharide le plus abondant sur Terre après le glucose, étant le constituant principal de l'hémicellulose. Cependant, contrairement au glucose, beaucoup moins d'organismes sont capables de l'assimiler aussi efficacement, y compris parmi les levures et les bactéries (Domingues et al., 2021; Queiroz et al., 2024). *G. sulphuraria* en est capable et fait même figure d'exception parmi les microalgues, dont le nombre d'espèces capables d'assimiler le xylose est extrêmement limité (voir chapitre VI : **Conclusion et perspectives – Tableau 1**).

Il est très probable que, chez cette microalgue rouge, la translocation du xylose se fasse par des transporteurs spécifiques de la famille des MFS, puisqu'elle est capable de le métaboliser lorsqu'il est présent comme seule source de carbone, à l'instar de certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* (Perez Saura et al., 2024). En revanche, il a également été démontré que son entrée dans la cellule pouvait être induite par la présence de glucose dans le milieu et facilitée par des transporteurs d'hexoses, comme c'est le cas chez *Chlorella sorokiniana* (Zheng et al., 2014).

La métabolisation intracellulaire du xylose repose principalement sur la voie des pentoses phosphates. Elle commence par la réduction du xylose en xylitol par une xylose réductase (XR) NAD(P)H-dépendante, suivie de l'oxydation du xylitol en xylulose par une xylitol déshydrogénase

(XDH), le plus souvent NAD⁺-dépendante. Enfin, le xylulose est phosphorylé en xylulose-5-phosphate par une xylulokinase (XK) avant d'intégrer la voie des pentoses phosphates (Stein et al., 1997) (**Fig. 5**).

L'acétate

L'acétate est un acide organique (et acide gras volatil) possédant deux carbones et une fonction acide. Il est efficacement métabolisé par de nombreuses espèces de microalgues et autres microorganismes (Lacroux et al., 2020).

Chez les microalgues comme *E. gracilis* et *A. protothecoides*, l'acétate est transporté soit par diffusion passive sous sa forme protonée liposoluble d'acide acétique, soit activement sous sa forme ionisée (acétate) par des transporteurs de monocarboxylates (MCTs) couplés au passage d'un proton (Inwongwan et al., 2019) (**Fig. 5**). Une fois dans la cellule, l'acétate est rapidement converti en acétyl-CoA par une acétyl-CoA synthétase (ACS) en présence d'ATP et de CoA, générant également de l'AMP et du PPi en une seule étape. L'ACS et les MCTs peuvent être localisés dans différents compartiments cellulaires selon les besoins de la cellule et l'espèce considérée. Par exemple, chez *E. gracilis*, des ACS et des MCTs sont présents dans la membrane mitochondriale, permettant l'assimilation de l'acétyl-CoA via le cycle de Krebs (Inwongwan et al., 2019). Chez les algues vertes comme *C. reinhardtii*, l'activité ACS est retrouvée dans des dérivés des peroxysomes, où se déroule le cycle du glyoxylate (Lauersen et al., 2016). En revanche, chez certaines algues oléagineuses comme *Chlorella desiccata*, l'ACS est également localisée dans le plaste, permettant ainsi d'orienter l'acétyl-CoA vers la synthèse des lipides (Avidan & Pick, 2015).

CHAPITRE II : CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

2.1 Contexte de la thèse

Cette thèse participe à un projet de plus grande ampleur impliquant, à l'échelle nationale, plusieurs intervenants localisés dans des universités du sud et du nord du pays. Il s'intitule : « *Innovation technologique dans la production de biocarburants avancés applicables au territoire belge pour le transport routier et aérien et analyses technico-économique et environnementale* », et porte pour acronyme ADV_BIO, pour « Advanced Biofuels » (Financé par : le SPF Économie, P.M.E., Classes moyennes et Énergie, Direction générale de l'Énergie). En d'autres termes, l'objectif général était le développement, sur le territoire belge, d'alternatives innovantes de production de biocarburants de 2^e et 3^e génération à partir de biomasse de microalgues et de matrices lignocellulosiques. Dans ce cadre, différents acteurs se sont partagés des rôles complémentaires allant de la production de biomasse à la confection de différents types de biocarburants, en passant par une analyse technico-économique des résultats obtenus.

Notre laboratoire était impliqué dans la production de biomasse de microalgues destinée à la confection de biocarburants de types kérosène et diesel, demandant de hautes proportions d'acides gras saturés et monoinsaturés, tout en minimisant au maximum les taux d'acides gras insaturés, de protéines de pigments, et de carbohydrates (voir section 1.1.3 : **Application des microalgues**). La production de biocarburants devait ensuite être réalisée selon deux méthodes distinctes mises en place par nos collaborateurs. La première, déjà bien documentée, repose sur le procédé de transestérification pour la conversion des triglycérides (TAGs) en esters méthyliques d'acides gras (FAMES), destinés à être utilisés dans le secteur du transport routier comme additif au diesel conventionnel, voire comme substitut direct. La seconde méthode est la liquéfaction hydrothermale (HTL), qui a pour but de générer des analogues du kérosène trouvant des applications dans le secteur de l'aviation. Dans ce procédé, la biomasse est placée dans un réacteur en présence d'un solvant aqueux et soumise à des températures et pressions élevées (250-375 °C, 10-20 MPa) pendant plusieurs minutes à plusieurs heures. Après refroidissement, les constituants se séparent en plusieurs phases distinctes : une phase solide, une phase aqueuse, une phase huileuse (d'intérêt, puisque riche en hydrocarbures) et une phase gazeuse. Cette technique est novatrice, notamment en permettant de contourner les coûteuses étapes de purification de la biomasse algale, en utilisant directement le milieu de culture comme solvant d'extraction.

L'utilisation de la biomasse issue de microalgues pour la production de biocarburants est déjà largement documentée dans de nombreuses études. La stratégie de croissance communément employée, en raison de son avantage économique, est la phototrophie. Cependant, la Belgique n'offrant pas les conditions climatiques idéales pour la culture en systèmes lumineux, nous avons décidé de nous focaliser principalement sur les avantages que peuvent offrir la culture de microalgues à l'obscurité. En outre, puisqu'il existe déjà de nombreuses études sur le sujet, nous avons porté notre

attention sur un aspect durable de la croissance hétérotrophe : l'utilisation de substrats non conventionnels issus de sous-produits industriels. Pour ce faire, nous avons sélectionné trois types de microalgues qui montraient des caractéristiques intéressantes pour leur utilisation dans le domaine des biocarburants, ayant la capacité de croître en hétérotrophie : *Galdieria sulphuraria*, qui a notamment attiré notre attention car des expériences précédentes au laboratoire ont montré que sa capacité à synthétiser certains pigments dépendait de la source de carbone utilisée ; *Euglena gracilis*, qui montre une adaptation exemplaire à l'hétérotrophie tout en étant capable de produire d'importantes quantités d'esters de cires, riches en acides gras saturés ; et *Auxenochlorella protothecoides*, riche en lipides, et connue pour accumuler d'importantes quantités de biomasse.

D'après les thèmes évoqués dans le contexte de cette thèse, nous avons été amenés dans un premier temps à nous poser les questions suivantes, desquelles ont découlé nos différents axes de recherche : Quels seraient les régulateurs impliqués dans la synthèse des pigments photosynthétiques riches en azote, sachant que le glucose exerce un effet inhibiteur plus poussé sur leur synthèse que le glycérol ? Est-ce que ce mécanisme pourrait s'appliquer à d'autres espèces ? Quels substrats utiliser pour la culture des microalgues en hétérotrophie ayant un coût et un impact réduit sur l'environnement ? Est-ce que la biomasse des algues étudiées correspond aux critères attendus dans un contexte de production de biocarburants avancés pour le secteur du transport ? Quelles pourraient être les autres applications en lien avec la composition de la biomasse de ces microalgues cultivées dans ces conditions particulières ?

2.2 Objectifs de la thèse

2.2.1 Adaptation cellulaire de la microalgue rouge extrémophile *Galdieria sulphuraria* face à la disponibilité en sources de carbone

Dans cette première partie, l'objectif principal était de déterminer la capacité de *Galdieria sulphuraria* à métaboliser le glycérol, un sous-produit de la production de biodiesel, par rapport au glucose. Nous avons voulu étudier ses paramètres de croissance et la composition de sa biomasse dans ces différents contextes. En parallèle, nous souhaitions également comprendre, via des analyses transcriptomiques, quels étaient les gènes impliqués dans l'adaptation de l'algue à l'une ou l'autre source de carbone, ainsi que ceux impliqués dans la croissance en hétérotrophie par rapport à la phototrophie.

Cet article a été publié dans *Frontiers in Plant Science* en septembre 2022 sous la référence : Perez Saura P, Chabi M, Corato A, Cardol P and Remacle C. (2022) Cell adaptation of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* to the availability of carbon sources. *Front. Plant Sci.* 13:978246. doi: 10.3389/fpls.2022.978246

2.2.2 Utilisation du xylose, du glucose et de l'acétate comme nutriments pour la croissance de trois espèces de microalgues cultivées en hétérotrophie

Dans cette seconde partie, nous nous sommes fixés comme objectif d'évaluer les paramètres de croissance et la composition de la biomasse de trois espèces de microalgues, *Galdieria sulphuraria*, *Euglena gracilis* et *Auxenochlorella protothecoides*, lors de leur croissance hétérotrophe en présence des trois principales sources de carbone retrouvées dans les hydrolysats d'hémicellulose du bois de peuplier, à savoir le xylose, le glucose et l'acétate.

Cet article a été publié dans *Algal Research* en octobre 2024 sous la référence : Perez Saura P, Gérin S, Cardol P and Remacle C. (2024) Xylose, glucose and acetate as feedstock for three microalgal species cultivated in heterotrophy. *Algal Research*. Volume 83:103689. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103689>

2.2.3 Assimilation du xylose en hétérotrophie par *Auxenochlorella protothecoides* : Une avancée vers la production de xylitol par une microalgue

Dans cette troisième partie, l'objectif était d'évaluer les rôles joués par le glucose et l'acétate dans la capacité de *A. protothecoides* à assimiler le xylose, mais aussi à produire du xylitol. En parallèle, nous avons cherché, via des analyses bioinformatiques, à identifier des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du xylose chez cette microalgue.

Cet article intitulé 'Xylose uptake in heterotrophic *Auxenochlorella protothecoides*: Unlocking the potential of microalgae for xylitol bioproduction' de Perez Saura P, Cardol P, and Remacle C., sera soumis à *Journal of Applied Phycology*.

CHAPITRE III : ADAPTATION CELLULAIRE DE LA MICROALGUE ROUGE EXTRÊMOPHILE *GALDIERIA SULPHURARIA* FACE À LA DISPONIBILITÉ EN SOURCES DE CARBONE

Dans ce premier article, nous nous sommes intéressés à l'adaptation cellulaire de la microalgue rouge *Galdieria sulphuraria* face à l'utilisation du glucose ou du glycérol comme source de carbone en hétérotrophie. Dans un premier temps, l'objectif était d'évaluer dans quelle mesure cette microalgue pouvait métaboliser le glycérol, un sous-produit bon marché issu de la production de biodiesel, par rapport au glucose, dont l'exploitation pose des contraintes économiques et éthiques.

Lors de la culture de *G. sulphuraria* à l'obscurité, nous avons constaté que les algues en présence de glucose perdaient presque totalement leur coloration, à l'inverse de celles cultivées en présence de glycérol. Ce fait marquant nous a amené à nous demander si ces substrats jouaient un rôle sur la nature de sa biomasse, mais aussi quels pouvaient être les mécanismes impliqués dans cette déficience pigmentaire. Nous avons donc comparé les paramètres de croissance et la composition de la biomasse de la microalgue en présence de glucose ou de glycérol. De plus, nous avons analysé son transcriptome dans ces deux conditions en hétérotrophie afin d'identifier les gènes différenciellement exprimés selon le mode trophique et le substrat étudié.

3.1 Résumé de l'article

Conditions expérimentales et résultats physiologiques

Les concentrations en glucose et en glycérol dans le milieu de culture ont été ajustées afin d'apporter une quantité équivalente de carbone (150 mM de carbone). Ainsi, nous avons utilisé 25 mM de glucose (4,5 g/L) et 50 mM de glycérol (4,6 g/L), les cultures d'un volume de 70mL étant maintenues dans des conditions optimales pour cette algue extrêmophile, à 42 °C et à pH 2. Après un temps d'adaptation aux sources de carbone à l'obscurité, nous avons suivi la croissance des cellules pendant huit jours et collecté des échantillons de biomasse en phase exponentielle, en début de phase stationnaire et en fin de culture.

Nos résultats ont montré que la croissance est similaire dans les deux conditions : la biomasse finale atteint environ 2,5 g L⁻¹, et les taux de conversion des substrats carbonés en biomasse sont comparables (~0,57 g g⁻¹). De plus, la composition cellulaire en protéines, acides gras et polysaccharides de réserve (phytoglycogène) ne variait que très peu entre l'utilisation du glucose ou du glycérol comme source de carbone. On a observé des taux de protéines et de phytoglycogène d'environ 30 % de la masse sèche, tandis que les lipides en constituent entre 7,5 et 10 %. Dans les deux conditions hétérotrophes, on a constaté une nette diminution de la concentration cellulaire en

phytoglycogène en fin de phase stationnaire, indiquant une utilisation des réserves de glucanes lorsque les sources de carbone étaient épuisées.

La seule différence notable entre ces deux conditions apparaissait au niveau de la pigmentation. Nous avons observé que les cellules cultivées en présence de glucose se dépigmentaient, tandis que celles cultivées en présence de glycérol conservaient une teinte verte. Cela se traduisait dans les résultats au niveau du contenu en phycocyanine, pigment majoritaire chez *G. sulphuraria*, qui était deux fois moins présent en présence de glucose qu'en présence de glycérol, et 40 fois moins présent en hétérotrophie (glucose) qu'en phototrophie. Une fois le glucose totalement consommé, la pigmentation était restaurée, ce qui indique que ce sucre affectait de manière réversible la synthèse des pigments.

Analyse transcriptomique : régulation de la photosynthèse et du métabolisme

Pour comprendre ces différences, nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative dans trois conditions : hétérotrophie avec glucose, hétérotrophie avec glycérol et phototrophie. Nous avons extrait l'ARN des cellules en phase exponentielle et analysé les gènes différentiellement exprimés selon les conditions étudiées.

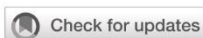
Nos résultats ont montré que l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse et la biosynthèse des pigments était fortement réprimée en hétérotrophie, avec une inhibition d'autant plus marquée en présence de glucose que de glycérol. En effet, 36 gènes liés à la photosynthèse et aux antennes collectrices de lumière (LHC) étaient sous-exprimés en hétérotrophie par rapport à la phototrophie. Parmi eux, 11 ont subi une répression plus importante en présence de glucose qu'en présence de glycérol. On retrouve également des gènes liés au métabolisme de la gluconéogenèse, comme la pyruvate phosphate dikinase (PPDK) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK).

En plus des gènes liés à la photosynthèse, nous avons observé, dans les conditions hétérotrophes par rapport à la condition phototrophe, une sous-expression de différents transporteurs membranaires impliqués dans l'absorption des sources de carbone et l'assimilation de certains acides aminés. En particulier, plusieurs transporteurs de la superfamille des *Major Facilitator Superfamily* (MFS), ainsi que des transporteurs et perméases d'acides aminés, sont moins exprimés. À l'inverse, quatre gènes sur huit liés au cycle de Krebs sont régulés positivement dans l'obscurité, ainsi que certains gènes impliqués dans l'assemblage des ribosomes.

Conclusion

Notre travail a montré que *G. sulphuraria* est capable de produire une biomasse équivalente en utilisant du glycérol ou du glucose, à l'exception des pigments dont la synthèse était fortement réprimée par le glucose. L'analyse transcriptomique a révélé une répression plus marquée des gènes liés à la photosynthèse en présence de glucose, mais surtout accentuée par la culture à l'obscurité.

Ces observations ont indiqué que le glycérol pourrait être une alternative intéressante au glucose pour la culture de *G. sulphuraria*, notamment dans une optique de valorisation de la biomasse.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Mirjam Czjzek,
UMR8227 Laboratoire de Biologie
Intégrative des Modèles Marins, France

REVIEWED BY

Jianhua Fan,
East China University of Science
and Technology, China
Peter J. Lammers,
Arizona State University, United States

*CORRESPONDENCE

Claire Remacle
c.remacle@uliege.be

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Marine and Freshwater Plants,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

RECEIVED 25 June 2022

ACCEPTED 16 August 2022

PUBLISHED 15 September 2022

CITATION

Perez Saura P, Chabi M, Corato A,
Cardol P and Remacle C (2022) Cell
adaptation of the extremophilic red
microalga *Galdieria sulphuraria* to the
availability of carbon sources.
Front. Plant Sci. 13:978246.
doi: 10.3389/fpls.2022.978246

COPYRIGHT

© 2022 Perez Saura, Chabi, Corato,
Cardol and Remacle. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Cell adaptation of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* to the availability of carbon sources

Pablo Perez Saura , Malika Chabi , Amélie Corato,
Pierre Cardol and Claire Remacle *

Laboratory of Genetics and Physiology of Microalgae, InBios/Phytosystems Research Unit,
University of Liège, Liège, Belgium

Global energy demand and fossil fuels impact on climate can be partially managed by an increase in the use of biofuels for transports and industries. Biodiesel production is generally preceded by a transesterification process of the green biomass triacylglycerols that generates large amounts of glycerol as a by-product. In this study, the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* 074W was cultivated in heterotrophy. The microalgal growth parameters and biomass composition were compared when grown on an equivalent molar concentration of carbon of either glucose or glycerol as unique carbon source. The maximal biomass reached in these two conditions was not significantly different ($\sim 2.5 \text{ g.L}^{-1}$). Fatty acid profile, protein and storage carbohydrate contents were also statistically similar, irrespectively of the metabolized carbon source. We also observed that the pigment content of *G. sulphuraria* cells decreased during heterotrophic growth compared to photoautotrophic cultivated cells, and that this diminution was more important in the presence of glucose than glycerol: cells were yellowish in the presence of glucose and green in the presence of glycerol. The pigmentation was restored when glucose was totally consumed in the medium, suggesting that the presence of glucose repressed pigment synthesis. Based on this observation, a transcriptome analysis was performed in order to better understand the mechanisms involved in the loss of color mediated by darkness and by glucose in *G. sulphuraria*. Three conditions were analyzed: heterotrophy with glycerol or glucose and phototrophy. This allowed us to understand the transcriptional response of cells to light and dark environments both at the nuclear and chloroplast levels, and to show that transcription of gene families, acquired by horizontal gene transfer, such as sugar, amino acid, or acetate transporters, were involved in the response to the availability of different (in)organic sources.

KEYWORDS

Galdieria sulphuraria, heterotrophy, phototrophy, pigments, transcriptome, biomass composition, glucose, glycerol

Introduction

Global energetic demand is rising continuously with more than 13,147 million tons of oil equivalent (Mtoe) in 2015 and more than 17,000 Mtoe forecast for 2040 (Dong et al., 2020). In 2020, primary energy consumption was still ensured at 80% by fossil fuels (British Petroleum, 2021; International Energy Agency, 2021). Apart from the fact that fossil fuels are not perennial resources, they have a high impact on global warming. One of the strategies to reduce this impact is the use of renewable energies, such as renewable biofuels (Field et al., 2020; International Energy Agency, 2021; Nazari et al., 2021). To reduce CO₂ release to the atmosphere and face the global increase of temperature, IEA recommends that by 2050, around 25–65% of renewable fuels should be produced (International Energy Agency, 2021), with a majority of biodiesel, also called Fatty Acid Methyl Esters (FAMES), intended in majority for the transport sector (Concawe, 2021; International Energy Agency, 2021).

Fatty Acid Methyl Esters are principally produced *via* a transesterification process performed on triglycerides found in animal fats, vegetable oils, waste cooking oils, or microalgae, that generates crude glycerol as a very cheap by-product (Sangaletti et al., 2013; Maneerung et al., 2016; Vivek et al., 2017). When 10 kg of FAMES for biodiesel use are produced, about 1 kg of crude glycerol is generated and its purification into chemically pure glycerol is expensive and challenging (Sun and Chen, 2008; Ardi et al., 2015). Even if pure glycerol is a valuable material for many commercial applications, crude glycerol is, however, considered as a waste. Indeed, crude glycerol obtained from FAMES production contains impurities (methanol and salts) that have an impact on metabolite production by microorganisms (Samul et al., 2014) or chemical use for industries (Kaur et al., 2020). However, different studies support the interest and the possibility to produce microorganism-valuable biocompounds with the use of crude glycerol as a substrate (Samul et al., 2014; Choi and Yu, 2015; Kaur et al., 2020). The red microalga *Galdieria sulphuraria* could be an interesting candidate for crude glycerol valorization because it has been reported to grow on glycerol (Gross and Schnarrenberger, 1995; Salbitani et al., 2021) unlike many other algae. In addition to glycerol, *G. sulphuraria* is able to grow on 26 different organic substrates (Gross and Schnarrenberger, 1995), many of which are usually not metabolized by heterotrophic microalgae. In contrast, glucose, the most widespread sugar found in nature can be metabolized by a large majority of microalgae (Perez-Garcia et al., 2011) and in the presence of glucose, *G. sulphuraria* can reach very high cell densities in heterotrophy (up to 100 g.L⁻¹ in fed-batch and continuous flow cultures) (Schmidt et al., 2005; Graverholt and Eriksen, 2007). However, glucose and other sugars derived from food material have ethical limitations and are in general too expensive for large-scale biocompounds production (Li et al., 2007). An

intriguing feature of *Galdieria* in heterotrophy is its ability to synthesize variable amounts of pigments, depending on the carbon source (Gross and Schnarrenberger, 1995).

Galdieria sulphuraria presents other interesting characteristics, such as the ability to grow up to 56°C (with an optimum at 42°C) and at very low pH (with an optimum at 2) (Hirooka and Miyagishima, 2016) which is explained by the conditions of its natural environment consisting of hot and acidic sulfurous springs of volcanic regions (Toplin et al., 2008; Ciniglia et al., 2014). These harsh growing conditions limit the presence of contaminating microorganisms, and even allow cultivation under non-sterile conditions (Pleissner et al., 2021; Scherhag and Ackermann, 2021). These characteristics are even more appropriate when the culture medium contains organic substrates that can be easily metabolized by contaminants such as fungi or bacteria that grow faster than microalgae. Moreover, *G. sulphuraria* has potential for biotechnological applications including bioremediation and biofuel production (Cheng et al., 2019; Cui et al., 2020; Somers et al., 2021), the capacity to resist to high salt concentrations, to recover heavy metals and nutrients from wastewaters (Ju et al., 2016; Delanka-Pedige et al., 2019; Scherhag and Ackermann, 2021; Sun et al., 2021), and to produce high added-value biocompounds such as phycocyanin and α -tocopherol (Carfagna et al., 2015; Bottone et al., 2019) and for nutritional applications (Graziani et al., 2013).

Galdieria sulphuraria is frequently studied for its capacity to grow heterotrophically (Cizkova et al., 2019). Contrary to the commonly used light-dependent strategy for microalgal growth, heterotrophy does not depend on climatic conditions, which is interesting in countries located in latitudes suffering weakness and scarcity of sunshine mostly during winter season. In addition, heterotrophic growth of microalgae can be conducted in fermenters that can be implemented in any type of surface and show higher cell-density yields than phototrophic cultivation systems (Perez-Garcia et al., 2011; Jareonsin and Pumas, 2021).

The nuclear genome sequence of *G. sulphuraria* was published in 2013. It is a small genome (13.7 Mb), characterized by gene families acquired by horizontal gene transfer (HGT) (Schönknecht et al., 2013). The transcriptional activity of some of these HGT gene families has been demonstrated in the acclimation process to temperature decrease (Rossoni et al., 2019).

Considering the large amounts of glycerol that are expected to be produced from FAMES in the future, we aimed at evaluating how *G. sulphuraria* metabolizes it compared to glucose in heterotrophy. We showed that growth parameters were similar except the pigments content: cells were green with glycerol while they were yellowish with glucose. This led us to explore the transcriptome of cells grown in these two conditions and compare it to light conditions to get insight into the regulation of the pigment synthesis. This allowed us to understand the transcriptional response of cells to light and dark environments both at the nuclear and chloroplast levels, and to

show that transcription of HGT genes is involved in the response to the availability of different (in)organic sources.

Materials and methods

Microalgal strain, culture media, and precultures

Galdieria sulphuraria strain 074 (hereafter 074W) was obtained from the algal Collection at the University Federico II (ACUF).¹ Based on Pinto et al. (2003) and confirmed by the results presented here, this strain corresponds to the 074W isolate described in Gross and Schnarrenberger (1995), being white in the presence of glucose in heterotrophy. Prior to experimental cultivation, cells were maintained at 32°C on sterile 1% agar plates containing 2xGS modified Allen medium (Allen, 1959). One liter of medium contains: 300 mg (NH₄)₂SO₄, 300 mg MgSO₄·7H₂O, 300 mg KH₂PO₄, 20 mg CaCl₂·2H₂O, 19.8 mg NaCl, 13.2 mg Fe-Na-EDTA, 5.72 mg H₃BO₃, 3.64 mg MnCl₂·4H₂O, 0.44 μg ZnSO₄·7H₂O, 2.1 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, CuSO₄·5H₂O, 0.05 mg NaVO₃·4H₂O, and 44 μg CoCl₂·6H₂O. pH was adjusted to 2.0 with 4N H₂SO₄ and the medium was sterilized by autoclaving for 20 min at 121°C. Liquid precultures were maintained in 250 ml flasks at 42°C in an incubator under continuous light (100 μmol_{photon}·m⁻²·s⁻¹) under constant shaking. Cells were then adapted to heterotrophy by transferring the flasks into a light-free incubator set at 42°C containing fresh 2xGS modified Allen medium supplemented with 5 g·L⁻¹ of glucose or glycerol for 10 days. Adaptation step was performed two times before starting experimental cultures.

Growth conditions and harvesting

Phototrophic cultures were seeded from phototrophic precultures in 500 ml flasks containing 140 ml of fresh 2xGS modified Allen medium. They were maintained at 42°C under constant shaking and illumination (100 μmol_{photon}·m⁻²·s⁻¹). Harvesting for RNA purification and pigment analysis in this condition were performed during exponential phase after 10 days of cultures at OD₈₀₀ = 2.5 (OD, Optical Density). OD was determined measuring absorbance of the culture at a wavelength of 800 nm, using a UV-visible spectrophotometer (Perkin-Elmer lambdaTM 265 UV/VIS, United States) in cuvettes of an optical path of 1 cm. Dilutions have been performed to reach an OD₈₀₀ between 0.1 and 0.3. All

phototrophic and heterotrophic culture experiments were performed in three independent biological replicates.

Heterotrophic cultures were seeded from two-times adapted heterotrophic precultures at a starting OD₈₀₀ = 0.2. They were maintained under constant shaking in 500 ml flasks containing 140 ml of fresh 2xGS modified Allen medium supplemented with 25 mM of glucose or 50 mM of glycerol for 8 days in the dark in an incubator set at 42°C. Every day, samples were harvested for algal growth measurements and substrate quantification. After 2, 4, and 8 days of growth, samples were harvested for lipids, protein, and glycogen quantification. For pigment and RNA analysis, cells were collected after 2 days of growth from cells grown in three independent biological replicates.

Algal growth measurements

Algal growth was determined daily by OD₈₀₀, at which pigment absorbance is negligible, using a UV-visible spectrophotometer (Perkin-Elmer lambdaTM 265 UV/VIS, United States) in cuvettes of an optical path of 1 cm. Dilutions have been performed to reach an OD₈₀₀ between 0.1 and 0.3. OD measurements were extrapolated as dry biomass using an OD/biomass correlation. Biomass was estimated by centrifuging 25–50 ml of culture (3000×g; 3 min) once during exponential phase and once in stationary phase. Samples were washed twice in distilled water, centrifuged again, transferred in an aluminum cup pre-weighted and weighted after 48 h in a 70°C oven.

Specific growth rate (μ) expressed in day⁻¹, was calculated as the slope of the linear regression of the natural log dry weight number as a function of time in exponential phase. Doubling time (Td), expressed in day was calculated as the natural log of 2 divided by the specific growth rate. Maximum biomass productivity expressed in g DW·L⁻¹·day⁻¹, was calculated by subtracting the dry biomass concentration after 3 days from dry biomass concentration after 4 days of growth. Biomass to substrate yield expressed in g DW·g substrate⁻¹ was calculated dividing the dry biomass concentration after carbon source depletion to the initial carbon source concentration.

Substrate quantification (carbon source, ammonium, phosphate)

Culture supernatants were harvested by centrifugation (16,000×g; 3 min) and pH was neutralized with small volumes of 10 M NaOH. Samples were 0.22 μm filtered and stored at -20°C before quantification.

Glucose and glycerol concentrations in the cultures were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) using an ion exclusion column Supelcogel C610-H (6% Crosslinked, 9 μm particle size, L × I.D.

¹ http://www.acuf.net/index.php?option=com_content&view=article&id=520:galdieria-sulphuraria-galdieri-merola24&catid=2&Itemid=127&lang=en&Itemid=113

30 cm × 7.8 mm, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, United States) and a refractor index detector (RID-20A, Shimadzu). 40 µl of sample was charged in the column and elution was performed at 35°C with a flow of 0.5 ml.min⁻¹ of H₃PO₄ 0.1% in isocratic mode as eluent during 35 min. Concentrations were determined based on the peak area of the chromatogram, compared to standard curves of known glucose or glycerol concentrations.

Ammonium concentration was determined using Berthelot reagent (Searle, 1984). In a 96-well plate, 20 µl of reagent (sodium nitroprusside 0.04%; phenol 3.5%; sodium hypochlorite 0.4%; NaOH 2%; trisodium citrate 38%) were added to 100 µl of sample. After 6 h of incubation, newly formed indophenol complexes absorbance was measured spectrophotometrically at 660 nm (Synergy Mx, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States). Concentrations were calculated based on a standard curve of known NH₄⁺ concentrations between 0 and 0.4 mM. The formula for ammonium concentration determination in the culture based on known concentrations was $[NH_4^+] = \frac{A_{660} - 0.080}{4.112}$ ($r^2 = 0.9975$). Samples were diluted in distilled water to an estimated NH₄⁺ concentration between 0.05 and 0.4 mM if needed.

Phosphate concentration was measured spectrophotometrically based on a colorimetric method from Murphy and Riley (1962). In a 96-well plate, 50 µl of reagent (ascorbic acid 10%; ammonium heptamolybdate 2.5%; sulfuric acid 6 N; distilled water in proportions 1:1:1:2) were added to 50 µl of sample. After 30 min of incubation, absorbance was measured at 750 nm (Synergy Mx, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States). Concentrations were calculated based on a standard curve of known PO₄⁻³ concentrations between 0 and 0.75 mM. The formula for phosphate concentration determination in the culture based on known concentrations was $[PO_4^{-3}] = \frac{A_{750} - 0.050}{1.693}$ ($r^2 = 0.9985$). Samples were diluted in distilled water to an estimated PO₄⁻³ concentration between 0.15 and 0.75 mM if necessary.

Pigments determination

Chlorophyll a, zeaxanthin, and β-carotene

Pigments were quantified using a reverse-phase HPLC method (Shimadzu, Tokyo, Japan) with a photodiode array detector SPD-M20A (PDA, Shimadzu, Tokyo, Japan). 2 ml of culture were centrifuged (16,000×g; 3 min) and the pellet was resuspended in dichloromethane/methanol (1:3, v/v). Glass beads were added to the sample and cells were disrupted through horizontal agitation in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2 × 5 min at 30 Hz, with 5 min break on ice between the two lysing steps. After centrifugation (16,000×g; 3 min) and 0.22 µm filtration, 40 µl of samples were injected on a Nova-Pak C18 column (Nova-Pak silica column, 3.9 × 150 mm, 4 µm particle size, Waters, Milford, MA,

United States). Elution was performed during 25 min at 25°C with a flow of 1 ml.min⁻¹ using a gradient mode with three solvents: methanol 80% and ammonium acetate 100 mM (A), acetonitrile 90% (B), and ethyl acetate 100% (C). Gradient was: 0 min – 100% A; 0.5 min – 100% B; 1.1 min – 90% B + 10% C; 6.1 min – 65% B + 35% C; 11.5 min – 40% B + 60% C; 15.0 min – 100% C; 17.0 min – 100% A; 23.0 min – 100% A. Quantification was based on the peak area at 430 nm and compared to calibration curves obtained with pure pigments (DHI Lab Products, Denmark). Pigment content was then normalized on the dry biomass concentration.

Phycocyanin

Between 25 and 50 ml of culture were harvested, centrifuged (16,000×g; 3 min) and washed twice in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, and resuspended in the same buffer. Glass beads were added to the sample and cells were disrupted through horizontal agitation in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2 × 10 min at 30 Hz, with 5 min break on ice between the two lysing steps. Disrupted cells were centrifuged at 24,000×g for 90 min and the phycocyanin concentration was estimated spectrophotometrically (Perkin-Elmer lambdaTM 265 UV/VIS, United States) as described in Kursar et al. (1983). Phycocyanin content was then normalized on soluble protein concentration (Bradford, 1976).

Protein quantification

Total protein content was measured using the Bradford method (Bradford, 1976). 2 ml of culture were centrifuged (16,000×g; 3 min) and the pellet was resuspended in a detergent to solubilize all proteins (1% Triton X100; NaOH 0.1 M). Glass beads were added to the sample and cells were disrupted through horizontal agitation in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2 × 10 min at 30 Hz with 5 min break on ice between the two lysing steps. In a 96-well plate, 10 µl of samples were added to 200 µl of Bradford reagent 1X. Absorbance of the samples was read at 595 nm (Synergy Mx, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States). Concentrations were calculated based on a standard curve of known BSA concentrations diluted in the same solvent as the samples, between 0 and 0.5 mg.ml⁻¹. Samples were diluted in the solubilization detergent (1% Triton X100; NaOH 0.1M) to an estimated protein concentration between 0.1 and 0.5 mg.ml⁻¹ if necessary. Protein content was then normalized on the dry biomass concentration.

Fatty Acid Methyl Esters quantification

2 to 4 ml of culture were centrifuged (16,000×g; 3 min) and the pellet was resuspended in chloroform/methanol (2:1, v/v).

Glass beads were added to the sample and cells were disrupted through horizontal agitation in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2×5 min at 30 Hz. Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) were generated from the microalgal biomass as described in [Corato et al. \(2022\)](#). FAMES quantification was performed using gas chromatography (GC, Shimadzu, Tokyo, Japan) and a flame ionization detector (FID, Shimadzu) as mentioned in [Gérin et al. \(2020\)](#). 1 μ l of sample was injected on a SGE BPX70 column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) in “split” mode with a ratio of 10. Elution was ensured with a temperature gradient from 120 to 240°C at a speed of 4°C.min⁻¹ with helium as carrier gas. The quantification of FAMES was based on the peak area, using an external calibration curve realized with a FAMES mix, suitable for microalgae fatty acids determination (Supelco37, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, United States). Total fatty acid (FA) content was calculated by summing all the separated FAMES concentrations. Fatty acid content was then normalized on the dry biomass concentration.

Glycogen quantification

Polysaccharide accumulation was quantified. The polysaccharide of *G. sulphuraria* is a soluble “glycogen-type” polysaccharide, hereafter called glycogen ([Shimonaga et al., 2008](#)). Total glycogen content was determined with an enzymatic method using amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (Megazyme, Ireland) to break the α -1,4-glycosidic bonds and a mix of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the presence of ATP/NADP⁺ to generate one molecule of 6-phospho-gluconolactone and one molecule of NADPH per molecule of glucose. NADPH formation was measured at 340 nm spectrophotometrically (Synergy Mx, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States). 2–4 ml of culture were centrifuged (16,000 \times g; 3 min) and the pellet was resuspended in 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.5. Glass beads were added to the sample and cells were disrupted through horizontal agitation in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2×10 min at 30 Hz. Samples were then treated as described in [Colpaert et al. \(2021\)](#). Glycogen concentrations were calculated based on a standard curve of known glucose concentrations ranged between 0 and 1 g.L⁻¹. Samples were diluted in distilled water to an estimated glucose concentration between 0.1 and 1 g.L⁻¹ if necessary. Total glycogen content was calculated by summing all the separated FAMES concentrations. Glycogen content was then normalized on the dry biomass concentration.

Oxygen consumption rate measurements

Oxygen consumption rate was measured on cells harvested in exponential phase of growth using a Clark-type oxygen

electrode (Hansatech, King’s Lynn, United Kingdom). 40 ml of cells were harvested at OD₈₀₀ = 2.5 and concentrated by centrifugation (3500 \times g; 2 min) and resuspended in 10 ml of fresh medium to reach a OD₈₀₀ = 10. After 1 h adaptation at 37°C, they were transferred into the oxygen electrode chamber set at 37°C (maximum controlled temperature of the device). Oxygen consumption rate was measured after 2–5 min in the dark as the slope of the linear regression of the oxygen consumption as a function of time. Values were normalized on the dry weight.

Transcriptomic analysis

Sample collection and preparation

50 ml of culture of exponentially growing cells were centrifuged (3500 \times g; 2 min) and resuspended in a small volume of SDS-EB (2% SDS, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) for cell disruption through horizontal agitation in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2×5 min at 30 Hz, in the presence of glass beads.

RNA extraction was performed as previously described ([Remacle et al., 2010](#)). Sample were sent to Novogene (United Kingdom) Company Limited for RNA sequencing and bioinformatic analysis.

RNA quantification and quality assessment

RNA integrity was assessed using the RNA Nano 6000 Assay Kit of the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States).

Library preparation for transcriptome sequencing (Novogene Experimental Department)

Total RNA was used as input material for the RNA sample preparations. Briefly, mRNA was purified from total RNA using poly-T oligo-attached magnetic beads. Fragmentation was carried out using divalent cations under elevated temperature in First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X). First strand cDNA was synthesized using random hexamer primer and M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-). Second strand cDNA synthesis was subsequently performed using DNA Polymerase I and RNase H. Remaining overhangs were converted into blunt ends *via* exonuclease/polymerase activities. After adenylation of 3’ ends of DNA fragments, Adaptor with hairpin loop structure were ligated to prepare for hybridization. In order to select cDNA fragments of preferentially 370~420 bp in length, the library fragments were purified with AMPure XP system (Beckman Coulter, Beverly, United States). Then PCR was performed with Phusion High-Fidelity DNA polymerase, Universal PCR primers and Index (X) Primer. At last, PCR products were purified (AMPure XP system) and library quality was assessed on the Agilent Bioanalyzer 2100 system.

Clustering and sequencing (Novogene Experimental Department)

The clustering of the index-coded samples was performed on a cBot Cluster Generation System using TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina) according to the manufacturer's instructions. After cluster generation, the library preparations were sequenced on an Illumina Novaseq platform and 150 bp paired-end.

Data analysis (Novogene Experimental Department)

Quality control

Raw data (raw reads) of fastq format were firstly processed through in-house perl scripts. In this step, clean data (clean

reads) were obtained by removing reads containing adapter, reads containing poly-N and low quality reads from raw data. At the same time, Q20, Q30 and GC content the clean data were calculated. All the downstream analyses were based on the clean data with high quality.

Reads mapping to the reference genome

Reference genome and gene model annotation files were downloaded from genome website directly. Index of the reference genome was built using Hisat2 v2.0.5 and paired-end clean reads were aligned to the reference genome using Hisat2 v2.0.5. We selected Hisat2 as the mapping tool for that Hisat2 can generate a database of splice junctions based on the gene model annotation file and thus a better mapping result than other non-splice mapping tools.

Quantification of gene expression level

FeatureCounts v1.5.0-p3 was used to count the reads numbers mapped to each gene. FPKM of each gene was calculated based on the length of the gene and reads count mapped to this gene. FPKM, expected number of Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced, considers the effect of sequencing depth and gene length for the reads count at the same time, and is currently the most commonly used method for estimating gene expression levels.

Differential expression analysis

Differential expression analysis of two conditions/groups (three biological replicates per condition) was performed using the DESeq2R package (1.20.0). DESeq2 provide statistical routines for determining differential expression in digital gene expression data using a model based on the negative binomial distribution. The resulting *P*-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg's approach for controlling the false discovery rate. Genes with an adjusted *P*-value ≤ 0.05 found by DESeq2 were assigned as differentially expressed.

Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis of differentially expressed genes

Gene Ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes was implemented by the clusterProfiler R package, in which gene length bias was corrected. GO terms with corrected *P*-value less than 0.05 were considered significantly enriched by differential expressed genes. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) is a database resource for understanding high-level functions and utilities of the biological system, such as the cell, the organism and the ecosystem, from molecular-level information, especially large-scale molecular datasets generated by genome sequencing and other high-through put experimental

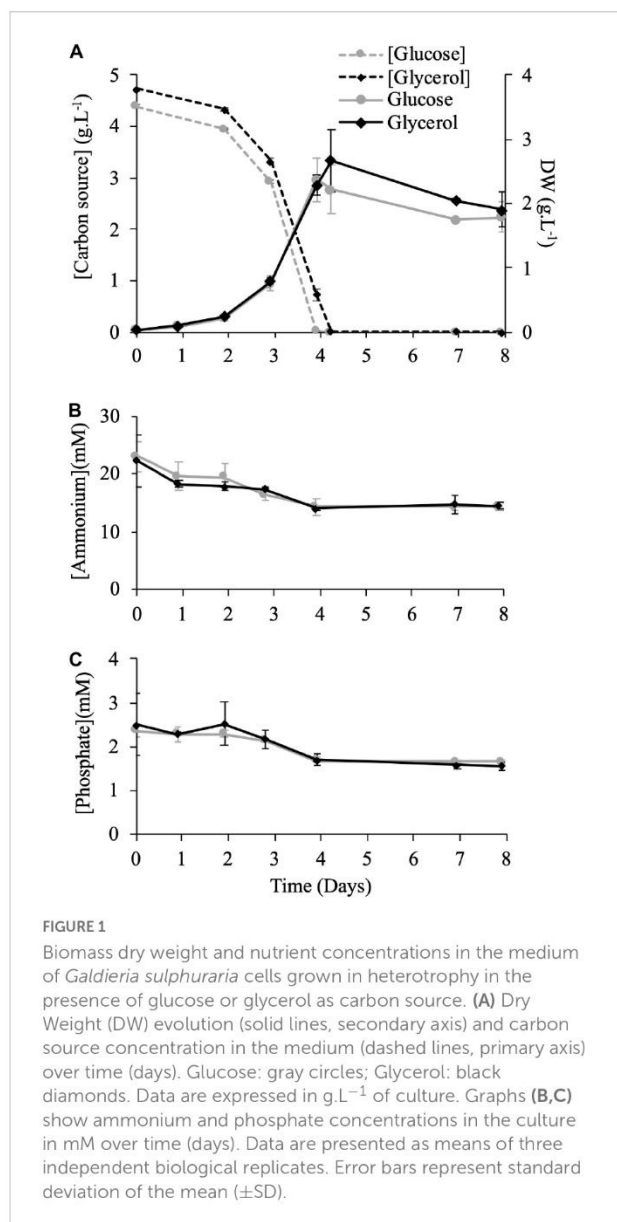


TABLE 1 Comparison of specific growth rate and biomass substrate yield of *Galdieria sulphuraria* heterotrophic growth on different substrates.

Strain	Culture condition	Carbon source	Concentration (g.L ⁻¹)	Specific growth rate (μ) (day ⁻¹)	Doubling time (Day)	Max biomass (g.L ⁻¹)	Max productivity (gDW.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Oxygen consumption rate (mmolO ₂ .min ⁻¹ .gDW ⁻¹)	Sugar to biomass conversion (gDW.ggsugar ⁻¹)	References
074W	500 ml Shake flasks	Glucose	4.5	1.10 ± 0.03	0.63 ± 0.02	2.37 ± 0.34	1.62 ± 0.22	9.56 ± 0.28	0.56 ± 0.08	This study
074W	500 ml Shake flasks	Glycerol	4.6	1.08 ± 0.03	0.64 ± 0.02	2.67 ± 0.48	1.50 ± 0.10	9.78 ± 0.25	0.57 ± 0.05	This study
074G	500 ml Shake flasks	Glucose	4.5	1.10	0.63	/	/	/	0.48	Schmidt et al., 2005
074G	500 ml Shake flasks	Glucose + fructose	52.5	1.44	0.48	/	/	/	0.42	Schmidt et al., 2005
SAG 21.92	500 ml Shake flasks	Sucrose, glucose, and fructose	36	1.44	0.48	/	/	/	0.63	Scherhag and Ackermann, 2021
SAG 21.93	500 ml Shake flasks	Sucrose, glucose, and fructose	6	1.53	0.45	/	/	/	0.64	Scherhag and Ackermann, 2021
074G	3 L Bioreactor	Glucose	10	1.26	0.55	/	/	/	0.46	Graverholt and Eriksen, 2007
074G	500 ml Shake flasks	Glucose	5	1.20	0.58	2.5	/	/	0.52	Sloth et al., 2006
074G	500 ml Shake flasks	Glycerol	5	1.20	0.58	3.5	/	/	0.70	Sloth et al., 2006
074G	1 L Bioreactor	Glucose	10	0.72	0.96	4.7	/	/	0.47	Rahman et al., 2020

technologies.² We used clusterProfiler R package to test the statistical enrichment of differential expression genes in KEGG pathways.

Results

Growth parameters, nutrient consumption, and biomass composition

Our aim was to characterize the heterotrophic growth of *Galdieria* cells cultivated on glycerol and compare to growth on glucose, taken as a widely used carbon source reference. The cultures were maintained under heterotrophy at 42°C. 150 mM carbon atoms were present in both cases, corresponding to 25 mM glucose (4.5 g/L) and 50 mM glycerol (4.6 g/L). Cells were adapted to the carbon source during two consecutive cultivation periods before the analysis. As shown in Figure 1A, growth was similar in both cases, and the stationary phase was reached at day 4 upon depletion of

the carbon source. The nitrogen (ammonium) and phosphate sources were not depleted at day 4 (Figures 1B,C), confirming that the carbon source is the main nutrient responsible for growth arrest.

The different growth parameters such as doubling time, maximum biomass, maximum productivity, were similar between glycerol and glucose (Table 1) and also in the range of those found in the literature (Schmidt et al., 2005; Sloth et al., 2006; Graverholt and Eriksen, 2007; Rahman et al., 2020; Scherhag and Ackermann, 2021). Whole cell respiration rates were also similar at mid-exponential phase (Table 1) and the yield of biomass to substrate was comparable for the two carbon sources (Table 1), suggesting that the efficiency of carbon assimilation was the same in both conditions. To check whether the carbon allocation inside the cells would be different according to the carbon source, the biomass composition was investigated at three timepoints: at day 2 (exponential phase), day 4 (start of the stationary phase), and day 8 (stationary phase) (Figure 2). The three components analyzed, glycogen, protein and fatty acids, presented the same profile of accumulation on both carbon sources. Glycogen content represented ~30% of DW until day 4 (Figure 2A). It dropped at day 8, constituting only ~10 % of the amount found at the beginning of the growth. Protein content also represented ~30% of DW and

² <http://www.genome.jp/kegg/>

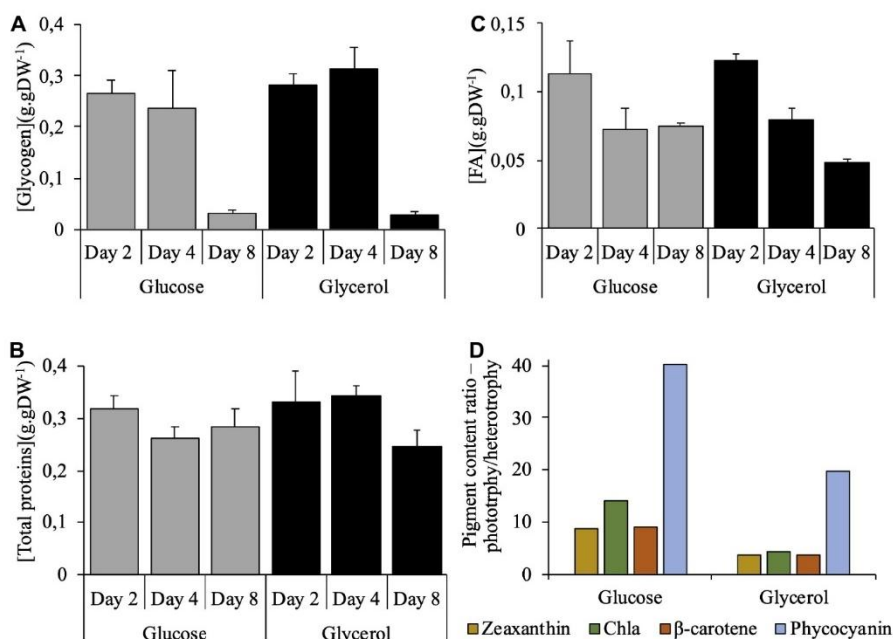


FIGURE 2

Biomass composition of *Galdieria sulphuraria* cells grown in heterotrophy in the presence of glucose or glycerol. Glucose (gray bars) or glycerol (black bars). Graphs (A–C) show the total glycogen, proteins, and fatty acids content expressed in g.g DW⁻¹, respectively. Day 2: exponential phase; Day 4: early stationary phase; Day 8: late stationary phase (last day of culture). Data are presented as means of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation (±SD). Bar chart (D) shows the phototrophy to heterotrophy (glucose or glycerol as substrate) pigment content ratio in exponential phase (Day 2). Pigments shown for each data series are, from left to right, zeaxanthin, chlorophyll a (Chla), β-carotene, and phycocyanin. Data are presented as the mean from three independent biological replicates of *G. sulphuraria* grown in phototrophy divided by the mean from three independent biological replicates grown in heterotrophy.

remained high until day 8, still constituting between ~70 and 80% of the initial content (Figure 2B). FAME analysis showed that fatty acid content represented ~11–12% of DW at the beginning of the growth, which is higher compared to values of the literature (~4%, López et al., 2019; Mozaffari et al., 2019). The content was reduced by one third at day 4, and remained stable until day 8 (Figure 2C). Fatty acid composition was analyzed. The major fatty acids accumulated were saturated

fatty acids [mainly palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids, Supplementary Table 1] which represented ~55% of the total amount at day 2 and ~45% at day 8. The monounsaturated fatty acids (mainly oleic acid, C18:1 ω-9, Supplementary Table 1) increased during growth, to reach ~18% of the total fatty acid at day 8 while the polyunsaturated fatty acids (mainly linoleic and linolenic acid) constituted ~35% of the total fraction during the entire course of the growth.

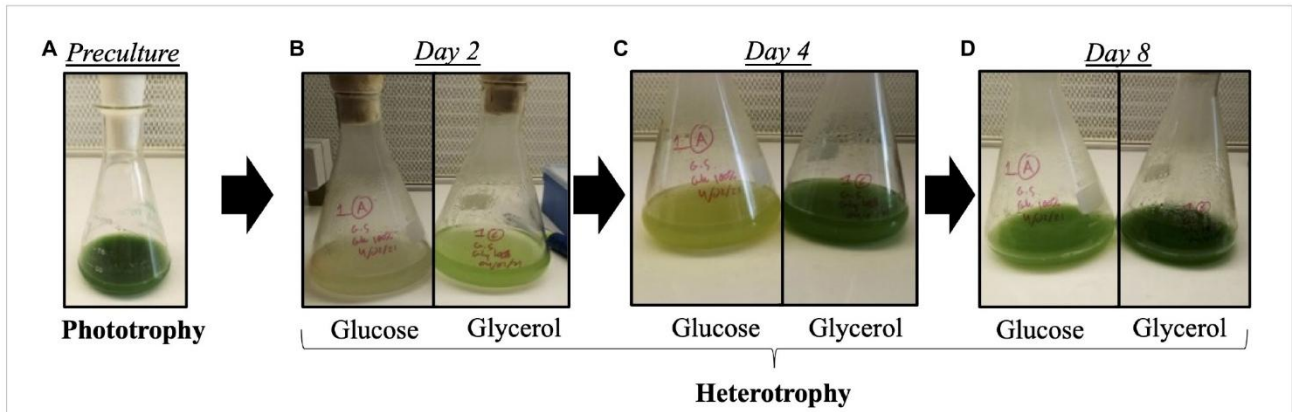


FIGURE 3

Images of *Galdieria sulphuraria* cultures. Cultures in phototrophy as a preculture (A), or in heterotrophy after 2 days (B), 4 days (C), and 8 days (D) in the presence of 25 mM of glucose or 50 mM of glycerol as carbon source. Yellow color of the culture mediated by the pigment loss can clearly be observed during exponential phase (B) only when glucose is present. After glucose depletion at stationary phase (D), a return of the green color is observed.

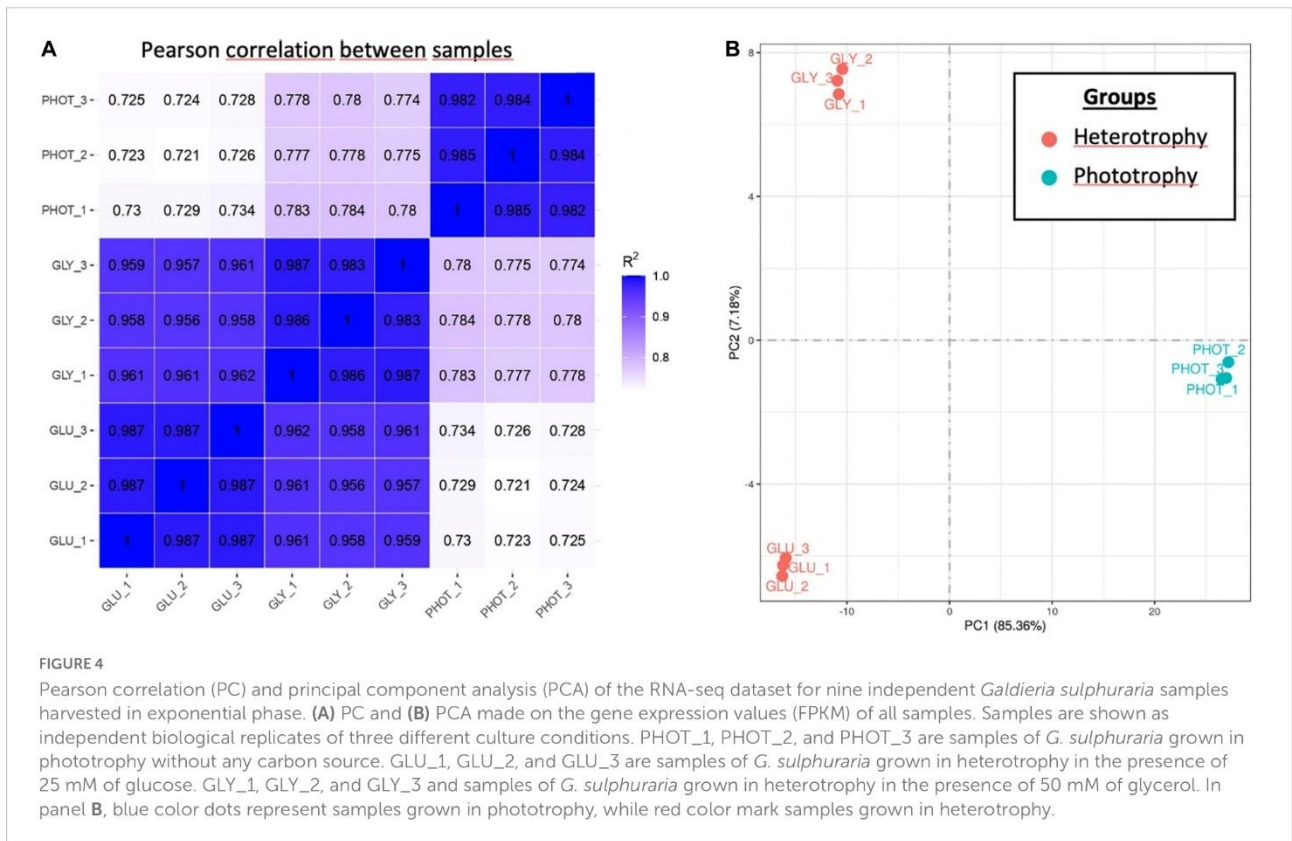


FIGURE 4

Pearson correlation (PC) and principal component analysis (PCA) of the RNA-seq dataset for nine independent *Galdieria sulphuraria* samples harvested in exponential phase. (A) PC and (B) PCA made on the gene expression values (FPKM) of all samples. Samples are shown as independent biological replicates of three different culture conditions. PHOT_1, PHOT_2, and PHOT_3 are samples of *G. sulphuraria* grown in phototrophy without any carbon source. GLU_1, GLU_2, and GLU_3 are samples of *G. sulphuraria* grown in heterotrophy in the presence of 25 mM of glucose. GLY_1, GLY_2, and GLY_3 and samples of *G. sulphuraria* grown in heterotrophy in the presence of 50 mM of glycerol. In panel B, blue color dots represent samples grown in phototrophy, while red color mark samples grown in heterotrophy.

A major difference was observed at the level of pigment content: as shown in **Figure 3**, *Galdieria* cells cultivated under glucose were yellowish at day 2 and day 4 while those cultivated under glycerol were green. On day 8, the pigmentation was restored in glucose-grown cells, when glucose was totally consumed. The phototrophy to heterotrophy (glucose or glycerol as substrate) pigment (chlorophyll *a*, zeaxanthin, beta-carotene, and phycocyanin) content ratios were calculated (**Figure 2D**) from absolute pigment content values (**Supplementary Figure 1**). Pigment ratios are above 1 for all the pigments, meaning that more pigments are present in phototrophy than in heterotrophy as expected. Chlorophyll *a*, zeaxanthin and beta carotene content ratios show a 2-fold increase in phototrophy compared to glycerol condition in heterotrophy, whereas the ratios show between 8- and 14-fold increase in phototrophy compared to glucose condition in heterotrophy. The phycocyanin content shows a 20-fold increase in phototrophy compared to glycerol and a 40-fold increase when compared to glucose. It can thus be concluded that heterotrophy inhibits pigment synthesis, and that the inhibition is stronger in the presence of glucose than with glycerol.

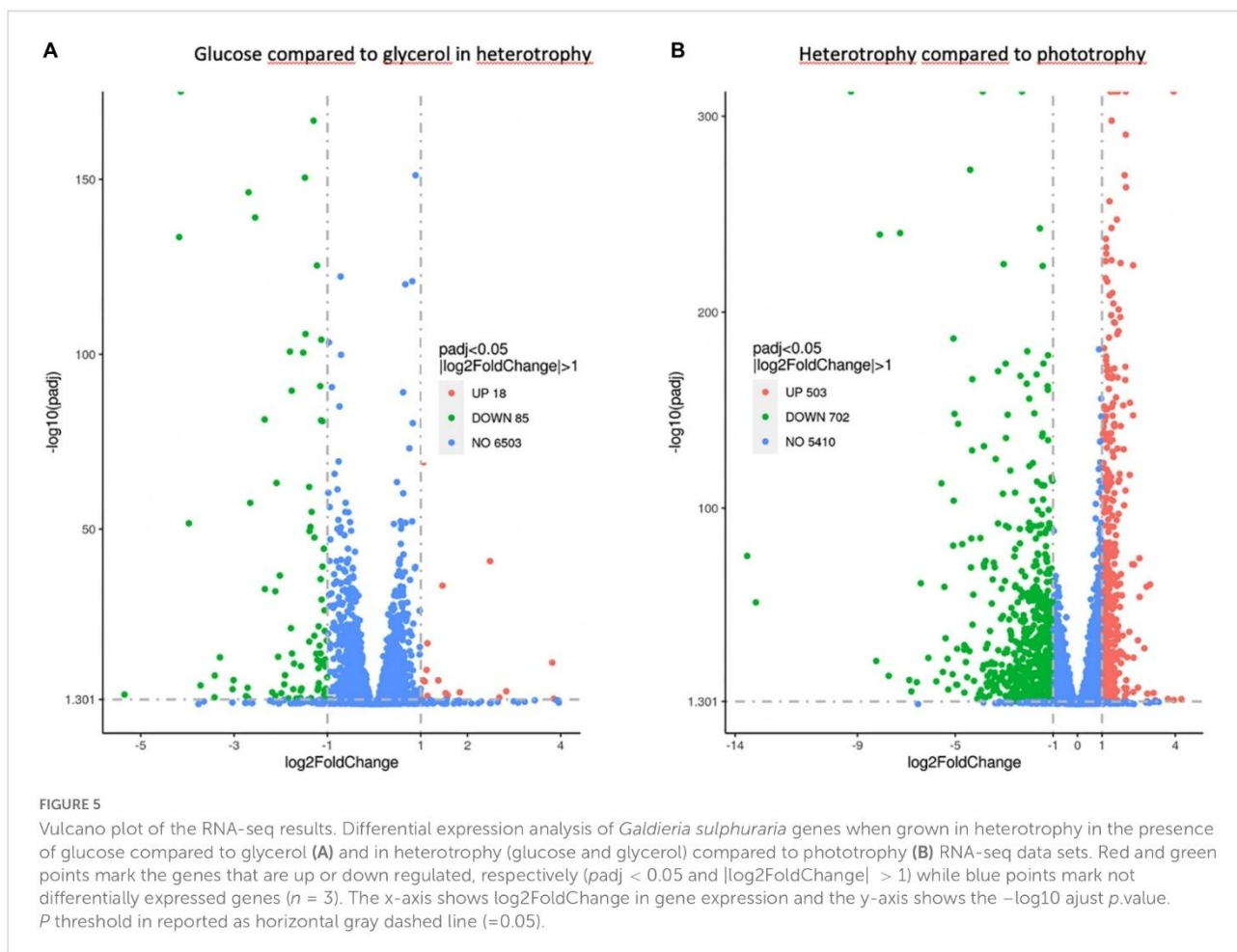
Transcriptomics analysis

In order to decipher the regulation underlying the inhibition of pigment synthesis in the dark, the transcriptome response of *Galdieria* cells grown in heterotrophy with glucose or glycerol was compared. In addition, the transcriptome response of cells grown in phototrophy was also added in the analyses as a control for full pigment synthesis and the lack of organic carbon source for growth.

Data summary and global gene expression profiling analysis

For that purpose, RNA was extracted in three biological replicates from cultures at mid-exponential phase in heterotrophy with glycerol or glucose and in phototrophy. RNA-seq data were obtained and the sequencing data are presented in **Supplementary Table 2**. The raw datasets generated for this study are deposited on NCBI [Sequence Read Archive (SRA), PRJNA854810³].

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA854810>



Comparison of global gene expression profiles between each pair of samples revealed that the biological replicates were highly correlated with each other ($r > 0.98$), which suggested experimental reliability. In addition, the samples cultivated on glycerol were highly correlated with those on glucose ($r \sim 0.95$), while the three samples cultivated under phototrophy exhibited lower correlation rates with the two other sets of samples ($r \sim 0.78$) suggesting that the presence of light influences more the global expression than the source of carbon in the dark (Figure 4A).

The principal component analysis (PCA) on the gene expression values (FPKM) of all samples showed that the three biological replicates clustered together for each condition with PC1 (85% of the gene expression variance) explaining the dependence to the light and PC2 (7% of the gene expression variance) explaining the dependence to the carbon source under heterotrophy (Figure 4B).

Differential expression analysis and biological pathways unique to the response to the different growth conditions

Comparison between glucose and glycerol samples grown in heterotrophy

Differentially expressed genes (DEGs) [adjusted $p < 0.05$ and $\log_2(\text{fold change}) > 1$] were identified in the samples grown in heterotrophy with glucose or glycerol (Figure 5A). The expression of 18 genes was found significantly upregulated in the samples cultivated with glucose compared to those cultivated with glycerol (Supplementary Table 3). Two hypothetical transcription factors were identified, one with a myb_DNA binding domain (Gasu_31830) and the other with a basic-leucine zipper domain (Gasu_38680) as well as a sugar transporter (Gasu_53180) in addition to many hypothetical genes with unknown function.

Eighty-five genes were downregulated in the samples cultivated with glucose compared to those cultivated with glycerol (Supplementary Table 3). Transcripts of two genes encoding enzymes that catalyze the production of phosphoenolpyruvate from pyruvate were in decreased amounts in glucose compared to glycerol: Gasu_42070 encoding pyruvate phosphate dikinase (PPDK)/phosphoenolpyruvate synthase (-4.14) and Gasu_48040 (-1.07) encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), with Gasu_42070 being the most downregulated transcript of the list. These two enzymes belong to gluconeogenesis (Figure 6), which would suggest that this pathway is downregulated in the presence of glucose contrary to the situation with glycerol, although proteomic data are missing to confirm this conclusion. Indeed, glycerol is a preferential substrate for gluconeogenesis (Shah and Wondisford, 2020; Figure 6). In addition to glycerol, gluconeogenesis is also supplied by amino acids (Shah and Wondisford, 2020). Interestingly five genes encoding amino acid transporters and amino acid permeases

were downregulated in glucose compared to glycerol (Figure 7 and Supplementary Table 4). Ten genes encoding transporters from the Major Facilitator Superfamily (MSF) with proposed sugar transporter activity were also downregulated in the presence of glucose while only one was upregulated (Figure 7 and Supplementary Table 4). Four genes encoding putative acetate transporters were similarly downregulated in glucose (Figure 7 and Supplementary Table 4). Lastly, 11 genes involved in photosynthesis were downregulated in glucose. As mentioned above, these variations of transcript abundance cannot be directly translated into regulation of metabolism in the absence of comparative proteomic and functional analyses. Although the pigment content varies between glucose and glycerol grown cells (Figure 3 and Supplementary Figure 1), expression of genes involved in chlorophylls, phycocyanin or carotenoid synthesis was not significantly modified between these two conditions (Supplementary Table 4).

Gene Ontology (GO) and KEGG pathway analyses on all the DEGs were analyzed and the significant processes ($p_{\text{adj}} < 0.05$) are shown (Supplementary Figure 2 and Supplementary Tables 5, 6). They revealed 17 GO terms located in biological processes (BP, 5), cellular components (CC, 10), and molecular function (MF, 2). The KEGG enrichment identified two pathways related to photosynthesis (photosynthesis and photosynthesis antenna).

Comparison between samples grown in heterotrophy and phototrophy

DEGs [adjusted $p < 0.05$ and $\log_2(\text{fold change}) > 1$] were identified in the samples cultivated in heterotrophy versus phototrophy (Figure 5B). We thus searched for genes whose expression is similar in heterotrophy, whatever the sugar considered and significantly differs in phototrophy. The expression of 503 genes was upregulated in heterotrophy compared to phototrophy (Supplementary Table 3). As proteomic data were available for comparison between heterotrophy and phototrophy (Curien et al., 2021), we calculated the protein ratios between these two conditions in Supplementary Table 4. The transcript and protein ratios usually followed the same trend, which would suggest an impact on the affected metabolisms. Considering the energetic mitochondrial metabolism, the expression of most of the genes encoding subunits of the complexes of the respiratory chain was unmodified, except for two components of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), two components ATP synthase (complex V) and an assembly factor of this last complex (Supplementary Table 4). The expression of the alternative oxidase (Gasu_36260) was upregulated. This enzyme is known to be subject to transcriptional regulation in algae and land plants, upon various stresses (Baurain et al., 2003; Molen et al., 2006; Selinski et al., 2018) to avoid electrons accumulation in the respiratory chain and ROS production, which is in agreement with its higher expression in heterotrophy for *G. sulphuraria*.

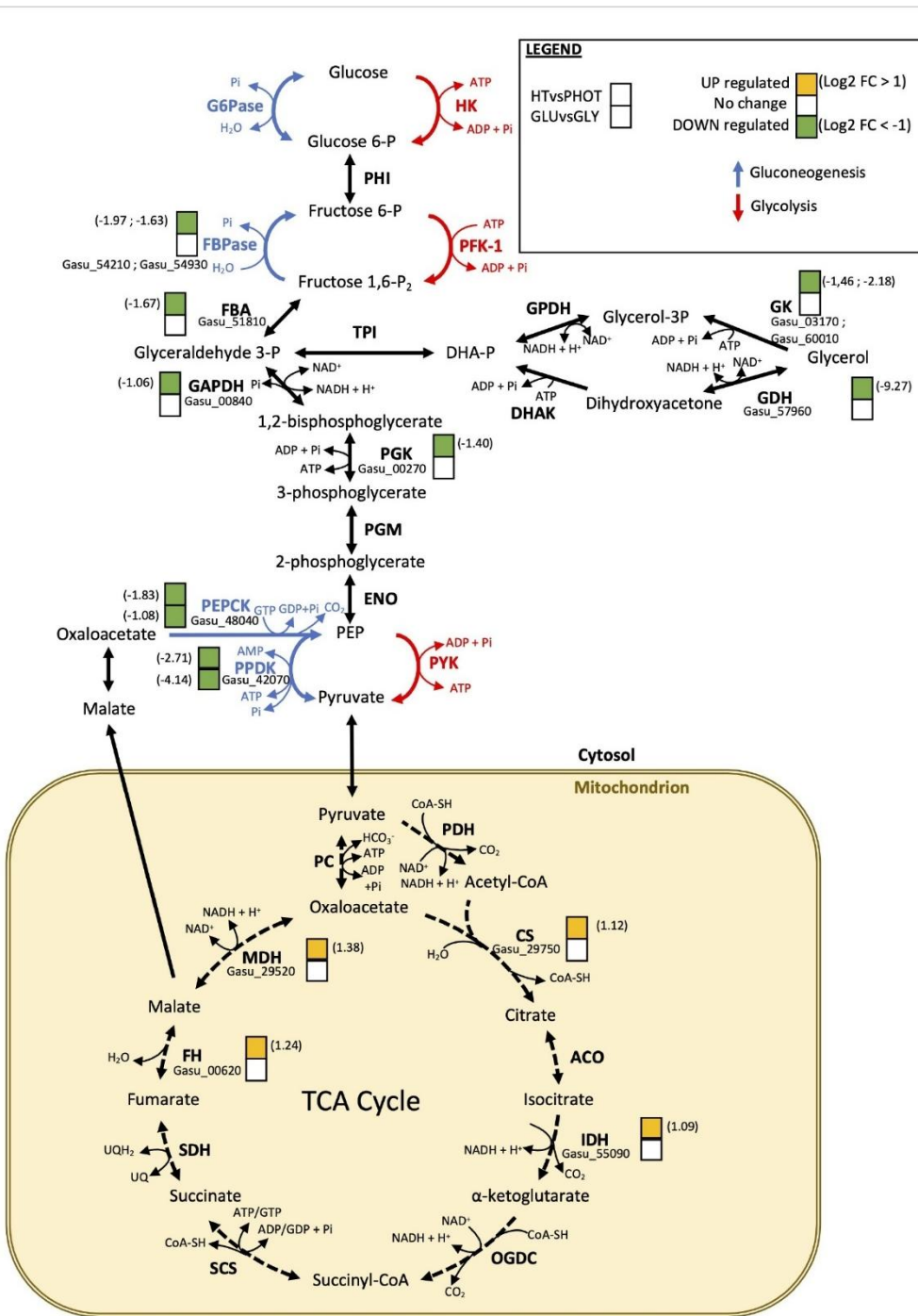


FIGURE 6

Schematic representation of glycolysis, gluconeogenesis, and tricarboxylic acid (TCA) cycles. Solid red and blue arrows mark specific reactions of glycolysis and gluconeogenesis, respectively. Cytosol is in white and mitochondrion is in light brown. Enzymes are highlighted and intermediated metabolites are shown in normal letters. Enzymes encoded by differentially expressed genes are marked with two overlapped squares. The one on the bottom refers to glucose compared to glycerol differentially expressed genes and the one on the top refers to heterotrophy compared to phototrophy differentially expressed genes. Green color is for downregulated genes, yellow color for overexpressed genes and white color means no significant differences in gene expression. Log2FoldChange is written on the right or on the left size of the squares when differences are observed. Transcript names are written above enzyme abbreviations. Abbreviations for enzymes: G6Pase, glucose-6-phosphatase; HK, hexokinase; FBPase, fructose 1,6-bisphosphatase; PFK-1, phosphofruktokinase-1; FBA, aldolase; TPI, triose-phosphate isomerase; GPDH, glycerol 3-phosphate dehydrogenase; GK, glycerol kinase; DHAK, dihydroxyacetone kinase; GDH, glycerol dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglycerate mutase; ENO, enolase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase; PYK, pyruvate kinase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PC, pyruvate carboxylase; CS, citrate synthase; ACO, aconitase; IDH, isocitrate dehydrogenase; OGDC, α -ketoglutarate dehydrogenase; SCS, succinyl-CoA synthetase; SDH, succinate dehydrogenase; FH, fumarase; MDH, malate dehydrogenase.

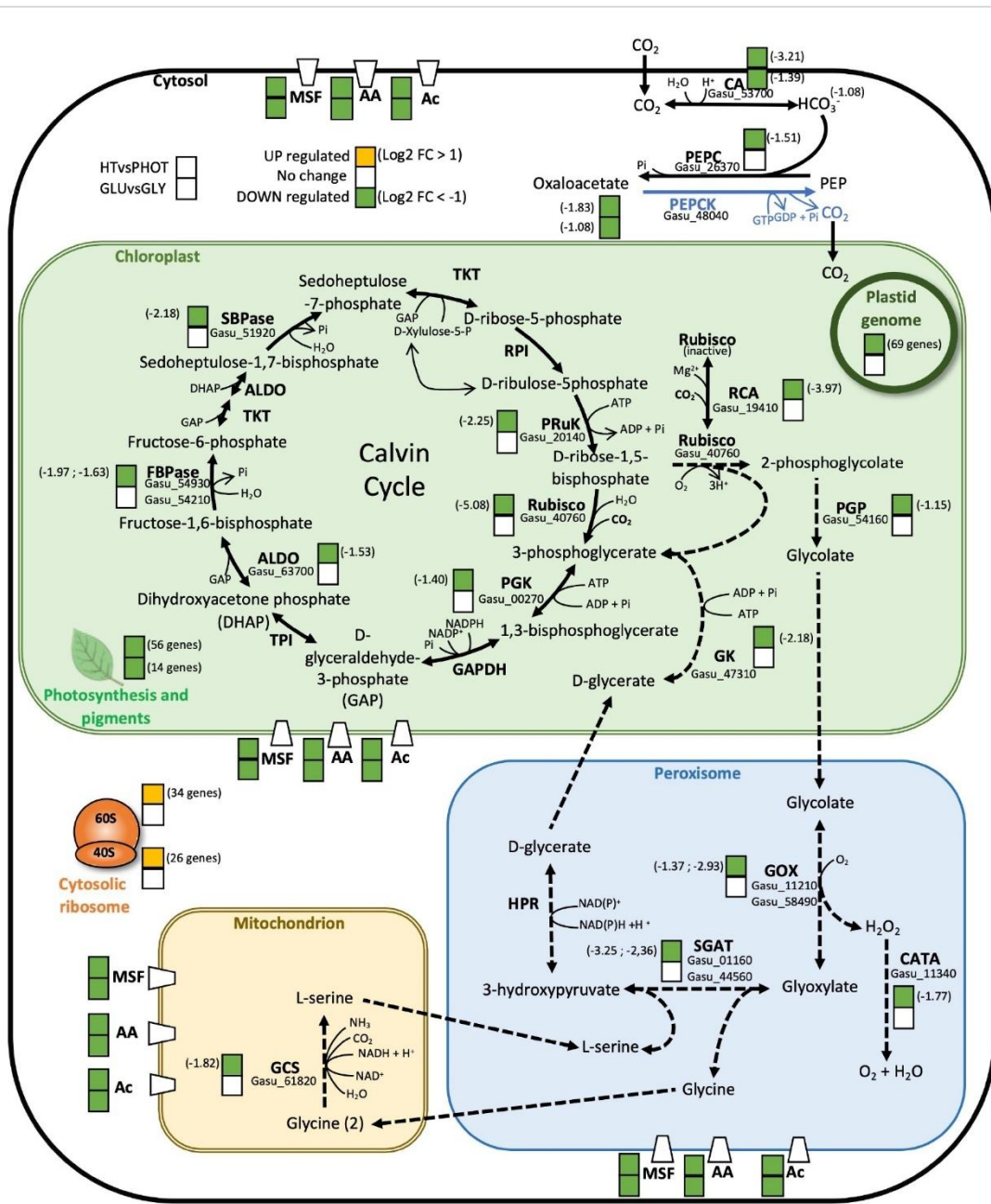


FIGURE 7

Schematic representation of the carbon concentrating (CCM) and photorespiration pathways (solid and dashed arrows, respectively). Cytosol is in white, chloroplast is in green, peroxisome is in blue, mitochondrion is in light brown, plastid genome in dark green, and ribosome is in orange. Leaf drawing shows the number of genes that are differentially expressed in photosynthesis related enzymes and pigment biosynthesis. Enzymes are highlighted and intermediated metabolites are shown in normal letters. Enzymes encoded by differentially expressed genes are marked with two overlapped squares. The one on the bottom refers to glucose compared to glycerol differentially expressed genes and the one on the top refers to heterotrophy compared to phototrophy differentially expressed genes. Green color is for downregulated genes, yellow color for overexpressed genes, and white color means no significant differences in gene expression. Log2FoldChange is written on the right or on the left side of the squares when differences are observed. Gene names are written above enzymes abbreviation. Blue arrow shows the limiting step of gluconeogenesis liberating carbon dioxide. Abbreviations for enzymes: ALDO, aldolase (fructose-bisphosphate aldolase); FBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGK, phospho-glycerate kinase; PRuK, phosphoribulokinase; RPE, ribulosephosphate 3-epimerase; RPI, ribose 5-phosphate isomerase; Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; SBPase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; TKT, transketolase; TPI, triose-phosphate isomerase; PGP, phosphoglycolate phosphatase; CA, carbonic anhydrase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; CATA, catalase; GOX, glyoxylate oxidase; SGAT, serine/glyoxylate transaminase; HPR, hydroxyppyruvate reductase; GK, glycerate kinase; GCS, glycine cleavage system; RCA, rubisco activase. Transporter proteins are marked with white trapezoids crossing the membranes and their abbreviations are: MSF, major facilitator superfamily; AA, amino acid transporters; Ac, acetate transporters.

An increased expression of four genes (out of 8) encoding enzymes of the Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) has been found, which would suggest a transcriptional upregulation of this cycle in heterotrophy (**Supplementary Table 4** and **Figure 6**). Lastly, a significant number of genes encoding proteins of the large (35 for the 60S) and small (27 for the 40S) subunits was upregulated (**Supplementary Table 4** and **Figure 7**).

The expression of 702 genes was downregulated in heterotrophy versus phototrophy (**Supplementary Table 3**). The most downregulated gene (−13.51) encodes a putative acetate transporter (Gasu_57950) and like in the comparison glucose/glycerol in heterotrophy, a large number of putative transporters were found downregulated in heterotrophy versus phototrophy: 29 amino acid transporters/permeases, 36 transporters of MSF, 7 acetate transporters (**Figure 7** and **Supplementary Table 4**).

As expected, a large number of genes of photosynthesis were downregulated in heterotrophy and the downregulation also comprises genes involved in pigment synthesis (chlorophylls, phycocyanin, and carotene, **Supplementary Table 4**) and components of the Calvin cycle (**Supplementary Table 4** and **Figure 7**). Considering the poor availability of CO₂ especially at pH 2 and at 42°C (Gross, 1999), we also found downregulation of transcripts encoding the pseudo carbon-concentrating mechanism of red microalgae (Rademacher et al., 2017; Curien et al., 2021) and photorespiration in heterotrophy compared to phototrophy (**Figure 7** and **Supplementary Table 4**). The Rubisco activase, known to be important in low CO₂ condition in microalgae (Pollock et al., 2003) was also strongly downregulated in heterotrophy. The second most downregulated gene (−9.26) encodes a glycerol dehydrogenase/iron containing alcohol dehydrogenase (Gasu_57960), which belongs to a diverse and ancient protein family of iron dehydrogenases (FeADH), present in bacteria and microorganisms but absent in land plants (Gaona-López et al., 2016). The enzyme shows the GlyGlyGlyXXXAsp amino acid motif for cofactor [NAD(P)+] binding as well as several Asp and His amino acid residues as putative Fe-ligands. In addition to their role in alcohol assimilation, some FeADHs have a critical role in oxidative stress in bacteria (Lin et al., 2021), which could explain the downregulation of Gasu_57960 in heterotrophic condition compared to phototrophy where light oxidative stress is present (**Supplementary Table 4**). In addition, genes encoding components of gluconeogenesis were also downregulated in heterotrophy (**Supplementary Table 4** and **Figure 6**).

Lastly, two nucleus-encoded RNA polymerase sigma factors (Gasu_28760, Gasu_35420) of the chloroplast-encoded RNA polymerase were downregulated in heterotrophy (−2.00, −1.94) and 69 genes of the chloroplast genome, including two components of the chloroplast-encoded RNA polymerase (Gasu_40590, Gasu_40330) (**Figure 7** and **Supplementary Table 4**). This suggests that the chloroplast genome is subject

to transcriptional regulation and that chloroplast transcripts of *G. sulphuraria* are polyadenylated and can be trapped by poly-T primers like the nucleus-encoded transcripts as it was demonstrated for the chloroplast-encoded transcripts of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Shi et al., 2016).

Gene Ontology (GO) and KEGG pathway analyses on all the DEGs revealed 32 GO terms and 6 biosynthetic pathways (**Supplementary Figure 2** and **Supplementary Tables 5, 6**). The GO terms are located in biological processes (BP, 13), cellular components (CC, 14) and molecular function (MF, 5) in which the BP of photosynthesis, translation and peptide biosynthesis are at the top. The top 3 KEGG pathways are related to ribosome, photosynthesis and photosynthesis-antenna proteins.

Discussion

The first aim of this study was to understand the physiology of *Galdieria* cells grown in heterotrophy when glucose or glycerol are used as reduced carbon source. All the parameters analyzed were similar irrespective of the carbon source, except the pigment content. This content was significantly higher in glycerol than in glucose, although it remained significantly much lower than in phototrophy. This led us to perform a transcriptomics analysis in three conditions: glucose or glycerol as carbon source in heterotrophy and phototrophy. This analysis showed that 11 transcripts related to photosynthesis were significantly downregulated in glucose when glucose- and glycerol-grown cells were compared. The decrease was even more pronounced when comparing heterotrophy and phototrophy since in that case 36 genes were downregulated. The expression of genes involved in pigment synthesis was also downregulated in heterotrophy compared to phototrophy while the difference was not significant when the comparison was made between cells grown in glucose and glycerol in heterotrophy (**Supplementary Table 4**). The difference between glycerol- and glucose-grown cells could only be detected at the level of pigment synthesis when each condition was separately compared to phototrophy (Glu/PHOT and Gly/PHOT, **Supplementary Table 4**). A significant downregulation of genes involved in pigment synthesis (chlorophylls, phycocyanin, and carotenoids) and in photosynthesis could be seen in both cases (Glu/PHOT and Gly/PHOT), with generally a stronger level of downregulation for cells grown in glucose than for cells grown in glycerol (**Supplementary Table 4**). It could thus be concluded that heterotrophy and glucose in particular exerts a negative control on the expression of genes involved in photosynthesis, and pigment synthesis compared to phototrophy. The role of glucose had been already studied in the light (mixotrophy). This sugar exerts a negative control on photosynthesis activity in *Galdieria* (Oesterhelt et al., 2007; Curien et al., 2021) and other microalgae (Martínez and Orús, 1991) in the absence of supplemental CO₂. In the green microalga *Chromochloris*

zofingiensis, this sugar regulates photosynthesis and pigment synthesis at transcriptional level in mixotrophy, with hexokinase playing a critical role for this regulation (Roth et al., 2019). In the dark, glucose addition is responsible for the decrease/loss of pigmentation in *G. sulphuraria* (Gross and Schnarrenberger, 1995; Schönknecht et al., 2013). Heterotrophy whatever the carbon source considered is also known to reduce pigment content in microalgae including *G. sulphuraria* (Martínez and Orús, 1991; Mozaffari et al., 2019). In *G. sulphuraria* and other microalgae, this decrease could be or not accompanied by alteration of the chloroplast ultrastructure (Pellegrini, 1980; Tischendorf et al., 2007; Mozaffari et al., 2019).

The results presented here also show that heterotrophy negatively regulates the expression of the chloroplast-encoded genes. Amongst the seven nucleus-encoded chloroplast RNA polymerase sigma factors (Gasu_29800, Gasu_17390, Gasu_43280, Gasu_54330, Gasu_44980, Gasu_28760, Gasu_35420) found in the DEGs between heterotrophy and phototrophy, two (Gasu_28760, Gasu_35420) were significantly downregulated, which would suggest that they are required for controlling expression of the chloroplast genome in heterotrophy. In *Cyanidoschyzon merolae*, a red microalga very close to *G. sulphuraria*, a MYB2 transcription factor represses the expression of the nuclear-encoded chloroplast RNA polymerase sigma factor gene SIG2, which results in the downregulation of the expression of the chloroplast-encoded phycobilisome genes (Kawase et al., 2017). Only one myb-family related factor was found upregulated in heterotrophy (Gasu_46180, +1.12), which could thus be considered as a good candidate for the repression of sigma factors controlling chloroplast-encoded RNA polymerase.

A similar trend was very often observed between the transcript ratios determined in this study and the protein ratios calculated from proteomic data (Curien et al., 2021) when heterotrophy and phototrophy were compared (Supplementary Table 4). This observation is valid for chloroplast- and nucleus-encoded genes/proteins, meaning that when a transcript is downregulated in heterotrophy compared to phototrophy, the relative abundance of the corresponding protein is reduced in that condition too. This would suggest that post-transcriptional regulation is not frequent. Concerning transcripts of chloroplast-encoded genes, this pattern of regulation is also described in the red microalga *C. merolae* (Minoda et al., 2005) but is different from the situation in the green microalga *C. reinhardtii* where post-transcriptional regulation is the rule (Rochaix, 1996).

A striking feature of heterotrophy is the upregulation of many genes encoding proteins of the large (60S) and small (40S) ribosomal subunits (Supplementary Table 4 and Supplementary Figure 2). This suggests that more cytosolic ribosomes are present in heterotrophy than in phototrophy, which would reflect a better fitness of the cells in heterotrophy than in phototrophy in the conditions used here (low CO₂). This low CO₂ environment is also reflected by the presence

of transcripts of the pseudo-carbon concentration mechanism and the photorespiration in phototrophy. An increase of the expression of genes encoding ribosomal proteins was found when *Galdieria* cells were grown in suboptimal temperature (28°C versus 42°C) and in that case it was considered as a marker of cold stress (Rossoni et al., 2019).

Galdieria sulphuraria is well known for the large diversity of its transporters, which are acquired by HGT (Schönknecht et al., 2013). Of the 10 putative acetate transporters of the YaaH family, four are downregulated when cells grown with glucose are compared to cells grown with glycerol and three additional ones are downregulated when DEGs are analyzed between heterotrophy and phototrophy (Supplementary Table 4). A similar situation is found for genes encoding amino acid permeases of the APC and AAAP families and for sugar transporters of the MSF family. Only one gene (Gasu_53180) encoding a putative sugar transporter, is upregulated in glucose (+2.83) compared to glycerol (Supplementary Table 4). Being upregulated in glucose condition compared to glycerol, this suggests that the corresponding transporter could be implicated in glucose assimilation. These gene families of transporters seem thus to be subject to a tight transcriptional regulation depending on the carbon source used for growth. Transcriptional regulation of gene families acquired by HGT, including the transporter families, was also found by Rossoni et al. (2019) in case of cold adaptation. Overall, these results suggest that some of the gene families acquired by HGT are subject to transcriptional regulation in *G. sulphuraria*. Whether this transcriptional regulation is specific to this alga or common amongst the red algae with HGT still needs to be deciphered (Ji et al., 2021).

Considering the biotechnological value of *G. sulphuraria*, the results presented here show that the microalga presents growth parameters similar in glucose and glycerol. This suggests that if the transport sector is based on biodiesel produced by transesterification of triacylglycerols in the near future, glycerol could be used as a source of heterotrophic growth for *G. sulphuraria*. The next step in this field will be to assess to which extent the crude glycerol produced directly by the transesterification process is as efficient as the pure glycerol used in this study for *Galdieria* growth. Knowing that *G. sulphuraria* is able to grow on toxic- and salt-rich media (Reeb and Bhattacharya, 2010), we believe that crude glycerol could also be metabolized efficiently. The presence of pigments when cells are grown with glycerol may represent a problem since they are not desirable for oil production, considering the presence of extra nitrogen that could generate NO_x if a mechanical approach is used for oil extraction (Kumar et al., 2015). Our molecular results indicate that there is a strong transcriptional downregulation of genes belonging to photosynthesis, pigment synthesis and also the chloroplast genome in heterotrophy. Still, we cannot conclude about the regulatory mechanism underlying the difference of pigment content between glucose and glycerol-fed cells. It is also worth adding that other targets

than oils could also be considered, since *G. sulphuraria* is a good source for nutritional applications due to its high protein content (Graziani et al., 2013).

Data availability statement

The data presented in this study are deposited in the NCBI repository, accession number PRJNA854810.

Author contributions

PPS, MC, and AC performed the experiments. All authors designed the experiments, contributed to the analysis and the interpretation of the results, wrote the manuscript, contributed to the article, and approved the submitted version.

Funding

This study was funded by Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) (CDR J.0175.20); Fonds Wetenschappelijk Onderzoek–Vlaanderen (FWO) and FNRS under the Excellence of Science (EOS) Project No. 30829584; Action de Recherche Concertée from the University of Liège (DARKMET ARC grant 17/21-08); and ADV_BIO grant (SPF Économie, P.M.E., Classes moyennes et Énergie, Direction générale de l'Énergie).

Acknowledgments

We thank M. Radoux and R. Dhondt for expert technical assistance.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.978246/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Pigments content of *Galdieria sulphuraria* cells grown in heterotrophy in the presence of glucose or glycerol or in phototrophy, during exponential phase (day 2). Bar chart (A) shows the pigment content expressed in mg.g DW⁻¹. Pigments shown for each condition are, from left to right, zeaxanthin, chlorophyll *a* (Chl*a*), and β-carotene. Bar chart (B) shows the phycocyanin content expressed in mg.g⁻¹ of soluble proteins. Data are presented as means of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation (±SD).

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of DEGs. (A,B) GO enrichment analysis of DEGs in heterotrophy in the presence of glucose compared to glycerol (A) or in heterotrophy compared to phototrophy (B). Graphs show the 10 most significantly ($p < 0.05$) enriched GO terms at three different levels: biological processes (pink), cellular component (green), and molecular function (blue). Data are expressed in $-\log_{10}(p\text{adj})$. Labeled values represent the gene count in each pathway. (C,D) Significantly enriched KEGG pathways of the DEGs (up and down regulated) in heterotrophy in the presence of glucose compared to glycerol (C) or in heterotrophy compared to phototrophy (D). Data are expressed in $-\log_{10}(p\text{adj})$. Labeled values represent the gene count in each pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

Fatty acid profile and quantification of *Galdieria sulphuraria* cells grown in heterotrophy in the presence of glucose or glycerol. Day 2: exponential phase; Day 4: early stationary phase; Day 8: late stationary phase. SFAs, saturated fatty acids; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids. Values are expressed in mg g⁻¹ DW. The SFA, MUFA, and PUFA classes are expressed in % of the total FAs. The data are presented as the mean ± standard deviation from three independent biological replicates.

SUPPLEMENTARY TABLE 2

Categorization and abundance of reads. PHOT_1, PHOT_2, and PHOT_3 are samples of *Galdieria sulphuraria* grown in phototrophy without any carbon source. GLU_1, GLU_2, and GLU_3 and samples of *G. sulphuraria* grown in heterotrophy in the presence of 25 mM of glucose. GLY_1, GLY_2, and GLY_3 and samples of *G. sulphuraria* grown in heterotrophy in the presence of 50 mM of glycerol.

SUPPLEMENTARY TABLE 3

DEG analyses of all the comparisons (GlvsGly, HTvsPHOT, GlvsPHOT, GlyvsPHOT).

SUPPLEMENTARY TABLE 4

Selected pathways displaying transcript relative variations (glucose versus glycerol in heterotrophy and heterotrophy versus phototrophy). Log2FoldChange values and protein relative abundance only for comparison between heterotrophy and phototrophy. Sheet 1: Photosynthesis, chlorophyll biosynthesis, phycocyanin biosynthesis, carotenoid biosynthesis, Calvin cycle, Carbon concentrating mechanism, Photorespiration; Sheet 2: Mitochondria; Sheet 3: Ribosomes; Sheet 4: Transporters; Sheet 5: Chloroplast genome.

SUPPLEMENTARY TABLE 5

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways analyses (GlvsGly, HTvsPHOT, GlvsPHOT, GlyvsPHOT).

SUPPLEMENTARY TABLE 6

Gene Ontology (GO) analyses (GlvsGly, HTvsPHOT, GlvsPHOT, GlyvsPHOT).

References

- Allen, M. B. (1959). Studies with cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte. *Archiv. Mikrobiol.* 32, 270–277. doi: 10.1007/BF00409348
- Ardi, M. S., Aroua, M. K., and Hashim, N. A. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 42, 1164–1173. doi: 10.1016/j.rser.2014.10.091
- Baurain, D., Dinant, M., Coosemans, N., and Matagne, R. F. (2003). Regulation of the alternative oxidase Aox1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the Aox1 promoter. *Plant Physiol.* 131, 1418–1430. doi: 10.1104/pp.013409
- Bottoni, C., Camerlingo, R., Miceli, R., Salbitani, G., Sessa, G., Pirozzi, G., et al. (2019). Antioxidant and anti-proliferative properties of extracts from heterotrophic cultures of *Galdieria sulphuraria*. *Nat. Prod. Res.* 33, 1659–1663. doi: 10.1080/14786419.2018.1425853
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- British Petroleum (2021). *BP Statistical Review of World Energy*, 70th Edn. Edinburgh: Heriot-Watt University
- Carfagna, S., Napolitano, G., Barone, D., Pinto, G., Pollio, A., and Venditti, P. (2015). Dietary supplementation with the microalga *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) reduces prolonged exercise-induced oxidative stress in rat tissues. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015:732090. doi: 10.1155/2015/732090
- Cheng, F., Mallick, K., Henkanatte Gedara, S. M., Jarvis, J. M., Schaub, T., Jena, U., et al. (2019). Hydrothermal liquefaction of *Galdieria sulphuraria* grown on municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* 292:121884. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121884
- Choi, H.-J., and Yu, S.-W. (2015). Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29, 506–513. doi: 10.1080/13102818.2015.1013988
- Ciniglia, C., Yang, E. C., Pollio, A., Pinto, G., Iovinella, M., Vitale, L., et al. (2014). Cyanidiphyceae in Iceland: plastid *rbc L* gene elucidates origin and dispersal of extremophilic *Galdieria sulphuraria* and *G. maxima* (Galdieriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 53, 542–551. doi: 10.2216/14-032.1
- Cizkova, M., Vitova, M., and Zachleder, V. (2019). “The red microalga galdieria as a promising organism for applications in biotechnology,” in *Microalgae- From Physiology to Application (UK)*, ed. M. Vitova (London: Intechopen), 105–122.
- Colpaert, M., Kadouche, D., Ducatez, M., Pillonel, T., Kebbi-Beghdadi, C., Cenci, U., et al. (2021). Conservation of the glycogen metabolism pathway underlines a pivotal function of storage polysaccharides in *Chlamydiae*. *Commun. Biol.* 4:296. doi: 10.1038/s42003-021-01794-y
- Concawe. (2021). *Concawe's Transport and Fuel Outlook towards EU 2030 Climate Targets*. Available online at: https://www.concawe.eu/wp-content/uploads/Rpt_21-2.pdf (accessed April 19, 2021).
- Corato, A., Le, T. T., Baurain, D., Jacques, P., Remacle, C., and Franck, F. (2022). A fast-growing oleaginous strain of coelastrella capable of astaxanthin and canthaxanthin accumulation in phototrophy and heterotrophy. *Life* 12:334. doi: 10.3390/life12030334
- Cui, Z., Greene, J. M., Cheng, F., Quinn, J. C., Jena, U., and Brewer, C. E. (2020). Co-hydrothermal liquefaction of wastewater-grown algae and crude glycerol: a novel strategy of bio-crude oil-aqueous separation and techno-economic analysis for bio-crude oil recovery and upgrading. *Algal Res.* 51:102077. doi: 10.1016/j.algal.2020.102077
- Curien, G., Lyska, D., Guglielmino, E., Westhoff, P., Janetzko, J., Tardif, M., et al. (2021). Mixotrophic growth of the extremophile *Galdieria sulphuraria* reveals the flexibility of its carbon assimilation metabolism. *New Phytol.* 231, 326–338. doi: 10.1111/nph.17359
- Delanka-Pedige, H. M. K., Munasinghe-Arachchige, S. P., Cornelius, J., Henkanatte-Gedera, S. M., Tchinda, D., Zhang, Y., et al. (2019). Pathogen reduction in an algal-based wastewater treatment system employing *Galdieria sulphuraria*. *Algal Res.* 39:101423. doi: 10.1016/j.algal.2019.101423
- Dong, K., Dong, X., and Jiang, Q. (2020). How renewable energy consumption lower global CO2 emissions? Evidence from countries with different income levels. *World Econ.* 43, 1665–1698. doi: 10.1111/twec.12898
- Field, J. L., Richard, T. L., Smithwick, E. A. H., Cai, H., Laser, M. S., LeBauer, D. S., et al. (2020). Robust paths to net greenhouse gas mitigation and negative emissions via advanced biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 21968–21977. doi: 10.1073/pnas.1920877117
- Gaona-López, C., Julián-Sánchez, A., and Riveros-Rosas, H. (2016). Diversity and evolutionary analysis of iron-containing (Type-III) alcohol dehydrogenases in eukaryotes. *PLoS One* 11:e0166851. doi: 10.1371/journal.pone.0166851
- Gérin, S., Delhez, T., Corato, A., Remacle, C., and Franck, F. (2020). A novel culture medium for freshwater diatoms promotes efficient photoautotrophic batch production of biomass, fucoxanthin, and eicosapentaenoic acid. *J. Appl. Phycol.* 32, 1581–1596.
- Graverholt, O. S., and Eriksen, N. T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 69–75. doi: 10.1007/s00253-007-1150-2
- Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M. A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., et al. (2013). Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food Funct.* 4, 144–152. doi: 10.1039/C2FO30198A
- Gross, W. (1999). “Revision of comparative traits for the acido- and thermophilic red algae cyanidium and galdieria,” in *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. cellular origin and life in extreme habitats*, Vol. 1, ed. J. Seckbach, (Dordrecht: Springer). doi: 10.1007/978-94-011-4838-2_34
- Gross, W., and Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol.* 36, 633–638. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803
- Hirooka, S., and Miyagishima, S. (2016). Cultivation of acidophilic algae *Galdieria sulphuraria* and *Pseudochlorella* sp. YKT1 in media derived from acidic hot springs. *Front. Microbiol.* 7:2022. doi: 10.3389/fmicb.2016.02022
- International Energy Agency (2021). *World Energy Outlook 2021*. Paris: International Energy Agency
- Jareonsin, S., and Pumas, C. (2021). Advantages of heterotrophic microalgae as a host for phytochemicals production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:628597. doi: 10.3389/fbioe.2021.628597
- Ji, L., Li, S., Chen, C., Jin, H., Wu, H., and Fan, J. (2021). Physiological and transcriptome analysis elucidates the metabolic mechanism of versatile *Porphyridium purpureum* under nitrogen deprivation for exopolysaccharides accumulation. *Bioresour. Bioprocess.* 8:73.
- Ju, X., Igarashi, K., Miyashita, S., Mitsuhashi, H., Inagaki, K., Fujii, S., et al. (2016). Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfotermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 211, 759–764. doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.061
- Kaur, J., Sarma, A. K., Jha, M. K., and Gera, P. (2020). Valorisation of crude glycerol to value-added products: perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol. Rep.* 27:e00487. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00487
- Kawase, Y., Imamura, S., and Tanaka, K. (2017). A MYB-type transcription factor, MYB 2, represses light-harvesting protein genes in *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS Lett.* 591, 2439–2448. doi: 10.1002/1873-3468.12763
- Kumar, R., Rao, P., and Arumugam, M. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. *Front. Energy Res.* 2:61. doi: 10.3389/fenrg.2014.00061
- Kursar, T. A., van der Meer, J., and Alberte, R. S. (1983). Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiol.* 73, 353–360. doi: 10.1104/pp.73.2.353
- Li, X., Xu, H., and Wu, Q. (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 764–771. doi: 10.1002/bit.21489
- Lin, G.-H., Hsieh, M.-C., and Shu, H.-Y. (2021). Role of iron-containing alcohol dehydrogenases in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 stress resistance and virulence. *Int. J. Mol. Sci.* 22:9921. doi: 10.3390/ijms22189921
- López, G., Yate, C., Ramos, F. A., Cala, M. P., Restrepo, S., and Baena, S. (2019). Production of polyunsaturated fatty acids and lipids from autotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation of *Galdieria* sp. strain USDA-GBX-832. *Sci. Rep.* 9:10791. doi: 10.1038/s41598-019-46645-3
- Maneering, T., Kawi, S., Dai, Y., and Wang, C.-H. (2016). Sustainable biodiesel production via transesterification of waste cooking oil by using CaO catalysts prepared from chicken manure. *Energy Convers. Manag.* 123, 487–497. doi: 10.1016/j.enconman.2016.06.071
- Martínez, F., and Orús, M. I. (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 101. *Plant Physiol.* 95, 1150–1155. doi: 10.1104/pp.95.4.1150

- Minoda, A., Nagasawa, K., Hanaoka, M., Horiuchi, M., Takahashi, H., and Tanaka, K. (2005). Microarray profiling of plastid gene expression in a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Mol. Biol.* 59, 375–385. doi: 10.1007/s11103-005-0182-1
- Molen, T. A., Rosso, D., Piercy, S., and Maxwell, D. P. (2006). Characterization of the alternative oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to oxidative stress and a shift in nitrogen source. *Physiol. Plant* 127, 74–86. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00643.x
- Mozaffari, K., Seger, M., Dungan, B., Hanson, D. T., Lammers, P. J., and Holguin, F. O. (2019). Alterations in photosynthesis and energy reserves in *Galdieria sulphuraria* during corn stover hydrolysate supplementation. *Bioresour. Technol. Rep.* 7:100269. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100269
- Murphy, J., and Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. doi: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Nazari, M. T., Mazutti, J., Basso, L. G., Colla, L. M., and Brandli, L. (2021). Biofuels and their connections with the sustainable development goals: a bibliometric and systematic review. *Environ. Dev. Sustain.* 23, 11139–11156. doi: 10.1007/s10668-020-01110-4
- Oesterhelt, C., Schmälzlin, E., Schmitt, J. M., and Lokstein, H. (2007). Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*[†]: regulation of photosynthesis in *Galdieria*. *Plant J.* 51, 500–511. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03159.x
- Pellegrini, M. (1980). Three-dimensional reconstruction of organelles in *Euglena gracilis* Z. II. Qualitative and quantitative changes of chloroplasts and mitochondrial reticulum in synchronous cultures during bleaching. *J. Cell Sci.* 46, 313–340. doi: 10.1242/jcs.46.1.313
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037
- Pinto, G., Albertano, P., Ciniglia, C., Cozzolino, S., Pollio, A., Yoon, H. D., et al. (2003). Comparative approaches to the taxonomy of the genus *Galdieria* Merola (Cyanidiales, Rhodophyta). *Cryptogamie Algol.* 24, 13–32.
- Pleissner, D., Lindner, A. V., and Händel, N. (2021). Heterotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* under non-sterile conditions in digestate and hydrolyzed straw. *Bioresour. Technol.* 337:125477. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125477
- Pollock, S. V., Colombo, S. L., Prout, D. L., Godfrey, A. C., and Moroney, J. V. (2003). Rubisco activase is required for optimal photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in a low-CO₂ atmosphere. *Plant Physiol.* 133, 1854–1861. doi: 10.1104/pp.103.032078
- Rademacher, N., Wrobel, T. J., Rossoni, A. W., Kurz, S., Bräutigam, A., Weber, A. P. M., et al. (2017). Transcriptional response of the extremophile red alga *Cyanidioschyzon merolae* to changes in CO₂ concentrations. *J. Plant Physiol.* 217, 49–56. doi: 10.1016/j.jplph.2017.06.014
- Rahman, D. Y., Sarian, F. D., and van der Maarel, M. J. E. C. (2020). Biomass and phycocyanin content of heterotrophic *Galdieria sulphuraria* 074G under maltodextrin and granular starches-feeding conditions. *J. Appl. Phycol.* 32, 51–57. doi: 10.1007/s10811-019-01957-9
- Reeb, V., and Bhattacharya, D. (2010). “The thermo-acidophilic cyanidiophyceae (Cyanidiales),” in *Red Algae in the Genomic Age Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, eds J. Seckbach and D. J. Chapman (Dordrecht: Springer), 409–426. doi: 10.1007/978-90-481-3795-4_22
- Remacle, C., Coosemans, N., Jans, F., Hanikenne, M., Motte, P., and Cardol, P. (2010). Knock-down of the COX3 and COX17 gene expression of cytochrome c oxidase in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 74, 223–233. doi: 10.1007/s11103-010-9668-6
- Rochaix, J. D. (1996). Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 32, 327–341. doi: 10.1007/BF00039389
- Rossoni, A. W., Schi Nknecht, G., Lee, H. J., Rupp, R. L., Flachbart, S., Mettler-Altmann, T., et al. (2019). Cold acclimation of the thermoacidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*: changes in gene expression and involvement of horizontally acquired genes. *Plant Cell Physiol.* 60, 702–712. doi: 10.1093/pcp/pcy240
- Roth, M. S., Gallaher, S. D., Westcott, D. J., Iwai, M., Louie, K. B., Mueller, M., et al. (2019). Regulation of oxygenic photosynthesis during trophic transitions in the green alga *Chromochloris zofingiensis*. *Plant Cell* 31, 579–601. doi: 10.1105/tpc.18.00742
- Salbitani, G., Cipolletta, S., Vona, V., Di Martino, C., and Carfagna, S. (2021). Heterotrophic cultures of *Galdieria phlegrea* shift to autotrophy in the presence or absence of glycerol. *J. Plant Growth Regul.* 40, 371–378. doi: 10.1007/s00344-020-10109-0
- Samul, D., Leja, K., and Grajek, W. (2014). Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Ann. Microbiol.* 64, 891–898. doi: 10.1007/s13213-013-0767-x
- Sangaletti, N., Cea, M., Regitano-d’Arce, M. A. B., de Souza Vieira, T. M. F., and Navia, R. (2013). Enzymatic transesterification of soybean ethanolic miscella for biodiesel production: soybean ethanolic miscella for biodiesel production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 2098–2106. doi: 10.1002/jctb.4080
- Scherhag, P., and Ackermann, J. (2021). Removal of sugars in wastewater from food production through heterotrophic growth of *Galdieria sulphuraria*. *Eng. Life Sci.* 21, 233–241. doi: 10.1002/elsc.202000075
- Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., and Eriksen, N. T. (2005). Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 77–84. doi: 10.1002/bit.20417
- Schönknecht, G., Chen, W.-H., Ternes, C. M., Barbier, G. G., Shrestha, R. P., Stanke, M., et al. (2013). Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science* 339, 1207–1210. doi: 10.1126/science.1231707
- Searle, P. L. (1984). The berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. A review. *Analyst* 109:549. doi: 10.1039/an9840900549
- Selinski, J., Scheibe, R., Day, D. A., and Whelan, J. (2018). Alternative oxidase is positive for plant performance. *Trends Plant Sci.* 23, 588–597. doi: 10.1016/j.tplants.2018.03.012
- Shah, A. M., and Wondisford, F. E. (2020). Tracking the carbons supplying gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 295, 14419–14429. doi: 10.1074/jbc.REV120.012758
- Shi, C., Wang, S., Xia, E.-H., Jiang, J.-J., Zeng, F.-C., and Gao, L.-Z. (2016). Full transcription of the chloroplast genome in photosynthetic eukaryotes. *Sci. Rep.* 6:30135. doi: 10.1038/srep30135
- Shimonaga, T., Konishi, M., Oyama, Y., Fujiwara, S., Satoh, A., Fujita, N., et al. (2008). Variation in storage a-glucans of the porphyridiales (Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.* 49, 103–116. doi: 10.1093/pcp/pcm172
- Sloth, J. K., Wiebe, M. G., and Eriksen, N. T. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 168–175. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.05.010
- Somers, M. D., Chen, P., Clippinger, J., Cruce, J. R., Davis, R., Lammers, P. J., et al. (2021). Techno-economic and life-cycle assessment of fuel production from mixotrophic *Galdieria sulphuraria* microalgae on hydrolysate. *Algal Res.* 59:102419. doi: 10.1016/j.algal.2021.102419
- Sun, F., and Chen, H. (2008). Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 99, 5474–5479. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.001
- Sun, Y., Shi, M., Lu, T., Ding, D., Sun, Y., and Yuan, Y. (2021). Bio-removal of PtCl₆²⁻ complex by *Galdieria sulphuraria*. *Sci. Total Environ.* 796:149021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149021
- Tischendorf, G., Oesterhelt, C., Hoffmann, S., Girnus, J., Schnarrenberger, C., and Gross, W. (2007). Ultrastructure and enzyme complement of proplastids from heterotrophically grown cells of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur. J. Phycol.* 42, 243–251. doi: 10.1080/09670260701437642
- Toplin, J. A., Norris, T. B., Lehr, C. R., McDermott, T. R., and Castenholz, R. W. (2008). Biogeographic and phylogenetic diversity of thermoacidophilic cyanidiales in Yellowstone National Park, Japan, and New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2822–2833. doi: 10.1128/AEM.02741-07
- Vivek, N., Sindhu, R., Madhavan, A., Anju, A. J., Castro, E., Faraco, V., et al. (2017). Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: an overview. *Bioresour. Technol.* 239, 507–517. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.056

3.2 Figures et tableau supplémentaires

Figure S1 : Pigments content of *Galdieria sulphuraria* cells grown in heterotrophy in the presence of glucose or glycerol or in phototrophy, during exponential phase (Day 2). Bar chart (A) shows the pigment content expressed in mg.gDW^{-1} . Pigments shown for each condition are, from left to right, zeaxanthin, chlorophyll *a* (Chl*a*), and β -carotene. Bar chart (B) shows the phycocyanin content expressed in mg.g^{-1} of soluble proteins. Data are presented as means of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation (\pm SD).

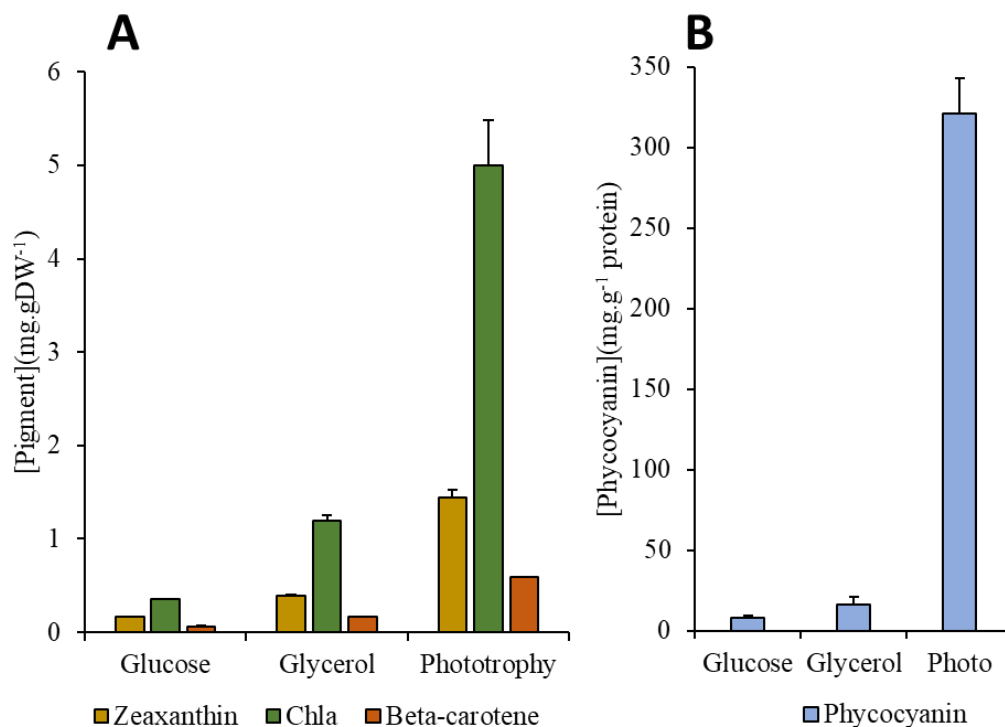


Figure S2: GO and KEGG pathway enrichment analysis of DEGs. (A) and (B): Gene ontology (GO) enrichment analysis of DEGs in heterotrophy in the presence of glucose compared to glycerol (A) or in heterotrophy compared to phototrophy (B). Graphs show the 10 most significantly ($P < 0.05$) enriched GO terms at three different levels: biological processes (pink), cellular component (green) and molecular function (blue). Data are expressed in $-\log_{10}(\text{padj})$. Labeled values represent the gene count in each pathway. (C) and (D) : Significantly enriched KEGG pathways of the DEGs (up and down regulated) in heterotrophy in the presence of glucose compared to glycerol (C) or in heterotrophy compared to phototrophy (D). Data are expressed in $-\log_{10}(\text{padj})$. Labeled values represent the gene count in each pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

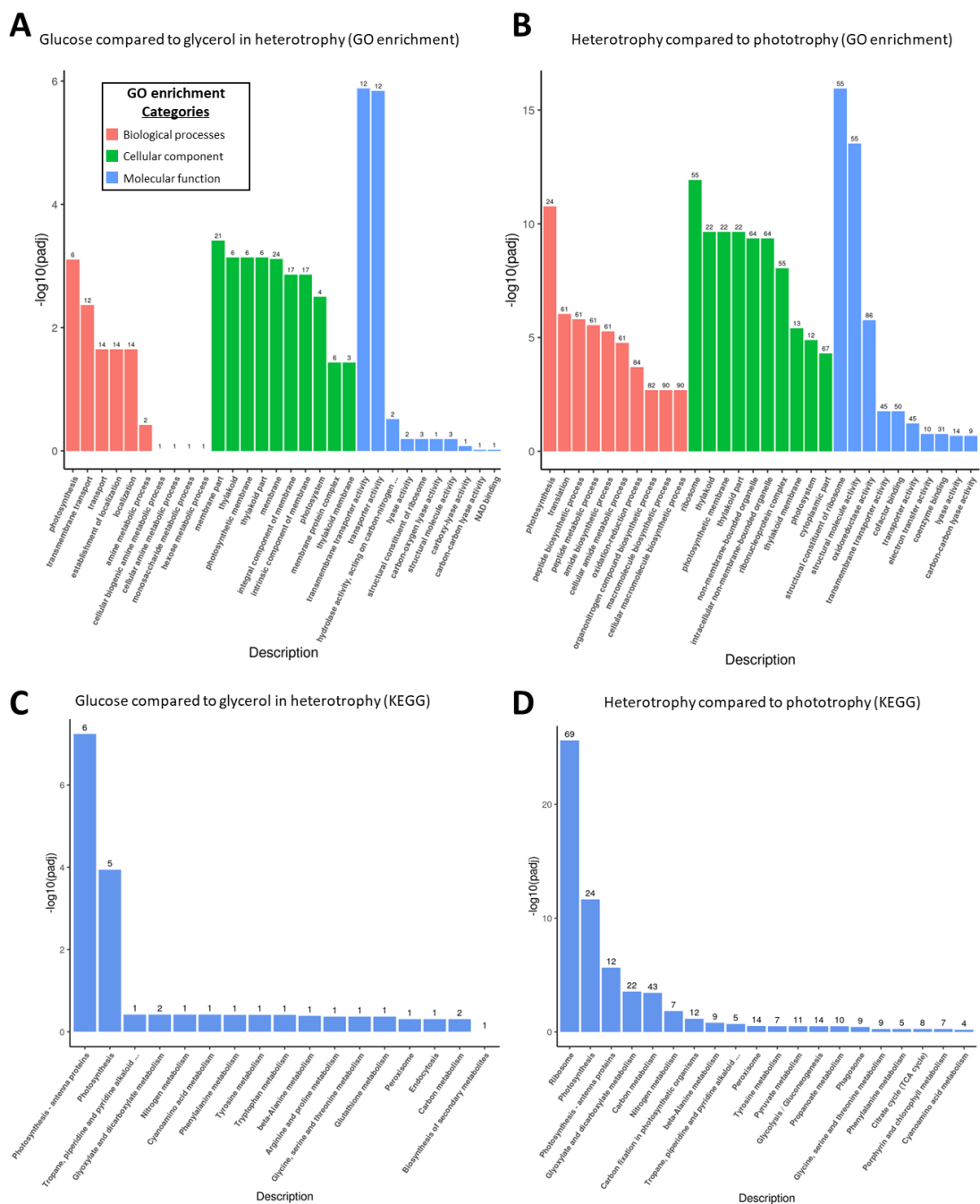


Table S1: Fatty acid profile and quantification of *Galdieria sulphuraria* cells grown in heterotrophy in the presence of glucose or glycerol. Day 2: exponential phase; Day 4: early stationary phase; Day 8: late stationary phase (last day of culture). SFAs = saturated fatty acids, MUFAs = monounsaturated fatty acids, PUFAs = polyunsaturated fatty acids. Values are expressed in mg gDW⁻¹. The SFA, MUFA, and PUFA classes are expressed in % of the total FAs. Data are presented as the mean ± standard deviation from three independent biological replicates.

[FA](mg.gDW ⁻¹)	Day 2		Day 4		Day 8	
	Glucose	Glycerol	Glucose	Glycerol	Glucose	Glycerol
C14:0	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.7 ± 0.0	0.2 ± 0.0
C15:0	2.9 ± 0.5	3.1 ± 0.1	4.0 ± 0.9	4.2 ± 0.5	3.4 ± 0.1	2.2 ± 0.0
C15:1	/	/	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.0
C16:0	32.7 ± 7.0	35.6 ± 3.3	21.7 ± 5.0	26.5 ± 2.9	21.4 ± 0.4	13.5 ± 0.3
C16:1	/	/	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2
C17:0	3.4 ± 1.4	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.6	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.0	1.9 ± 0.0
C17:1	/	/	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0
C18:0	23.1 ± 4.7	22.8 ± 2.3	8.9 ± 2.0	10.4 ± 0.9	5.5 ± 0.1	4.3 ± 0.3
C18:1n9t	1.4 ± 1.3	1.8 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0
C18:1n9c	7.9 ± 1.7	8.0 ± 0.5	8.9 ± 2.0	9.7 ± 1.2	11.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3
C18:2n6c	15.8 ± 4.2	17.5 ± 1.4	20.4 ± 4.0	20.0 ± 2.3	20.8 ± 1.0	13.2 ± 0.2
C18:3n3	23.0 ± 3.7	22.9 ± 1.8	2.4 ± 0.4	1.9 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.0 ± 0.2
C20:0	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.7	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0
C20:1n9	/	/	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
C20:2	/	6.5 ± 1.3	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.0	1.4 ± 0.2
Total FA	113.0 ± 24.0	123.1 ± 4.8	72.5 ± 15.4	79.6 ± 0.6	74.6 ± 2.1	49.1 ± 1.3
% SFA	57.4 ± 0.5	53.9 ± 3.2	52.1 ± 1.5	56.5 ± 0.8	44.9 ± 0.7	45.5 ± 2.7
% MUFA	8.1 ± 0.7	8.0 ± 0.6	14.5 ± 0.6	14.3 ± 0.3	18.9 ± 0.4	16.5 ± 0.6
% PUFA	34.4 ± 0.5	38.1 ± 2.7	33.4 ± 1.1	29.2 ± 0.4	36.2 ± 0.5	38.0 ± 0.7

Table S2: Categorization and abundance of reads. PHOT_1, PHOT_2 and PHOT_3 are samples of *G. sulphuraria* grown in phototrophy without any carbon source. GLU_1, GLU_2 and GLU_3 and samples of *G. sulphuraria* grown in heterotrophy in the presence of 25mM of glucose. GLY_1, GLY_2 and GLY_3 and samples of *G. sulphuraria* grown in heterotrophy in the presence of 50mM of glycerol.

Sample	Raw reads	Raw bases (Gb)	Clean reads	Clean bases (Gb)	Error rate (%)	Mapped reads	% mapped
GLU_1	28189606	4.23	27935272	4.19	0.03	25753902	92.19%
GLU_2	20607850	3.09	20419958	3.06	0.03	18835518	92.24%
GLU_3	28562634	4.28	28295516	4.24	0.03	26206195	92.62%
GLY_1	22556868	3.38	22359568	3.35	0.03	20802904	93.04%
GLY_2	20365426	3.05	20182930	3.03	0.03	18579101	92.05%
GLY_3	22576944	3.39	22403438	3.36	0.03	20938575	93.46%
PHOT_1	25275726	3.79	25026698	3.75	0.03	23584464	94.24%
PHOT_2	22707596	3.41	22525382	3.38	0.03	21366301	94.85%
PHOT_3	21052566	3.16	20894924	3.13	0.03	19916351	95.32%

CHAPITRE IV : UTILISATION DU XYLOSE, DU GLUCOSE ET DE L'ACÉTATE COMME NUTRIMENTS POUR LA CROISSANCE DE TROIS ESPÈCES DE MICROALGUES CULTIVÉES EN HÉTÉROTROPHIE

Dans l'article précédent, nous avons montré que *G. sulphuraria* avait la capacité de croître en condition hétérotrophe aussi efficacement en utilisant du glycérol que du glucose. Étant un sous-produit de la transestérification, ce substrat s'inscrivait particulièrement bien dans le cadre du projet ADV_BIO (voir chapitre II : **Contexte et objectifs de la thèse**), visant à la production de biomasse destinée à la confection de biocarburants sur le territoire belge.

Cependant, le projet avait également pour objectif de valoriser la biomasse produite localement. Dans ce contexte, certains de nos partenaires travaillaient sur la culture de peupliers présentant un taux de lignine plus faible que la normale, réduisant ainsi leur récalcitrance et améliorant l'accessibilité aux autres polymères constituant la lignocellulose.

Outre la cellulose, déjà bien exploitée dans divers contextes bioindustriels, le bois de peuplier est également riche en hémicellulose. Celle-ci est rarement valorisée en raison de sa faible accessibilité, de la complexité liée à sa dégradation, mais aussi de la diversité des monomères qui composent ses chaînes polymériques. Parmi ces sucres, certains sont rarement assimilables par des microorganismes non modifiés génétiquement, comme le rhamnose, l'arabinose ou encore le xylose, constituant majeur de l'hémicellulose. La composition en sources de carbone peut varier en fonction de l'organisme d'origine de l'hémicellulose, mais aussi selon la méthode d'extraction, qu'elle soit chimique ou enzymatique (voir section 1.3.2 : **Les substrats atypiques pour la croissance en hétérotrophie**).

Comme nous l'avons déjà introduit dans l'article précédent, *G. sulphuraria* possède une plasticité métabolique impressionnante, notamment en ce qui concerne la croissance en hétérotrophie et l'utilisation de sources de carbone variées. De plus, elle a montré des taux élevés de protéines ainsi que de glycogène qui, étant soluble, simplifie sa purification et son utilisation comme substrat carboné pour d'autres microorganismes (par exemple, pour la production de bioéthanol).

En revanche, la quantité d'acides gras accumulés dans sa biomasse était relativement faible, ce qui ne faisait pas de *G. sulphuraria* une candidate idéale pour la production d'hydrocarbures à longues chaînes, comme le biodiesel ou le biokérosène. C'est pourquoi nous avons envisagé, en plus de *G. sulphuraria*, l'utilisation d'autres espèces de microalgues présentant simultanément l'avantage de croître en hétérotrophie et d'être des candidates potentielles pour la conversion de leur biomasse en biocarburants : *E. gracilis* et *A. protothecoides*.

Lors de cette deuxième étude, nous avons cherché à comprendre comment ces trois microalgues, *Galdieria sulphuraria*, *Euglena gracilis* et *Auxenochlorella protothecoides*, réagissaient à la présence des sources de carbone majoritaires de l'hémicellulose en condition hétérotrophe.

4.1 Résumé de l'article

Cette étude comparait la croissance et la composition de la biomasse de *Galdieria sulphuraria*, *Euglena gracilis* et *Auxenochlorella protothecoides* en condition hétérotrophe, en présence des trois principales sources de carbone présentes dans la matière lignocellulosique de peuplier : le glucose, le xylose et l'acétate. L'objectif était d'identifier les souches capables de valoriser ces substrats par la production de biomasse et de détailler leur composition en acides gras, en glucides, en protéines et en pigments.

Pour ce faire, chaque espèce a été cultivée à l'obscurité en présence de chaque substrat ainsi que d'un mélange équimolaire des trois. La concentration finale en carbone avait été fixée à 150 mMC afin de permettre la comparaison de la capacité d'utilisation de chaque substrat pour une même espèce, mais aussi d'analyser les paramètres de croissance de chaque microalgue.

Croissance et assimilation des substrats

Les résultats ont montré une forte variabilité dans l'assimilation des substrats selon les espèces étudiées. *G. sulphuraria* affichait une croissance presque aussi efficace en présence de xylose seul qu'en présence de glucose, avec des rendements élevés ($\sim 0,5 \text{ gDW g}^{-1}$) et les plus hautes concentrations en biomasse enregistrées ($\sim 2,5 \text{ g L}^{-1}$). En revanche, sa croissance était inhibée par la présence d'acétate, même à faible concentration (12,5 mM) dans la condition où les trois sources de carbone étaient combinées, à pH2. Cela s'expliquait par le fait qu'à des pH inférieurs à 5, l'acétate se retrouvait principalement sous sa forme protonée (acide acétique), et devenait toxique pour les cellules.

À l'inverse, *E. gracilis* ne métabolisait que l'acétate, avec un rendement faible ($0,26 \text{ g g}^{-1}$). Cependant, le glucose et le xylose n'avaient pas d'impact négatif sur sa croissance, lui permettant d'évoluer dans un environnement où les substrats étaient mélangés.

A. protothecoides, quant à elle, montrait la capacité d'utiliser l'acétate ou le glucose, avec une préférence pour ce dernier ($0,42$ à $0,54 \text{ gDW g}^{-1}$, respectivement), mais pas le xylose seul. Néanmoins, bien que son taux de croissance spécifique ait été le plus élevé de l'étude ($3,19 \text{ d}^{-1}$), la condition où seul le glucose était présent avait induit une acidification intense et rapide du milieu de culture, empêchant dès lors la poursuite de la croissance. Heureusement, l'acétate ayant un effet inverse sur le pH extracellulaire lors de son assimilation, la condition combinant les trois sources de carbone avait permis un contrôle spontané du pH et l'utilisation complète des deux substrats (glucose et acétate).

De plus, *A. protothecoides* se distinguait des autres espèces par sa capacité à assimiler le xylose lorsque les deux autres substrats étaient présents dans le milieu. Nous avons pu démontrer que l'algue

était capable d'en diminuer la concentration de moitié dans le milieu, ce qui la plaçait dès lors comme une candidate potentielle pour la valorisation de substrats lignocellulosiques.

Composition de la biomasse

Après avoir étudié ces paramètres de croissance, nous nous sommes intéressé à la composition en pigments, en protéines, en polysaccharides de réserve et en lipides de la biomasse de chaque algue, en fonction de la phase de croissance et du substrat carboné étudié.

En ce qui concerne les protéines, le taux s'est toujours situé entre 15 % et 35 %, quelle que soit la souche ou la condition étudiée. *G. sulphuraria* a montré une composition relativement élevée, allant de 24 % à 32 %, quel que soit le stade de croissance. En revanche, *E. gracilis* accumulait plus de protéines par rapport à son poids sec en fin de culture, passant de 18 % en phase exponentielle à 34 % en phase stationnaire. *A. protothecoides* a affiché la plus grande variabilité en fonction de la source de carbone, avec 16 % de protéines lors de sa croissance en présence de glucose et 31 % en présence d'acétate.

La pigmentation était très faible dans toutes les espèces testées, en raison des conditions hétérotrophes. En particulier, les chlorophylles étaient indétectables chez *E. gracilis*, malgré l'utilisation de la technique HPLC, pourtant réputée très sensible. Bien que l'obscurité ait affecté toutes les conditions, la synthèse des pigments était particulièrement réduite en présence de glucose. L'acétate, en revanche, semblait légèrement atténuer cette répression chez *A. protothecoides*, maintenant une pigmentation plus stable que sous glucose seul.

Durant la phase exponentielle de croissance, les trois espèces ont accumulé en quantité variable leurs polysaccharides de réserve. *G. sulphuraria* a montré que 20 à 26 % de son poids sec était constitué de glycogène lors de la phase exponentielle, qu'elle soit cultivée en présence de glucose ou de xylose. *E. gracilis*, quant à elle, s'est distinguée par sa forte production de paramylon (jusqu'à 47 % du poids sec), qui pourrait presque entièrement être transformé en esters de cire si elle était confrontée à des conditions limitées en oxygène. *A. protothecoides* a montré les taux les plus faibles d'amidon, avec un maximum à 11 % en présence de glucose, ce qui peut s'expliquer par sa tendance à utiliser les lipides comme réserve de carbone. Dans tous les cas, ces teneurs en polysaccharides de réserve ont fortement diminué lors de l'évaluation de la composition de la biomasse en phase stationnaire, en raison de leur utilisation en l'absence de source de carbone exogène.

Enfin, concernant leur teneur en lipides, *G. sulphuraria* a affiché un faible rendement lipidique (5-15 % du poids sec), avec une forte proportion d'acides gras saturés (45 à 63 %), favorables à la production de biodiesel. De son côté, *E. gracilis* a présenté un taux de lipides très faible (~6 % du poids sec), mais avec la plus haute proportion d'acides gras saturés (60 à 77 %), qui pourrait être fortement augmentée en anaérobie. Enfin, *A. protothecoides* a maintenu une teneur lipidique plus importante que les autres espèces dans toutes les conditions (16-18 % du poids sec), bien que ces valeurs soient relativement faibles par rapport à celles rapportées dans la littérature.

Conclusion et perspectives

CHAPITRE IV

Cette étude a mis en évidence que *G. sulphuraria* et *A. protothecoides* étaient deux microalgues prometteuses pour la valorisation des sources de carbone composant l'hémicellulose. *G. sulphuraria* s'est distinguée par son rendement élevé en présence de xylose et sa production d'acides gras saturés, tandis que *A. protothecoides* a affiché la plus grande flexibilité métabolique, lui permettant d'assimiler efficacement un mélange de substrats tout en maintenant une teneur lipidique plus élevée et une croissance rapide.

Xylose, glucose and acetate as feedstock for three microalgal species cultivated in heterotrophy

Pablo Perez Saura¹, Stéphanie Gérin¹, Pierre Cardol¹, Claire Remacle^{1*}

¹Laboratory of genetics and physiology of microalgae, InBios/Phytosystems Research Unit, University of Liege, Belgium

ORCID: Pablo Perez-Saura: 0000-0002-9823-685X; Stéphanie Gérin: 0009-0002-8661-3213; Pierre Cardol: 0000-0001-9799-0546; Claire Remacle: 0000-0002-5016-9547

***Corresponding Author:** c.remacle@uliege.be

Keywords: *Galdieria sulphuraria*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Euglena gracilis*, heterotrophy, hemicellulose, biomass content

Abstract

Microalgae are known as good producers of high-added value bioproducts useful in many applications such as pharmaceuticals, nutrition or biofuel production. In contrast to phototrophy, heterotrophy emerges as a promising strategy for algal biomass production due to high cell densities, controlled conditions and reduced space requirement. Hemicellulose is the second most abundant material in land plants. Its hydrolysis liberates xylose, glucose, acetate. Our study focuses on three microalgal species, *Galdieria sulphuraria*, *Euglena gracilis*, and *Auxenochlorella protothecoides*, cultivated under heterotrophy with the above-mentioned carbon sources, supplemented alone or in combination. Growth parameters and biomass analysis revealed distinctive characteristics. *G. sulphuraria*, despite a modest fatty acid content (5-15% w/w), displayed potential for hemicellulose valorization, demonstrating high biomass yield using xylose as a sole carbon source (approx. 0.5 gDW $\text{g}_{\text{xylose}}^{-1}$) and high saturated fatty acid (SFA) content (45-63%). In our cultivation conditions, *E. gracilis* only assimilated acetate with low fatty acid content (approx. 6% w/w), but high SFA content (60-77%) and high paramylon content (47% w/w), convertible to wax-esters under anaerobiosis. *A. protothecoides* exhibited biomass yields of 0.42-0.54 gDW $\text{g}_{\text{substrate}}^{-1}$ depending on the carbon substrate supplied but maintained constant fatty acid content (16-18% w/w) in the presence of all substrates except xylose. Surprisingly, despite an inability to grow with xylose alone, sugar depletion analysis indicated decreasing xylose concentration when other carbon sources were present in the cultivation medium for this alga. This comparative study discusses the strengths and weaknesses of each strain, providing insights into their potential when grown on hemicellulose carbon sources.

Introduction

Microalgae are widely studied across various fields such as human nutrition, pharmacology, bioremediation, and biofuel production [1–3]. Certain microalgal species exhibit the ability to grow heterotrophically, utilizing carbon molecules from their environment in the absence of light. Heterotrophic growth offers several advantages over phototrophic growth, including better monitoring over culture conditions, reduced risk of contamination as a consequence of indoor and closed cultivation systems, and typically higher growth rates [4–7]. Additionally, heterotrophic microalgae often show increased accumulation of reserve polysaccharides [8–13] and higher lipid content and/or productivity [7,14–17]. Furthermore, the absence of light generally reduces the pigment [18–21] and protein contents [13,22–24]. These nitrogenous compounds can affect the costs of the biomass conversion process into biofuel, and the oil quality by the production of nitrogen oxides (NO_x) during combustion [25–28].

However, the utilization of carbon sources such as glucose for microalgal growth raises ethical concerns when derived from biomass cultivated on arable lands. Nonetheless, these carbon compounds can also originate from renewable feedstock like agricultural wastes, straw, or from forestry operations [29–31]. The organic matter originating from such industries primarily comprises cellulose, along with a substantial amount of hemicellulose, considered the second most prevalent family of compounds in plant biomass [32]. Once completely hydrolyzed using thermochemical methods, hemicellulose releases various carbon compounds, predominantly xylose (5–25 g L⁻¹), glucose (1–25 g L⁻¹), and acetate (2–8 g L⁻¹) [33,34]. Although glucose and acetate are known to be suitable for heterotrophic growth of many microalgae, xylose, despite being the most abundant sugars on Earth after glucose (accounting for 18–30% of lignocellulose hydrolysate sugars) is rarely metabolized [35]. Once translocated into the cell via Major Facilitator Family (MSF) transporters or hexose/H⁺ symporter systems [20,36], glucose can be phosphorylated to enter glycolysis or pathways for reserve or structural polysaccharide biosynthesis [37–39]. Acetate, on the other hand, can either passively diffuse through the plasma membrane in its acetic acid form or utilize proton-linked MonoCarboxylate Transporters (MCTs) before being converted into acetyl-CoA [38–40]. This central molecule of energy metabolism can then participate in fatty acid synthesis or enter the glyoxylate and the tricarboxylic acid (TCA) cycle or undergo gluconeogenesis to form hexoses [40]. Xylose, meanwhile, uses specific pentose transporters in some species, while in others it utilizes transporters normally intended for hexoses [41]. Subsequently, it is redirected to various metabolic pathways such as the pentose phosphate pathway (PPP) and/or glycolysis after its conversion to xylitol, then xylulose, and finally xylulose 5-P [42] (**Fig. 1**). Only a few microalgae species have shown effective growth on sole xylose [41,43,44], and even fewer can use the three aforementioned carbon sources as feedstock. This is likely because most photosynthetic organisms lack specific transporters for their assimilation [45–48]. Among heterotrophic microalgal species, we decided to focus on three strains originating from different phyla and able to convert the carbon sources found in hemicellulose into algal biomass intended for various applications. We selected *Galdieria sulphuraria*, a red microalga (Rhodophyta)

known for its ability to assimilate numerous different carbon sources under heterotrophic conditions while being capable of reaching high biomass concentrations [49,50]. Additionally, *G. sulphuraria* can produce high levels of saturated fatty acids (SFAs), known to be favorable for biofuel production [51,52]. Also, *G. sulphuraria* accumulates significant amounts of a particular type of glycogen, stored in the cytosol, and called floridean starch, studied in health, nutrition, and in the fermentation-based synthesis of certain types of biofuels [10,53,54].

We also conducted our research on the Euglenozoa *Euglena gracilis*, for its capacity to assimilate acetate and glucose [13,55]. Furthermore, lacking a cell wall, its cellular content is easily accessible for industrial purposes. *E. gracilis* accumulates paramylon within the cytosol as storage polysaccharide, that is insoluble in water and imparting unique properties in the medical fields such as immunity [9,12,56]. Moreover, in addition to produce high levels of SFAs, *E. gracilis* paramylon is converted into wax esters under anoxic conditions, which are highly favorable to produce medium-chain biofuels such as biodiesel or biokerosene [14,57,58].

Lastly, we investigated *Auxenochlorella protothecoides*, a green alga of the genus *Chlorella*. It is known to reach high biomass densities in heterotrophy in the presence of various carbon sources [4–7], but also for its flexibility of growth conditions, and its relevance in 3rd generation biomass production for biofuel synthesis [5,7]. Indeed, the *Chlorella* genus is one of the most studied for biofuel production due to the ability of some strains to exhibit high lipid content (up to 50% of the total DW in some cases for *A. protothecoides* grown in heterotrophy) [4,7,29,59], while producing few reserve of polysaccharides and pigments [4,7,29,59].

In this article, we investigated the growth of the three microalgae—*G. sulphuraria*, *E. gracilis*, and *A. protothecoides*—in the presence of the main carbon sources found in hemicellulose hydrolysate, namely glucose, acetate, and xylose, as well as in an equimolar mixture of the three. Additionally, we measured their biomass content and composition to evaluate their potential applications, particularly in the field of biofuels.

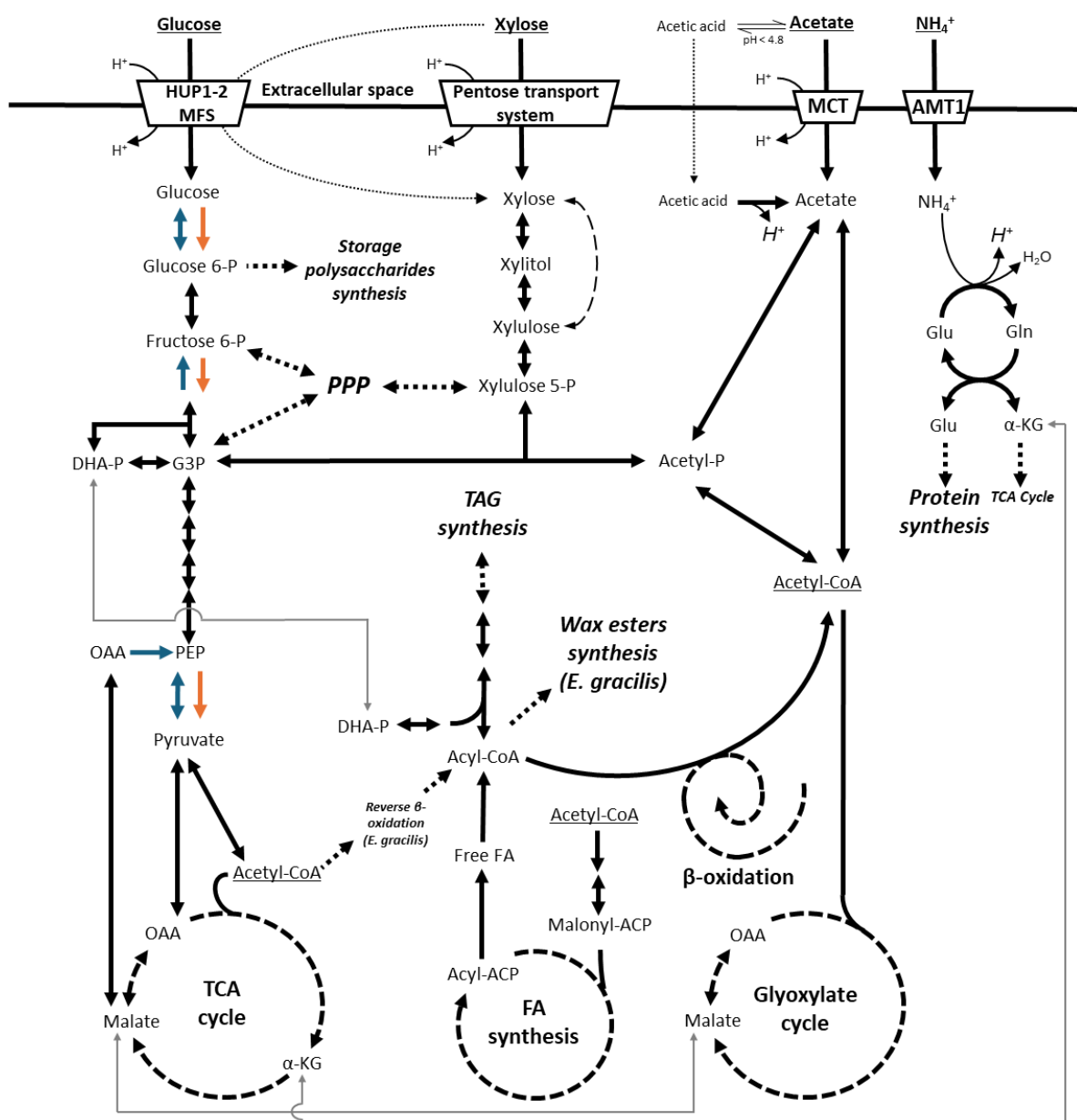


FIGURE 1 : Schematic representation of the uptake and metabolism of glucose, xylose, acetate, and ammonium (NH_4^+) in microalgae, based on [14,20,36–42,60]. Black arrows indicate specific enzymatic reactions leading to the subsequent products (enzyme names and co-substrates are generally not specified). Black arrows crossing trapezoids represent transporters. Small gray arrows connect single compounds that can be transferred from one pathway to another. Circular dashed arrows represent metabolic cycles (with intermediate products and enzymatic reactions not shown), and straight dashed arrows indicate entry points into specific metabolic pathways written in bold and italics, which are not necessarily detailed. Orange and blue arrows mark specific reactions of glycolysis and gluconeogenesis, respectively. The dashed arrows connecting xylose to xylulose omitting the xylitol intermediate represent the putative presence of a xylose isomerase, as already characterized in bacteria [61]. Compound abbreviations are specified as follows: α -KG, α -ketoglutarate; ACP, acyl carrier protein; AMT1, ammonium transporter 1; CoA, coenzyme A; DHA-P, dihydroxyacetone phosphate; FA, fatty acid; G3P, glyceraldehyde 3-P; Gln, glutamine; Glu, glutamate; HUP1-2, hexose uptake protein; MCT, monocarboxylate transporters; MFS, major facilitator superfamily; PEP, phosphoenolpyruvate; PPP, pentose phosphate pathway; TAG, triacylglycerol; TCA, tricarboxylic acid. The locations where metabolic reactions occur have intentionally not been specified, as they may differ depending on the species studied.

Materials and methods

Microalgal strains, culture media, and precultures

G. sulphuraria strain 074 was obtained from the algal Collection at the University Federico II (ACUF) (http://www.acuf.net/index.php?option=com_content&view=article&id=520:galdieria-sulphuraria-galdieri-merola24&catid=2&Itemid=127&lang=en&Itemid=113). The strain corresponds to the 074W isolate described in [49] and previously described in [20]. The strain was maintained axenically at 25°C under constant illumination ($40 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on a sterile agar plate containing 2xGS modified Allen medium [62] (**Table 1**). One liter of 2xGS Allen medium contains: 1.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 300 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 300 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 19.9 mg NaCl, 13.2 mg Fe-Na-EDTA, 5.72 mg H_3BO_3 , 3.64 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.44 μg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.1 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05 mg $\text{NaVO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and 44 μg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. pH was adjusted to 2.0 with 96% H_2SO_4 prior to sterilization by autoclaving the medium for 20 min at 121°C. For solid 2xGS Allen medium, 500 mL with 2% agar were mixed with a 2-times concentrated medium after autoclaving and being cooled down to around 60°C to achieve 1% agar plates.

E. gracilis SAG 1224-5/25 (**strain Z**) and *A. protothecoides* SAG 211-7a strains were obtained from the Culture Collection of Algae at Göttingen University, Germany (SAG). Both strains were maintained axenically at 25°C under constant illumination ($40 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on agar plates containing Tris-Minimal-Phosphate (TMP) medium [63] (**Table 1**). One liter of TMP medium contains: 2.42g Tris buffer, 400 mg NH_4Cl , 50 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 93.5 mg K_2HPO_4 , 63.0 mg KH_2PO_4 , 50 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.4 mg H_3BO_3 , 5.1 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4.9 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 1.1 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. pH was adjusted to 7.0 with 37% HCl prior to sterilization by autoclaving the medium for 20 min at 121°C. For solid TMP medium, 15 g of agar were added to the solution before sterilization to achieve 1.5% agar plates. After sterilization, the medium was supplemented with thiamine (vitamin B_1) at a concentration of 10 μM for *A. protothecoides* and with a mix of biotin (vitamin B_8 , 100 nM), cobalamin (vitamin B_{12} , 100 nM), and thiamine (10 μM) for *E. gracilis* cultivation, respectively.

CHAPITRE IV

Table 1. Comparison of the molecules and elements concentrations between the 2xGS Allen and TMP media. Values are expressed in molar units (M) and do not include pH adjustment. NF: the compound is not found in the medium.

Compound	Medium	
	TMP	2xGS Allen
TRIS	$2 \cdot 10^{-2}$	NF
Mg ²⁺	$4.06 \cdot 10^{-4}$	$1.22 \cdot 10^{-2}$
SO ₄ ²⁻	$5.06 \cdot 10^{-4}$	$1.26 \cdot 10^{-2}$
Ca ²⁺	$3.40 \cdot 10^{-4}$	$1.36 \cdot 10^{-4}$
Cl ⁻	$8.19 \cdot 10^{-3}$	$6.50 \cdot 10^{-4}$
K ⁺	$1.54 \cdot 10^{-3}$	$2.20 \cdot 10^{-3}$
PO ₄ ³⁻	$1.00 \cdot 10^{-3}$	$2.20 \cdot 10^{-3}$
NH ₄ ⁺	$7.49 \cdot 10^{-3}$	$2.27 \cdot 10^{-2}$
EDTA	$1.71 \cdot 10^{-4}$	$3.60 \cdot 10^{-5}$
BO ₃ ³⁻	$1.84 \cdot 10^{-4}$	$9.25 \cdot 10^{-5}$
Fe ²⁺	$1.76 \cdot 10^{-5}$	$3.60 \cdot 10^{-5}$
Cu ²⁺	$6.29 \cdot 10^{-6}$	$6.40 \cdot 10^{-7}$
Zn ²⁺	$7.65 \cdot 10^{-5}$	$1.54 \cdot 10^{-5}$
Mn ²⁺	$2.56 \cdot 10^{-5}$	$1.84 \cdot 10^{-5}$
Co ²⁺	$6.77 \cdot 10^{-6}$	$3.36 \cdot 10^{-7}$
Mo ₇ O ₂₄ ⁶⁻	$8.90 \cdot 10^{-7}$	$1.70 \cdot 10^{-6}$
Na ⁺	NF	$3.76 \cdot 10^{-4}$
VO ₃ ⁻	NF	$4.12 \cdot 10^{-7}$

For the three strains, cells grown on agar plates were used to inoculate liquid phototrophic precultures that were maintained in 250 mL flasks with 70 mL of medium under constant shaking and LED-illumination ($100 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25°C (*E. gracilis* and *A. protothecoides*) or 42°C (*G. sulphuraria*) in an incubator (GroBanks®, CLF Plant Climatics, Germany or Memmert GmbH, Germany, respectively). Before the experiments, cells were adapted to heterotrophy as described in the following section **Growth conditions and harvesting**. Heterotrophic precultures were maintained in the dark in an incubator at the same temperature as for phototrophic precultures under constant shaking for 10 days. Adaptation step was performed a second time using the first heterotrophic preculture as inoculum, when the conditions permitted growth.

Growth conditions and harvesting

All strains were grown in the dark in 250 mL flasks containing 70 mL of medium in an incubator under constant shaking with specific temperature and culture medium, as described for the precultures. The four tested conditions for each strain were different regarding the nature of the carbon source supplemented to the medium: 25 mM of glucose, 30 mM of xylose, 75 mM of sodium acetate or a mix of the three carbon sources (8.33 mM of glucose, 10 mM of xylose, 25 mM of sodium acetate). The carbon sources were added to the cultivation media to reach a final concentration of 150 mM of carbon atoms (mMC). The flasks were inoculated with two-times heterotrophically adapted cells pre-cultivated on the same carbon source as the tested condition, at a starting OD₈₀₀ of 0.2. All strains and culture conditions were performed in three independent biological replicates.

Once or twice a day, culture medium samples were harvested for algal growth measurements. 2-25 mL of culture were harvested and centrifuged (16,000 x g; 3min) to recover the algal cells for pigments, proteins, storage polysaccharides (glycogen, paramylon or starch), and lipids quantification. Samples were frozen at -20°C if the analysis was not performed directly. At the end of the culture, the remaining volume served for biomass estimation.

All cultures were monitored until growth arrest, generally due to the assimilable carbon source depletion, since other elements such as ammonium and phosphate were supplied in excess and were never spotted as depleted at the end of growth (**Fig. S1**).

Additional analyses on *E. gracilis* cells adapted to heterotrophic conditions were conducted using Koren-Hutner (KH) [64] and TMP media. The cells were grown at 25°C in the dark with constant agitation in 100 mL flasks with 25 mL of medium. Each medium was supplemented with 50 mMC of either acetate or glucose with an initial pH of 3.5 or 7.5 and cultures were maintained for 7 days. The experiments were performed with two independent biological replicates, starting with an inoculum of 125.000 dark-adapted cells per mL.

Algal growth measurements, biomass determination and growth parameter calculation

Algal growth was determined at least once a day measuring the OD₈₀₀ spectrophotometrically (Perkin-Elmer lambda™ 265 UV/VIS, USA) in cuvettes of an optical path of 1 cm. Dilutions are performed to maintain an absorbance value between 0.1 and 0.3. The dry biomass (DW) concentration was estimated upon OD measurements using an OD/DW ratio calculated at the end of the culture for each strain and carbon source. When no growth was observed in a specific condition, an OD/DW ratio from another condition was used for biomass estimation. Biomass was measured by harvesting 15-30 mL of algal culture that were centrifuged (4,000 x g; 3min), washed twice in distilled water, and transferred in pre-weighted aluminum cup. After 24 h in a 70°C oven, the aluminum cups were then weighted to gravimetrically estimate the DW.

Specific growth rate (μ) expressed in day⁻¹ as the slope of the linear regression of the natural log dry weight number as a function of time in exponential phase as follows:

$$\mu = \frac{\ln OD_{800_2} - \ln OD_{800_1}}{t_2 - t_1}$$

Biomass productivity, expressed in DW L⁻¹ d⁻¹, was calculated as follows:

$$DW \text{ productivity} = \frac{DW_2 - DW_1}{t_2 - t_1}$$

Biomass yield ($Y_{x/s}$) on substrate, expressed in gDW g_{substrate}⁻¹, was calculated as follows:

$$Y_{x/s} = \frac{X_{max} - X_0}{S_0 - S_1}$$

Where X_{max} represents the maximal DW concentration and X_0 the DW concentration (g L^{-1}) at the start of the culture. S_0/S_1 represent the carbon source concentration (g L^{-1}) at the start and at the end of the culture, respectively.

Xylose biomass yield in the mix condition for *A. protothecoides* ($Y_{x/xylose}$), expressed in $\text{gDW g}_{xylose}^{-1}$, was estimated as follows:

$$Y_{x/xylose} = \frac{X_{max_{mix}} - (Xth_{glucose} + Xth_{acetate})}{[xylose]_0 - [xylose]_1}$$

The theoretical glucose ($Xth_{glucose}$) and acetate ($Xth_{acetate}$) contributions as carbon source to the maximal DW concentration (gDW L^{-1}) were extrapolated as follows:

$$Xth_{glucose} = ([glucose]_0 - [glucose]_1) \times Y_{x/glucose}$$

$$Xth_{acetate} = ([acetate]_0 - [acetate]_1) \times Y_{x/acetate}$$

Where $[xylose]_0/[xylose]_1$, $[glucose]_0/[glucose]_1$, and $[acetate]_0/[acetate]_1$ are the carbon source concentrations (g L^{-1}) at the start and at the end of the culture, respectively. $X_{max_{mix}}$ (gDW L^{-1}) represents the maximal DW concentration in the mix condition. $Y_{x/glucose}$ and $Y_{x/acetate}$ (gDW g^{-1}) are the biomass yields of *A. protothecoides* calculated based on the glucose and acetate conditions, respectively.

Cell count of additional analyses on *E. gracilis* grown on KH or TMP medium was performed using a Thoma counting chamber.

pH measurement and nutrient quantification

For pH, carbon source, ammonium, and phosphate quantification, 2 mL of culture medium were harvested and centrifuged ($16,000 \times g$; 3min). Supernatant was stored at -20°C before quantification.

pH. pH was measured in 1 mL of culture supernatant using a pH-meter probe (HANNAH® instruments Edge® Dedicated pH Meter, USA).

Carbon sources. Glucose, xylose and acetate concentrations in the culture supernatant were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu, Japan) as described in [20]. Concentrations were determined based on the peak area of the chromatogram, compared to standard curves of known glucose, acetate, or xylose concentrations. Injection volume was 40 μL for all samples.

Ammonium. Ammonium concentration in the culture medium was determined using the enzymatic method provided by the Megazyme® Ammonia Assay Kit (Rapid) (Neogen® corporation, USA) in 96-well plate. Concentrations were calculated based on a standard curve of known NH_4Cl concentrations ranged between 0 and 1 μg of NH_4^+ per well.

Phosphate. The determination of the phosphate concentration in the culture medium was based on a colorimetric method from [65] performed in a 96-well plate and already described in a previous paper [20]. Concentrations were calculated based on a standard curve of known KH_2PO_4 concentrations ranged between 0 and 0.75 mM of PO_4^{3-} per well.

Pigment quantification. Hydrophobic pigments were separated by HPLC (Shimadzu, Japan) using a reverse-phase C18 column (Nova-Pak silica column, 3.9 x 150 mm, 4 μm particle size, Waters, USA) and detected with a photodiode array detector SPD-M20A (PDA, Shimadzu, Japan) as previously described [20]. The identity of each pigment was determined based on the retention time and the specific absorbance spectrum in the visible light. Quantification was done by comparison with pure pigments at different concentrations (DHI Lab Products, Denmark). Injection volume was ranged between 10-100 μL for all samples. Pigment content was normalized on the dry biomass concentration.

Hydrophilic pigments. Phycocyanin concentration in *G. sulphuraria* cells was estimated spectrophotometrically (Perkin-Elmer lambdaTM 265 UV/VIS, USA) as described previously in [20]. The blue supernatant was used to calculate the phycocyanin concentration spectrophotometrically with the formulas reported in [66]. Phycocyanin content was normalized on the dry biomass concentration.

Protein quantification. Protein concentration of frozen pelleted cells (2-4 mL of culture) was quantified using a *RCDC*TM Protein Assays kit (BioRad, USA) based on a modified Lowry assay [67], that is detergent compatible as described previously [20]. Concentrations were calculated based on a standard curve of known bovine serum albumin (BSA) concentrations ranged between 0 and 3 mg mL^{-1} of the solubilization solution mentioned above. Protein content was normalized on the dry biomass concentration.

Glycogen, paramylon and starch quantification. Paramylon content in *E. gracilis* was quantified using a colorimetric method based on the phenol-sulfuric acid assay [68]. 5-10 mL of culture pellet were washed twice in TMP without carbon source and resuspended in 1 mL of Tris-acetate buffer (25 mM, pH7.5). 0.5 mm \varnothing glass beads were added to the tubes and cells were disrupted with a TissueLyzer II (Qiagen, Netherlands) for 5 min at 30Hz. Cell debris were washed twice in Tris-acetate buffer (25 mM, pH7.5) and pelleted (800 x g, 10 min) into a new 2 mL test tube. To separate the insoluble paramylon from the cell debris, the pellet was resuspended in 1 mL of 80% Percoll[®] solution and transferred on the top of 1 mL of 80% Percoll[®] solution in a 2 mL test tube. The samples were centrifuged at 10,000 x g for 10 min and the supernatant containing the debris was discarded. The paramylon-rich pellet was washed twice with distilled water to eliminate the Percoll[®] and finally resuspended in 500 μL distilled water. 40 μL of each sample were placed in a 96-well plate with dilutions from 1 to 1/128 to fit in the standard curve range, before adding 20 μL of 5% phenol solution and 100 μL of H_2SO_4 95-98% to each well. After an incubation at 80°C for 45 min, the absorbance of the 96-well plate was read spectrophotometrically at 490 nm (Synergy Mx, Biotek Instruments, Inc., USA). Paramylon concentrations were calculated based on a standard curve of known glucose

concentrations ranged between 0 and 0.3 g L⁻¹. The final paramylon concentration was normalized on the dry biomass concentration. Glycogen in *G. sulphuraria* or starch in *A. protothecoides* were determined with an enzymatic method as previously described in [20], with some modifications. All enzymes were provided by Megazyme® (Neogen® corporation, USA). 2-4 mL of culture were pelleted and washed twice in the culture medium with no carbon source. Cells were disrupted with a TissueLyzer II (Qiagen, Netherlands) for 2x10 min at 30Hz (5 min break on ice between the two lysing steps) in the presence of 700 µL of Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.5) and 0.5 mm Ø glass beads. Samples were then centrifuged (16,000 x g; 5 min) and the supernatant (containing soluble starch or glycogen) was transferred into a new 1.5 mL tube. DMSO 20% were added to the insoluble starch-containing pellet. Megazyme® thermostable α-amylase (10-times diluted in 100 mM acetate buffer, pH 5) was added to all samples (insoluble in DMSO 20% and soluble) and the tubes were placed at 99°C for 10 min under constant agitation. During this step, the insoluble starch could be solubilized. Samples were centrifuged and the supernatant was transferred into a 96-well plate. Samples were then incubated for 30 min at 58°C Megazyme® Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* was used to break the α-1,4-glycosidic bonds. In the presence of NADP and ATP, 100 µL of a Megazyme® mix of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase generated one molecule of 6-phosphogluconolactone and one molecule of NADPH per molecule of glucose. NADPH formation was measured at 340 nm spectrophotometrically (Synergy Mx, Biotek Instruments, Inc., USA). Soluble starch (or glycogen) and insoluble starch concentrations were calculated based on a standard curve of known glucose concentrations ranged between 0 and 1 g L⁻¹. The final starch or glycogen concentration was calculated by summing the soluble and insoluble fractions. This total storage polysaccharide concentration was normalized on the dry biomass concentration.

Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) quantification. Fatty acids quantification and distribution were determined as previously described in [20,69]. 2-4 mL of culture were pelleted and resuspended in chloroform/methanol (2:1, v/v). The quantification of FAMES was based on the peak area, using an external calibration curve realized with a FAMES mix, suitable for microalgae fatty acids determination (Supelco37, Sigma-Aldrich, USA). Total fatty acid content was calculated by summing all the separated FAMES concentrations. Fatty acid content was normalized on the dry biomass concentration.

Results and discussion

All the data for *G. sulphuraria* grown on glucose are from a previous study conducted by the present research group and can be found in the following article : [20].

Growth parameters analysis

(i) With glucose

In this study, *E. gracilis* was cultivated under neutral pH conditions. This choice was made because, at pH values below 5, certain organic acids including formate, propionate, butyrate, and acetate (the latter being particularly relevant here as it is a component of hemicellulose hydrolysate)-exist in their lethal non-dissociated forms [70,71]. This consideration is further discussed in section (iv) which addresses the assimilation of glucose, xylose, and acetate. Unfortunately, *E. gracilis* did not grow in the presence of glucose under the tested culture conditions (**Fig. 2A**). This result is surprising since, even if growth rates are slightly lower compared to the low pH conditions (pH 3.5-5) [71–74], growth in the presence of glucose at pH close to 7 has been reported in various studies [71–74]. This prompted us to conduct additional experiments on two media: TMP and KH [58] at pH levels of 3.5 and 7.5. The results demonstrated that *E. gracilis* strain Z is unable to grow on glucose on TMP at either pH (**Supplemental Table S2**). In contrast, the strain can grow on glucose in the KH medium, but only at pH 3.5. As expected, neither KH nor TMP sustain growth on acetate at pH 3.5 due to the toxicity of acetate at acidic pH levels (**Table S2** and discussion below). A key component present in KH and a significant factor in *E. gracilis* (strain Z) growth on glucose, but absent in TMP, is citrate [24,71]. Some studies have found that sodium citrate, even if not assimilated, may play an important chelating role in glucose metabolism during neutral pH adaptation, as no growth was observed in a mineral medium containing only glucose as carbon source [75]. A similar observation was made when citrate (50 mg.L⁻¹) was replaced by EDTA (10 mg.L⁻¹), suggesting that a chelating agent may be necessary for glucose assimilation at pH 7.0 [75]. The TMP-medium used in this study contains EDTA at a concentration of 50 mg.L⁻¹, which may be slightly too high to effectively promote glucose assimilation as the same study found that a concentration of 100 mg.L⁻¹ of EDTA did not have a positive effect in the same context [75]. Chelators likely facilitate the entry of essential metallic ions in the cell and/or capture inhibitory heavy metals. However, their exact role in carbon metabolism remains unclear, as they are not required for acetate assimilation (see section (iii) on acetate). Further experiments could be conducted using TMP medium supplemented with citrate to evaluate the importance of this molecule in the context of glucose assimilation. Since the aim of the paper is growth analysis on a mix of the three carbon sources mentioned previously, including acetate, the choice of the TMP medium for both *E. gracilis* and *A. protothecoides* is relevant.

In contrast, as already shown in a previous study conducted in the laboratory [20] and reported here for comparison, *G. sulphuraria* showed a specific growth rate (μ) of $1.10 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$, a

maximum biomass productivity yield of $1.62 \pm 0.22 \text{ gDW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, a maximal biomass production of $2.37 \pm 0.34 \text{ g L}^{-1}$ and a biomass yield ($Y_{x/s}$) of $0.53 \pm 0.08 \text{ gDW g}_{\text{substrate}}^{-1}$ in the presence of glucose (**Fig. 2A; Table 2**). After 4 days of culture, the stationary phase was reached due to glucose depletion. These growth parameters are similar to those reported in the literature [30]. Finally, *A. protothecoides* showed an exponential growth in the presence of glucose only during the first day but with exceptionally high growth parameters compared to the literature [29,76,77]: a specific growth rate of $3.29 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$, a maximum biomass productivity yield of $1.77 \pm 0.22 \text{ gDW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and a biomass yield of $0.54 \pm 0.04 \text{ gDW g}^{-1}$, comparable to *G. sulphuraria* (**Table 2**). However, the growth stopped abruptly at day 2. By the end of the culture only about 50 mMC have been consumed (**Fig. 2A**), resulting in low biomass production ($0.78 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$) compared to the other species of this study (**Table 2**). Given that the growth of most *Chlorella* species is typically compromised at pH levels below 5 [77–80], we suggest that the growth arrest observed in *A. protothecoides* cells cultivated with glucose is likely due to rapid medium acidification during glucose consumption.

Effectively, glucose consumption lowers the pH in both *G. sulphuraria* and *A. protothecoides* cultures, dropping from 2.05 ± 0.02 to 1.83 ± 0.03 and from 7.05 ± 0.03 to 2.87 ± 0.05 , respectively (**Fig. 2B**). Such pH imbalance was reported before in similar conditions [79,80] and can result from various factors, one of which is the production of CO_2 in response to respiratory metabolism, leading to a decrease in pH due to the molecule dissolution in water, forming carbonic acid that dissociates into bicarbonate and protons [60]. Therefore, it can be inferred that the accumulation of CO_2 , triggered by the rapid growth rate of the algae (**Table 2**) in the presence of glucose, played a significant role in the acidification of the culture medium. Another significant process contributing to pH acidification could be the metabolism of ammonium through the GS-GOGAT pathway (**Fig. 1**), wherein a proton is released into the medium for every assimilated ammonium molecule [60]. To address the problem of medium acidification that is lethal to most *Chlorella* species, another buffer like PIPES with a lower pKa (pKa=6.76) than the Tris used in this study (pKa=8.3) could be used or an automatic pH monitoring [78,82]. Additionally, many *Chlorella* species can assimilate nitrate, which, unlike ammonia, tends to raise pH with non-lethal effects [60,77,81].

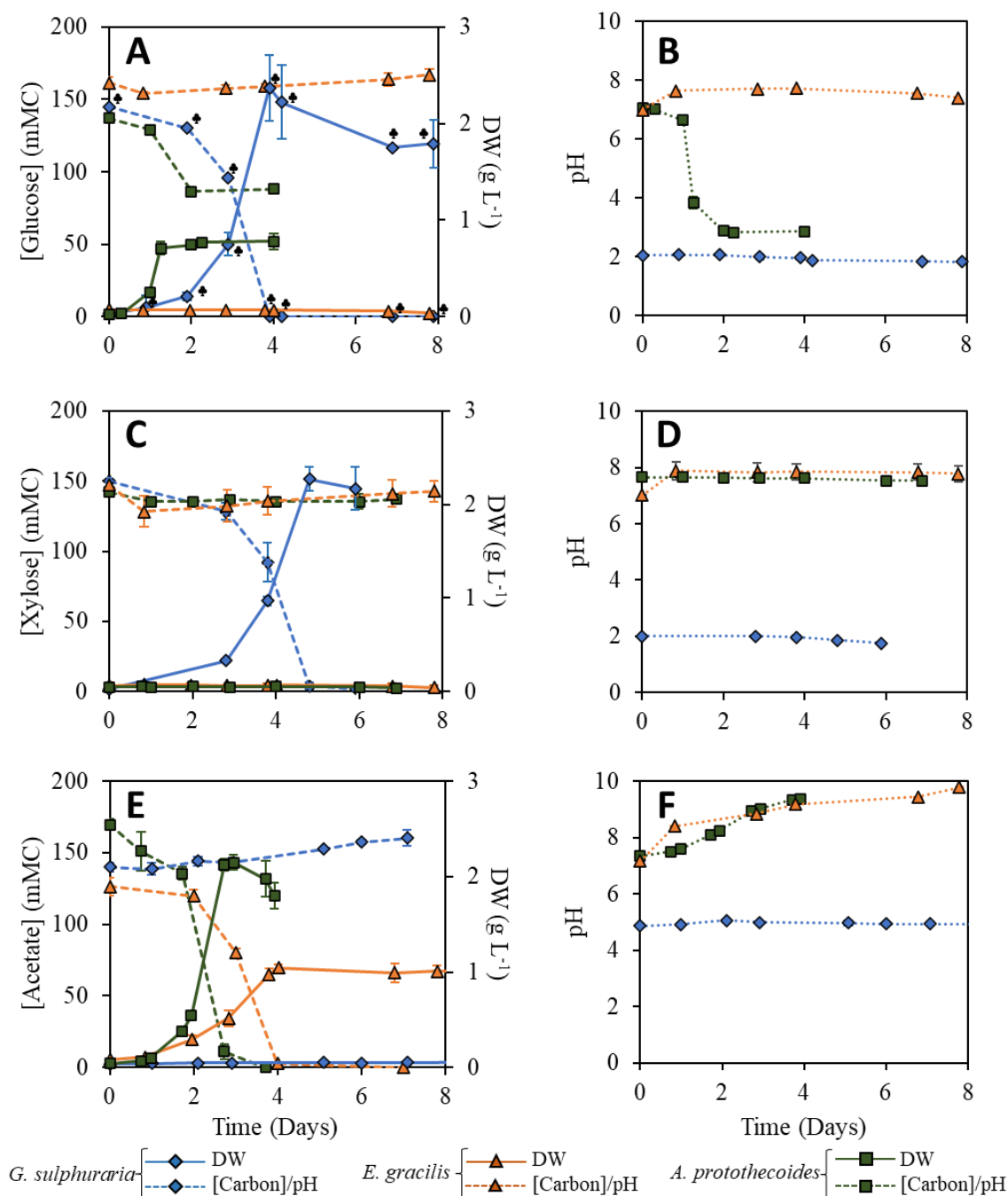


FIGURE 2: Growth curves, and evolution of carbon sources concentration and pH in the culture media of *G. sulphuraria* (light blue diamonds), *E. gracilis* (orange triangles), and *A. protothecoides* (dark green squares) cells grown in heterotrophy in the presence of glucose (A-B), xylose (C-D), or acetate (E-F). Graphs (A,C,E) show dry weight evolution (gDW L⁻¹ - solid lines, secondary vertical axis) and carbon source concentration in the media (mM of carbon atoms - dashed lines, primary vertical axis) over time (days). Graphs (B,D,F) show the pH evolution in cultures (pH units - dashed lines, primary horizontal axis) over time (days). Each value on the graphs is presented as the mean of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation of the mean (\pm SD). The clover symbol (♣) indicates values for *G. sulphuraria* grown on glucose from a previous study conducted in our laboratory [20].

(ii) With xylose

In the presence of xylose assimilation as sole carbon source in heterotrophy no growth was observed for both *E. gracilis* and *A. protothecoides*, as reported previously [76,83] (**Fig. 2C**). In contrast, *G. sulphuraria* was able of growing in the presence of xylose as sole carbon source (**Fig. 2C**). Exponential phase lasted 5 days, with a specific growth rate of $0.97 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$, a biomass yield of $0.51 \pm 0.01 \text{ gDW g}^{-1}$, and a maximum biomass productivity of $1.31 \pm 0.08 \text{ gDW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. These results are comparable to those mentioned in [30], except for the biomass yield that is about 30% higher in this case, indicating that xylose can be used as an effective carbon source by *G. sulphuraria* for biomass production (**Table 2**). With *G. sulphuraria* apart, to the best of our knowledge, *C. sorokiniana* and some *Scenedesmaceae* such as *Scenedesmus quadricauda* are exceptions that demonstrated xylose uptake when used as the sole carbon source in heterotrophic condition [41,43,44]. Nevertheless, compared to the mentioned xylose-metabolizing species, *G. sulphuraria* stands out as the most promising microalga for converting xylose into biomass.

(iii) With acetate

G. sulphuraria did not grow in the presence of acetate. At the beginning of the culture, the addition of 75 mM sodium acetate to the pH 2 medium leads to a pH increase to approximately 5 due to the buffering action of the acetate/acetic acid buffer system, where acetate ions react with hydronium ions, consuming them and thereby elevating the pH while remaining within the buffering range ($\text{pKa}=4.8$) (**Fig. 2F**) [84]. Given that a pH superior to 5 impedes *G. sulphuraria* growth, we attempted to lower the pH to 2 using sulfuric acid after the addition of sodium acetate. Nonetheless, adjusting the pH had no positive effect on growth and acetate assimilation, indicating that *G. sulphuraria* is not able to use acetate as sole carbon source. *A. protothecoides* was capable of more efficient acetate assimilation and metabolization than *E. gracilis* since specific growth rates of $1.74 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$ and $0.73 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$, and biomass yield of 0.42 ± 0.02 and $0.26 \pm 0.02 \text{ gDW g}^{-1}$ were monitored, for a total of 2 and 3 days of exponential phase, respectively (**Fig. 2E; Table 2**). The specific growth rate for *E. gracilis* was lower compared to other studies on the same strain. For instance, a specific growth rate of 1.28 d^{-1} was obtained in [71], but with a significantly reduced biomass yield of 0.11 g.g^{-1} on an inorganic medium supplemented with 30 mM of acetate. Due to the toxicity of acetate at pH levels below pKa (4.8), the researchers confirmed that biomass production was optimal at nearly neutral pH, with little variation observed between pH 6 to 9 [71]. Acetate consumption resulted in a pH elevation for both *E. gracilis* and *A. protothecoides* raising the pH of the culture from 7.16 ± 0.01 to 9.78 ± 0.02 and 7.33 ± 0.03 to 9.36 ± 0.03 , respectively (**Fig. 2F**). pH elevation during acetate consumption has been reported in other studies as well [40,71,84]. Like for glucose which enters the cell using the hexose/ H^+ symport system [36], acetate uptake into the cytoplasm is also accompanied by the uptake of a proton via the monocarboxylate/proton symport (MCT) system [37,85]. Nevertheless, since acetate and glucose have two and six carbon atoms, respectively, acetate transportation will tend to remove 3-times more H^+ to the cultivation medium for an equivalent

amount of carbon atoms assimilated. This might be the primary reason for such pH elevation during acetate metabolization.

(iv) In a mix of glucose, acetate and xylose

The final condition investigated was an equimolar mixture of the three previously mentioned carbon sources. Even if the condition does not exactly mimic the composition of hardwood hemicellulose hydrolysate [34], it gives an insight of the ability of each strain to grow in the presence of such substrate. *G. sulphuraria* did not grow under this condition, despite the presence of glucose and xylose that could be assimilated when provided alone (**Fig. 3A**). Acetate toxicity in acidic conditions has been demonstrated in various microorganisms such as fungi, bacteria, archaea, and microalgae [40,70,71,86–90]. An acidic environment such as the low pH (pH=2) used for optimal *G. sulphuraria* or *E. gracilis* growth, promotes the formation of acetic acid. Contrary to their dissociated form, the non-dissociated form of some organic acids, directly related to their lipophilic nature when protonated, diffuse passively through the cell membrane contrary to free protons that are blocked by diverse mechanisms in acidophilic organisms [91]. The consequence is an acidification of the cytosol, perturbing the proton gradient used for ATP synthesis [40] and enzymatic reactions [91,92]. Other studies on the heterotrophic growth of *G. sulphuraria* have also shown growth inhibition in the presence of low amounts of organic acids such as acetate and butyrate [30,89]. Experiments on *G. sulphuraria* strain UTEX 2919 on a mixture of glucose and acetate revealed similar results, demonstrating that glucose consumption and growth were inhibited in the presence of acetic acid in concentrations superior to 0.6 g L^{-1} (approx. 10 mM) [30]. However, below that threshold, representing around 40% of the tested acetate concentration in this study (25 mM), the *G. sulphuraria* was able to detoxify the medium and even metabolize acetic acid, prior to start glucose consumption [30]. Organic acid consumption and detoxification has already been shown in other acidophilic microorganisms such as archaea species but seems to be limited to low organic acids concentrations [90,91]. Another study, focusing on the utilization of a wide range of carbon sources by *G. sulphuraria* 074G in the presence of light, shows that not all organic acids are toxic, since malic and citric acids had either a negative or positive effect on growth compared to phototrophic growth [88]. In addition, among the variety of the tested carbon sources (hexoses, pentoses, polyols and amino acids), none of them triggered growth inhibition. These results suggest that toxicity of the carbon source is truly mediated by the lipophilic nature of the non-dissociated form of some molecule such as organic acids at in low pH conditions [88].

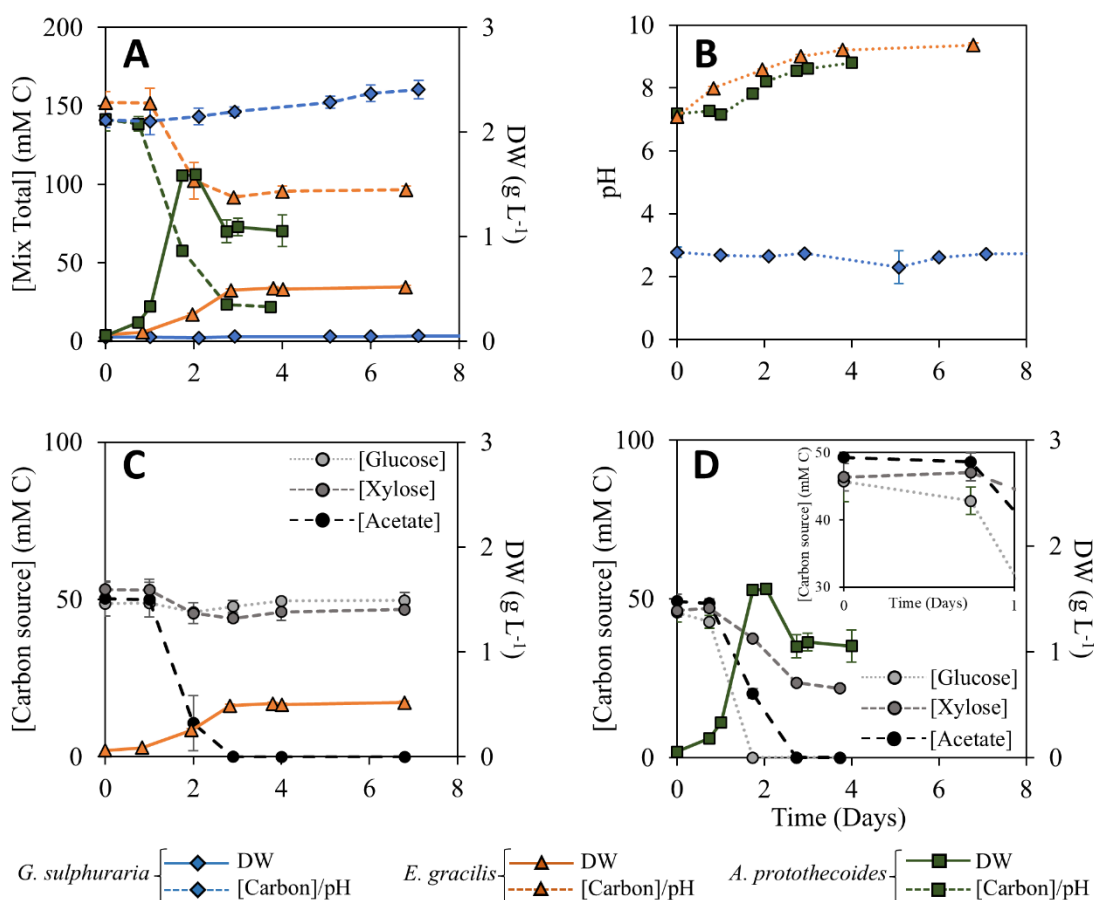


FIGURE 3: Growth curves, and evolution of carbon sources concentration and pH in the culture media of *G. sulphuraria* (light blue diamonds), *E. gracilis* (orange triangles), and *A. protothecoides* (dark green squares) cells grown in heterotrophy in the presence of a mix of glucose, xylose and acetate (A-D). Graphs (A) shows dry weight evolution (gDW L^{-1} - solid lines, secondary vertical axis) and carbon source concentrations in the media (mM of total carbon atoms - dashed lines, primary vertical axis) over time (days). Graphs (B) show the pH evolution in cultures (pH units - dashed lines, primary vertical axis) over time (days). Graphs (C) and (D) show the glucose (dashed line, light gray circles) xylose (dashed line, dark gray circles), and acetate (dashed line, black circles) consumption (mM of carbon atoms - primary vertical axis) over time (days) in cultures of *E. gracilis* or *A. protothecoides*, respectively. In graph (D), the inset shows the carbon source evolution from day 0 to day 1. Each value on the graphs is presented as the mean of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation of the mean (\pm SD).

E. gracilis, as expected from the other conditions, did not consume glucose and efficiently assimilated acetate with a comparable biomass yield as with acetate alone ($0.28 \pm 0.04 \text{ gDW g}^{-1}$) (**Fig. 2A; Table 2**). However, a slight decrease in xylose concentration from $53.15 \pm 2.34 \text{ mM C}$ to $44.00 \pm 1.17 \text{ mM C}$ was observed between day 1 and day 3 (**Fig. 3C**). While xylitol uptake has been shown to support the growth of *E. gracilis* in mixotrophic conditions [93], to the best of our knowledge, xylose diminution in heterotrophic cultivation conditions has not been previously reported for Euglenoids. Given that some xylose-containing polysaccharides are present in the cell composition of *E. gracilis* [94,95], it is plausible that this alga can recycle xylose-containing compounds [95]. Nonetheless, since no xylose was consumed when present as the sole carbon source, it suggests that the main challenge lies in xylose transport through the cell membrane. This assumption raises questions about how xylose uptake was facilitated in this condition. Further experiments using ^{13}C -labeled xylose should be

conducted to confirm xylose uptake and metabolization, or to understand the xylose concentration decrease within the cultivation medium.

A. protothecoides was the only candidate able to metabolize the three carbon sources when provided together and efficient growth was observed, lasting 2 days before growth arrest (**Fig. 3A,D**). As expected from the cultures conducted with the carbon sources alone, glucose and acetate were consumed, leading to comparable biomass yield to acetate conditions (0.43 ± 0.02 gDW g⁻¹ for the mix and 0.42 ± 0.02 gDW g⁻¹ with acetate) (**Table 2**) and a specific growth rate slightly higher than with acetate alone, but far from that observed with glucose (1.94 ± 0.04 d⁻¹ for the mix, 3.29 ± 0.01 d⁻¹ with glucose and 1.74 ± 0.09 d⁻¹ with acetate). As can be seen in **Fig. 3D**, glucose was preferentially consumed over acetate since glucose is depleted between day 1 and day 2, when acetate is still present. Because of the lack of sampling between these two points, it is not possible to determine if acetate uptake starts before or after complete glucose depletion. These observations remind the carbon catabolite repression (CCR) found in many microorganisms such as bacteria [83] and yeasts [98–100] which usually leads to a preference for consuming glucose or acetate over 'secondary' carbon sources. Nevertheless, there is no clear evidence that such a mechanism can occur in *A. protothecoides*. Experiments in the presence of acetate and a non-metabolized glucose analogue like 2-deoxy-d-glucose should be performed to either demonstrate a CCR mechanism or to show that the assimilation rate is specific the carbon source catabolism.

TABLE 2: Growth parameters of *G. sulphuraria*, *E. gracilis*, or *A. protothecoides* in the presence of different substrates. Data are presented as means of three independent biological replicates \pm SD. NG: no growth was observed for that strain and condition. The clover symbol (♣) indicates values for *G. sulphuraria* grown on glucose from a previous study conducted in our laboratory [20].

Carbon substrate	Strain	Specific growth rate μ (d ⁻¹)	Max DW (g L ⁻¹)	Max DW productivity (gDW L ⁻¹ d ⁻¹)	Biomass yield
					$Y_{(x/y)}$ (gDW g _{substrate} ⁻¹)
Glucose	<i>G. sulphuraria</i>	1.10 ± 0.03 ♣	2.37 ± 0.34 ♣	1.62 ± 0.22 ♣	0.53 ± 0.08 ♣
	<i>A. protothecoides</i>	3.29 ± 0.01	0.78 ± 0.08	1.77 ± 0.22	0.54 ± 0.04
	<i>E. gracilis</i>	NG	NG	NG	NG
Xylose	<i>G. sulphuraria</i>	0.97 ± 0.03	2.27 ± 0.13	1.31 ± 0.08	0.51 ± 0.01
	<i>A. protothecoides</i>	NG	NG	NG	NG
	<i>E. gracilis</i>	NG	NG	NG	NG
Acetate	<i>G. sulphuraria</i>	NG	NG	NG	NG
	<i>A. protothecoides</i>	1.74 ± 0.09	2.15 ± 0.08	2.00 ± 0.03	0.42 ± 0.02
	<i>E. gracilis</i>	0.73 ± 0.02	1.04 ± 0.03	0.47 ± 0.08	0.26 ± 0.02
Mix	<i>G. sulphuraria</i>	NG	NG	NG	NG
	<i>A. protothecoides</i>	1.94 ± 0.04	1.59 ± 0.03	1.72 ± 0.03	0.43 ± 0.02
	<i>E. gracilis</i>	0.87 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.04

In addition, besides the expected depletion of acetate and glucose, a significant reduction of xylose concentration was also detected for *A. protothecoides* (from 46.3 to 21.9 mM carbon equivalent) despite no growth was stated in the presence of xylose alone (**Fig. 2C**). In the mixture, xylose assimilation started after one day of culture and accelerated until day 3, one day after reaching

the stationary phase (**Fig. 3D**). This behavior with xylose in the presence of another carbon source has been previously documented in *A. protothecoides* and other microalgae [41,76,101,102]. As *A. protothecoides* was unable to consume xylose as the sole carbon source in our study, its uptake in the mix condition could be attributed to the induction of the glucose-induced hexose transporter [41]. Indeed, if xylose is assimilated through the same transporters as glucose but with lower affinity, it can explain why xylose uptake starts when glucose is completely depleted (**Fig. 3D**). Consequently, rapid glucose depletion could have stopped the glucose-induced xylose transport within the cell, explaining that only half of the xylose was consumed by the end of the culture (24.5 mM). In a study of *A. protothecoides* cultivation with glucose and reducing sugars (arabinose and xylose) provided in nearly similar concentrations, but more elevated compared to this study (14-16 g L⁻¹ and 20 g L⁻¹, respectively, Chen et al. (2015)[101] reported a delayed pentose (xylose and arabinose) assimilation compared to hexose assimilation, with pentose concentration in the medium gradually decreasing after glucose/hexose depletion and after reaching the stationary phase. Even if metabolized in specific context, the authors assessed that, during batch fermentation in a 5-L stirred tank bioreactor, the global pentose consumption rate was approximately 10-fold lower than the hexose consumption rate [101].

Using the formulas detailed in the **Material & Methods** section, the biomass yield on xylose $Y_{x/xylose}$ was calculated based on the biomass yields on glucose and acetate as sole carbon source, the amount of acetate, glucose and xylose consumed in the mix, and the maximal DW concentration achieved in this condition ($X_{max,mix}$). Since biomass yields on glucose and acetate as sole carbon source were 0.54 gDW g_{glucose}⁻¹ and 0.42 gDW g_{acetate}⁻¹, respectively, the estimated biomass yield on xylose was 0.34 gDW g_{xylose}⁻¹, for *A. protothecoides* grown in heterotrophy in a glucose-induced environment. Even if the deduced biomass yield is lower compared to those calculated during the utilization of acetate and glucose, it is noteworthy that xylose could be utilized to generate biomass for *A. protothecoides*, when grown in heterotrophy in a glucose-supplemented environment. In addition, biomass yield on xylose is practically never exposed for heterotrophic microalgae and the value calculated in this study is close to those observed for bacterial and fungal wild-type species such as *E. coli* and *S. cerevisiae* [44,103–105].

The mixed carbon source condition offered another non negligible advantage. Indeed, when looking at (**Fig. 3B**), we can see that pH imbalance was reduced compared to the sole carbon source conditions (glucose and acetate), enabling the complete utilization of acetate and glucose introduced at the start of the culture. This is likely attributed to the balance between glucose, ammonium, and acetate metabolisms, which lowers and raises the pH, respectively. Consequently, this mixed condition appears to be the best optimal choice for *A. protothecoides* compared to the other conditions biomass production, with the added benefit of xylose valorization.

Quantitative and qualitative analysis of the biomass composition of each strain looking at the growth-effective carbon source.

Samples were collected at the exponential and stationary phases for each strain in the conditions in which growth was detected. In such case, the fatty acid, glycogen, paramylon or starch, and protein and pigment contents were investigated.

(i) Protein content

In this study, regardless of the conditions or strains, the protein content ranged between 15% and 35% of the total dry weight (**Fig. 4A**).

As shown in our previous work [20], *G. sulphuraria* grown on glucose exhibited a total protein content of $32 \pm 3\%$ during exponential phase and $28 \pm 3\%$ during stationary phase (**Fig. 4A**). When grown on xylose, the microalgae showed a total protein content of $24 \pm 2\%$ and $30 \pm 4\%$, during the exponential and the stationary phase, respectively (**Fig. 4A**). These results are consistent with those reported for *G. sulphuraria* in heterotrophic conditions [10]. To our knowledge, the value of 32% with glucose is the highest reported protein content similar to [11].

Concerning *E. gracilis*, the protein content was $18 \pm 3\%$ and $34 \pm 7\%$ in the mix of all carbon sources during the exponential and stationary phases, respectively, while it remained stable at $28 \pm 2\%$ during growth with acetate only (**Fig. 4A**). These results align with literature when *Euglena* is cultivated in the presence of glucose [13,24]. The protein content may vary from 10% to 52% depending on the nitrogen source, with ammonium sulfate being the most effective [24]. The carbon-to-nitrogen (C/N) ratio also significantly impacts protein content that is decreasing proportionally to the increase of the ratio. In the presence of acetate as the sole carbon source, the C/N ratio remains constant (≥ 20) as both carbon and nitrogen sources are consumed simultaneously until near depletion. However, when acetate is no longer available in the mix, ammonium persists. Therefore, it is assumed that the C/N ratio decreases as the stationary phase approaches, eventually leading to an increase in protein content.

The C/N ratio variations may also explain why *A. protothecoides* exhibited a protein content ranging from $16 \pm 1\%$ in the presence of glucose to $31 \pm 2\%$ in the presence of acetate during the exponential phase (**Fig. 4A**). Indeed, the C/N ratio is maintained higher in the presence of glucose (around 35), since the sugar consumption led to rapid growth cessation due to pH drop (**Fig. 3B**). While protein content doubles when stationary phase is reached in the presence of glucose, an opposite behavior can be noticed in the presence of acetate (**Fig. 4A**). This observation could be attributed to the rapid consumption of ammonium in the presence of acetate, subsequently reducing the C/N ratio below 1. An intermediate protein content ranged between $22 \pm 4\%$ and $30\% \pm 2\%$ was obtained under mix conditions regarding both growth phases (**Fig. 4A**). Although some studies reported a low protein

content for *Chlorella* species such as *A. protothecoides* UTEX 25 in heterotrophy (4.3%) [18,106], they are typically known to accumulate 25-50% protein in dry weight, even in heterotrophic conditions [24,72,107].

In conclusion, heterotrophy is not an ideal growth cultivation for protein accumulation, and the carbon source has a low impact on the total protein content under our conditions for any of the strains. Protein content could be enhanced or reduced using different nitrogen sources or by manipulating the C/N ratio at various points during cultivation.

(ii) Pigment content and profile

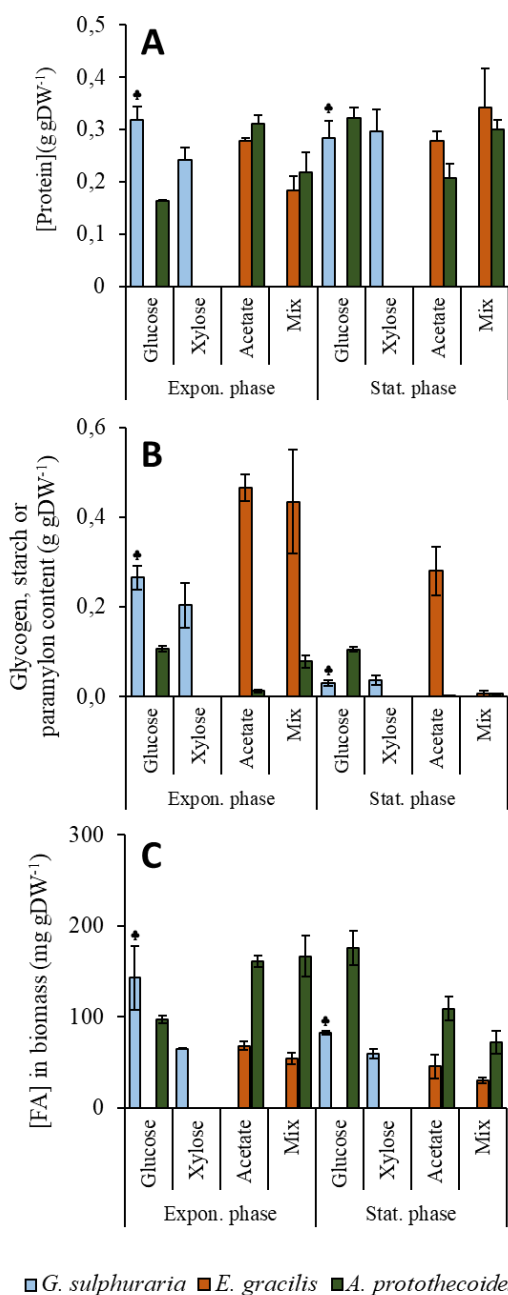


FIGURE 4: Total fatty acids, storage polysaccharides (glycogen, paramylon or starch), and protein content of *G. sulphuraria* (light blue bars), *E. gracilis* (orange bars), and *A. protothecoides* (dark green bars) cultures grown in heterotrophy in the presence of glucose, xylose, acetate, or a mix of the three carbon sources, during exponential or stationary phases. Bar charts (A) and (B) show the protein and storage polysaccharide content in biomass (expressed in g gDW⁻¹), respectively. Bar chart (C) shows the fatty acids content in biomass (expressed in mg gDW⁻¹). Data represent the mean of three independent biological replicates. Error bars represent the standard deviation of the mean (± SD). The clover symbol (♣) indicates values for *G. sulphuraria* grown on glucose from a previous study conducted in our laboratory [20].

It is widely documented that pigment content is low or even unmeasurable in heterotrophic conditions contrasting with phototrophic conditions because light exposure is essential for pigment synthesis. *G. sulphuraria* strain 074W exhibited dramatically diminished pigment content in the presence of glucose like previously reported in our lab [20] or xylose (Table S1). Consistent with these findings, *E. gracilis* exhibited extremely low pigment content and chlorophylls were completely absent, as reported in other studies conducted in heterotrophic conditions [24]. The pigment content of *A. protothecoides* was also very low during heterotrophic cultivation (Table S1), in line with previous reports [18,19,21]. Amongst the three carbon sources studied, glucose appears to have the most significant impact on photosynthetic pigment content. Specifically, when glucose is present, the total chlorophyll content is three times lower than in

the presence of acetate during exponential phase. Conversely, when glucose is depleted in the stationary phase, the chlorophyll levels are like those observed in the acetate condition, confirming the major influence of glucose on pigment accumulation. The impact of glucose on photosynthetic metabolism may involve different mechanisms that are not completely elucidated. Transcriptional analysis of *G. sulphuraria* performed in our laboratory showed that glucose have a negative effect on photosynthesis and pigment components compared to glycogen in heterotrophy [20], or in the presence of light in mixotrophy [88]. In the green microalga *Chromochloris zofingiensis* grown mixotrophically, exogenous glucose has an impact on gene expression mediated by the hexokinase (HXK1) that subsequently represses photosynthetic-related genes at a transcriptional level [108]. As discussed by the authors [108], the role of the hexokinase on the photosynthetic machinery and pigments is unknown and could be direct (initiating a signaling cascade) or indirect (involving metabolic intermediates).

(ii) Glycogen, paramylon or starch content

The glycogen content of *G. sulphuraria* cells grown in heterotrophy with glucose, as shown previously [20], or xylose, is not significantly different and accounts for $26 \pm 3\%$ and $20 \pm 4\%$ of the total dry weight in the exponential phase (**Fig. 4B**). Similar biomass proportion was observed in the presence of glycerol (20-36%) and glucose [17,109]. However, other results have shown higher glycogen accumulation in almost similar conditions to those in the present study, sometimes close to 70% of the total biomass [10,11].

In *E. gracilis*, paramylon content was around 45% in both acetate and mix conditions during the exponential phase (**Fig. 4B**). Studies have demonstrated that paramylon content could reach up to 80% of the total DW when cells are grown heterotrophically in the presence of glucose instead of acetate [9,12,13]. Paramylon biosynthesis begins with the conversion of a molecule of glucose to UDP-glucose [13,110]. Given our experimental conditions, which are ATP-consuming since they require acetate conversion into glucose (see **Fig. 1** and [111], it is understandable that the paramylon content would be reduced.

In *A. protothecoides*, the maximum starch content of $11 \pm 1\%$, is found under glucose conditions, while around 1% was detected in the presence of acetate during the exponential phase (**Fig. 4B**). In the mixed condition, starch content reached $8 \pm 1\%$, confirming that glucose is more effective than acetate for starch production, as discussed above.

Overall, our results showed that glycogen, paramylon or starch contents were consistently lower during the stationary phase (**Fig. 4B**). *G. sulphuraria* glycogen content exhibited a significant decrease to 3-4% during the stationary phase. Similarly, *E. gracilis* paramylon content dropped to nearly undetectable levels during the stationary phase in the mix condition (**Fig. 4B**). Typically, microalgae utilize their storage polysaccharides to sustain metabolic activity when carbon sources are depleted, thereby explaining the low content of glycogen, paramylon or starch observed during the stationary phase, as long as other nutrients such as phosphorous and nitrogen are available (**Fig. S1**).

The remaining paramylon content in *E. gracilis* in acetate (**Fig. 4B, Fig. S1**) could be due to the absence of ammonia impeding paramylon catabolism, which was not the case for the mix condition (**Fig. 4B, Fig. S1**). One exception noted is *A. protothecoides* in the presence of glucose, possibly due to metabolic arrest triggered by low pH conditions.

CHAPITRE IV

TABLE 3: Fatty acids distribution in exponential and stationary phases when growth was observed in the presence of glucose, xylose, acetate or a mix of the three carbon sources for *G. sulphuraria*, *E. gracilis*, or *A. protothecoides*. SFA, saturated fatty acids; MUFA, mono-unsaturated fatty acids; PUFA, poly-unsaturated fatty acids. Data are expressed as a percentage of the FA species on the total FAs detected. Values represent the means \pm SD (n=3). ND: the FA species was not detected. The clover symbol (♣) indicates values for *G. sulphuraria* grown on glucose from a previous study conducted in our laboratory [20].

Fatty acid distribution in exponential phase

Fatty Acid	<i>G. sulphuraria</i>			<i>E. gracilis</i>			<i>A. protothecoides</i>			
	Glucose	Xylose	Acetate	Mix	Glucose	Acetate	Mix	Glucose	Acetate	Mix
C14:0	0.8 \pm 0.1 ♣	1.8 \pm 1.4	8.3 \pm 0.4	8.0 \pm 5.2	1.4 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2			
C16:0	29.7 \pm 1.1 ♣	38.4 \pm 0.9	31.3 \pm 1.8	36.5 \pm 1.7	21.8 \pm 0.3	17.3 \pm 0.5	21.4 \pm 0.5			
C16:1	ND	ND	0.9 \pm 0.8	0.5 \pm 0.8	0.4 \pm 0.1	0.8 \pm ND	0.5 \pm ND			
C17:0	3.0 \pm 0.9 ♣	2.0 \pm 0.1	0.6 \pm 0.5	0.9 \pm 1.2	ND	ND	ND			
C17:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
C18:0	21.0 \pm 0.3 ♣	18.4 \pm 1.1	20.5 \pm 0.3	26.5 \pm 1.2	9.9 \pm 0.8	6.7 \pm 0.5	12.2 \pm 0.6			
C18:1n9t	1.2 \pm 1.1 ♣	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
C18:1n9c	7.1 \pm 0.4 ♣	16.9 \pm 0.6	3.7 \pm 0.3	3.4 \pm 0.3	30.3 \pm 0.3	41.4 \pm 0.6	35.1 \pm 1.2			
C18:2n6c	13.6 \pm 1.1 ♣	14.5 \pm 1.3	0.5 \pm ND	1.4 \pm ND	27.1 \pm 0.8	27.3 \pm 0.5	24.0 \pm 0.7			
C18:3n3	19.1 \pm 1.3 ♣	3.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.6	ND	8.3 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2			
C20:0	1.8 \pm 0.2 ♣	ND	0.5 \pm 0.5	ND	0.3 \pm ND	0.1 \pm 0.2	0.4 \pm ND			
C20:1n9	ND	ND	0.3 \pm 0.3	ND	ND	0.2 \pm 0.2	ND			
C20:2	ND	1.4 \pm 0.2	5.6 \pm 0.2	4.5 \pm ND	ND	ND	ND			
C20:3n6	ND	ND	1.3 \pm 0.1	ND	ND	ND	ND			
C20:4n6	ND	ND	8.0 \pm 0.5	4.5 \pm 0.3	ND	ND	ND			
C20:3n3	ND	ND	4.0 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	0.4 \pm ND	ND	0.5 \pm ND			
C22:0	ND	ND	2.1 \pm	ND	ND	ND	ND			
C22:1	ND	ND	3.8 \pm 0.2	2.7 \pm 0.1	ND	ND	ND			
C22:2	ND	ND	0.7 \pm 1.2	ND	ND	ND	ND			
C24:0	ND	ND	3.9 \pm 0.3	2.1 \pm 0.1	ND	ND	ND			
C24:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
C22:6n3	ND	ND	3.3 \pm 0.1	4.8 \pm 4.8	ND	ND	ND			
%SFA	59.0 \pm 0.6	62.9 \pm 0.8	67.2 \pm 1.1	75.4 \pm 4.7	33.4 \pm 0.9	25.3 \pm 1.0	35.2 \pm 1.3			
%MUFA	8.3 \pm 0.7	16.9 \pm 0.6	8.8 \pm 0.6	6.7 \pm 0.6	30.6 \pm 0.3	42.5 \pm 0.7	35.6 \pm 1.2			
%PUFA	32.7 \pm 0.5	20.2 \pm 0.1	27.8 \pm 1.3	20.7 \pm 4.2	36.0 \pm 1.2	32.2 \pm 0.5	29.2 \pm 0.9			

ND: The FA was not detected

Fatty acid distribution in stationary phase

Fatty Acid	<i>G. sulphuraria</i>			<i>E. gracilis</i>			<i>A. protothecoides</i>			
	Glucose	Xylose	Acetate	Mix	Glucose	Acetate	Mix	Glucose	Acetate	Mix
C14:0	0.9 \pm 0.0 ♣	0.8 \pm 0.2	6.2 \pm 1.7	3.0 \pm 1.6	1.4 \pm 0.0	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1			
C16:0	29.2 \pm 0.4 ♣	34.3 \pm 0.3	26.5 \pm 3.9	39.1 \pm 1.6	17.2 \pm 0.4	12.9 \pm 0.1	21.0 \pm 0.3			
C16:1	0.4 \pm 0.3 ♣	ND	1.1 \pm 0.1	ND	0.5 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0			
C17:0	3.0 \pm 0.1 ♣	2.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	ND	ND	ND	ND			
C17:1	1.7 \pm 0.0 ♣	0.9 \pm 0.0	ND	ND	ND	ND	ND			
C18:0	7.6 \pm 0.3 ♣	11.7 \pm 0.0	18.9 \pm 2.9	31.3 \pm 2.6	5.2 \pm 0.3	3.1 \pm 0.1	8.7 \pm 0.3			
C18:1n9t	0.5 \pm 0.1 ♣	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
C18:1n9c	15.6 \pm 0.2 ♣	17.8 \pm 0.0	3.9 \pm 0.1	2.9 \pm 0.0	38.7 \pm 0.7	43.0 \pm 0.4	20.4 \pm 0.8			
C18:2n6c	27.0 \pm 0.7 ♣	21.6 \pm 0.4	0.8 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2	28.2 \pm 0.3	33.3 \pm 0.3	38.0 \pm 0.3			
C18:3n3	5.6 \pm 0.2 ♣	4.1 \pm 0.6	1.7 \pm 0.1	ND	8.1 \pm 0.2	4.9 \pm 0.3	10.0 \pm 0.5			
C20:0	0.6 \pm 0.1 ♣	ND	ND	ND	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0			
C20:1n9	0.3 \pm 0.1 ♣	0.5 \pm 0.0	0.2 \pm 0.3	ND	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	ND			
C20:2	2.4 \pm 0.0 ♣	1.6 \pm 0.0	7.1 \pm 0.7	4.4 \pm 0.7	ND	ND	ND			
C20:3n6	ND	ND	1.0 \pm 0.3	ND	ND	ND	ND			
C20:4n6	ND	ND	10.4 \pm 1.9	4.1 \pm 0.3	ND	ND	ND			
C20:3n3	ND	ND	5.0 \pm 0.8	2.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.0	ND	0.4 \pm 0.0			
C22:0	ND	ND	1.7 \pm 1.0	1.3 \pm 1.8	ND	ND	ND			
C22:1	ND	ND	4.4 \pm 0.6	2.3 \pm 0.2	ND	ND	ND			
C22:2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
C24:0	ND	ND	5.7 \pm 1.1	1.9 \pm 0.5	ND	ND	ND			
C24:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
C22:6n3	ND	ND	4.7 \pm 0.6	6.2 \pm 5.4	ND	ND	ND			
%SFA	45.8 \pm 0.7	53.6 \pm 0.9	59.7 \pm 4.2	76.5 \pm 4.9	24.1 \pm 0.7	17.1 \pm 0.3	30.8 \pm 0.7			
%MUFA	19.2 \pm 0.4	19.1 \pm 0.1	9.5 \pm 0.8	5.2 \pm 0.2	39.4 \pm 0.7	44.6 \pm 0.5	20.9 \pm 0.8			
%PUFA	34.9 \pm 0.5	27.2 \pm 0.9	35.2 \pm 4.1	20.6 \pm 4.9	36.5 \pm 0.1	38.3 \pm 0.5	48.3 \pm 0.7			

(iv) Fatty acid (FA) content and profile

The FA content and profile of *G. sulphuraria* in the presence of glucose was reported in a previous study [20]. The total FA content in glucose was $14 \pm 4\%$ while it has been shown to be $6 \pm 1\%$ in the presence of xylose in the present work (**Fig. 4C**). Unlike glycogen content, FA content remained stable during the stationary phase, (**Fig. 4C**). These results are in line with other studies where the total FA content observed in the presence of various carbon sources never exceeds 6% and do not decrease (or even increase) when cells reach the stationary phase [52,112]. This behavior suggests that glycogen is more likely utilized by the cell than FAs as a carbon source during carbon starvation. Additionally, *G. sulphuraria* has high proportions of SFAs in both conditions and growth phases, which is uncommon for red algae [113]. SFAs distribution reached up to 60% of the total FAs during exponential phase, with predominant C16:0 and C18:0 (up to $38 \pm 1\%$ as C16:0 in the presence of xylose), while poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) accounted for $33 \pm 1\%$ and $20 \pm 1\%$ in the glucose and xylose conditions, respectively. At the end of the culture, unsaturated fatty acid content is slightly elevated, but SFAs remain dominant with $46 \pm 1\%$ in the presence of glucose and $54 \pm 1\%$ in the presence of xylose (**Table 3**). [52] reported very similar results to the present study. In summary, even though *G. sulphuraria* total FA content is low compared to oleaginous microalgae, it is promising for the valorization of xylose-rich hemicellulose-containing biomass in the context of biofuel production because of its high biomass productivity using xylose and high levels of SFAs. The observed *G. sulphuraria* FA distribution could be suitable for conversion into medium-chain fuels such as biokerosene that allow the presence of some unsaturation, lowering its melting point and thus increasing the cold flow properties of the fuel [114].

E. gracilis exhibited a total FA content during the exponential phase of only $7 \pm 1\%$ in the acetate condition and $5 \pm 1\%$ with a mix of all three carbon sources. These percentages decreased to $5 \pm 1\%$ and $3 \pm 1\%$, upon reaching the stationary phase (**Fig. 4C**). FA distribution shows a high yield of SFAs in both growth conditions, reaching up to $75 \pm 1\%$ in the presence of mixed carbon sources with no distinction in the monitored growth phase (**Table 3**). These observations are in agreement with those previously published [57]. The predominant SFAs found were C16:0 (31-37%), C18:0 (21-27%), and C14:0 (8%), depending on the growth condition.

A. protothecoides generally exhibited higher FA content than the two other species studied, with $16 \pm 1\%$ and $17 \pm 2\%$ in the acetate and mix conditions, respectively. The assimilation of acetate could lead to better FA accumulation than glucose in the mix since acetate is rapidly converted into acetyl-CoA after its entry into the cytosol by the acetyl-CoA synthase, the key molecule to start FA biosynthesis, as in [78,115,116]. When reaching the stationary phase, the total FA content decreased in the acetate and mix conditions, to $11 \pm 1\%$ and $7 \pm 1\%$, respectively (**Fig. 4C**). The decrease of FA in the stationary phase could be explained by their utilization when the carbon source and the starch reserves are depleted, while other nutrients remain as mentioned above (**Fig. S1**). In contrast, the same levels of FAs ($18 \pm 2\%$) were found once the stationary phase was reached in the presence of glucose as during the exponential phase for the acetate and mix conditions (**Fig. 4C**), possibly due to

their accumulation before cell death caused by the prementioned low pH stress. Regardless of the growth phase, FA content is barely affected by the carbon source, as long as the cells can assimilate it. Even if no studies were conducted in the presence of a mix the three carbon sources, similar observations have been reported before for *A. protothecoides* grown heterotrophically with a total lipid content of approximately 20% in the presence of either glucose, glycerol, or acetate [115]. In our study, we observed that FAs are almost equally distributed among SFAs, mono-unsaturated fatty acids (MUFAs), and in all conditions during the exponential phase (ranging from 25% to 42% each) (**Table 3**). As the stationary phase of growth is reached, the proportion of SFAs decreases in the glucose and acetate conditions, increasing the amount of MUFAs. However, in the mixed condition, the end of the culture is marked by a decrease in MUFAs and an increase in PUFAs, which are less suitable for biofuel production (**Table 3**). Irrespectively of the growth conditions, the main represented SFAs are palmitic and stearic acids (C:16 and C:18, respectively), while oleic acid (C18:1) is the only representative of MUFAs, accounting for 30-43% of the total FAs in both growth phases. The primary PUFA produced is linoleic acid (C18:2 ω -6), accounting for 24-27% in the exponential phase and 28-38% in the stationary phase, comparable to levels reported in other studies on heterotrophically grown *A. protothecoides* [29,117,118]. In summary, *A. protothecoides*, widely studied for lipid production in heterotrophy, shows a lipid content comparable to other oleaginous microalgae in all conditions. Since high levels of SFAs and MUFAs could be observed together with xylose assimilation in the mixed condition, it appears to be a good candidate for hemicellulose valorization in the context of biofuel production.

Conclusion

The present study highlights the potential of three microalgal species—*A. protothecoides*, *G. sulphuraria*, and *E. gracilis*—for biomass valorization using hemicellulose-containing carbon sources through heterotrophic cultivation. Each species demonstrated unique growth characteristics and metabolic capabilities, offering distinct advantages for specific applications. *G. sulphuraria* showed notable biomass yields, particularly with xylose as the sole carbon source, and produced high levels of SFAs, glycogen, and proteins. *E. gracilis*, although limited by its inability to assimilate glucose or xylose, efficiently utilized acetate and stored a significant amount of carbohydrates as paramylon, which can be converted into wax esters under anaerobic conditions. *A. protothecoides* emerged as the most versatile species, capable of efficient growth when all three carbon sources (acetate, glucose, and xylose) were combined. The high specific growth rate, remarkable FA content (mostly SFAs and MUFAs) in combination with low starch and pigment content, make this alga a promising candidate for biofuel production from hemicellulose hydrolysate. In addition, the ability of *A. protothecoides* to maintain pH balance in mixed carbon source media further underscores its suitability for industrial applications. Future research should focus on the scalability of *A. protothecoides* cultivation using actual hardwood hemicellulose hydrolysate to validate its potential in biofuel production. Overall, the findings from this study provide a solid foundation for the development of sustainable and efficient microalgal-based bioprocesses for hemicellulose valorization.

References

- [1] M. Gouda, M.A. Tadda, Y. Zhao, F. Farmanullah, B. Chu, X. Li, Y. He, Microalgae Bioactive Carbohydrates as a Novel Sustainable and Eco-Friendly Source of Prebiotics: Emerging Health Functionality and Recent Technologies for Extraction and Detection, *Front. Nutr.* 9 (2022) 806692. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.806692>.
- [2] Y. Qiao, F. Yang, T. Xie, Z. Du, D. Zhong, Y. Qi, Y. Li, W. Li, Z. Lu, J. Rao, Y. Sun, M. Zhou, Engineered algae: A novel oxygen-generating system for effective treatment of hypoxic cancer, *Sci. Adv.* 6 (2020) eaba5996. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5996>.
- [3] R. Ravindran, G. Rajauria, Carbohydrates derived from microalgae in the food industry, in: *Cult. Microalgae Food Ind.*, Elsevier, 2021: pp. 127–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821080-2.00007-1>.
- [4] T. Ghidossi, I. Marison, R. Devery, D. Gaffney, C. Forde, Characterization and Optimization of a Fermentation Process for the Production of High Cell Densities and Lipids Using Heterotrophic Cultivation of *Chlorella protothecoides*, *Ind. Biotechnol.* 13 (2017) 253–259. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0007>.
- [5] L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici, Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>.
- [6] A.K. Sharma, P.K. Sahoo, S. Singhal, A. Patel, Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp., *3 Biotech* 6 (2016) 116. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0434-6>.
- [7] H. Xu, X. Miao, Q. Wu, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *J. Biotechnol.* 126 (2006) 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>.
- [8] R. Barone, L. De Napoli, L. Mayol, M. Paolucci, M.G. Volpe, L. D’Elia, A. Pollio, M. Guida, E. Gambino, F. Carraturo, R. Marra, F. Vinale, S.L. Woo, M. Lorito, Autotrophic and Heterotrophic Growth Conditions Modify Biomolecule Production in the Microalga *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophyceae, Rhodophyta), *Mar. Drugs* 18 (2020) 169. <https://doi.org/10.3390/md18030169>.
- [9] A. Gissibl, A. Sun, A. Care, H. Nevalainen, A. Sunna, Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 108. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>.
- [10] G. Graziani, S. Schiavo, M.A. Nicolai, S. Buono, V. Fogliano, G. Pinto, A. Pollio, Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*, *Food Funct* 4 (2013) 144–152. <https://doi.org/10.1039/C2FO30198A>.
- [11] M. Massa, S. Buono, A.L. Langellotti, A. Martello, G.L. Russo, D.A. Troise, R. Sacchi, P. Vitaglione, V. Fogliano, Biochemical composition and in vitro digestibility of *Galdieria sulphuraria* grown on spent cherry-brine liquid, *New Biotechnol.* 53 (2019) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.06.003>.
- [12] A. Sun, M.T. Hasan, G. Hobba, H. Nevalainen, J. Te’o, Comparative assessment of the *Euglena gracilis* var. *saccharophila* variant strain as a producer of the β -1,3-glucan paramylon under varying light conditions, *J. Phycol.* 54 (2018) 529–538. <https://doi.org/10.1111/jpy.12758>.
- [13] M. Wu, H. Qin, J. Deng, Y. Liu, A. Lei, H. Zhu, Z. Hu, J. Wang, A new pilot-scale fermentation mode enhances *Euglena gracilis* biomass and paramylon (β -1,3-glucan) production, *J. Clean. Prod.* 321 (2021) 128996. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128996>.
- [14] S. Koritala, Microbiological synthesis of wax esters by *Euglena gracilis*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66 (1989) 133–134. <https://doi.org/10.1007/BF02661801>.
- [15] X. Miao, Q. Wu, High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*, *J. Biotechnol.* 110 (2004) 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.013>.

- [16] M.A. Mohammad Mirzaie, M. Kalbasi, S.M. Mousavi, B. Ghobadian, Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 46 (2016) 150–156. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.995812>.
- [17] T. Sakurai, M. Aoki, X. Ju, T. Ueda, Y. Nakamura, S. Fujiwara, T. Umemura, M. Tsuzuki, A. Minoda, Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotrophic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.014>.
- [18] C.D. Lane, D.A. Coury, F.C.T. Allnut, Composition and Potential Products from *Auxenochlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris*, *Ind. Biotechnol.* 13 (2017) 270–276. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0015>.
- [19] G. Markou, A. Diamantis, E. Korozi, V. Tsagou, I. Kefalogianni, I. Chatzipavlidis, Effects of Monochromatic Illumination with LEDs Lights on the Growth and Photosynthetic Performance of *Auxenochlorella protothecoides* in Photo- and Mixotrophic Conditions, *Plants* 10 (2021) 799. <https://doi.org/10.3390/plants10040799>.
- [20] P. Perez Saura, M. Chabi, A. Corato, P. Cardol, C. Remacle, Cell adaptation of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* to the availability of carbon sources, *Front. Plant Sci.* 13 (2022) 978246. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978246>.
- [21] Y. Xiao, X. He, Q. Ma, Y. Lu, F. Bai, J. Dai, Q. Wu, Photosynthetic Accumulation of Lutein in *Auxenochlorella protothecoides* after Heterotrophic Growth, *Mar. Drugs* 16 (2018) 283. <https://doi.org/10.3390/md16080283>.
- [22] F. Abiusi, P. Moñino Fernández, S. Canziani, M. Janssen, R.H. Wijffels, M. Barbosa, Mixotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* for C-phycoerythrin and protein production, *Algal Res.* 61 (2022) 102603. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102603>.
- [23] S.R. Chae, E.J. Hwang, H.S. Shin, Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.037>.
- [24] W. Xie, X. Li, H. Xu, F. Chen, K.-W. Cheng, H. Liu, B. Liu, Optimization of Heterotrophic Culture Conditions for the Microalgae *Euglena gracilis* to Produce Proteins, *Mar. Drugs* 21 (2023) 519. <https://doi.org/10.3390/md21100519>.
- [25] H. Li, Z. Liu, Y. Zhang, B. Li, H. Lu, N. Duan, M. Liu, Z. Zhu, B. Si, Conversion efficiency and oil quality of low-lipid high-protein and high-lipid low-protein microalgae via hydrothermal liquefaction, *Bioresour. Technol.* 154 (2014) 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.074>.
- [26] L. Matricon, A. Roubaud, G. Haarlemmer, C. Geantet, The challenge of nitrogen compounds in hydrothermal liquefaction of algae, *J. Supercrit. Fluids* 196 (2023) 105867. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2023.105867>.
- [27] F. Obeid, T. Chu Van, R. Brown, T. Rainey, Nitrogen and sulphur in algal biocrude: A review of the HTL process, upgrading, engine performance and emissions, *Energy Convers. Manag.* 181 (2019) 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.11.054>.
- [28] R. Ranjith Kumar, P. Hanumantha Rao, M. Arumugam, Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review, *Front. Energy Res.* 2 (2015). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061>.
- [29] A. Patel, L. Matsakas, U. Rova, P. Christakopoulos, Heterotrophic cultivation of *Auxenochlorella protothecoides* using forest biomass as a feedstock for sustainable biodiesel production, *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018) 169. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1173-1>.
- [30] F.V.-L. Portillo, E. Sierra-Ibarra, R. Vera-Estrella, S. Revah, O.T. Ramírez, L. Caspeta, A. Martínez, Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy, *Algal Res.* 65 (2022) 102752. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102752>.

- [31] T.-Y. Zhang, Y.-H. Wu, J.-H. Wang, X.-X. Wang, V.M. Deantes-Espinosa, G.-H. Dao, X. Tong, H.-Y. Hu, Heterotrophic cultivation of microalgae in straw lignocellulose hydrolysate for production of high-value biomass rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), *Chem. Eng. J.* 367 (2019) 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.049>.
- [32] A. Ebringerová, Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses, *Macromol. Symp.* 232 (2005) 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>.
- [33] A. Aho, M. Alvear, J. Ahola, J. Kangas, J. Tanskanen, I. Simakova, J.L. Santos, K. Eränen, T. Salmi, D.Y. Murzin, H. Grénman, Aqueous phase reforming of birch and pine hemicellulose hydrolysates, *Bioresour. Technol.* 348 (2022) 126809. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126809>.
- [34] K. Miazek, C. Rémacle, A. Richel, D. Goffin, Beech wood *Fagus sylvatica* dilute-acid hydrolysate as a feedstock to support *Chlorella sorokiniana* biomass, fatty acid and pigment production, *Bioresour. Technol.* 230 (2017) 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.034>.
- [35] J.S. Van Dyk, B.I. Pletschke, A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>.
- [36] W. Tanner, The *Chlorella* hexose/H⁺-symporters, in: *Int. Rev. Cytol.*, Elsevier, 2000: pp. 101–141. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(00\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(00)00003-6).
- [37] O. Perez-Garcia, F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan, Y. Bashan, Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Res.* 45 (2011) 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>.
- [38] W. Ran, H. Wang, Y. Liu, M. Qi, Q. Xiang, C. Yao, Y. Zhang, X. Lan, Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients, *Bioresour. Technol.* 291 (2019) 121894. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121894>.
- [39] H. Wang, Y. Zhang, W. Zhou, L. Noppol, T. Liu, Mechanism and enhancement of lipid accumulation in filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* under heterotrophic condition, *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018) 328. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1329-z>.
- [40] G. Proietti Tocca, V. Agostino, B. Menin, T. Tommasi, D. Fino, F. Di Caprio, Mixotrophic and heterotrophic growth of microalgae using acetate from different production processes, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 23 (2024) 93–132. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09682-7>.
- [41] Y. Zheng, X. Yu, T. Li, X. Xiong, S. Chen, Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP⁺-linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*, (2014).
- [42] H. Alper, G. Stephanopoulos, Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 715–723. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2186>.
- [43] G.B. Leite, K. Paranjape, P.C. Hallenbeck, Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose, *Algal Res.* 16 (2016) 338–348. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.041>.
- [44] M. Song, H. Pei, The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source, *Bioresour. Technol.* 263 (2018) 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.020>.
- [45] L.C. Krämer, D. Wasser, F. Haitz, B. Sabel, C. Büchel, Heterologous expression of HUP1 glucose transporter enables low-light mediated growth on glucose in *Phaeodactylum tricorutum*, *Algal Res.* 64 (2022) 102719. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102719>.
- [46] W. Zhang, W. Zhou, S. Jiang, Y. Wang, L. Chen, G. Yang, T. Liu, Heterotrophic modification of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin, *Algal Res.* 72 (2023) 103137. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103137>.
- [47] A. Doebbe, J. Rupprecht, J. Beckmann, J.H. Mussnug, A. Hallmann, B. Hankamer, O. Kruse, Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*:

- Impacts on biological H₂ production, *J. Biotechnol.* 131 (2007) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.017>.
- [48] L.A. Zaslavskaja, J.C. Lippmeier, C. Shih, D. Ehrhardt, A.R. Grossman, K.E. Apt, Trophic Conversion of an Obligate Photoautotrophic Organism Through Metabolic Engineering, *Science* 292 (2001) 2073–2075. <https://doi.org/10.1126/science.160015>.
- [49] W. Gross, C. Schnarrenberger, Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*, *Plant Cell Physiol.* 36 (1995) 633–638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803>.
- [50] R.A. Schmidt, M.G. Wiebe, N.T. Eriksen, Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*, *Biotechnol. Bioeng.* 90 (2005) 77–84. <https://doi.org/10.1002/bit.20417>.
- [51] E.G. Giakoumis, A statistical investigation of biodiesel physical and chemical properties, and their correlation with the degree of unsaturation, *Renew. Energy* 50 (2013) 858–878. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.07.040>.
- [52] G. López, C. Yate, F.A. Ramos, M.P. Cala, S. Restrepo, S. Baena, Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Lipids from Autotrophic, Mixotrophic and Heterotrophic cultivation of *Galdieria* sp. strain USBA-GBX-832, *Sci. Rep.* 9 (2019) 10791. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46645-3>.
- [53] M. Martinez-Garcia, A. Kormpa, M.J.E.C. van der Maarel, The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers, *Carbohydr. Polym.* 169 (2017) 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.004>.
- [54] N. Pade, N. Linka, W. Ruth, A.P.M. Weber, M. Hagemann, Floridoside and isofloridoside are synthesized by trehalose 6-phosphate synthase-like enzymes in the red alga *Galdieria sulphuraria*, *New Phytol.* 205 (2015) 1227–1238. <https://doi.org/10.1111/nph.13108>.
- [55] Y. Huang, X. Wan, Z. Zhao, H. Liu, Y. Wen, W. Wu, X. Ge, C. Zhao, Metabolomic analysis and pathway profiling of paramylon production in *Euglena gracilis* grown on different carbon sources, *Int. J. Biol. Macromol.* 246 (2023) 125661. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125661>.
- [56] R. Russo, L. Barsanti, V. Evangelista, A.M. Frassanito, V. Longo, L. Pucci, G. Penno, P. Gualtieri, *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors, *Food Sci. Nutr.* 5 (2017) 205–214. <https://doi.org/10.1002/fsn3.383>.
- [57] J.-M. Jung, J.Y. Kim, S. Jung, Y.-E. Choi, E.E. Kwon, Quantitative study on lipid productivity of *Euglena gracilis* and its biodiesel production according to the cultivation conditions, *J. Clean. Prod.* 291 (2021) 125218. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125218>.
- [58] M. Nakazawa, H. Andoh, K. Koyama, Y. Watanabe, T. Nakai, M. Ueda, T. Sakamoto, H. Inui, Y. Nakano, K. Miyatake, Alteration of Wax Ester Content and Composition in *Euglena gracilis* with Gene Silencing of 3-ketoacyl-CoA Thiolase Isozymes, *Lipids* 50 (2015) 483–492. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4010-3>.
- [59] Y.-H. Chen, T.H. Walker, Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol, *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 1973–1983. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0672-y>.
- [60] J. Wang, W.R. Curtis, Proton stoichiometric imbalance during algae photosynthetic growth on various nitrogen sources: toward metabolic pH control, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 43–52. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0551-3>.
- [61] Z. Zhao, M. Xian, M. Liu, G. Zhao, Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms, *Biotechnol. Biofuels* 13 (2020) 21. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>.
- [62] M.B. Allen, Studies with cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte, *Arch. Mikrobiol.* 32 (1959) 270–277. <https://doi.org/10.1007/BF00409348>.

- [63] D.S. Gorman, R.P. Levine, Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54 (1965) 1665–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>.
- [64] S.H. Hutner, A.C. Zahalsky, S. Aaronson, H. Baker, O. Frank, Chapter 8 Culture Media for *Euglena gracilis*, in: *Methods Cell Biol.*, Elsevier, 1966: pp. 217–228. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62140-8](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62140-8).
- [65] J. Murphy, J.P. Riley, A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Anal. Chim. Acta* 27 (1962) 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).
- [66] T.A. Kursar, J. Van Der Meer, R.S. Alberte, Light-Harvesting System of the Red Alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical Analyses of Pigment Mutations, *Plant Physiol.* 73 (1983) 353–360. <https://doi.org/10.1104/pp.73.2.353>.
- [67] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [68] S.S. Nielsen, Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates, in: S.S. Nielsen (Ed.), *Food Anal. Lab. Man.*, Springer US, Boston, MA, 2010: pp. 47–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6.
- [69] A. Corato, T.T. Le, D. Baurain, P. Jacques, C. Remacle, F. Franck, A Fast-Growing Oleaginous Strain of *Coelastrella* Capable of Astaxanthin and Canthaxanthin Accumulation in Phototrophy and Heterotrophy, *Life* 12 (2022) 334. <https://doi.org/10.3390/life12030334>.
- [70] R.C. Bates, R.E. Hurlbert, The Effect of Acetate on *Euglena gracilis* var. *bacillaris* as a Function of Environmental Conditions, *J. Protozool.* 17 (1970) 134–138. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1970.tb05172.x>.
- [71] J.R. Cook, B. Heinrich, Glucose vs. Acetate Metabolism in *Euglena* *, *J. Protozool.* 12 (1965) 581–584. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1965.tb03258.x>.
- [72] J.-P. Schwarzhans, D. Cholewa, P. Grimm, U. Beshay, J.-M. Risse, K. Friehs, E. Flaschel, Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions, *J. Appl. Phycol.* 27 (2015) 1389–1399. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0458-4>.
- [73] Y. Wang, T. Seppänen-Laakso, H. Rischer, M.G. Wiebe, *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions, *PLoS ONE* 13 (2018) e0195329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>.
- [74] F. Ivušić, B. Šantek, Optimization of complex medium composition for heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* and paramylon production, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2015) 1103–1112. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1353-3>.
- [75] R.E. Hurlbert, S.C. Rittenberg, Glucose Metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; Growth and Enzymatic Studies*, *J. Protozool.* 9 (1962) 170–182. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1962.tb02602.x>.
- [76] J. Chen, L. Liu, P.-E. Lim, D. Wei, Effects of sugarcane bagasse hydrolysate (SCBH) on cell growth and fatty acid accumulation of heterotrophic *Chlorella protothecoides*, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 42 (2019) 1129–1142. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02110-z>.
- [77] X.-M. Shi, X.-W. Zhang, F. Chen, Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources, *Enzyme Microb. Technol.* 27 (2000) 312–318. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00208-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00208-8).
- [78] A. Huang, L. Sun, S. Wu, C. Liu, P. Zhao, X. Xie, G. Wang, Utilization of glucose and acetate by *Chlorella* and the effect of multiple factors on cell composition, *J. Appl. Phycol.* 29 (2017) 23–33. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0920-6>.
- [79] M. Sakarika, M. Kornaros, Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation, *Bioresour. Technol.* 219 (2016) 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.033>.

- [80] X. Shi, Z. Wu, F. Chen, Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 763–768. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600037>.
- [81] W. Kong, H. Song, Y. Cao, H. Yang, S. Hua, C. Xia, The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation, *Afr. J. Biotechnol.* 10 (2011) 11620–11630.
- [82] J.L. Yániz, J.A. Mateos, P. Santolaria, Tris buffer improves fluorescence yield of ram spermatozoa when evaluating membrane integrity, *Microsc. Res. Tech.* 75 (2012) 520–523. <https://doi.org/10.1002/jemt.21086>.
- [83] K. Hosotani, T. Ohkochi, H. Inui, A. Yokota, Y. Nakano, S. Kitaoka, Photoassimilation of Fatty Acids, Fatty Alcohols and Sugars by *Euglena gracilis* Z, *Microbiology* 134 (1988) 61–66. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-61>.
- [84] J. Lacroux, J. Seira, E. Trably, N. Bernet, J.-P. Steyer, R. Van Lis, Mixotrophic Growth of *Chlorella sorokiniana* on Acetate and Butyrate: Interplay Between Substrate, C:N Ratio and pH, *Front. Microbiol.* 12 (2021) 703614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703614>.
- [85] M. Casal, O. Queirós, G. Talaia, D. Ribas, S. Paiva, Carboxylic Acids Plasma Membrane Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, in: J. Ramos, H. Sychrová, M. Kschischo (Eds.), *Yeast Membr. Transp.*, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 229–251. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_9.
- [86] J. Lacroux, E. Trably, N. Bernet, J.-P. Steyer, R. van Lis, Mixotrophic growth of microalgae on volatile fatty acids is determined by their undissociated form, *Algal Res.* 47 (2020) 101870. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101870>.
- [87] J. Trček, N.P. Mira, L.R. Jarboe, Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 6215–6229. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6762-3>.
- [88] G. Curien, D. Lyska, E. Guglielmino, P. Westhoff, J. Janetzko, M. Tardif, C. Hallopeau, S. Brugière, D. Dal Bo, J. Decelle, B. Gallet, D. Falconet, M. Carone, C. Remacle, M. Ferro, A.P.M. Weber, G. Finazzi, Mixotrophic growth of the extremophile *Galdieria sulphuraria* reveals the flexibility of its carbon assimilation metabolism, *New Phytol.* 231 (2021) 326–338. <https://doi.org/10.1111/nph.17359>.
- [89] C. Chen, Q. Shi, A. Tong, L. Sun, J. Fan, Screening of microalgae strains for efficient biotransformation of small molecular organic acids from dark fermentation biohydrogen production wastewater, *Bioresour. Technol.* 390 (2023) 129872. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129872>.
- [90] N. Kishimoto, K. Inagaki, T. Sugio, T. Tano, Growth inhibition of *Acidiphilium* species by organic acids contained in yeast extract, *J. Ferment. Bioeng.* 70 (1990) 7–10. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90021-N](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90021-N).
- [91] C. Baker-Austin, M. Dopson, Life in acid: pH homeostasis in acidophiles, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>.
- [92] L.C. Rai, J.P. Gaur, eds., *Algal Adaptation to Environmental Stresses*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59491-5>.
- [93] J. Zhu, M. Wakisaka, Effect of two lignocellulose related sugar alcohols on the growth and metabolites biosynthesis of *Euglena gracilis*, *Bioresour. Technol.* 303 (2020) 122950. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122950>.
- [94] X. Huang, Y. Wen, Y. Chen, Y. Liu, C. Zhao, Structural characterization of *Euglena gracilis* polysaccharide and its in vitro hypoglycemic effects by alleviating insulin resistance, *Int. J. Biol. Macromol.* 236 (2023) 123984. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123984>.
- [95] E.C. O'Neill, M. Trick, L. Hill, M. Rejzek, R.G. Dusi, C.J. Hamilton, P.V. Zimba, B. Henrissat, R.A. Field, The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry, *Mol. Biosyst.* 11 (2015) 2808–2820. <https://doi.org/10.1039/C5MB00319A>.

- [96] K.J. Fox, K.L. Prather, Carbon catabolite repression relaxation in *Escherichia coli*: global and sugar-specific methods for glucose and secondary sugar co-utilization, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 30 (2020) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2020.05.005>.
- [97] B. Görke, J. Stülke, Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>.
- [98] M.A. Mechoud, N. Pujol-Carrion, S. Montella-Manuel, M.A. De La Torre-Ruiz, Interactions of GMP with Human Glrx3 and with *Saccharomyces cerevisiae* Grx3 and Grx4 Converge in the Regulation of the Gcn2 Pathway, *Appl. Environ. Microbiol.* 86 (2020) e00221-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00221-20>.
- [99] A. Nair, S.J. Sarma, The impact of carbon and nitrogen catabolite repression in microorganisms, *Microbiol. Res.* 251 (2021) 126831. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126831>.
- [100] W.A. Wilson, S.A. Hawley, D.G. Hardie, Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio, *Curr. Biol.* 6 (1996) 1426–1434. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(96\)00747-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(96)00747-6).
- [101] J. Chen, X. Liu, D. Wei, G. Chen, High yields of fatty acid and neutral lipid production from cassava bagasse hydrolysate (CBH) by heterotrophic *Chlorella protothecoides*, *Bioresour. Technol.* 191 (2015) 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.116>.
- [102] J. Mu, S. Li, D. Chen, H. Xu, F. Han, B. Feng, Y. Li, Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*, *Bioresour. Technol.* 185 (2015) 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.082>.
- [103] J.E. Gonzalez, C.P. Long, M.R. Antoniewicz, Comprehensive analysis of glucose and xylose metabolism in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions by ¹³C metabolic flux analysis, *Metab. Eng.* 39 (2017) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.11.003>.
- [104] V. Novy, R. Wang, J.O. Westman, C.J. Franzén, B. Nidetzky, *Saccharomyces cerevisiae* strain comparison in glucose–xylose fermentations on defined substrates and in high-gravity SSCF: convergence in strain performance despite differences in genetic and evolutionary engineering history, *Biotechnol. Biofuels* 10 (2017) 205. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0887-9>.
- [105] H.G. Lawford, J.D. Rousseau, Effect of oxygen on ethanol production by a recombinant ethanologenic *E. coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45–46 (1994) 349–366. <https://doi.org/10.1007/BF02941811>.
- [106] A. Andreeva, E. Budenkova, O. Babich, S. Sukhikh, E. Ulrikh, S. Ivanova, A. Prosekov, V. Dolganyuk, Production, Purification, and Study of the Amino Acid Composition of Microalgae Proteins, *Molecules* 26 (2021) 2767. <https://doi.org/10.3390/molecules26092767>.
- [107] E.E. Andeden, S. Ozturk, B. Aslim, Effect of alkaline pH and nitrogen starvation on the triacylglycerol (TAG) content, growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Auxenochlorella protothecoides* KP7, *J. Appl. Phycol.* 33 (2021) 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02311-0>.
- [108] M.S. Roth, D.J. Westcott, M. Iwai, K.K. Niyogi, Hexokinase is necessary for glucose-mediated photosynthesis repression and lipid accumulation in a green alga, *Commun. Biol.* 2 (2019) 347. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0577-1>.
- [109] M. Martinez-Garcia, M.J.E.C. Van Der Maarel, Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress, *AMB Express* 6 (2016) 71. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0244-6>.
- [110] E. Suzuki, R. Suzuki, Variation of Storage Polysaccharides in Phototrophic Microorganisms, *J. Appl. Glycosci.* 60 (2013) 21–27. https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2012_016.
- [111] C. Plancke, H. Vigeolas, R. Höhner, S. Roberty, B. Emonds-Alt, V. Larosa, R. Willamme, F. Duby, D. Onga Dhali, P. Thonart, S. Hiligsmann, F. Franck, G. Eppe, P. Cardol, M. Hippler, C. Remacle,

- Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth, *Plant J.* 77 (2014) 404–417. <https://doi.org/10.1111/tpj.12392>.
- [112] K. Mozaffari, M. Seger, B. Dungan, D.T. Hanson, P.J. Lammers, F.O. Holguin, Alterations in photosynthesis and energy reserves in *Galdieria sulphuraria* during corn stover hydrolysate supplementation, *Bioresour. Technol. Rep.* 7 (2019) 100269. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100269>.
- [113] I. Lang, L. Hodac, T. Friedl, I. Feussner, Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection, *BMC Plant Biol.* 11 (2011) 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124>.
- [114] M.A. Hazrat, M.G. Rasul, M. Mofijur, M.M.K. Khan, F. Djevanroodi, A.K. Azad, M.M.K. Bhuiya, A.S. Silitonga, A Mini Review on the Cold Flow Properties of Biodiesel and its Blends, *Front. Energy Res.* 8 (2020) 598651. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.598651>.
- [115] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, B. Hu, Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 1978–1995. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8974-4>.
- [116] W. Kong, S. Yang, H. Wang, H. Huo, B. Guo, N. Liu, A. Zhang, S. Niu, Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources, *J. Appl. Phycol.* 32 (2020) 1569–1579. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02089-1>.
- [117] E. Korozi, V. Tsagou, I. Kefalogianni, G. Markou, D. Antonopoulos, L. Chakalis, Y. Kotzamanis, I. Chatzipavlidis, Continuous Culture of *Auxenochlorella protothecoides* on Biodiesel Derived Glycerol under Mixotrophic and Heterotrophic Conditions: Growth Parameters and Biochemical Composition, *Microorganisms* 10 (2022) 541. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030541>.
- [118] A. Wei, X. Zhang, D. Wei, G. Chen, Q. Wu, S.-T. Yang, Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0624-x>.

CRedit authorship contribution statement

Pablo Perez Saura: Writing – original draft, Writing – review & editing, Conceptualization, Methodology. Claire Remacle: Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. Pierre Cardol: Writing – review & editing. Stéphanie Gérin: Writing – review & editing. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS) (CDR J.0175.20 to CR and n°40020920 to PC; PDR n°33663953 to PC) ; Fonds Wetenschappelijk Onderzoek – Vlaanderen (FWO) and FNRS under the Excellence of Science (EOS) Project No. 30829584; Action de Recherche Concertée from the University of Liege (DARKMET ARC grant 17/21- 08), and ADV_BIO grant (SPF Économie, P.M.E., Classes moyennes et Énergie, Direction générale de l'Énergie). We thank M. Radoux for expert technical assistance. We would also like to extend our thanks to Clarisse Varisano for her valuable contribution to the experiments during her internship.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the author(s) used ChatGPT (OpenAI) for its assistance in linguistic and grammatical improvement of the manuscript. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the publication.

4.2 Supplemental files

Figure S1. Ammonium (NH_4^+ , dotted lines – primary vertical axis) and phosphate (PO_4^{3-} , dashed lines – secondary vertical axis) concentrations upon time in cultures media of *G. sulphuraria* (light blue diamonds), *E. gracilis* (orange triangles), and *A. protothecoides* (dark green squares) cells grown in heterotrophy in the presence of glucose (A), xylose (B), acetate (C), or a mix of the three carbon sources (D). Data are expressed in mM. Each value on the graphs is presented as the mean of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation of the mean (\pm SD). The clover symbol (\clubsuit) indicates values for *G. sulphuraria* grown on glucose from a previous study conducted in our laboratory [20].

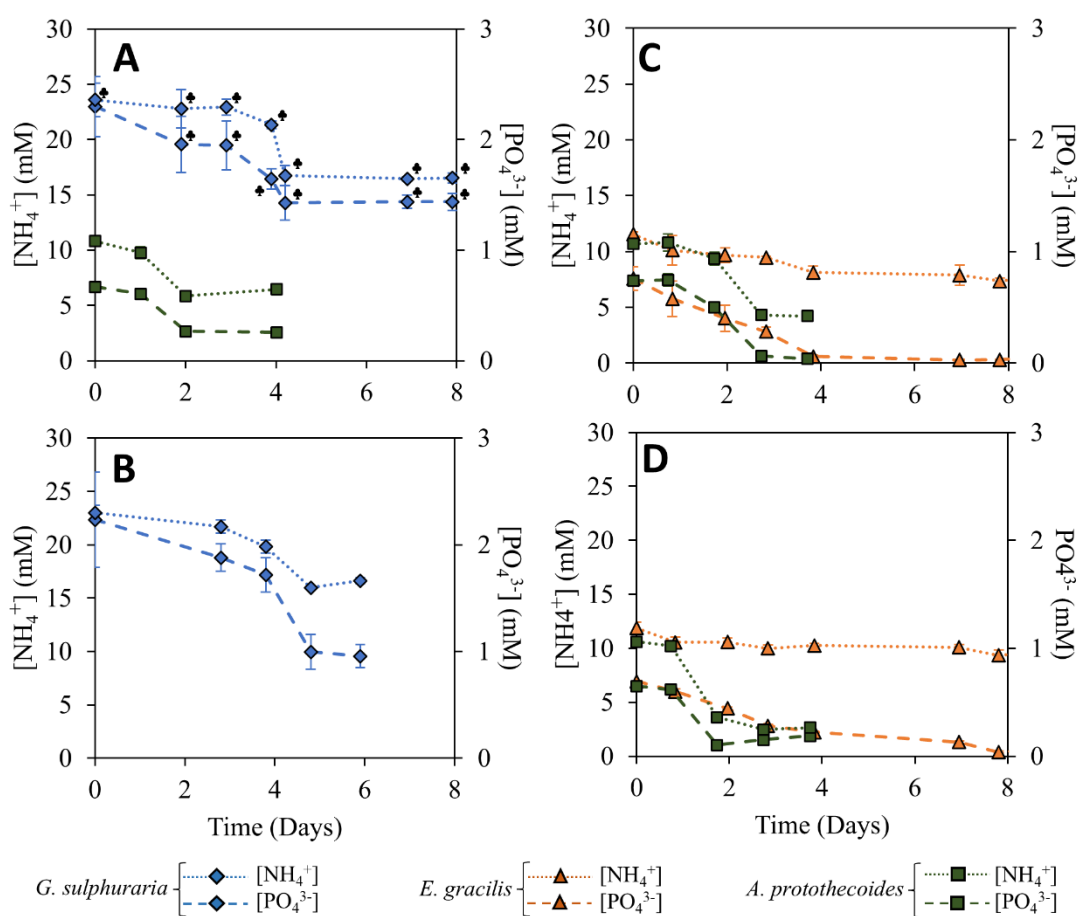


Table S1. Pigment content and distribution in exponential and stationary phase when growth was observed in the presence of glucose, xylose, acetate or a mix of the three carbon sources for *G. sulphuraria*, *E. gracilis*, or *A. protothecoides*. Data are expressed in mg gDW⁻¹. Values represent the means ± SD (n=3). NF: The pigment does not exist in the microalgal species. ND: The pigment can be found but was not detected during this study. The clover symbol (♣) indicates values for *G. sulphuraria* grown on glucose from a previous study conducted in our laboratory [20].

Growth phase	Pigment content (mg gDW ⁻¹)	Glucose		Xylose		Acetate		Mix	
		<i>G. sulphuraria</i>	<i>A. protothecoides</i>	<i>G. sulphuraria</i>	<i>A. protothecoides</i>	<i>E. gracilis</i>	<i>A. protothecoides</i>	<i>E. gracilis</i>	
Exponential	Neoxanthin	NF	0.014 ± 0.007	NF	0.012 ± 0.011	ND	0.005 ± 0.001	ND	
	Violaxanthin	NF	0.019 ± 0.003	NF	0.006 ± 0.005	ND	0.003 ± 0.000	ND	
	Antheraxanthin	NF	0.015 ± 0.006	NF	0.002 ± 0.002	ND	0.001 ± 0.000	ND	
	Lutein	ND	0.187 ± 0.005	ND	0.099 ± 0.007	ND	0.072 ± 0.006	ND	
	Zeaxanthin	0.164 ± 0.002 ♣	0.0863 ± 0.005	0.126 ± 0.005	0.038 ± 0.008	ND	0.030 ± 0.004	ND	
	Chlorophyll <i>b</i>	NF	0.0145 ± 0.003	NF	0.102 ± 0.024	ND	0.029 ± 0.005	ND	
	Chlorophyll <i>a</i>	0.354 ± 0.001 ♣	0.075 ± 0.009	0.200 ± 0.002	0.311 ± 0.036	ND	0.089 ± 0.013	ND	
	β-carotene	0.064 ± 0.005 ♣	0.012 ± 0.011	0.042 ± 0.002	ND	ND	ND	ND	
Stationary	Phycocyanin	1.048 ± 0.275 ♣	NF	0.765 ± 0.158	NF	NF	NF	NF	
	Neoxanthin	NF	ND	NF	0.005 ± 0.001	ND	0.011 ± 0.001	ND	
	Violaxanthin	NF	ND	NF	0.001 ± 0.000	ND	0.002 ± 0.000	ND	
	Antheraxanthin	NF	ND	NF	0.001 ± 0.000	ND	0.001 ± 0.000	ND	
	Lutein	ND	0.037 ± 0.001	ND	0.055 ± 0.002	ND	0.070 ± 0.002	ND	
	Zeaxanthin	0.270 ± 0.007 ♣	0.012 ± 0.001	0.239 ± 0.039	0.021 ± 0.001	ND	0.021 ± 0.003	ND	
	Chlorophyll <i>b</i>	NF	0.016 ± 0.001	NF	0.034 ± 0.001	ND	0.063 ± 0.008	ND	
	Chlorophyll <i>a</i>	0.528 ± 0.159 ♣	0.030 ± 0.001	0.487 ± 0.189	0.158 ± 0.009	ND	0.215 ± 0.020	ND	
β-carotene	0.115 ± 0.003 ♣	0.051 ± 0.007	0.091 ± 0.028	ND	ND	ND	ND		
Phycocyanin	1.818 ± 0.037 ♣	NF	2.275 ± 0.262	NF	NF	NF	NF		

NF: The pigment does not exist in the microalgal species. ND: The pigment can be found but was not detected during this study.

CHAPITRE IV

Table S2. Cell density, carbon source concentration, and pH, after 7 days of cultures of *E. gracilis* strain Z grown in KH or TMP medium in the presence of glucose or acetate (50 mM) at different starting pH values. Initial inoculum density was set at 125000 cells/mL. Data are expressed as the mean of two independent biological replicates \pm SD.

Medium	KH				TMP			
Starting pH	3.5		7.5		3.5		7.5	
Carbon source	Acetate	Glucose	Acetate	Glucose	Acetate	Glucose	Acetate	Glucose
Cell density (10^3 cells mL ⁻¹)	135 \pm 21	1530 \pm 71	375 \pm 35	145 \pm 7	155 \pm 21	100 \pm 14	525 \pm 64	98 \pm 3
Carbon source concentration (mMC)	53.2 \pm 0.6	8.0 \pm 3.2	3.1 \pm 0.1	57.1 \pm 1.6	7.2 \pm 0.6	59 \pm 2.6	10.4 \pm 0.3	54.7 \pm 3.0
Is growth observed ?	NO	YES	YES	NO	NO	NO	YES	NO

CHAPITRE V : ASSIMILATION DU XYLOSE EN HÉTÉROTROPHIE PAR AUXENOCHLORELLA PROTOTHECOIDES : UNE AVANCÉE VERS LA PRODUCTION DE XYLITOL PAR UNE MICROALGUE

Dans l'article précédent, nous avons observé qu'en présence de glucose et d'acétate, la culture hétérotrophe de *A. protothecoides* était accompagnée d'une diminution de la concentration en xylose dans le milieu. Nous avons alors supposé que le xylose entrant dans la cellule via des transporteurs non spécifiques induits par la présence de glucose et que la microalgue était capable de le métaboliser pour la production de biomasse.

Cette constatation nous a immédiatement semblé surprenante, compte tenu de la faible proportion de microalgues hétérotrophes capables d'utiliser le xylose comme source de carbone. Ce fait était d'autant plus intéressant qu'il concernait l'espèce étudiée présentant le taux de lipides le plus abondant, ce qui s'inscrivait parfaitement dans le cadre du projet ADV_BIO, visant la production de biocarburants à partir de biomasse algale issue de déchets lignocellulosiques.

Suite à cela, nous nous sommes interrogés sur les mécanismes pouvant amener *A. protothecoides* à n'utiliser le xylose que dans un contexte où d'autres sources de carbone étaient présentes. De plus, puisque cette observation avait été faite en présence simultanée de glucose et d'acétate, nous avons voulu déterminer si ces deux substrats contribuaient de manière égale à l'assimilation du xylose ou si ce phénomène était spécifique à l'un d'eux.

Afin de mieux préparer les expériences de cette troisième étude, nous nous sommes penchés à nouveau sur les résultats de l'article précédent portant sur l'assimilation du xylose par *A. protothecoides*, obtenus par HPLC. Alors que nous nous étions concentrés uniquement sur la disparition des différents substrats dans le milieu, nous n'avons pas prêté attention à un composé inconnu apparaissant sur les chromatogrammes au fur et à mesure que le xylose était consommé.

Afin d'identifier ce composé, nous avons décidé de faire passer sur la colonne différents métabolites du xylose. Cette démarche nous a permis de conclure qu'au fur et à mesure que l'algue assimilait du xylose, elle excrétaait en contrepartie du xylitol, un édulcorant massivement produit chimiquement à l'échelle industrielle. Bien que de nombreuses études portent sur sa production par des microorganismes, aucune ne mentionnait son implication chez les microalgues.

En plus de déterminer quel substrat, entre le glucose et l'acétate, permettait la valorisation du xylose, nous avons évalué la capacité de *A. protothecoides* à produire du xylitol. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à son génome afin d'en apprendre davantage sur les protéines potentiellement impliquées dans le transport du xylose ainsi que dans sa conversion en xylitol.

5.1 Résumé de l'article :

Conditions expérimentales et résultats physiologiques

Afin d'évaluer quel substrat, entre le glucose et l'acétate, favorisait l'assimilation du xylose par *Auxenochlorella protothecoides* en hétérotrophie, nous avons cultivé la microalgue en présence de 50 mMC de xylose, et de 100 mMC de glucose ou d'acétate. Comme contrôle, nous avons à nouveau réalisé la condition étudiée dans l'article précédent, où ces deux sources de carbone étaient présentes en quantités équivalentes en plus du xylose (50 mMC chacune). Nous avons suivi la croissance, ainsi que la disparition des substrats dans le milieu et l'apparition, le cas échéant, de xylitol.

Nos résultats ont montré que la présence de glucose inhibait dans un premier temps l'utilisation du xylose, mais qu'une fois le glucose devenu indétectable dans le milieu, son effet global sur l'assimilation du xylose était positif. En effet, lorsque du glucose était ajouté, la consommation de xylose, relativement à la densité cellulaire, atteignait un taux maximal de $0,84 \text{ g gDW}^{-1} \text{ j}^{-1}$. À l'inverse, en présence l'acétate, le xylose était assimilé de manière uniforme, mais avec un taux d'assimilation maximal bien inférieur ($0,24 \text{ g gDW}^{-1} \text{ j}^{-1}$). En revanche, lorsque le glucose et l'acétate étaient combinés simultanément au xylose, ce dernier montrait un taux d'assimilation proche de celui observé avec le glucose seul ($0,64 \text{ g gDW}^{-1} \text{ j}^{-1}$).

En ce qui concerne l'excrétion du xylitol, nous avons montré que, quelle que soit la condition étudiée, la conversion xylose-xylitol était quasiment stœchiométrique (1:1). Ce résultat suggérait un métabolisme actif, mais limité à la réduction du xylose en xylitol sans utilisation ultérieure pour la production de biomasse. De plus, le taux de production de xylitol au cours du temps, en tenant compte de la densité cellulaire, variait selon les conditions. Alors qu'en présence d'acétate, il restait relativement faible ($0,27 \text{ g gDW}^{-1} \text{ j}^{-1}$), suivant proportionnellement la consommation du xylose, il en était de même en présence de glucose ($0,30 \text{ g gDW}^{-1} \text{ j}^{-1}$), malgré un taux d'assimilation rapide. Lorsque les deux substrats étaient simultanément consommés, on observait un taux de production de xylitol rapide, à l'instar de la vitesse d'assimilation du xylose ($0,65 \text{ g gDW}^{-1} \text{ j}^{-1}$).

Ces résultats nous ont permis de supposer que le glucose jouait un rôle capital dans l'assimilation du xylose. Sa présence stimulait probablement l'expression de transporteurs membranaires permettant l'entrée du xylose, mais avec une affinité supérieure pour le glucose, ce qui empêchait alors le passage d'autres composés. L'acétate, quant à lui, étant pris en charge par des transporteurs spécifiques, n'entraînait pas en compétition avec le xylose pour l'entrée dans la cellule. Par conséquent, il pouvait être assimilé et favoriser le métabolisme rédox ainsi que l'activité de la xylose réductase, nécessaire à la production de xylitol.

Une stratégie de culture en *fed-batch*, où nous ajoutions progressivement du glucose et de l'acétate, a permis d'améliorer encore la conversion du xylose en xylitol, atteignant un rendement final de $0,91 \text{ g gxylose}^{-1}$, comparable aux taux de production obtenus chez certaines levures et bactéries génétiquement modifiées.

Analyse génomique : transport du xylose et conversion en xylitol

Face à ces résultats démontrant un métabolisme du xylose chez *A. protothecoides*, nous avons cherché à identifier d'éventuels transporteurs du xylose ainsi qu'une enzyme ayant une activité xylose réductase favorisant la production de xylitol. Pour ce faire, nous avons exploré le génome de la microalgue afin d'y rechercher ces protéines en les comparant à des homologues actifs bien caractérisés provenant de levures, de bactéries ou de plantes.

Nous avons mis en évidence deux transporteurs présumés appartenant à la famille des *Major Facilitator Superfamily* (MFS), dont l'un présente des caractéristiques structurelles compatibles avec un transport du xylose. Par ailleurs, nous avons identifié un gène codant une xylose réductase atypique contenant deux domaines catalytiques, alors que ses homologues fongiques et bactériens fonctionnent généralement sous forme d'homodimère.

Conclusion

Nos résultats ont montré que *A. protothecoides* était capable de métaboliser le xylose et de le convertir en xylitol avec un rendement élevé, particulièrement grâce à la présence combinée de glucose et d'acétate.

Xylose assimilation in heterotrophic *Auxenochlorella protothecoides*: A step towards microalgal xylitol bioproduction

Pablo Perez Saura¹, Pierre Cardol¹, Claire Remacle^{1*}

¹Laboratory of genetics and physiology of microalgae, InBios/Phytosystems Research Unit, University of Liège, Belgium

ORCID: Pablo Perez-Saura: 0000-0002-9823-685X; Pierre Cardol: 0000-0001-9799-0546; Claire Remacle: 0000-0002-5016-9547

***Corresponding Author:** c.remacle@uliege.be

Keywords: *Auxenochlorella protothecoides*, microalgae, heterotrophy, xylose, xylitol

Abstract

Xylitol is a high-value sugar alcohol widely used in the food and pharmaceutical industries. While microbial xylitol production primarily relies on fermentative organisms, sustainable alternatives involving photosynthetic microorganisms as a substitute for chemical hydrogenation remain largely unexplored. Here, we investigate whether *Auxenochlorella protothecoides* UTEX 25 can assimilate xylose and produce xylitol under heterotrophic conditions when glucose, acetate, or both carbon sources were simultaneously provided to the medium. When supplemented with glucose, xylose uptake was initially inhibited but later accelerated, leading to the highest xylose consumption rate ($0.84 \pm 0.10 \text{ g gDW}^{-1} \text{ d}^{-1}$). When supplemented with acetate, xylose assimilation occurred gradually with a lower consumption rate ($0.24 \pm 0.01 \text{ g gDW}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Xylose uptake was linked to xylitol excretion, with a 1:1 xylose-to-xylitol conversion ratio in all conditions. When supplemented with both carbon sources, xylose metabolism was enhanced, combining the benefits of both glucose-induced transport and acetate-sustained metabolism. This condition led to an intermediate xylose consumption rate ($0.64 \pm 0.06 \text{ g gDW}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and the highest xylitol production rate ($0.65 \pm 0.01 \text{ g gDW}^{-1} \text{ d}^{-1}$). A fed-batch strategy further improved xylose conversion and increased final xylitol yield to $0.91 \text{ g g}_{\text{xylose}}^{-1}$, comparable to xylitol bioproduction rates in engineered yeasts. Genome analysis identified putative xylose transporters and a putative xylose reductase. These findings establish *A. protothecoides* as a promising candidate for microalgal-based xylitol production, providing a foundation for further metabolic engineering and process optimization for sustainable xylose valorization.

1. Introduction

Microalgae are photosynthetic organisms, with some species also capable of efficient heterotrophic growth. Heterotrophy offers several advantages, including reduced contamination risks and the elimination of costly enclosed photobioreactors (Carone et al., 2019). Additionally, heterotrophic cultivation enhances biomass accumulation and the production of valuable biocompounds, such as lipids (Ghidossi et al., 2017). One of the main challenges in heterotrophic cultivation is selecting economically and ecologically viable carbon sources.

Hemicellulose, a major compound of lignocellulosic biomass alongside cellulose and lignin, is among the most abundant biomolecules on Earth. However, its industrial utilization is hindered by its complex structure and limited accessibility (Rao et al., 2023). Moreover, hemicellulose primarily contains xylose, a sugar rarely assimilated by microorganisms, except for certain yeasts (Fonseca et al., 2011; Morais Junior et al., 2019), filamentous fungi (Sampaio et al., 2003), bacteria (Yoshitake et al., 1973), and a few microalgae (Leite et al., 2015; Portillo et al., 2022; Zheng et al., 2014).

A previous study conducted in our laboratory demonstrated that the oleaginous green microalga *Auxenochlorella protothecoides* UTEX 25 is capable of heterotrophic growth using glucose, xylose, and acetate, the three major carbon sources found in beech wood dilute-acid hemicellulose hydrolysates (Miazek et al., 2017; Perez Saura et al., 2024). However, while *A. protothecoides* could not grow when xylose was the sole carbon source, a decrease in xylose concentration was observed when acetate and glucose were simultaneously present in the medium. It remained unclear whether glucose or acetate, enabling xylose facilitated assimilation, and the metabolic fate of xylose inside the cell was not determined (Perez Saura et al., 2024).

In this study, we evaluated the ability for *A. protothecoides* to utilize xylose in the presence of glucose and/or acetate and assessed the influence of these carbon sources on xylose metabolism. Additionally, we proposed a strategy to improve xylose valorization. Interestingly, we discovered that xylose uptake was associated with xylitol excretion, suggesting a partially active xylose metabolism pathway. This pathway likely involves sugar membrane transporters for xylose uptake and xylose reductase (XR) for catalyzing the reduction of xylose into xylitol.

This finding brings another biotechnological value to *A. protothecoides*, which is already considered as a platform for lipid production (Ghidossi et al., 2017; Goold et al., 2024). Xylitol, a widely used sucrose substitute in the agri-food and cosmetic industries, offers high sweetening power comparable to glucose but with only half of the caloric value (Umai et al., 2022). Although industrial xylitol production typically relies on the acidic hydrolysis of xylans from hemicellulose-rich materials and chemical reduction using Raney nickel (Umai et al., 2022), microbial-based xylitol production presents a more sustainable alternative, often relying on engineered yeasts and bacteria (Umai et al., 2022). Reports of xylitol excretion by wild-type microalgae remains scarce, with, to our knowledge, only one example described in the green microalga *Chlorella sorokiniana* (Zheng et al., 2014).

2. Materials and methods

a. Microalgal strain, cultivation medium, and preculture

The study was conducted on *A. protothecoides* strain SAG 211-7a (UTEX 25), obtained from the Culture Collection of Algae at Göttingen University, Germany (SAG). The cells were maintained on 1.5% agar plates with Tris-Minimal-Phosphate (TMP) medium (Gorman & Levine, 1965) at 25°C under constant illumination ($40 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). To acclimate the cells to heterotrophic conditions prior to experimentation, they were maintained in the dark in 25 mL of liquid TMP (100 mL flask) at 27°C under constant shaking in an incubator (GroBanks®, CLF Plant Climatics, Germany or Memmert GmbH, Germany). The medium was supplemented with an equimolar carbon concentration of D-glucose, D-xylose (referred from now as glucose and xylose), and acetate, resulting in a final carbon concentration of 150 mM of carbon atoms (mMC) (50-50-50 mMC, or 8.33 mM of glucose, 10 mM of xylose, 25 mM of sodium acetate). One liter of TMP medium contains: 2.42g Tris buffer, 400 mg NH_4Cl , 50 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 93.5 mg K_2HPO_4 , 63.0 mg KH_2PO_4 , 50 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.4 mg H_3BO_3 , 5.1 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4.9 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 1.1 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. pH was adjusted to 7.5 with HCl and the medium was sterilized in an autoclave for 20 min at 121°C. For solid TMP medium, 15 g of agar were added to the solution before sterilization. After sterilization, the medium was supplemented with 0.22 μM filtered thiamine (vitamin B1) at a final concentration of 10 μM . Two sequential precultures, each lasting one week, were performed before starting the experiments in the different media described above.

b. Growth conditions and growing parameters determination

TABLE 1: Carbon sources supplied in each cultivation condition (GX, AX, AGX, or 2x-AGX). Values are presented as the percentage (%) or the concentration of the total amount of carbon atoms represented by the substrate (mMC), or by the equivalent molar concentration considering the specific carbon source molarity (mM). A (+) symbol in 2x-AGX specifies the substrate concentration added during the cultivation process as a fed-batch strategy.

Conditions	Acetate			D-glucose			D-xylose		
	%	[] (mM)	[] (mMC)	%	[] (mM)	[] (mMC)	%	[] (mM)	[] (mMC)
GX	0	0	0	66	16.67	100	33	10	50
AX	66	50	100	0	0	0	33	10	50
AGX	33	25	50	33	8.33	50	33	10	50
2x-AGX	40	25+25	50+50	40	8.33+8.33	50+50	20	10	50

Four different culture conditions were tested (**Table 1**). All cultures were inoculated with the preculture at an initial optical density at 800 nm (OD_{800}) of 0.2. Cultures were maintained in the dark at 27°C using 100 mL shaking flasks containing 25 mL of minimal medium at pH 7.5. Each condition contained 50 mMC of xylose (10 mM) supplemented with either 100 mMC of glucose (GX condition), 100 mMC of acetate (AX condition), or both at equimolar concentrations (50-50 mMC) in the AGX condition. A fed-batch 2x-AGX condition was also tested, in which exponentially growing preculture

cells were inoculated in the AGX condition. When acetate and glucose were depleted (after two days), an additional 50 mM of acetate and 50 mM of glucose were supplied.

The TMP medium was used as the basal liquid culture medium, with pH adjustment depending on the carbon source. For AX and AGX conditions, the initial pH was set to 7.5. In GX conditions, the 20 mM Tris-HCl buffer (pKa=8.1 at 25°C) was replaced with an equivalent amount of MES buffer (pKa=6.2 at 20°C) and the initial pH was set to 7.0. The use of MES buffer, with a lower pKa, counteracts the rapid acidification occurring when glucose and ammonium serve as sole carbon and nitrogen sources. In case of AGX, the basification of the medium by acetate uptake compensates the acidification by glucose uptake (Perez Saura et al., 2024).

Microalgal growth was monitored spectrophotometrically cultures at 800 nm (Perkin-Elmer lambdaTM 265 UV/VIS, USA) using plastic cuvettes with a 1 cm optical path. When necessary, samples were diluted to maintain OD₈₀₀ values between 0.1 and 0.3. The dry biomass concentration (DW) was estimated with the following equation (Perez Saura et al., 2024):

$$DW (g L^{-1}) = OD_{800} \times 0.207$$

The specific growth rate (μ), expressed in day⁻¹, was calculated during exponential phase as the slope of the OD₈₀₀ natural log linear regression over time:

$$\mu = \frac{\ln OD_{800_2} - \ln OD_{800_1}}{t_2 - t_1}$$

Biomass yield ($Y_{x/s}$) on substrate, expressed in gDW g_{substrate}⁻¹, was calculated as:

$$Y_{x/s} = \frac{X_{max} - X_0}{S_0 - S_1}$$

Where X_0 , X_{max} represent the initial and maximal DW concentration (g L⁻¹) at the start of the culture, and S_0/S_1 are the initial and final concentrations of acetate and/or glucose (g L⁻¹).

The xylose consumption and xylitol production rates, expressed in g gDW⁻¹ day⁻¹ were calculated as follows:

$$Xylose \text{ consumption rate} = \frac{[xylose]_1 - [xylose]_2}{(t_2 - t_1) \times \bar{X}}$$

$$Xylitol \text{ production rate} = \frac{[xylitol]_2 - [xylitol]_1}{(t_2 - t_1) \times \bar{X}}$$

Where $[xylose]_2/[xylose]_1$ and $[xylitol]_2/[xylitol]_1$ represent the highest and the lowest values of xylose or xylitol (g L⁻¹) at the time points t_2 and t_1 (in days) and \bar{X} represents the average DW concentration (g L⁻¹) over the same period.

To assess statistical significance, a Fisher test was first performed to evaluate the variance homogeneity (p value < 0.05). A Student's t-test was applied to compare the two groups. If the p value was greater than 0.01, the statistical result was explicitly stated in the text.

c. Carbon source concentration determination

At the same time-points as OD₈₀₀ measurement, 1-2 mL of culture were sampled and centrifuged (16,000 x g; 3min). The supernatant was stored at -20°C for further analysis. Glucose, xylose, xylitol and acetate were quantified in 0.22 µm filtered culture supernatant by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu, Japan) as described in (Perez Saura et al., 2024). Concentrations were determined by comparing chromatogram peak areas to standard calibration curves of known glucose, xylose, xylitol, or acetate concentration. The injection volume was 40 µL for all samples.

d. Protein alignments

Putative xylose transporter and xylose reductase from *A. protothecoides* UTEX 25 were identified using *Candida intermedia* glucose/xylose facilitator 1 (Q2MDH1, Ci|gxf1) (Leandro et al., 2006), and *Debaryomyces nepalensis* xylose reductase (A0A0M4HL56, Dn|akr2) (Paidimuddala et al., 2018) as queries for tblastn searches in the Phycocosm database (<https://phycocosm.jgi.doe.gov/phycocosm/home>) (Grigoriev et al., 2021). Globally protein sequence alignment were performed using Clustal Omega (Madeira et al., 2024). Experimentally determined protein structures were obtained from the Uniprot database or the RCSB Protein Data Bank. 3D structure predictions were generated using AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024), and protein alignments visualization were created using the ESPript 3.0 software (Robert & Gouet, 2014). 3D structure representations were generated using the PyMOL™ software (v3.1.1, Schrödinger, Inc., NY, USA).

3. Results and discussion

a. Algal growth and carbon consumption

To determine whether glucose or acetate enables xylose assimilation, we first assessed the growth of *A. protothecoides* in a medium containing either glucose and xylose (GX), or acetate and xylose (AX). A medium containing both glucose and acetate along with xylose (AGX) was used as a control, based on our previous studies showing that xylose assimilation occurs under this condition (Perez Saura et al., 2024). **Figure 1A** displays the cell density of the three conditions over 8 days of dark cultivation. The GX condition reached a maximal biomass at 1.77 ± 0.08 gDW L⁻¹ after 2 days, with a specific growth rate (μ) of 2.65 ± 0.02 d⁻¹, before entering the stationary phase. In contrast in the AX condition, the maximum biomass was significantly lower (0.82 ± 0.06 gDW L⁻¹), achieved after 4 days, with a growth rate more than twofold lower (0.98 ± 0.02 d⁻¹) than in the GX condition. The AGX condition exhibited intermediate growth dynamics, reaching the stationary phase after 2 days, with a growth rate of 2.32 ± 0.06 d⁻¹ and a maximum biomass of 1.13 ± 0.05 gDW L⁻¹.

As shown in Figure 1B-C, the stationary phase coincided with acetate or glucose depletion in GX and AX. However, in AGX (Fig. 1D), exponential growth phase ceased after glucose depletion, despite acetate remaining in the medium. Complete acetate consumption followed on next day, after the culture had already entered the stationary phase. Biomass yields on substrates, calculated as biomass produced per gram of acetate and/or glucose consumed, were 0.28 ± 0.01 and 0.59 ± 0.02 gDW g⁻¹ in the AX and GX conditions, respectively, with an intermediate value of 0.40 ± 0.02 gDW g⁻¹ in AGX. These trends align with previous findings on *A. protothecoides* growth (Heredia-Arroyo et al., 2010; Perez Saura et al., 2024; Shi et al., 1999).

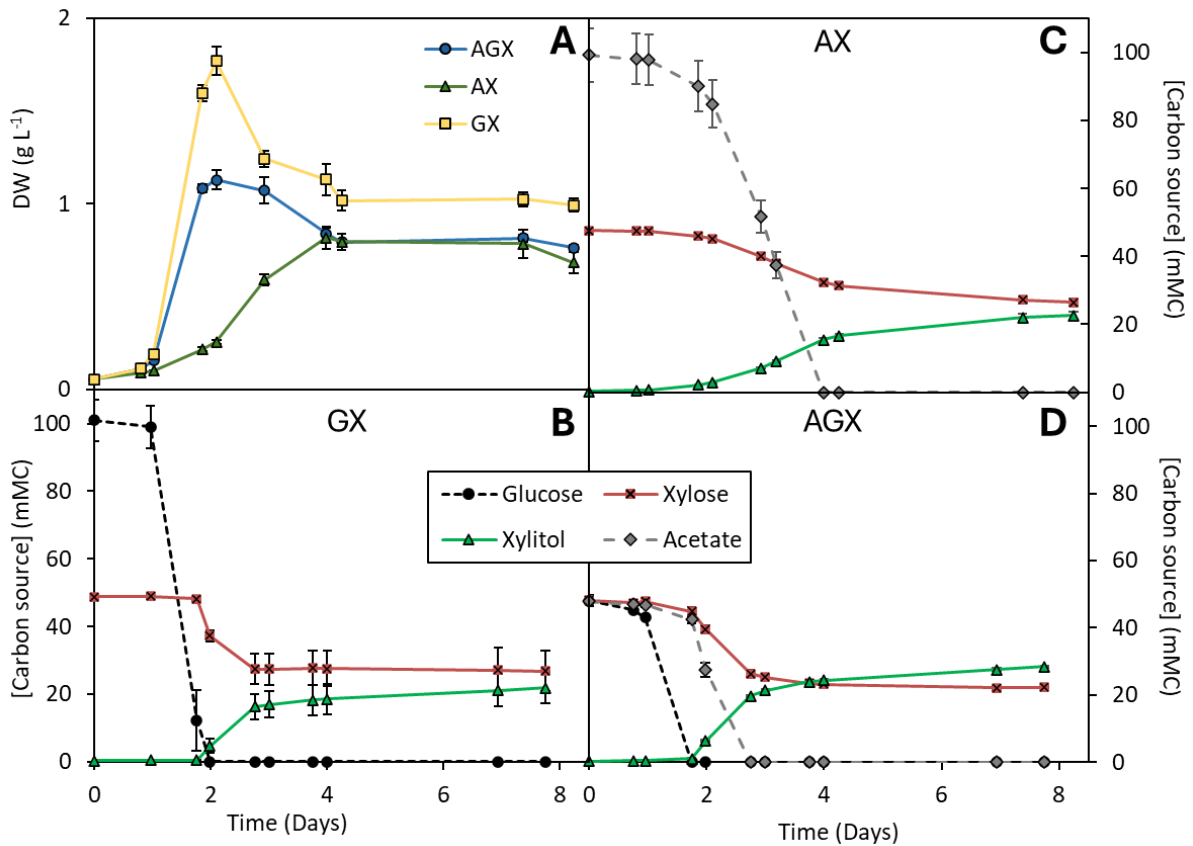


FIGURE 1: Growth curves (A), and carbon sources concentrations (B-D) in the culture medium of *A. protothecoides* cells grown in heterotrophy in the presence of xylose, glucose and/or acetate. Graph (A) shows dry weight evolution (in g L⁻¹) in the AGX (blue circles), AX (green triangles), and GX (yellow squares) conditions over time (days). Graphs (B-D) represent the evolution of glucose (dashed lines – black circles), acetate (dashed lines – grey diamonds), xylose (solid lines – black crossed-red squares), and xylitol (solid lines – green triangles) concentrations (expressed in mM of carbon atoms), over time (days), in the GX (B), AX (C), and AGX (D) conditions. Each value on the graphs is presented as the mean of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation of the mean (\pm SD).

Beyond the glucose and acetate consumption, all three conditions showed significant xylose uptake (Fig. 1B-D), demonstrating that either glucose or acetate can stimulate the process. Xylose consumption was delayed in the presence of glucose and only began after glucose depletion in both AGX and GX (Fig. 1B, 1D), whereas in AX, xylose uptake occurred while acetate was still available (Fig. 1C). This suggests that, unlike acetate, glucose initially inhibits xylose uptake, likely due to competition for hexose or pentose transporters binding sites, as previously observed (Badary et al., 2024; Gupta et al., 2022; Sun et al., 2012). In addition, glucose is known to negatively regulate global xylose metabolism, including the xylose reductase (XR) enzymatic expression or activity (Gupta et al., 2022; Ribeiro et al., 2021). Interestingly, the presence of glucose at the start of the culture had in fine a positive impact on xylose consumption rate since it was about 3-times higher in AGX ($0.636 \pm 0.055 \text{ g day}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$, p value) and 4-times higher in GX ($0.848 \pm 0.104 \text{ g day}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$), compared to AX ($0.239 \pm 0.008 \text{ g day}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$, p value<0.01) (Fig. 2A). These findings suggest that xylose uptake might be

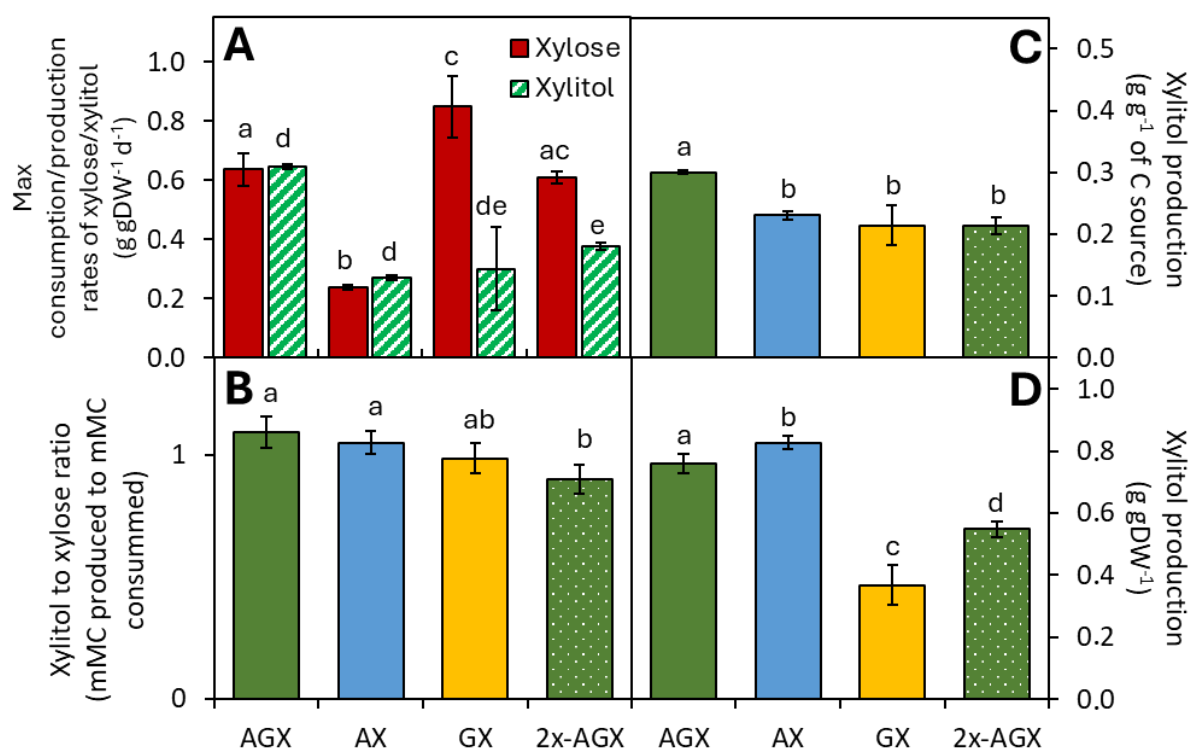


FIGURE 2: Xylose and/or xylitol consumption and production parameters calculated from *A. protothecoides* cells grown in heterotrophy in the presence of xylose and: glucose (GX, yellow bars), acetate (AX, blue bars), or both carbon sources in batch (AGX, green bars) or fed-batch (2x-AGX, white dotted green bars) cultivation strategies. Bar-chart (A) shows the maximal xylose consumption (red solid bars) and xylitol production (green hatched bars) rates, expressed in $\text{g gDW}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Bar-chart (B) represent the ratio of xylitol concentration at the end of the culture compared to the xylose concentration at the beginning of the culture, expressed in mM of carbon atoms. Bar-charts (C) and (D) display the global xylitol production by the end of the culture compared to the total carbon sources consumed (acetate and/or glucose) provided at the start of the culture (C, expressed in g g^{-1}), or to the maximal achieved biomass in the condition (D, expressed in g gDW^{-1}). Each value on the graphs is presented as the mean of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation of the mean (\pm SD). Distinct letters on top of the bars indicate significantly different values within the same data group, according to a Student's t-test ($p < 0.05$).

facilitated by transporters that are present in low amounts within the cell membrane (occurring in AX), with an increased expression under glucose-induced conditions. However, these transporters do not transport xylose as long as glucose is present. A similar observation was previously reported in *C.*

sorokiniana (Zheng et al., 2014), where xylose uptake was detected only after acclimation in the presence of glucose and was therefore likely mediated by nonspecific hexose transporters with some affinity for pentoses.

Since *A. protothecoides* UTEX 25 was originally isolated from the sap of a wounded *Populus alba* tree rich in xylose-containing polysaccharides (Viëtor et al., 1995), the ability to uptake xylose uptake is unsurprising. However, only a few reports describe xylose uptake by heterotrophically grown eucaryotic microalgae. Among red algae, *Galdieria sulphuraria* was shown to assimilate xylose efficiently (Perez Saura et al., 2024; Portillo et al., 2022). In green algae, xylose utilization was demonstrated in only two uncharacterized *Desmodesmus* strains from the class of Chlorophyceae (family of the Scenedesmaceae) (Badary et al., 2024; Sartori et al., 2025), and diverse species from the class of Trebouxiophyceae (Leite et al., 2015; Zheng et al., 2014), such as *A. protothecoides* (Mu et al., 2015). Nevertheless, in the latter case, no clear evidence of net xylose assimilation was provided, as it was mixed with other sugars found in sugarcane bagasse hydrolysate (Mu et al., 2015). At last, a study from (Leite et al., 2015) isolated and characterized ten putative *Chlorella spp.* strains capable of xylose utilization when grown in the dark (not axenically). As previously mentioned, *C. sorokiniana* also showed xylose uptake, that was combined with xylitol excretion in the cultivation medium (Zheng et al., 2014).

b. Xylose uptake is correlated to xylitol excretion

In all tested conditions, xylose consumption was accompanied by the appearance of an additional peak in high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. By passing standards of xylose secondary metabolites through the column, we identified this peak as xylitol (**Suppl. Fig. S1**) (**Fig. 1B-D**). Unlike *C. sorokiniana*, where about 60% of the consumed xylose was converted into secreted xylitol (Zheng et al., 2014), a near 1:1 ratio xylitol-to-xylose was observed in the three conditions (AX, GX, and AGX) (**Fig. 2B**). This suggests that while *A. protothecoides* possesses an active xylose reductase (XR) enzyme, the reduced xylitol is not further metabolized for biomass production.

Since xylitol production depended on the presence of the other carbon sources, we calculated the xylitol yield per gram of initially supplied acetate and glucose (**Fig. 2C**). No significant difference in xylitol production yield was observed between AX and GX (0.231 ± 0.007 and 0.214 ± 0.032 $\text{g}_{\text{xylitol}} \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}$, respectively). However, in AGX, the yield was significantly higher at 0.300 ± 0.003 $\text{g}_{\text{xylitol}} \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}$ ($p < 0.01$ vs AX, $p = 0.043$ vs GX) (**Fig. 2C**). Similarly, xylitol production rates per biomass unit followed the same trend: AGX exhibited a nearly 2-fold higher rate (0.647 ± 0.007 $\text{g}_{\text{xylitol}} \text{gDW}^{-1} \text{d}^{-1}$) compared to AX (p value < 0.01) and GX (p value = 0.049) (0.270 ± 0.007 , and 0.300 ± 0.140 $\text{g}_{\text{xylitol}} \text{gDW}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectively) (**Fig. 2A**). Finally, the final xylitol concentration relative to maximal cell density is more than 2-fold lower in GX (0.367 ± 0.064 g gDW^{-1}) compared to AX and AGX (0.827 ± 0.020 g gDW^{-1} and 0.759 ± 0.031 g gDW^{-1} , respectively) (**Fig. 2D**). These results suggest that glucose facilitates high initial growth and a rapid shift to xylitol conversion but may limit total xylitol yield due to early stationary phase onset.

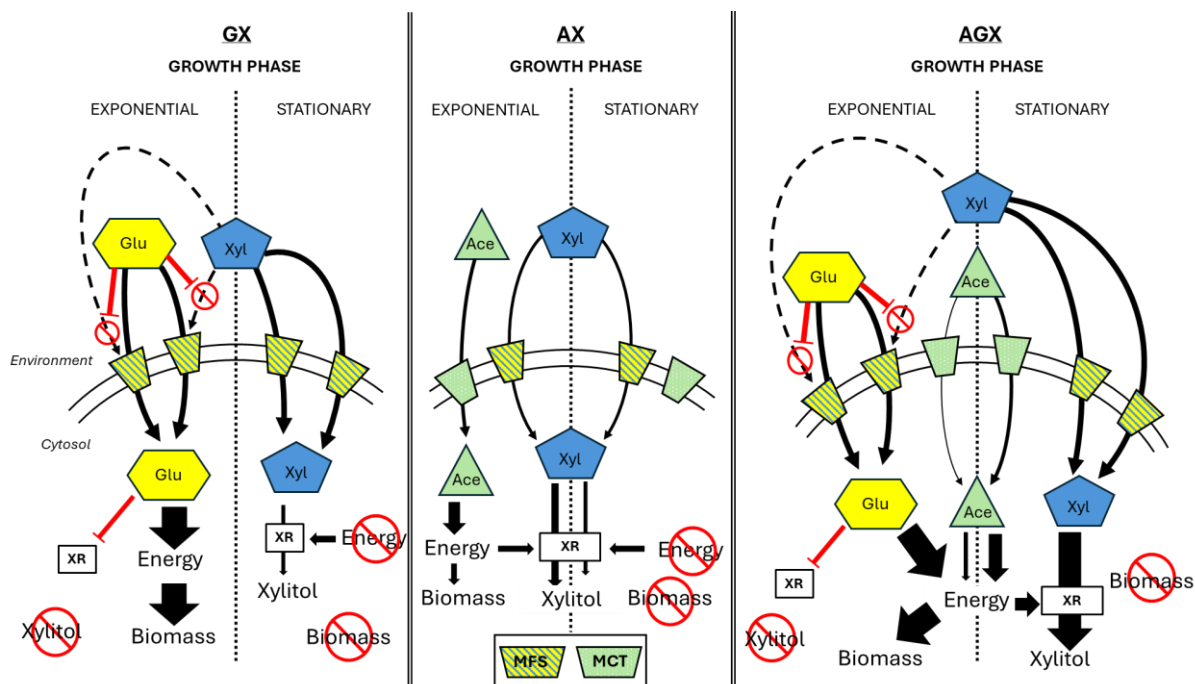


FIGURE 3: Hypothetical model of xylose conversion into xylitol of *A. protothecoides* grown heterotrophically in the presence of xylose and glucose (GX), acetate (AX), or both glucose and acetate (AGX), during exponential and stationary growth phases. Substrates are represented by yellow hexagons for glucose (Glu), blue pentagons for xylose (Xyl), and green triangles for acetate (Ace). Transporters are marked trapezoides colored in yellow with hashed blue line for glucose and xylose (MFS), and green with white dots for acetate (MCT). Xylose reductase (XR) is represented by a white box.

Overall, our findings indicate that xylose metabolism in *A. protothecoides* is influenced by the presence of glucose and acetate, which modulate both xylose uptake and xylitol production efficiency (Fig. 3). When acetate was the sole addition carbon source (AX), xylose uptake and xylitol production occurred gradually alongside acetate consumption. Since both xylose consumption and xylitol production rates were identically low compared to AGX, this suggests that xylose transport was limited in the absence of glucose-induced facilitation. Additionally, acetate and xylose uptakes did not appear to compete, likely because they utilize different transport systems. Acetate is transported across the membrane via monocarboxylate transporters (MCTs) (Casal & Leão, 1995; Inwongwan et al., 2019), whereas xylose is taken up by sugar transporters belonging to the Major Facilitators Superfamily (MFS) (Drew et al., 2021; Sun et al., 2012). In the presence of glucose (GX), xylose uptake is initially inhibited, likely due to higher glucose affinity for shared transporters, thereby outcompeting xylose. However, once glucose was depleted, xylose uptake accelerated rapidly. Despite this, the overall conversion of xylose to xylitol remained limited, as the culture quickly entered the stationary phase, likely due to energy reallocation. This resulted in a xylitol production rate more than 2-fold lower than the xylose consumption rate. In contrast, the AGX condition revealed a synergistic effect between glucose and acetate. Here, xylose uptake was presumably enhanced following glucose depletion due to the induction of hexose transporters, similar to what was observed in GX. Meanwhile, acetate contributed to sustained metabolic activity, allowing xylose assimilation via the glucose transporters while maintaining redox balance, as seen in AX. This combination ensured both high xylose consumption and efficient xylitol production rates. In conclusion, our findings highlight that while glucose dictates the

timing of xylose metabolism, acetate plays a key role in maintaining redox balance and enzymatic activity, ultimately optimizing xylitol yield.

c. Fed-batch cultivation enhances xylitol excretion

To improve xylose-to-xylitol conversion yield, that was around 50% (0.5 gram of xylitol per gram of xylose) by the end of the culture in the previously mentioned conditions (**Fig. 1B-D**), we implemented a fed-batch strategy under 2x-AGX condition. After two days, when glucose and acetate were depleted and xylose-to-xylitol conversion had begun, an additional supply of both carbon sources was added (**Fig. 4A**).

Following the replenishment, biomass production resumed, and acetate/glucose were rapidly consumed. Notably, xylitol production rate remained stable until about 70% of the xylose was consumed, confirming the importance of a metabolizable carbon source in sustaining XR activity (**Fig. 4A**).

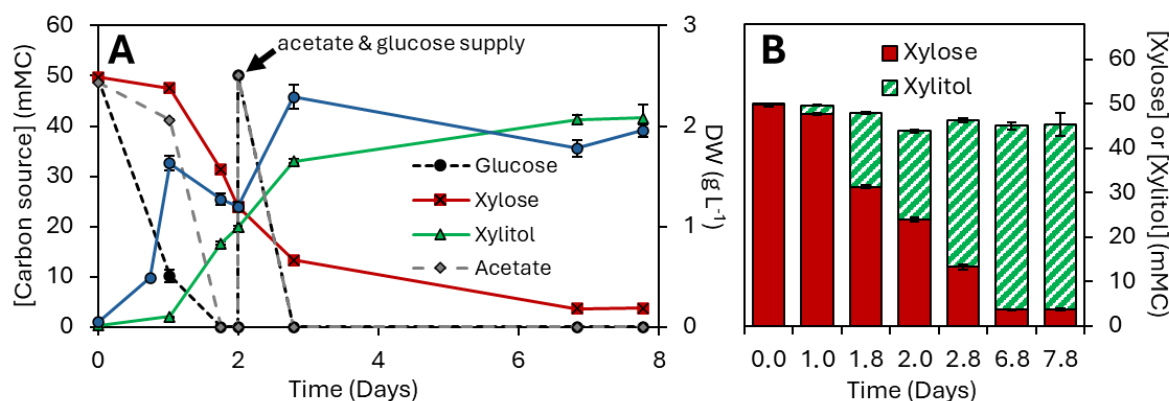


FIGURE 4: Growth curves (A), and carbon sources concentrations (A-B) in the culture medium of *A. protothecoides* cells grown in heterotrophy in the presence of xylose, glucose and acetate in the 2x-AGX condition. Graph (A) shows dry weight evolution (in g L⁻¹) in the AGX (blue circles) and glucose (dashed lines – black circles), acetate (dashed lines – grey diamonds), xylose (solid lines – black crossed-red squares), and xylitol (solid lines - green triangles) concentrations (expressed in mM of carbon atoms) over time (days). Bar-chart (B) shows the evolution of xylose consumption (red filled-bars) and xylitol production (green hatched-bars) over time (days). Each value on the graphs is presented as the mean of three independent biological replicates. Error bars represent standard deviation of the mean (\pm SD).

Beyond this point, biomass production, xylose consumption, and xylitol production gradually declined until stabilizing on day 7 (**Fig. 4A**). By the end of cultivation, the xylose conversion yield was significantly improved to 90%, with only 3.7 mM xylose remaining from an initial 49.5 mM supplied (**Fig. 2B & Fig. 4A-B**). The final xylitol yield was 0.91 ± 0.06 g g_{xylose}⁻¹, comparable to the highest yields reported for wild-type yeasts such as *Candida tropicalis* JA2 (0.86 g g_{xylose}⁻¹) and *Yarrowia lipolytica* (0.97 g g_{xylose}⁻¹) (Morais Junior et al., 2019; Prabhu et al., 2020), but also for engineered *E. coli* strains (~ 0.95 g g_{xylose}⁻¹) (Umai et al., 2022; Yuan et al., 2019).

Compared to the other conditions, the xylitol-to-xylose ratio in 2x-AGX was slightly below 1 (**Fig. 2B**), suggesting that a portion of the xylose may have been assimilated rather than excreted. Additionally, while the xylose consumption rate did not significantly differ between AGX and 2x-AGX, the xylitol production rate was markedly lower ($p < 0.01$) in 2x-AGX (0.375 ± 0.012 g gDW⁻¹ d⁻¹) compared to AGX (0.647 ± 0.007 g gDW⁻¹ d⁻¹) (**Fig. 2A**). Similarly, xylitol production per unit of final

biomass or per gram of consumed carbon (acetate and glucose) was slightly reduced in 2x-AGX ($0.548 \pm 0.026 \text{ g gDW}^{-1}$ and $0.213 \pm 0.014 \text{ g g}_{\text{substrate}}^{-1}$) compared to AGX condition ($0.759 \pm 0.031 \text{ g gDW}^{-1}$ and $0.300 \pm 0.003 \text{ g g}_{\text{substrate}}^{-1}$) (Fig. 2C-D).

This strategy appears promising if the main objective is maximizing net xylitol production. However, it may be less relevant in a biorefinery context, where simultaneous biomass production and efficient xylose valorization are targeted. While the maximal volumetric xylitol productivity observed in this study ($0.57 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) is relatively low compared to xylitol-producing microorganisms reported in literature, such as *Candida tropicalis* (e.g. $\sim 67 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), or engineered *E. coli* ($\sim 50 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Morais Junior et al., 2019; Yuan et al., 2019), our data provide valuable insights into xylitol production by microalgae, particularly in terms of achieving high xylitol yield.

d. Genome analysis of *A. protothecoides*

Following the physiological characterization, we explored the genome of *A. protothecoides* UTEX 25 to identify candidate genes encoding xylose transporters and xylose reductase (XR), using sequence homology analyses at the Phycocosm website (Grigoriev et al., 2021).

Xylose transporter

Sugar transport in cells is mediated by membrane transporters, with xylose uptake primarily facilitated by proteins belonging to the Major Facilitator Superfamily (MFS). MFS transporters are folded into 12 transmembrane segments, with the N- and C-terminal helices facing the intracellular side. These transporters can function as facilitators, antiporters, or symporters (Drew et al., 2021). Xylose is commonly transported through proton-coupled MFS transporters (Bueno et al., 2020; Drew et al., 2021, 2021; Leandro et al., 2006). One example is the glucose/xylose facilitator 1 of *Candida intermedia* PYCC 4715 (Ci|gxf1) (Fonseca et al., 2011; Leandro et al., 2006), which is the most efficient xylose transporter when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* (Runquist et al., 2010).

CHAPITRE V

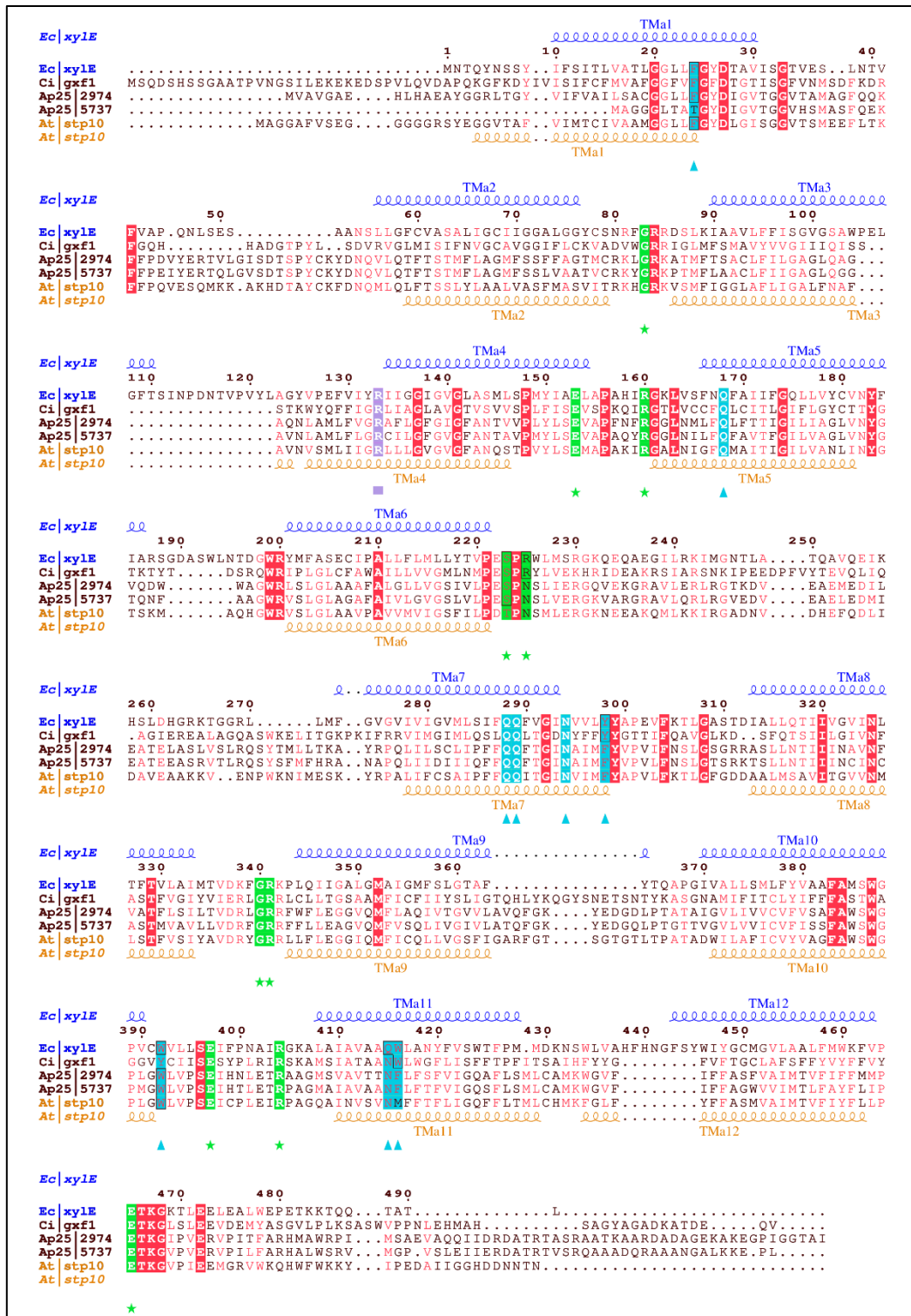


FIGURE 5: Global alignment of xylose transporters of *E. coli* (Ec|xylE), *C. intermedia* (Ci|gxf1), and *A. thaliana* (At|stp10) with two putative *A. protothecoides* xylose transporters (Ap25|2974 and Ap25|5737). Boxes with white characters in bold show amino acid residues with strict identity. Red characters show conserved function in amino acid residues among groups. Blue triangle labels show positions of key amino acid residues for xylose coordination. Green star labels show positions of key amino acid residues for sugar transporter (SP) signature. Black frames highlight strictly conserved amino acid residues across groups compared to Ec|XylE. Top secondary structures (in blue) show predicted transmembrane alpha-helices in Ec|xylE. Bottom secondary structures (in orange) show predicted transmembrane alpha-helices in At|stp10.

A bioinformatic search using Ci|gxf1 as a query identified two putative xylose transporters in *A. protothecoides*, designated Ap|2974 and Ap|5737, with 25.93% and 27.08% sequence identity to Ci|gxf1, respectively. These proteins also showed 25.55% and 27.31% identity to Ec|xylE, a high-affinity D-xylose:H⁺ symporter from *E. coli* (Sun et al., 2012), and 47.84% and 48.13% identity to STP10 from *A. thaliana* (At|stp10), a well-characterized hexose:H⁺ symporter (Bueno et al., 2020; Paulsen et al., 2019). Both Ap|2974 and Ap|5737 retained the characteristic 12 transmembrane domains and four internal helices typical of MFS sugar transporters, as shown in (**Suppl. Fig. S2**). However, Ap|5737 is truncated of 16 amino acid residues at the N-terminal region compared to the crystal structures of Ec|xylE (Sun et al., 2012) and At|stp10 (Paulsen et al., 2019), leading to an incomplete first transmembrane domain, which reduces the probabilities for a putative activity.

The sugar transporter (SP) signature, responsible for coupling sugar transport with proton movement, was well preserved in both *A. protothecoides* transporters (**Fig. 5, Table S1**). A notable exception was at position 225 of Ec|xylE (Sun et al., 2012) where an Arginine was found in Ci|gxf1 but replaced by an Asparagine in Ap|2974 and Ap|5737. Since At|stp10, a functional sugar/H⁺ symporter, also contains a Asn residue at this position (Paulsen et al., 2019), this substitution is unlikely to impair function of Ap|2974 and Ap|5737.

Amino acids implicated in xylose binding and coordination are predominantly located at the C-terminal end of the transporter and include polar residues with hydroxyl groups, facilitating hydrogen bonding, and aromatic residues that create a hydrophobic cavity to retain xylose (Faham et al., 2008; Sun et al., 2012). On the nine functionally-validated xylose-coordinating residues in Ec|xylE (Sun et al., 2012), six were conserved in Ap|2974 (**Fig. 5, Table S1**). The observed substitutions Q415N, Y298F, and W416F are unlikely to impact function, as Q415N is also present in Ci|gxf1, an efficient xylose transporter (Runquist et al., 2010), and the two aromatic substitutions unlikely impact xylose coordination (Faham et al., 2008; Sun et al., 2012). Conversely, Ap|5737 displayed an additional substitution: F24T (Ec|xylE numbering). Previous studies have shown that an F24A mutation in Ec|XylE impaired transport due to a loss of substrate stabilization (Bueno et al., 2020). Given this and the truncated transmembrane domain, Ap|5737 is unlikely to be functional as a xylose transporter.

Overall, Ap|2974 appears to be the most promising candidate for xylose transport in *A. protothecoides*. However, further experimental validation is required to assess its specificity and functionality.

Xylose reductase

To identify a putative xylose reductase (XR) in *A. protothecoides* UTEX 25 genome, we conducted a bioinformatic search using a well-characterized XR from *Debaryomyces nepalensis* (Dn|akr2), a member of aldose-keto reductase (AKR) NAD(P)H-dependent family (AKR2B) (Paidimuddala et al., 2018). A candidate protein, Ap|1177, was identified, displaying 20% sequence identity with Dn|akr2. However, Ap|1177 was notably longer (675 residues) compared to Dn|akr2 (320 residues). Structural modeling revealed that Ap|1177 consists of two globular domains with similar secondary and tertiary structures, except for the first 83 residues at the N-terminal region (**Fig.**

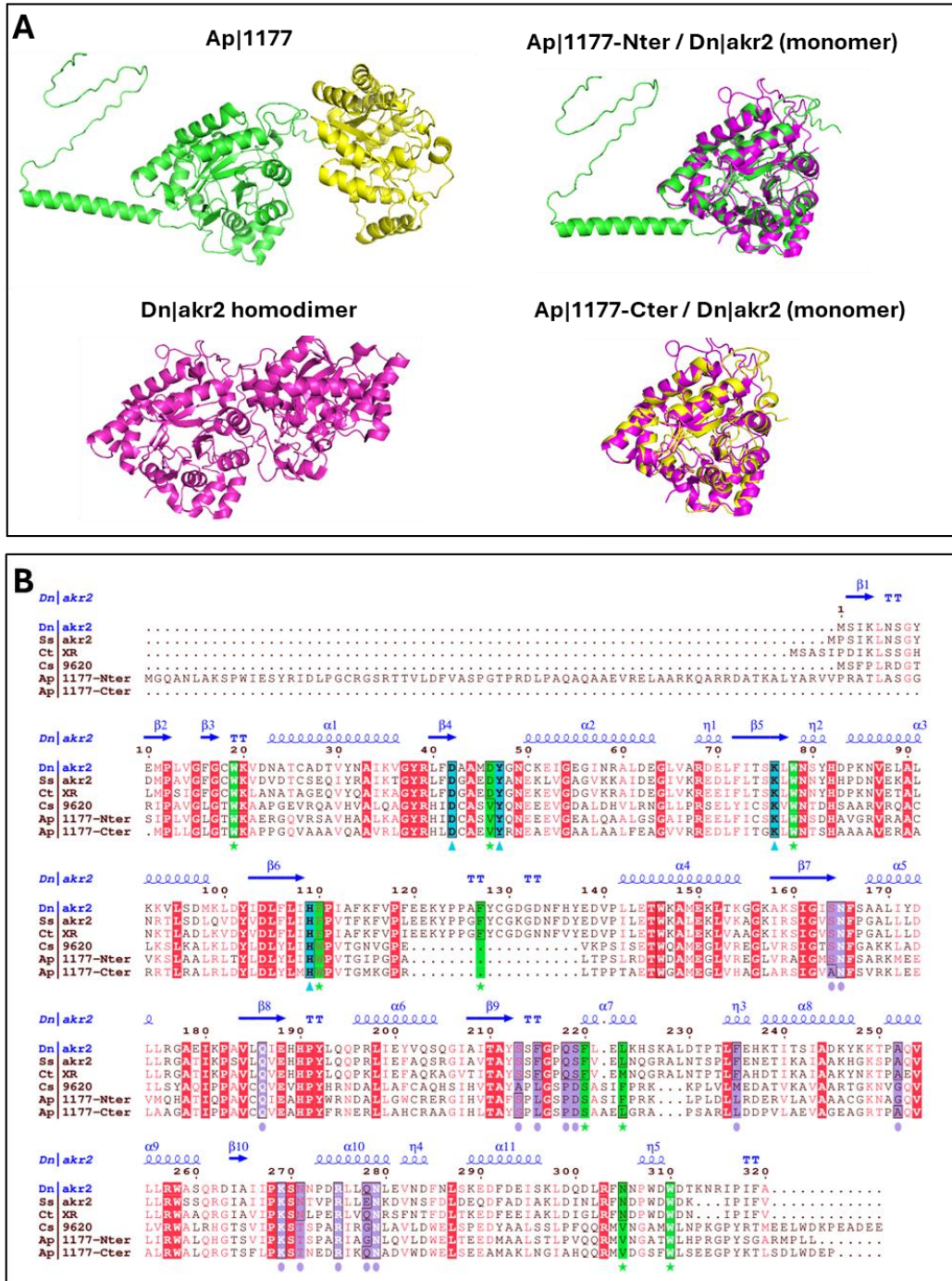


FIGURE 6: (A): Predicted 3D structure of the putative *A. protothecoides* xylose reductase Ap|1177 compared to Dn|akr2 (in purple). The green part represents the N-terminal domain of Ap|1177 and the yellow part represents the C-terminal domain of Ap|1177. (B): Global alignment of xylose reductase of *D. nepalensis* (Dn|akr2), *S. stipitis* (Ss|akr2), *C. tenuis* (Ct|XR), and *C. sorokiniana* (Cs|9620) with the N and C-terminal domains of a putative *A. protothecoides* xylose reductase (Ap|1177). Boxes with white characters in bold show amino acid residues with strict identity. Red characters show conserved function in amino acid residues among groups. Blue triangle labels show positions of the AKR family catalytic tetrad. Green star labels show positions of key amino acid residues for xylose binding. Purple circles labels show positions of key amino acid residues for NADPH-specificity. Black frames highlight strictly conserved amino acid residues across groups compared to Dn|akr2. Top secondary structures found in Dn|akr2 are marked in blue.

6A-B). In addition, the N-terminal (Ap|1177-Nter) and C-terminal (Ap|1177-Cter) domains of the protein shared 56.61% sequence identity. A multiple sequence alignment with known XRs, including *Scheffersomyces stipitis* (Ss|akr2) (Son et al., 2018), and *Candida tenuis* (Ct|XR) (Kratzer et al., 2006;

Petschacher & Nidetzky, 2005), revealed that Ap|1177-Nter and Ap|1177-Cter shared 38.41% and 39.15% identity with Dn|akr2, respectively (**Fig. 6B, Table S2**). A putative XR from *C. sorokiniana* found by bioinformatic analysis (Cs|9620) was also included in the alignment, since cell extracts demonstrated XR activity (Zheng et al., 2014). Enzymes from the AKR2 family are typically active as homodimer in solution (Kratzer et al., 2006; Petschacher & Nidetzky, 2005; Son et al., 2018). Structural prediction showed good superimposition of each domain of Ap|1177 to Dn|akr2 (**Fig. 6A**). These findings suggest that the N- and C-terminal domains of Ap|1177 function cooperatively, mimicking an active AKR2 homodimer. Consequently, each domain was analyzed individually through *in silico* approaches to further assess its potential role in xylose metabolism.

The conserved catalytic tetrad (D42, Y47, K76, H109) found in all AKR families, which is crucial for proton transfer and hydride donation in XR enzyme (Paidimuddala et al., 2018) was present in both Ap|1177-Nter and Cter domains (**Fig. 6B, Table S2**). Among NADPH-binding residues identified in Ss|akr2 (Son et al., 2018), N165, Q186, S213, K269, and R275 were fully conserved in both Ap|1177-Nter and Ap|1177-Cter domains, while S164, A252 and Q278 residues were retained in at least one domain (**Fig. 6B**). Other NADPH related residues substituted in Ap|1177 are often identical to Cs|9620 like N271T, F215L, Q218P and S219D (**Fig. 6B, Table S2**).

Of the 10 Ss|akr2 key residues previously identified as essential in xylose-binding through site-directed mutagenesis (Son et al., 2018), five were conserved in both domains of Ap|1177, while one was retained in the C-terminal domain (**Fig. 6B, Table S2**). Interestingly, the remaining four positions differing in Ap|1177 matched those found in Cs|9620.

These findings suggest that Ap|1177 possesses most of the key residues required for XR function. Notably, Ap|1177 is structurally distinct from typical XR enzymes, as it contains two AKR2-like domains within one single protein. A similar organization was identified in another strain of *A. protothecoides* (strain 0710, XM_011403998.1), as well as in the green microalgae *Picichlorum soloecismus* (Trebouxiophyceae), and *Scenedesmus obliquus* (**Suppl. Fig. S3**), that shows slow xylose assimilation in mixotrophic conditions (Yang et al., 2014).

4. Conclusion

This study highlights the ability of *A. protothecoides* UTEX25 to metabolize xylose in the presence of glucose and acetate, uncovering a previously uncharacterized pathway for xylitol bioproduction from microalgae. Our findings demonstrate that xylose uptake is facilitated by the presence of glucose, while xylitol production is enhanced when acetate is also present in the medium. Furthermore, the implementation of a fed-batch strategy significantly improved xylose-to-xylitol conversion yield, reaching 90%, a level comparable to that of xylitol-producing yeasts and engineered bacterial strains. Although volumetric productivity remains lower than that of industrial microbial systems, this study positions *A. protothecoides* as a promising microalgal platform for biotechnological xylitol production, expanding its potential applications beyond lipid biosynthesis. The observed correlation between xylose assimilation and xylitol excretion is supported by bioinformatic analysis that identified putative xylose transporters and an atypical monomeric xylose reductase from the AKR2 family in the *A. protothecoides* genome. These findings pave the way for further optimization of sustainable xylitol bioproduction in microalgae, potentially through high-cell-density cultivation systems or metabolic engineering strategies to enhance transport efficiency and enzymatic activity.

References:

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, *630*(8016), 493-500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Badary, A., Hidas, N., Ferrari, S., & Mayfield, S. P. (2024). Isolation and characterization of microalgae strains able to grow on complex biomass hydrolysate for industrial application. *Algal Research*, *78*, 103381. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103381>
- Bueno, J. G. R., Borelli, G., Corrêa, T. L. R., Fiamenghi, M. B., José, J., De Carvalho, M., De Oliveira, L. C., Pereira, G. A. G., & Dos Santos, L. V. (2020). Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01782-0>
- Carone, M., Corato, A., Dauvrin, T., Le Thanh, T., Durante, L., Joris, B., Franck, F., & Remacle, C. (2019). Heterotrophic Growth of Microalgae. In A. Hallmann & P. H. Rampelotto (Éds.), *Grand Challenges in Algae Biotechnology* (p. 71-109). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25233-5_3
- Casal, M., & Leão, C. (1995). Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: Specificity of the transport systems and their regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1267*(2-3), 122-130. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)00067-3](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)00067-3)
- Drew, D., North, R. A., Nagarathinam, K., & Tanabe, M. (2021). Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chemical Reviews*, *121*(9), 5289-5335. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983>
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G. M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B. A., Wright, E. M., & Abramson, J. (2008). The Crystal Structure of a Sodium Galactose Transporter Reveals Mechanistic Insights into Na⁺/Sugar Symport. *Science*, *321*(5890), 810-814. <https://doi.org/10.1126/science.1160406>
- Fonseca, C., Olofsson, K., Ferreira, C., Runquist, D., Fonseca, L. L., Hahn-Hägerdal, B., & Lidén, G. (2011). The glucose/xylose facilitator Gxf1 from *Candida intermedia* expressed in a xylose-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* increases xylose uptake in SSCF of wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, *48*(6-7), 518-525. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.010>
- Ghidossi, T., Marison, I., Devery, R., Gaffney, D., & Forde, C. (2017). Characterization and Optimization of a Fermentation Process for the Production of High Cell Densities and Lipids Using Heterotrophic Cultivation of *Chlorella protothecoides*. *Industrial Biotechnology*, *13*(5), 253-259. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0007>
- Goold, H. D., Moseley, J. L., & Lauersen, K. J. (2024). The synthetic future of algal genomes. *Cell Genomics*, *4*(3), 100505. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2024.100505>
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *54*(6), 1665-1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>

- Grigoriev, I. V., Hayes, R. D., Calhoun, S., Kamel, B., Wang, A., Ahrendt, S., Dusheyko, S., Nikitin, R., Mondo, S. J., Salamov, A., Shabalov, I., & Kuo, A. (2021). PhycoCosm, a comparative algal genomics resource. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1004-D1011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa898>
- Gupta, R., Mthembu, L. D., & Deenadayalu, N. (2022). Strain Improvement Methods for Enhanced Xylitol Production. In M. das G. de Almeida Felipe & A. K. Chandel (Éds.), *Current Advances in Biotechnological Production of Xylitol : Fermentative Production of Xylitol* (p. 67-80). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04942-2_4
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., & Hu, B. (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella* protothecoides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*(7), 1978-1995. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8974-4>
- Inwongwan, S., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., & O'Neill, E. C. (2019). Euglena Central Metabolic Pathways and Their Subcellular Locations. *Metabolites*, *9*(6), 115. <https://doi.org/10.3390/metabo9060115>
- Kratzer, R., Leitgeb, S., Wilson, D. K., & Nidetzky, B. (2006). Probing the substrate binding site of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) with site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, *393*(1), 51-58. <https://doi.org/10.1042/BJ20050831>
- Leandro, M. J., Gonçalves, P., & Spencer-Martins, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia* : First molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochemical Journal*, *395*(3), 543-549. <https://doi.org/10.1042/BJ20051465>
- Leite, G. B., Paranjape, K., Abdelaziz, A. E. M., & Hallenbeck, P. C. (2015). Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. *Bioresource Technology*, *184*, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.117>
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, *52*(W1), W521-W525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae241>
- Miazek, K., Remacle, C., Richel, A., & Goffin, D. (2017). Beech wood *Fagus sylvatica* dilute-acid hydrolysate as a feedstock to support *Chlorella sorokiniana* biomass, fatty acid and pigment production. *Bioresource Technology*, *230*, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.034>
- Morais Junior, W. G., Pacheco, T. F., Trichez, D., Almeida, J. R. M., & Gonçalves, S. B. (2019). Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *CANDIDA TROPICALIS* JA2 strain. *Yeast*, *36*(5), 349-361. <https://doi.org/10.1002/yea.3394>
- Mu, J., Li, S., Chen, D., Xu, H., Han, F., Feng, B., & Li, Y. (2015). Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella* protothecoides. *Bioresource Technology*, *185*, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.082>
- Paidimuddala, B., Mohapatra, S. B., Gummadi, S. N., & Manoj, N. (2018). Crystal structure of yeast xylose reductase in complex with a novel NADP - DTT adduct provides insights into substrate recognition and catalysis. *The FEBS Journal*, *285*(23), 4445-4464. <https://doi.org/10.1111/febs.14667>
- Paulsen, P. A., Custódio, T. F., & Pedersen, B. P. (2019). Crystal structure of the plant symporter STP10 illuminates sugar uptake mechanism in monosaccharide transporter superfamily. *Nature Communications*, *10*(1), 407. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08176-9>

- Perez Saura, P., Gérin, S., Cardol, P., & Remacle, C. (2024). Xylose, glucose and acetate as feedstock for three microalgal species cultivated in heterotrophy. *Algal Research*, *83*, 103689. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103689>
- Petschacher, B., & Nidetzky, B. (2005). Engineering *Candida tenuis* Xylose Reductase for Improved Utilization of NADH: Antagonistic Effects of Multiple Side Chain Replacements and Performance of Site-Directed Mutants under Simulated In Vivo Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(10), 6390-6393. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6390-6393.2005>
- Portillo, F. V.-L., Sierra-Ibarra, E., Vera-Estrella, R., Revah, S., Ramírez, O. T., Caspeta, L., & Martinez, A. (2022). Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy. *Algal Research*, *65*, 102752. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102752>
- Prabhu, A. A., Thomas, D. J., Ledesma-Amaro, R., Leeke, G. A., Medina, A., Verheecke-Vaessen, C., Coulon, F., Agrawal, D., & Kumar, V. (2020). Biovalorisation of crude glycerol and xylose into xylitol by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01378-1>
- Rao, J., Lv, Z., Chen, G., & Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. *Progress in Polymer Science*, *140*, 101675. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675>
- Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., De Souza, G. B., Mendonça, J. G. P., Rosa, C. A., Mendes, T. A. O., Santana, M. F., Da Silveira, W. B., & Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*, *157*, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W320-W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Runquist, D., Hahn-Hägerdal, B., & Rådström, P. (2010). Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, *3*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-5>
- Sampaio, F. C., Silveira, W. B. D., Chaves-Alves, V. M., Passos, F. M. L., & Coelho, J. L. C. (2003). Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*, *34*(4), 321-324. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400007>
- Sartori, M. L., Pantoja, L. D. A., & Santos, A. S. D. (2025). Evaluation of Xylose Assimilation by a Strain of *Desmodesmus* sp. And the use of Sugarcane Bagasse Hydrolysate as a Carbon Source for Algal Biomass Production. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-025-02933-w>
- Shi, X.-M., Liu, H.-J., Zhang, X.-W., & Chen, F. (1999). Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochemistry*, *34*(4), 341-347. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00101-0)
- Son, H. F., Lee, S.-M., & Kim, K.-J. (2018). Structural insight into D-xylose utilization by xylose reductase from *Scheffersomyces stipitis*. *Scientific Reports*, *8*(1), 17442. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35703-x>
- Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y., & Yan, N. (2012). Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature*, *490*(7420), 361-366. <https://doi.org/10.1038/nature11524>

- Umai, D., Kayalvizhi, R., Kumar, V., & Jacob, S. (2022). Xylitol : Bioproduction and Applications-A Review. *Frontiers in Sustainability*, 3, 826190. <https://doi.org/10.3389/frsus.2022.826190>
- Viëtor, R. J., Renard, C. M. G. C., Goldberg, R., & Catesson, A.-M. (1995). Cell-wall polysaccharides in growing poplar bark tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), 341-344. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(96\)81843-5](https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)81843-5)
- Yang, S., Liu, G., Meng, Y., Wang, P., Zhou, S., & Shang, H. (2014). Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 172, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.122>
- Yoshitake, J., Ishizaki, H., Shimamura, M., & Imai, T. (1973). Xylitol Production by an *Enterobacter* Species. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(10), 2261-2267. <https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10861002>
- Yuan, X., Wang, J., Lin, J., Yang, L., & Wu, M. (2019). Efficient production of xylitol by the integration of multiple copies of xylose reductase gene and the deletion of Embden–Meyerhof–Parnas pathway-associated genes to enhance NADPH regeneration in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(8), 1061-1069. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02169-3>
- Zheng, Y., Yu, X., Li, T., Xiong, X., & Chen, S. (2014). Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0125-7>

CRedit authorship contribution statement

Pablo Perez Saura: Writing – original draft, Writing – review & editing, Conceptualization, Methodology. Claire Remacle: Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. Pierre Cardol: Writing – review & editing.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS) (CDR J.0175.20 to CR and J.0025.24 to PC) ; Fonds Wetenschappelijk Onderzoek – Vlaanderen (FWO) and FNRS under the Excellence of Science (EOS) Project No. 30829584; Action de Recherche Concertée from the University of Liege (DARKMET ARC grant 17/21-08), and ADV_BIO grant (SPF Économie, P.M.E., Classes moyennes et Énergie, Direction générale de l'Énergie). PC is research director of Belgian Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS. We thank M. Radoux for expert technical assistance.

Data availability

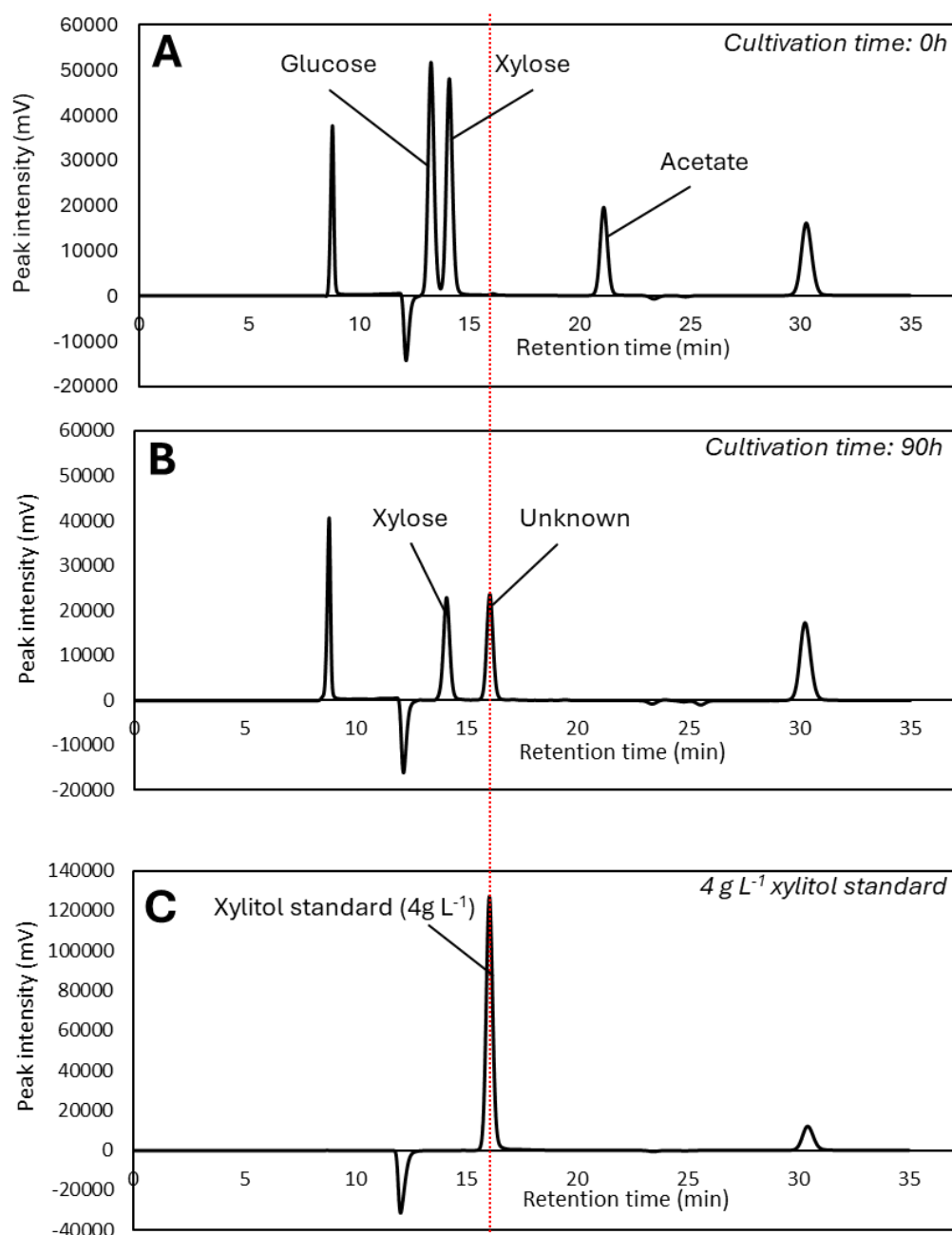
Data will be made available on request.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

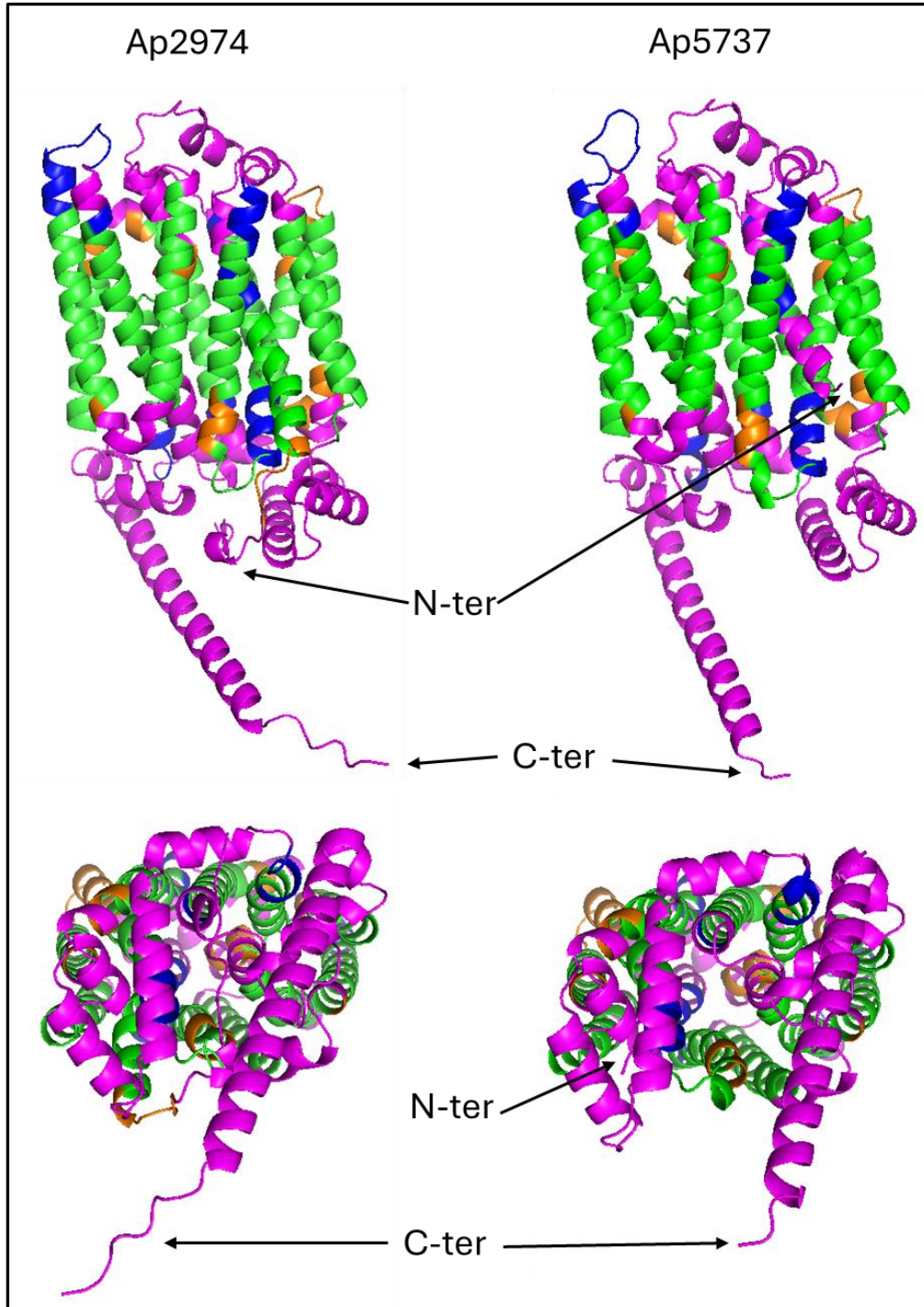
During the preparation of this work the author(s) used ChatGPT (OpenAI) for its assistance in linguistic and grammatical improvement of the manuscript. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the publication.

5.2 Supplementary Files

Supplementary Figure S1. HPLC chromatograms displaying the concentration of carbon sources in the cultivation medium of *A. protothecoides* under the AGX condition (acetate, glucose and xylose). (A) Chromatogram at the start of the culture. (B) Chromatogram after 90 hours of cultivation. (C) Xylitol commercial standard at 4 g L^{-1} for reference (retention time highlighted with a red line).



Supplementary Figure S2. Predicted 3D structure of the two putative *A. protothecoides* xylose transporters Ap25|2974 (on the left) and Ap25|5737 (on the right). Predicted transmembrane α helix are highlighted in blue or orange when matching to Ec|xylE or At|stp10 structure prediction, respectively. Green parts are matching with both Ec|xylE and At|stp10 structure predictions.



Supplementary Table S1. Comparison of xylose transporters of *E. coli* (Ec|xylE), *C. intermedia* (Ci|gfx1), the putative xylose transporters of *A. protothecoides* (Ap|2974 and Ap|5737) and the *A. thaliana* hexose transporter (At|stp10) (see main text and Supplemental Fig S2 for details). Amino acid defined for the sugar transporter (SP) signature and xylose binding are presented.

Function	One letter code	Three letter code	Ec xylE	Ci gfx1	Ap 2974	Ap 5737	At stp10
SP signature	G83	Gly	G	G	G	G	G
	E153	Glu	E	E	E	E	E
	R159	Arg	R	R	R	R	R
	S223	Ser	S	S	S	S	T
	R225	Arg	R	R	N	N	N
	G340	Gly	G	G	G	G	G
	R341	Arg	R	R	R	R	R
	E397	Glu	E	E	E	E	E
	R404	Arg	R	R	R	R	R
E465	Glu	E	E	E	E	E	
Xylose binding	F24	Phe	F	F	F	T	F
	Q168	Gln	Q	Q	Q	Q	Q
	Q288	Gln	Q	Q	Q	Q	Q
	Q289	Gln	Q	Q	Q	Q	Q
	N294	Asn	N	N	N	N	N
	Y298	Tyr	Y	Y	F	F	F
	W392	Trp	W	Y	W	W	W
	Q415	Gln	Q	N	N	N	N
	W416	Trp	W	W	F	F	M

CHAPITRE V

Table S2. Comparison of xylose reductase of *Debaryomyces nepalensis* (Dn|*akr2*), *Scheffersomyces stipitis* (Ss|*akr2*), the putative XR of *C. sorokiniana* (Cs|9620) and the putative XR of *A. protothecoides* (Ap|1177-Nter and Ap|1177-Cter). Amino-acid defined for the catalytic tetrad, the NADPH and xylose binding are presented (see **supplemental Fig. S4** and main text for details).

Function	One letter code	Three letter code	DnAKR2	SSAKR2	CtXR	Cs9620	Ap1177-Nter	Ap1177-Cter
Catalytic tetrad	D42	Asp	D	D	D	D	D	D
	Y47	Tyr	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	K76	Lys	K	K	K	K	K	K
	H109	His	H	H	H	H	H	H
NADPH specificity	S164	S	S	S	S	S	S	A
	N165	Asn	N	N	N	N	N	N
	Q186	Gln	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	S213	S	S	S	S	A	S	S
	F215	Phe	F	F	F	L	L	L
	Q218	Gln	Q	Q	Q	P	P	P
	S219	Ser	S	S	S	D	D	D
	F235	F	F	F	F	M	L	L
	A252	Ala	A	A	A	G	G	A
	K269	Lys	K	K	K	K	K	K
	N271	Asn	N	N	N	T	T	T
	R275	Arg	R	R	R	R	R	R
	Q278	Gln	Q	E	Q	G	G	Q
	N279	Asn	N	N	N	N	N	N
Xylose binding	W19	Trp	W	W	W	W	W	W
	D46	Asp	D	D	D	V	V	V
	W78	Trp	W	W	W	W	W	W
	H109	His	H	H	H	H	H	H
	F110	Phe	F	F	F	W	W	W
	F127	Phe	F	F	F	/	/	/
	F220	Phe	F	F	F	S	S	S
	L224	Leu	L	L	M	F	F	L
	N305	Asn	N	N	N	V	V	V
	W310	Trp	W	W	W	W	W	W

CHAPITRE VI : EXPÉRIENCES COMPLÉMENTAIRES, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6.1 Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous avons exploré l'utilisation du glycérol et des substrats carbonés majoritairement présents dans l'hémicellulose comme source de carbone pour la croissance hétérotrophe de microalgues. Par ailleurs, nous avons étudié plusieurs espèces appartenant à des phylums variés, sélectionnées pour leur capacité à croître à l'obscurité et leur potentiel en tant que productrice de biocarburants.

6.1.1 Conclusions sur le métabolisme du glycérol, du glucose, de l'acétate et du xylose chez les trois espèces de microalgues étudiées

Galdieria sulphuraria

L'algue rouge extrémophile *G. sulphuraria*, connue pour son exceptionnelle capacité à assimiler de nombreux substrats, pouvait métaboliser aussi bien le glycérol que le xylose ou le glucose. Bien que la majorité des gènes liés à la photosynthèse et à la synthèse des pigments soient réprimés à l'obscurité, nous avons observé que la synthèse de plusieurs pigments et en particulier la phycocyanine était en partie maintenue en présence de glycérol. Cette espèce s'est révélée être la plus efficace parmi les microalgues testées pour l'assimilation du xylose, avec un rendement de conversion substrat/biomasse atteignant $0,51 \text{ g g}^{-1}$ (**Tableau 1**), supérieur aux valeurs précédemment rapportées ($\leq 0,36 \text{ g g}^{-1}$) (Gross & Schnarrenberger, 1995; Portillo et al., 2022), pour des taux de croissance spécifique similaire de l'ordre de 1 j^{-1} .

Cependant, la toxicité de l'acétate à pH acide constitue un frein majeur à son exploitation (Baker-Austin & Dopson, 2007). L'acide acétique sous sa forme protonée diffuse passivement à travers la membrane cellulaire, perturbant l'homéostasie intracellulaire (Abusi et al., 2022). Nos analyses transcriptomiques avaient pourtant révélé la présence de transporteurs putatifs de l'acétate. Nous avons donc décidé de réaliser quelques expériences afin de vérifier la possibilité selon laquelle l'acétate à faible concentration pouvait être métabolisé par la microalgue. Lors d'une expérience en

particulier (**Fig. 13**), nous avons placé *G. sulphuraria* dans un mélange de glucose, acétate et xylose, avec des concentrations telles qu'elles sont présentes dans un hydrolysat acide d'hémicellulose (réalisé et analysé au laboratoire) qui serait dilué 10 fois. La concentration en acétate était ici relativement faible (2mM), mais a tout de même eu un impact non négligeable sur la durée de la phase de latence qui a duré 6 jours, alors qu'elle était presque inexistante lorsque l'algue ne croît qu'en

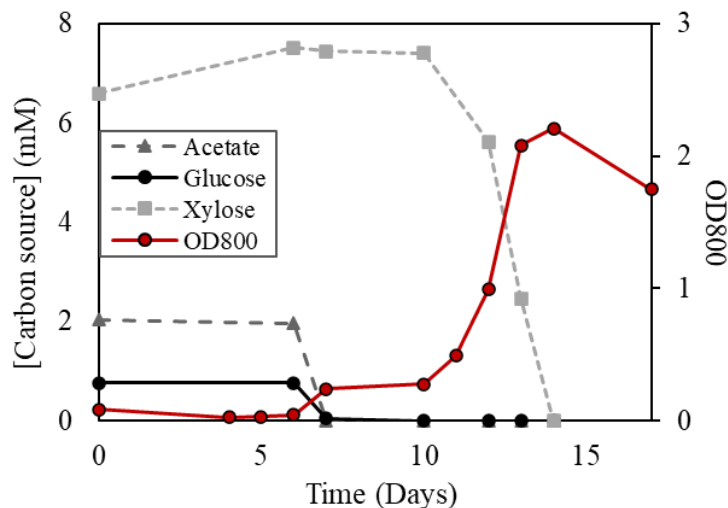


FIGURE 12: Croissance hétérotrophe de *G. sulphuraria* (pH=2) en présence des sources de carbone présentes dans l'hydrolysat acide d'hémicellulose de peuplier. La concentration des sources de carbone est exprimée en mM. La densité cellulaire est exprimée en unités d'absorbance à 800 nm. Un seul réplicat a été réalisé lors de cette expérience.

présence de glucose ou de xylose (Perez Saura et al., 2024) (**Fig. 12**). Ces résultats nous ont donc confirmé que la microalgue rouge était capable de supporter de faibles concentrations en acétate dans un milieu acide, mais que la croissance était rapidement inhibée à des concentrations plus élevées, comme indiqué par nos travaux (Perez Saura et al., 2024). Ces résultats confirment que, bien qu'elle puisse tolérer de faibles niveaux d'acétate, son exploitation sur des substrats lignocellulosiques riches en acétate demeure un défi. En ce sens, des chercheurs ayant étudié l'effet de l'acétate dans le milieu de culture de *G. sulphuraria* ont montré qu'à partir d'une concentration de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (8,5 mM) ou moins, ce substrat n'était pas seulement inoffensif, mais également métabolisé par la microalgue (Portillo et al., 2022).

Euglena gracilis

L'étude de *E. gracilis* visait à explorer son potentiel en tant qu'organisme bien connu pour utiliser divers substrats carbonés. Malheureusement, sous nos conditions expérimentales, elle n'a montré la capacité à assimiler que l'acétate, contrairement aux études rapportant son utilisation du glucose (Cook & Heinrich, 1965; W. Xie et al., 2023). Malgré cette limitation, *E. gracilis* accumulait jusqu'à 50% de sa biomasse sous forme de paramylon, un polymère de glucose en β -1,3 étudié pour diverses applications pharmaceutiques (Feuzing et al., 2022; Nakashima et al., 2018).

Les tests de croissance réalisés en présence de glucose à différents pH et dans divers milieux (TMP et KH), nous ont permis d'écarter l'hypothèse selon laquelle son incapacité à métaboliser le glucose serait due à un pH neutre inadapté à ses besoins physiologiques, l'algue étant habituée à des milieux plus acides (Cook & Heinrich, 1965). De plus, nous avons également exclu l'hypothèse d'une perte de fonction de la souche ; une possibilité qui nous était venue en raison des conditions de culture dans notre laboratoire, où elle est maintenue depuis plusieurs années exclusivement en phototrophie

ou en présence d'acétate comme unique source de carbone, dans des milieux tels que le Tris-Minimal-Phosphate (TMP) ou Tris-Phosphate-Acetate (TAP).

Par la suite, nous avons remarqué que toutes les études ayant rapporté une assimilation du glucose à l'obscurité par *E. gracilis* mentionnaient la présence d'un agent chélatant dans le milieu de culture, en particulier du citrate. Le citrate est retrouvé dans des milieux de culture comme Cramer-Meyer ou Koren-Hutner, qui sont couramment employés (Cook & Heinrich, 1965; Cramer & Myers, 1952; Heinrich & Cook, 1967; W. Xie et al., 2023). Cette observation suggérait que la présence d'un chélateur pourrait jouer un rôle clé dans l'absorption ou le métabolisme du glucose chez *E. gracilis* en conditions hétérotrophes.

Malheureusement, dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas eu l'occasion de tester expérimentalement cette hypothèse, par exemple en ajoutant du citrate au milieu TMP lors de nos expériences de culture d'*E. gracilis*. Toutefois, si cette hypothèse était avérée, elle élargirait les possibilités d'exploitation d'*E. gracilis* en conditions hétérotrophes, d'autant plus que cette espèce présente déjà une large tolérance aux variations de pH, allant de pH 3 à 8 sans que sa croissance soit fortement affectée (Yoshioka et al., 2020).

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

TABLEAU 1 : Récapitulatif de résultats concernant l'utilisation de xylose pour la croissance de microalgues en hétérotrophie (toutes celles répertoriées à notre connaissance), et en mixotrophie. Lorsque les paramètres de croissance ne sont pas disponibles (case blanche), la raison est généralement que l'implication du xylose dans la génération de la biomasse n'était pas possible à déterminer, en raison de la présence d'autres sources de carbone ou de lumière. Références : Cette étude, (Perez Saura et al., 2024) ; A, (Portillo et al., 2022) ; B, (Gross & Schnarrenberger, 1995) ; C, (Leite et al., 2015) ; D, (Zheng et al., 2014) ; E, (Mu et al., 2015) ; F, (Sartori et al., 2024) ; G, (Badary et al., 2024) ; H, (Freitas et al., 2017) ; I, (Angelini et al., 2024) ; J, (Kriechbaum et al., 2023) ; K, (Bhattacharya et al., 2025) ; L, (S. Yang et al., 2014) ; M, (De Freitas et al., 2019)

Mode trophique	Classe	Microalgue	Substrats	[Xylose] (g L ⁻¹)	Evidence de la consommation du xylose	Biomasse générée sur xylose (g L ⁻¹)	Durée de la culture (jours)	Biomasse sur xylose (g g ⁻¹)	μ (days ⁻¹)	Référence (dans la légende)
Hétérotrophie	Cyanidiales	<i>G. sulphuraria</i>	Xylose pure	4,5	Oui	2,27 ± 0,13	5	0,51 ± 0,01	0,97	Cette étude
Hétérotrophie*	Cyanidiales	<i>G. sulphuraria</i>	Xylose pure	10	Oui	3,6	5	0,36	0,97	A
Hétérotrophie	Cyanidiales	<i>G. sulphuraria</i>	Xylose pure	3,75	Oui	NP	NP	NP	0,29	B
Hétérotrophie	Trebouxiophyceae	<i>A. protothecoides</i>	Xylose+acétate+glucose	1,5	Oui (en phase stationnaire)		7	0		Cette étude
Hétérotrophie*	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella spp</i>	Xylose pure	3	Oui	0,1-0,5	2 à 12	0,033-0,17	0,48-0,88	C
Hétérotrophie*	Trebouxiophyceae	<i>C. sorokiniana</i>	Glucose+Xylose	6	Oui	NP	24h	NP	NP	D
Hétérotrophie*	Trebouxiophyceae	<i>A. protothecoides</i>	Bagasse de canne à sucre	5,27	Suggéré					E
Hétérotrophie*	Chlorophyceae	<i>Desmodesmus sp.</i>	Xylose pure	9	Oui	0,78	6	0,11	0,44	F
Hétérotrophie*	Chlorophyceae	<i>Desmodesmus sp.</i>	Hydrolysats lignocellulosique	4	Oui (en phase stationnaire)	0	20	0	0	G
Mixotrophie	Trebouxiophyceae	<i>C. minutissima</i>	Xylose+arabinose	0,02	Suggéré		15			H
Mixotrophie	Trebouxiophyceae	<i>C. vulgaris</i>	Hydrolysats de paille d'orge	0,26	Oui		7			I
Mixotrophie	Trebouxiophyceae	<i>C. vulgaris</i>	Hydrolysats de paille de maïs	0,95	NP		27			J
Mixotrophie	Trebouxiophyceae	<i>C. vulgaris</i>	Hydrolysats lignocellulosique	0,67	Oui		6			K
Mixotrophie	Chlorophyceae	<i>S. obliquus</i>	Xylose pure	4	Oui		60			L
Mixotrophie	Chlorophyceae	<i>D. salina</i>	Xylose pure	7,5	Oui		19			M
Mixotrophie	Chlorococaceae	<i>Chlorococcum sp.</i>	Hydrolysats lignocellulosique	4	Oui (en phase stationnaire)		20			G

NP: Non précisé. *L'astérisque indique que des résultats pour la croissance en mixotrophie sont aussi disponibles

Auxenochlorella protothecoides

Enfin, nos travaux ont confirmé que la microalgue verte oléagineuse *A. protothecoides* peut utiliser aussi bien l'acétate que le glucose comme source de carbone pour sa croissance hétérotrophe, sans différence majeure concernant la composition de sa biomasse. Toutefois, l'acidification rapide du milieu due à l'assimilation du glucose nécessite des stratégies d'atténuation, telles que l'utilisation de tampons ou l'ajout d'acétate (J. Wang & Curtis, 2016).

L'un des résultats les plus marquants de cette étude est que *A. protothecoides* ne consomme pas le xylose seul, mais peut l'assimiler en présence de du glucose ou d'acétate. Cependant, au lieu d'être utilisé pour la production de biomasse, le xylose est converti intégralement en xylitol et excrété dans le milieu. Cette observation est rare chez les microalgues, et n'a été rapportée qu'une seule fois auparavant chez *Chlorella sorokiniana* (Zheng et al., 2014). Fait notable, par rapport aux espèces étudiées pour la production de xylitol, qu'elles soient génétiquement modifiées dans ce but, ou non, *A. protothecoides* affiche un rendement de conversion xylitol/xylose proche de 100% (**Tableau 2**).

Concernant la production lipidique, nos résultats montrent une accumulation relativement faible (~20 % de la biomasse), bien en deçà des valeurs couramment rapportées dans la littérature (30–70 %), ainsi qu'un taux en PUFAs relativement élevé (~30%), peu compatible avec la production de biodiesel et biokérosène (Chen & Walker, 2011; Ghidossi et al., 2017; Mu et al., 2015). Néanmoins, notre étude étant principalement axée sur la capacité de cette microalgue à croître en hétérotrophie en présence de substrats inhabituels plutôt que sur sa production de lipides, ces résultats restent satisfaisants. En effet, parmi les espèces étudiées, *A. protothecoides* affiche le taux d'acides gras le plus élevé (~20%). De plus, grâce aux conditions hétérotrophes, cette production de lipides s'accompagne d'une très faible teneur en pigments, qui, étant des composés azotés, vont contribuer à diminuer la qualité du carburant en amenant des impuretés, et en favorisant la production de NOx lors de leur combustion (Kumar et al., 2015).

Enfin, la capacité de *A. protothecoides* à excréter du xylitol dans son milieu de culture pourrait en faire un candidat de choix pour une approche en bioraffinerie. On pourrait ainsi envisager une exploitation simultanée de sa biomasse riche en lipides et du milieu de culture potentiellement riche en xylitol, comme cela est envisagé pour certaines levures (Pérez-Bibbins et al., 2016). Malgré ces possibilités, l'idéal serait tout de même d'avoir une souche capable de métaboliser le xylose pour la production de biomasse.

En ce qui concerne la production de biomasse par *A. protothecoides*, elle reste relativement faible dans toutes les conditions étudiées lors des expériences réalisées (de l'ordre de 2 à 3 gDW L⁻¹). Cela s'explique par le fait que les concentrations en sources de carbone fournies étaient toujours relativement faibles, autour de 150 mM d'atomes de carbone, afin de rester à une échelle de laboratoire où l'oxygénation du milieu était garantie.

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Tableau 2 : Production de xylitol par divers organismes, modifiés génétiquement ou non. Le tableau reprend plusieurs exemples de levures et bactéries productrices de xylitol, ainsi que les trois seuls exemples de microalgues référencées comme productrices de xylitol. Références : Cette étude, chapitre V ; (Zheng et al., 2014) ; B, (Pourmir et al., 2013) ; C, (Morais Junior et al., 2019) ; D, (Dalli et al., 2017) ; E, (Prabhu et al., 2020) ; F, (Lee et al., 2003) ; G, (Akinterinwa & Cirino, 2009) ; H, (Pratter et al., 2015).

Organisme	Modification génétique	Espèce	Co-substrats	[Xylose] (g L ⁻¹)	[Xylitol] (g L ⁻¹)	Durée de la culture	Productivité maximale (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Rendement xylose/xylitol	Référence (dans la légende)
Microalgue	Non	<i>A. protothecoides</i>	Glucose +acétate	1,5	1,35	7 jours	0,81	91%	Cette étude
Microalgue	Non	<i>C. sorokiniana</i>	Glucose +Lumière	6	0,75-1,5	1 jour	0,063*	50-60%	A
Microalgue	Oui	<i>C. reinhardtii</i>	Lumière	7,5	0,38	3 jours	>0,01*	5%	B
Levure	Non	<i>Candida tropicalis</i>	Glucose +acétate	177	110	39h	2,81	89%	C
Levure	Non	<i>Candida tropicalis</i>	Acetate	50	46	48h	0,88	92%	D
Levure	Non	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glycerol	55	53	144h	0,32	97%	E
Levure	Oui (NADH-dépendant XR de <i>C. parapsilosis</i>)	<i>Candida tropicalis</i>	Glucose	50 (en continu)	255	54h	5,09	92%	F
Bactérie	Oui (xylulokinase de <i>Pichia stipitis</i>)	<i>E. coli</i>	Glucose	16,5	12	72h	0,17	72%	G
Levure	Oui (XR de <i>C. tenuis</i>)	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	40	35,9	49h	1,14	100%	H
Levure	Oui (XR de <i>C. tenuis</i>)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	40	NP	120h	0,75	100%	H

NP: Non précisé. *L'astérisque indique des calculs de productivité estimés sur base des données de la référence

De même, les concentrations en ammonium et en phosphate du milieu de culture utilisé, le TMP, suffisaient au bon déroulement d'une courbe de croissance complète. Cependant, à l'instar de la teneur en lipides comme expliqué précédemment, la densité cellulaire pourrait également être augmentée via l'utilisation de divers procédés. À titre d'exemple, des expériences préliminaires menées au laboratoire en Erlenmeyer sous agitation ont montré qu'une augmentation par quatre de la teneur en nutriments (ammonium, phosphate, glucose et acétate) permettait d'élever la biomasse maximale atteinte à l'obscurité de 2–3 g L⁻¹ à 6–7 g L⁻¹. Le principal problème rencontré était que la phase stationnaire de croissance était atteinte avant la consommation complète des sources de carbone, probablement à cause du manque d'oxygène dans le milieu, poussant les cellules à stopper leur croissance.

D'autres stratégies ont donc été envisagées pour pallier ce problème, notamment l'utilisation de fermenteurs permettant un contrôle constant de la pression partielle en oxygène. Ces expériences, menées dans un fermenteur de 5 L et toujours à l'obscurité, ont donné des résultats satisfaisants : l'agitation et l'apport en air dynamique permettaient de réguler la concentration en oxygène dissous et ainsi de favoriser la croissance. Malheureusement, faute de temps, ces expériences n'ont pas pu être répétées.

En se basant sur les données de la littérature, on peut néanmoins supposer que des teneurs en biomasse bien plus élevées auraient pu être atteintes dans nos conditions hétérotrophes. En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation de substrats carbonés à l'obscurité pouvait s'avérer

extrêmement efficace pour la croissance de *A. protothecoides*. Par exemple, cultivée en fermenteur de 5 L en mode fed-batch, Ghidossi et al. (2017) ont atteint une biomasse sèche de 255 g L⁻¹ en 228 h, tandis que d'autres études, dans des conditions similaires, ont obtenu 45,2 g L⁻¹ en 197 h (Chen et al., 2011) ou encore 51,2 g L⁻¹ en 167 h (Xiong et al., 2007), avec à chaque fois une teneur en lipides supérieure à 50. En comparaison, peu d'études existent sur la croissance de *A. protothecoides* en phototrophie, et les densités cellulaires atteintes dépassent rarement 2 g L⁻¹ (Caporgno et al., 2019). Pour d'autres espèces du genre *Chlorella*, une biomasse sèche notable de 20 g L⁻¹ a été atteinte en photobioréacteur (Fu et al., 2012), bien qu'elle reste inférieure à ce que l'on peut espérer en hétérotrophie. En conclusion, la culture de *A. protothecoides* visant la production de fortes biomasses semble optimale en présence de sources de carbone à l'obscurité, notamment pour maximiser la productivité tout en minimisant les coûts liés aux infrastructures lumineuses. Cette stratégie est d'autant plus pertinente lorsque l'objectif concerne la production de composés excrétés et récupérables dans le milieu de culture, comme cela pourrait être le cas pour le xylitol dans nos études.

6.1.2 Les microalgues comme alternative aux végétaux pour la production d'huiles ou de biopétrole

Comme expliqué dans la section 2.1 : **Contexte et objectifs de la thèse**, cette thèse s'inscrit dans un projet visant notamment à évaluer le potentiel des microalgues étudiées pour la production de biocarburants à base d'hydrocarbures. La biomasse obtenue devait être transformée, d'une part, par transestérification pour générer des FAMES (Fatty Acid Methyl Esters), destinés à compléter le diesel utilisé dans le secteur du transport routier, et, d'autre part, par liquéfaction hydrothermale (HTL) pour produire des biopétroles pouvant être raffinés en analogues du biokérosène utilisé dans l'aviation.

Pour la production de ces biocarburants, la biomasse utilisée doit être aussi riche que possible en lipides, en particulier en acides gras saturés (SFA) et mono-insaturés (MUFA), dans des proportions relativement équilibrées, tout en contenant le moins possible d'acides gras polyinsaturés (PUFA). Pour le biodiesel, les chaînes carbonées doivent généralement comporter entre 16 et 18 atomes de carbone, ce qui favorise l'auto-inflammation dans les moteurs diesel. En revanche, le biokérosène, utilisé à très basse température en altitude (jusqu'à -60 °C), nécessite des chaînes plus courtes, de 8 à 16 atomes de carbone, afin d'augmenter la volatilité du mélange et d'en diminuer la viscosité. Étant donné que les végétaux et les microalgues synthétisent majoritairement des acides gras à longues chaînes (rarement moins de 14 atomes de carbone), des techniques telles que la HTL permettent de fragmenter ces chaînes pour répondre aux exigences du kérosène (Martinez-Villarreal et al., 2022 ; Raheem et al., 2018 ; Chisti, 2007).

Comparées aux végétaux traditionnellement utilisés pour ces applications, principalement le colza, le soja et le palmier à huile, les microalgues présentent des avantages distincts, tant en termes de composition que de durabilité environnementale. En particulier en culture hétérotrophe, elles présentent une croissance rapide, indépendante des saisons lorsqu'elles sont cultivées en fermenteurs fermés. Contrairement aux plantes terrestres, elles ne nécessitent ni terres arables ni

grandes surfaces, évitant ainsi la concurrence avec l'agriculture alimentaire et les problèmes liés à la déforestation, notamment dans le cas de l'huile de palme (Fernandes et al., 2010; Martinez-Villarreal et al., 2022).

Concernant leur composition lipidique, certaines espèces de microalgues peuvent accumuler des lipides jusqu'à 50–70 % de leur poids sec, contre 10–40 % pour les graines de soja, de colza ou de palme (Mutanda et al., 2011; Pittman et al., 2011 ; Romero-Estévez et al., 2023 ; Vi et al., 2022 ; El-Beltagi et al., 2010). Leur croissance peut également être extrêmement rapide, notamment en hétérotrophie, comme l'a démontré *A. protothecoides*, atteignant une densité cellulaire impressionnante, avec un taux lipidique d'environ 60 % (Ghidossi et al., 2017). À titre de comparaison, bien qu'un palmier à huile produise des fruits de manière continue en climat tropical, il faut attendre 3 à 4 ans après la plantation pour obtenir une première récolte, sans compter que sa culture à l'échelle industrielle est impossible sous nos latitudes (Yao & Kamagate, 2011). Le colza et le soja ont quant à eux un cycle végétatif de 3 à 6 mois, selon les variétés et les conditions climatiques (Martínez-Alcalá et al., 2020 ; Mazur et al., 2024).

Ces végétaux ont toutefois l'avantage d'un profil lipidique bien adapté à la production de FAMES. Par exemple, l'huile de palme est riche en acide palmitique (C16:0) et en acide oléique (C18:1), avec une faible teneur en PUFA, ce qui en fait une excellente candidate pour la production de biodiesel (Romero-Estévez et al., 2023). Les graines de colza, bien que plus insaturées, contiennent majoritairement du C18:1 et du C18:2, également bien adaptés à la transestérification (El-Beltagi et al., 2010 ; Santaraite et al., 2020). Les graines de soja, plus riches en C18:2 qu'en C18:1, sont toutefois plus sensibles à l'oxydation (Vi et al., 2022). En comparaison, les microalgues présentent généralement une teneur plus élevée en acide palmitique (C16:0) que le colza et le soja, ce qui est favorable à la production de biodiesel. Toutefois, leur profil lipidique est souvent plus diversifié, avec une proportion importante d'acides gras à longue chaîne et de PUFA. Cela nécessite davantage de traitements en aval, comme l'hydrogénation, pour améliorer la stabilité oxydative du carburant. Néanmoins, la présence d'acides gras à longues chaînes (C20+) peut représenter un atout pour la production de biokérosène, car ces chaînes peuvent être fragmentées par HTL pour produire des molécules plus courtes répondant aux spécifications de ce carburant (Martinez-Villarreal et al., 2022).

Comme évoqué précédemment, les études menées dans le cadre de ce travail se sont davantage concentrées sur l'utilisation de substrats carbonés que sur l'optimisation des profils lipidiques en vue de la production de biocarburants. Ainsi, aucune expérience n'a été réalisée pour accroître le rendement lipidique de la biomasse ou orienter la synthèse vers les SFA et MUFA, malgré les nombreuses stratégies évoquées au fil du manuscrit.

Le taux lipidique le plus élevé observé reste celui d'*A. protothecoides*, atteignant environ 20 % en phase exponentielle en présence d'un mélange de glucose, d'acétate et de xylose en culture hétérotrophe. Cette biomasse présentait une proportion combinée de C16:0 et de C18:0 d'environ 30 %, et une proportion similaire de C18:1. Le reste des acides gras étaient des PUFA (principalement du C18:2), moins stables, mais néanmoins favorables à la production de FAMES, leur profil se rapprochant

de celui de l'huile de colza (El-Beltagi et al., 2010 ; Santaraita et al., 2020). Les autres espèces étudiées ont montré des taux lipidiques plus modestes : environ 15 % pour *G. sulphuraria* en présence de glucose, et 5 % pour *E. gracilis* en présence d'acétate. *G. sulphuraria* présentait majoritairement des SFA (C16:0 et C18:0), mais aussi une proportion importante de PUFA à deux ou trois insaturations (C18:2 et C18:3). *E. gracilis* a quant à elle présenté un profil lipidique extrêmement varié, comprenant plus de 18 acides gras différents allant de C14 à C24, avec environ 70 % de SFA et 30 % de PUFA. Ces longues chaînes carbonées peuvent être valorisées pour la production de biokérosène, à condition d'être craquées par HTL (Martinez-Villarreal et al., 2022). Un autre aspect particulièrement prometteur de *E. gracilis*, bien que non exploré expérimentalement ici, est sa capacité à transformer, en condition anaérobie, son polysaccharide de réserve, le paramylon (représentant plus de 50 % de son poids sec dans nos expériences), en esters de cire. Ces derniers sont majoritairement constitués de myristyl myristate, composé de deux chaînes C14:0 liées par une liaison ester (Iwasaki et al., 2019). Ce lipide à 28 atomes de carbone peut être facilement converti en deux chaînes saturées de 14 atomes de carbone, rendant la HTL particulièrement efficace pour la production de biokérosène, tout en nécessitant moins de traitements d'hydrogénation.

Les stratégies visant à améliorer la teneur en lipides chez les microalgues sont variées et bien documentées. Un exemple notable est la manipulation de l'expression de la diacylglycérol acyltransférase (DAGAT), qui intervient dans la dernière étape de la formation de triglycérides (TAG) (D.-W. Li et al., 2016; Niu et al., 2013). Une autre approche consiste à cibler des enzymes, en amont du métabolisme des lipides comme la Malonyl-CoA : ACP transacylase (Protéine transporteuse d'acyl, MAT), qui catalyse le transfert de malonyl à partir du Malonyl-CoA à l'ACP (J. Chen et al., 2017). D'autres modifications génétiques visent plutôt à augmenter la disponibilité des précurseurs métaboliques nécessaires à la synthèse lipidique, tels que l'acétyl-CoA ou le NADPH. A cet égard, l'expression hétérologue ou la surexpression d'une isoforme homologue de l'enzyme malique a été proposée comme une stratégie efficace. Cette enzyme produit du NADPH et du pyruvate à partir de malate, et mène par conséquent à un accroissement de la synthèse des lipides (Domingues et al., 2021). Toutefois, l'accumulation préférentielle de lipides, et surtout de certains types d'acides gras préférés dans l'industrie des biocarburants (SFAs, MUFAs), peut également être stimulée par des stress environnementaux, comme la privation d'azote, une salinité élevée ou une température inadéquate à la croissance (Bartley et al., 2013; Nagappan et al., 2020; Wu et al., 2013). L'avantage de ces stress est qu'ils pourraient être facilement mis en œuvre conjointement à l'utilisation des substrats étudiés dans ce travail.

En résumé, bien que les objectifs de cette étude ne fussent pas orientés vers l'optimisation des profils lipidiques des microalgues pour la production de biocarburants, les résultats obtenus mettent en évidence plusieurs espèces présentant un potentiel intéressant. En particulier, *A. protothecoides* et *E. gracilis* se démarquent par leur composition lipidique ou leur métabolisme secondaire, ouvrant des perspectives prometteuses pour des applications futures, notamment dans la production de biokérosène via HTL. Une valorisation plus poussée de ces souches, couplée à une optimisation des

conditions de culture, pourrait ainsi permettre d'en faire des candidates compétitives dans le cadre de stratégies de transition énergétique durable.

6.1.3 Les microalgues comme alternative à la production industrielle de xylitol

A l'échelle industrielle, la production de xylitol repose sur l'hydrogénation catalytique des xylanes, provenant de l'hémicellulose de biomasse lignocellulosique. Grâce à ce procédé catalytique, 50 à 70% des xylanes sont convertis en xylitol. Bien que très répandu, sa mise en place cache de nombreuses contraintes environnementales. Premièrement, il implique de saturer le xylose de dihydrogène (sous une pression de 5 MPa), qui provient le plus souvent de ressources fossiles. Cette réaction, qui se fait dans des réacteurs adaptés, demande également d'atteindre des températures de l'ordre de 80 à 140°C, ce qui augmente davantage la consommation énergétique. Enfin, la réaction demande l'intervention de catalyseurs métalliques, le plus répandu étant le nickel de Raney. Cet alliage, constitué de nickel et d'aluminium, est dépendant pour sa confection de métaux faiblement renouvelables et d'une grande quantité d'énergie. De plus, il est dangereux à manipuler à cause de son inflammabilité extrême, et demande un traitement des déchets approprié en raison de sa toxicité élevée pour les organismes vivants (Acaráño et al., 2020 ; Genchi et al., 2020).

Dans ce contexte, la capacité de *A. protothecoides* à convertir le xylose en xylitol avec un rendement atteignant les 90% constitue une avancée significative. Ce niveau de performance est comparable, voire supérieur, à celui observé chez des microorganismes eucaryotes traditionnellement utilisés à cette fin (**Tableau 2**). Au-delà de l'intérêt technique, la production de xylitol par cette microalgue présente plusieurs avantages environnementaux et stratégiques majeurs.

Contrairement à la voie conventionnelle par hydrogénation catalytique, on a vu que la conversion biologique opérée par *A. protothecoides* en hétérotrophie s'effectue dans des conditions douces, à température ambiante et sans catalyseur métallique. Cette simplicité permet une réduction importante de la consommation énergétique et des émissions de gaz à effet de serre. Par ailleurs, cette espèce est capable de valoriser les sucres issus d'hydrolysats de biomasse lignocellulosique issus de déchets agricoles ou forestiers, permettant d'intégrer le procédé dans une économie circulaire. De plus, on a vu que *A. protothecoides* pouvait également produire des composés à forte valeur ajoutée, tels que des lipides, permettant ainsi d'optimiser la rentabilité économique dans une approche de bioraffinerie (**Chapitre V**).

Ainsi, la production de xylitol à partir de microalgues comme *A. protothecoides* ouvre la voie à un procédé plus durable, potentiellement plus rentable, à condition d'être intégré dans un schéma global de valorisation optimisée des ressources.

6.2 Perspectives visant à la valorisation du xylose en utilisant les espèces étudiées

6.2.1 Ingénierie métabolique

Une stratégie prometteuse pour permettre l'assimilation du xylose chez *A. protothecoides* serait l'expression d'une xylose déshydrogénase (XDH), sachant que chez la levure, la réoxydation du xylitol en xylulose, nécessite une activité enzymatique de xylitol déshydrogénase (XDH) dix fois supérieure à celle de la xylose réductase (XR) pour être efficace (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

En ce sens, on pourrait imaginer l'insertion, par recombinaison homologue, d'un gène codant pour une XDH recombinante de levure ou d'une autre microalgue proche, comme *C. sorokiniana* (Zheng et al., 2014). Son expression pourrait être renforcée par l'association à un promoteur constitutif. L'utilisation de promoteurs hétérologues a déjà permis d'exprimer des protéines recombinantes chez certaines microalgues, comme le promoteur *CaMV 35S* du virus de la mosaïque du chou-fleur chez *C. reinhardtii* (Díaz-Santos et al., 2013). Cependant, cette méthode reste moins étudiée chez *A. protothecoides*. Un exemple documenté concerne l'utilisation d'un promoteur endogène du gène codant pour l'alpha-tubuline chez *Chlorella vulgaris*, permettant l'insertion et l'expression d'un gène de résistance à la streptomycine chez *C. sorokiniana* après transfection du plasmide par électroporation (Fernández-Rodríguez et al., 2020).

Des analyses bioinformatiques ont révélé la présence potentielle d'un ou plusieurs gènes codant pour une enzyme ayant une activité XDH chez *A. protothecoides* UTEX25 (**Annexe 1**). Si ces protéines sont fonctionnelles lorsqu'elles sont exprimées, il serait possible de simplifier la transformation en remplaçant leur promoteur endogène par un promoteur fort. Pour que cette approche soit efficace, le xylulose devrait poursuivre sa conversion via la voie des pentoses phosphates, dont l'activité transkétolase (TK) a été démontrée chez *A. protothecoides* (Ren et al., 2019). Il serait donc nécessaire de confirmer la présence d'une xylulokinase (XK) pour assurer la phosphorylation du xylulose. Si cette enzyme était absente ou faiblement exprimée, une version recombinante devrait également être introduite. Une autre approche pourrait être l'expression d'une xylose isomérase hétérologue chez la microalgue. Cette enzyme, exclusivement bactérienne, permet la transformation de xylose en xylulose, sans nécessiter de cofacteurs comme le NAD(P)⁺ ou le NAD(P)H. L'utilisation d'une xylose isomérase de *Clostridium phytofermentans* a, par exemple, permis de favoriser la consommation de xylose plutôt que la production de xylitol chez la levure *S. cerevisiae* (Cunha et al., 2019).

6.2.2 Culture mixotrophe

Sans recourir à des modifications génétiques, l'utilisation du xylose en conditions mixotrophes semble plus répandue qu'en hétérotrophie. En effet, l'activation de la machinerie photosynthétique par la lumière peut favoriser le métabolisme du xylose, notamment en fournissant à la cellule des équivalents réducteurs NAD(P)H nécessaires à sa réduction en xylitol lors de la première étape de

cette voie métabolique (Badary et al., 2024; S. Yang et al., 2014; Zheng et al., 2014). L'ajout d'une source lumineuse pourrait ainsi améliorer la production rapide et efficace de xylitol.

Nous avons observé que lorsque le glucose et l'acétate étaient présents dans le milieu, ce dernier jouait un rôle essentiel dans le maintien de l'activité xylose réductase. Cependant, il est probable que la production de xylitol dépende avant tout d'un métabolisme cellulaire actif et non spécifiquement de l'acétate. Si tel est le cas, la lumière pourrait permettre de maintenir cette activité et ainsi favoriser la réduction du xylose.

Plusieurs microalgues ont d'ailleurs une vitesse d'utilisation du xylose plus élevée en mixotrophie qu'en hétérotrophie, comme *Chlorococcum* sp., *Desmodesmus* sp. ou *Chlamydomonas debaryana* (Badary et al., 2024). Certaines espèces n'assimilent le xylose qu'en conditions mixotrophes, comme *Scenedesmus obliquus* (S. Yang et al., 2014), *C. vulgaris* (Bhattacharya et al., 2025; Plöhn et al., 2022), *Chlorococcum* sp. (Plöhn et al., 2022) ou encore *Dunaliella salina* (De Freitas et al., 2019) (**Tableau 1**).

Étonnamment, certaines études rapportent un effet inverse : bien que le xylose soit assimilé en mixotrophie, sa présence peut avoir un impact négatif sur la croissance par rapport aux conditions hétérotrophes et phototrophes (Bhattacharya et al., 2025; Leite et al., 2015). Par exemple, dans Leite et al., (2015), plusieurs souches supposées appartenir au genre *Chlorella* ont atteint une biomasse maximale inférieure en présence de xylose et de lumière qu'à l'obscurité ou sans source de carbone. Les auteurs ont également observé que cette inhibition était spécifique au xylose, puisque le glycérol n'induisait pas de répression de croissance (Leite et al., 2015). Chez *S. obliquus*, la présence de xylose dans le milieu affecte aussi la machinerie photosynthétique, entraînant une diminution de la fluorescence du photosystème II (PSII) par rapport au photosystème I (PSI) ainsi qu'une réduction de la concentration cellulaire en chlorophylle (S. Yang et al., 2014). Dans d'autres cas, comme chez *C. pyrenoidosa*, le xylose inhibe la photosynthèse, stoppe complètement la division cellulaire et favorise la dégradation des pigments (Hassall, 1958).

Une des perspectives envisagées à la suite de ce travail serait donc d'évaluer la culture mixotrophe d'*A. protothecoides* afin de déterminer l'effet positif ou négatif que la lumière pourrait avoir sur son métabolisme du xylose.

6.2.3 Co-culture ou cultures séquentielles

Une autre approche pour valoriser les substrats majoritaires de l'hémicellulose (xylose, glucose, acétate) serait de mettre en place une culture séquentielle des microalgues étudiées. Ce type de stratégie a déjà été testé à plusieurs reprises pour la valorisation du xylose, mais implique généralement un autre microorganisme non algal. Par exemple, la biomasse de *C. vulgaris* cultivée en mixotrophie sur divers pentoses a été utilisée comme substrat pour la production d'isopropanol par une souche recombinante de *S. cerevisiae* (Bhattacharya et al., 2025). Un autre cas concerne une co-culture avec la bactérie *Cellvibrio pealriver*, qui a facilité l'assimilation de sources de carbone par des Chlorelles grâce à son métabolisme de dégradation des xylanes (Z. Xie et al., 2016). Il est vrai que les

bactéries peuvent avoir une importance dans la dégradation ou la transformation de certains substrats, facilitant par conséquent leur assimilation par d'autres microorganismes. L'une des seules études clamant une assimilation efficace du xylose par une dizaine de souches indigènes de Chlorocelles, déjà abordée dans le **Chapitre V**, mentionne le fait que leurs microalgues n'ont pas été isolées suite aux échantillonnages et ne sont par conséquent pas axéniques (Leite et al., 2015). Ils n'ont pas discuté le rôle potentiel des microorganismes présents dans les cultures dans l'assimilation du xylose, alors qu'un tel métabolisme semble rarissime chez les microalgues. Ces exemples nous poussent à nous interroger sur le potentiel de cultiver un consortium de plusieurs organismes de natures différents, qui agiraient de concert pour valoriser au mieux certains types de substrats

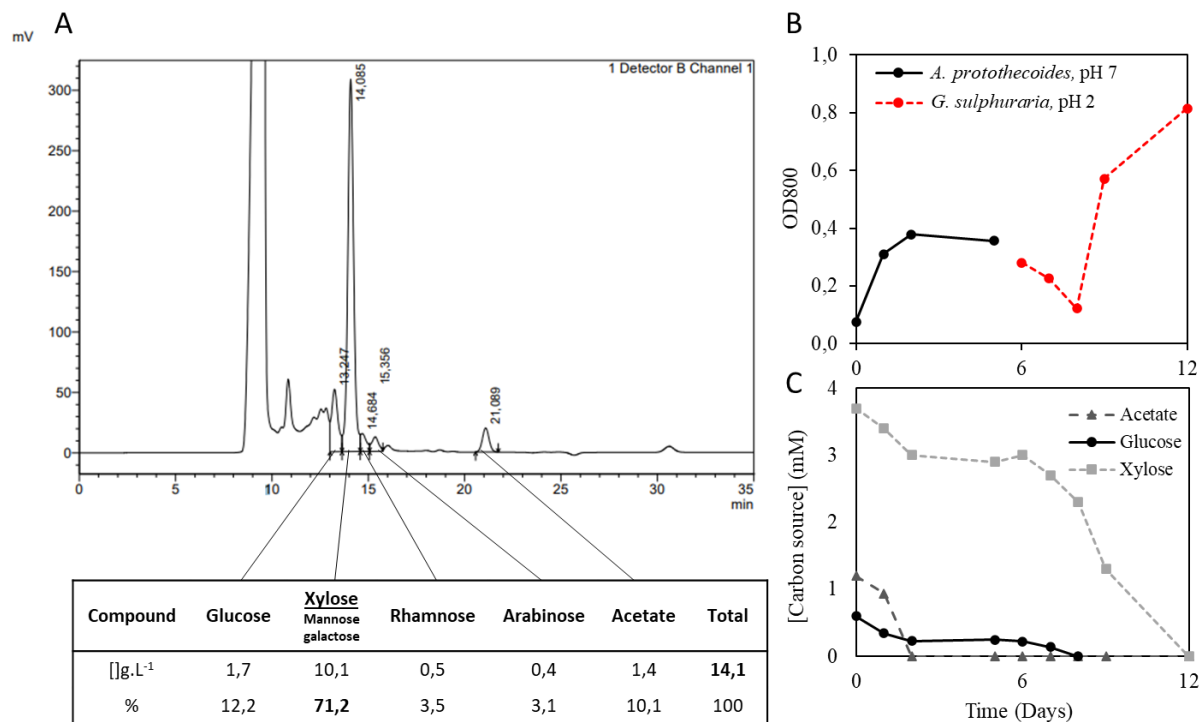


FIGURE 13 : (A) Chromatogramme HPLC d'un hydrolysate de sciure de bois (1 :20 (m : v), 4 % d'acide sulfurique, 121°C, 20 min) et tableau de la composition des substrats carbonés identifiés. (B) Densité optique en fonction du temps (jours) pour *A. protothecoides* et *G. sulphuraria*, inoculées successivement dans le même milieu contenant 10% d'hydrolysate acide de sciure de bois. (C) Concentration des principales sources de carbone présentes dans le milieu au fil du temps (jours). Les données sont exprimées en mM pour chaque source de carbone. Un seul réplica a été réalisé lors de ces expériences.

difficilement assimilables par des microalgues dont la biomasse présente un intérêt industriel.

Dans cette étude, nous avons envisagé d'adapter cette approche en combinant différentes espèces de microalgues. Nous avons notamment pensé à une co-culture d'*A. protothecoides* et d'*E. gracilis*. Bien que cette dernière ne soit pas capable de métaboliser le xylose, il a été démontré qu'elle pouvait utiliser le xylitol (Zhu & Wakisaka, 2020). Il serait donc envisageable de valoriser le xylitol produit par *A. protothecoides* en présence de glucose et d'acétate en l'utilisant comme substrat pour *E. gracilis*, soit en co-culture, soit en réutilisant le milieu de culture enrichi en xylitol.

Dans nos expériences, la productivité en xylitol est restée relativement faible, principalement en raison d'une densité cellulaire limitée par un apport en carbone modéré. Pourtant, *A.*

protothecoides est capable de produire une biomasse bien plus importante en conditions hétérotrophes ($>150 \text{ g L}^{-1}$) (De La Hoz Siegler et al., 2012; Ghidossi et al., 2017). Une culture initiale avec une densité cellulaire élevée, favorisée par un apport en glucose, suivie de l'ajout d'acétate pour maintenir un métabolisme actif sans générer de biomasse supplémentaire, pourrait ainsi améliorer la production de xylitol.

Chez la levure *Candida tropicalis*, des chercheurs ont par exemple réussi à produire plus de 110 g L^{-1} de xylitol en 39 heures en inoculant 30 g L^{-1} de biomasse sèche en présence d'acétate et de 177 g L^{-1} de xylose (Morais Junior et al., 2019). Ces résultats illustrent la résistance de certains organismes au stress osmotique généré par de telles concentrations en substrats. Cette résistance s'applique également à certaines microalgues étudiées. *G. sulphuraria*, par exemple, est capable de croître en présence de concentrations élevées en sels et en métaux (Kharel et al., 2024; Martinez-Garcia & Van Der Maarel, 2016), ainsi que dans des milieux contenant $1,5 \text{ M}$ de NaCl (90 g L^{-1}) (Martinez-Garcia & Van Der Maarel, 2016) ou encore 166 g L^{-1} de glucose ou de fructose (Graverholt & Eriksen, 2007). À l'instar d'*E. gracilis*, elle est capable d'utiliser le xylitol comme source de carbone pour produire efficacement de la biomasse (Gross & Schnarrenberger, 1995) et pourrait ainsi bénéficier du xylitol produit par *A. protothecoides*.

Étant donné la capacité exceptionnelle de *G. sulphuraria* à assimiler le xylose, il serait également pertinent de l'intégrer à des stratégies de valorisation de l'hémicellulose. Toutefois, un obstacle majeur, observé lors de nos travaux, réside dans la présence d'acétate toxique au pH optimal de cette microalgue. Il serait donc nécessaire d'éliminer l'acétate du milieu de culture avant d'y inoculer *G. sulphuraria* (**Fig. 13A**). Dans des expériences préliminaires, nous avons utilisé avec succès *A. protothecoides* pour « décontaminer » un milieu où avait été ajouté comme source de carbone 10% l'hydrolysat d'hémicellulose de peuplier, dont l'analyse par HPLC nous a fourni l'information qu'elle contenait environ 70 % d'un mélange de mannose, galactose et xylose, dont les concentrations individuelles n'ont pas pu être déterminées en raison de leur co-élution avec la technique de chromatographie utilisée (**Fig. 13A**). Néanmoins, nous avons supposé que la grande majorité de l'aire détectée sous le pic du chromatogramme pouvait être attribuée au xylose, étant donné que des données dans la littérature montre que l'hémicellulose de peuplier contient plus de 50% de xylose contre moins de 2% de mannose et de galactose (Gökkaya et al., 2020). Bien que cette étape visant à la disparition de l'acétate présent dans le milieu aurait également pu être réalisée avec *E. gracilis*, nous avons privilégié *A. protothecoides* en raison de sa capacité à produire davantage de lipides.

Après avoir éliminé l'acétate, nous avons réutilisé le milieu en y inoculant *G. sulphuraria*, qui a alors pu métaboliser l'excès de xylose (**Fig. 13B-C**). Toutefois, avant d'inoculer *A. protothecoides*, il a été nécessaire de neutraliser l'hydrolysat, initialement extrait en présence d'acide sulfurique 4 %. Ensuite, pour optimiser la culture de *G. sulphuraria*, un ajustement du pH à ~ 2 a permis de réduire fortement la phase de latence.

Fait intéressant, lorsque *G. sulphuraria* était directement inoculée à des pH allant de 5 à 7 sans acétate après la culture en présence de *A. protothecoides*, une phase de latence relativement longue

était observée (4-10 jours), suivie d'une acidification rapide du milieu, qui entraînait la reprise de la croissance (non documenté ici). Bien que ces résultats doivent être confirmés par des expériences supplémentaires et améliorés en employant par exemple de plus forte concentrations en hydrolysats, ils offrent une perspective nouvelle sur l'utilisation combinée de plusieurs microalgues pour valoriser les substrats issus de la biomasse lignocellulosique.

6.3 Recyclage d'autres nutriments que le carbone

Au-delà des substrats carbonés, nous avons également pensé à l'utilisation de composés azotés et phosphorés issus de déchets industriels. Cette idée nous est venue à la suite d'une discussion avec Sergio Martínez-Villarreal, un étudiant en thèse du Pr A. Richel, participant au projet ADV_BIO, dont la mission était la conversion de biomasse algale suite au procédé de liquéfaction hydrothermale (HTL). Lors de ce processus, déjà abordé dans le chapitre abordant les contextes de la thèse, la biomasse est soumise à de fortes températures et pression dans leur milieu de culture aqueuse. Après la réaction on peut récupérer dans le réacteur quatre phases avec des compositions différentes : une phase gazeuse, une phase huileuse riche en hydrocarbures (bien que souvent polluée de composés azotés et oxygénés), une phase solide, et une phase aqueuse (HTL-AP), dans laquelle se trouvent des composés organiques hydrosolubles mais aussi des sels et ions, dont une importante quantité d'ammonium et de phosphate directement extraits de la biomasse algale. La perspective envisagée était donc, comme cela a déjà été documenté (Ramírez-Romero et al., 2023; Watson et al., 2020; Y. Zhu et al., 2019), la réutilisation de ces nutriments pour la croissance de *A. protothecoides*, réduisant ainsi les coûts liés à l'ajout de sources commerciales d'azote et de phosphate. Toutefois, cette phase aqueuse contient également des composés inhibiteurs, comme les furfurals et les phénols, qui peuvent affecter la croissance des microorganismes (Ramírez-Romero et al., 2023).

Nous avons eu la possibilité de mener quelques expériences à ce sujet qui peuvent faire l'objet de perspectives intéressantes. Différentes phases aqueuses ont été isolées et mélangées à partir d'expériences de HTL menées par Sergio Martínez-Villarreal, dans le cadre de l'évaluation de divers paramètres de réaction pour la production de biopétrole à partir des souches microalgales *C. vulgaris* et *S. obliquus*.

Afin d'estimer la tolérance d'*A. protothecoides* à la croissance hétérotrophe en présence de HTL-AP recyclée, nous avons réalisé des dilutions allant de 1/2000 à 1/5 dans un milieu standard pour microalgues (TMP, Tris-Minimal Phosphate) supplémenté en quantité équimolaires de glucose, acétate et xylose (50-50-50 mM de carbone, soit 150 mMC au total). Les cultures ont été réalisées en duplicatas biologiques dans des Erlenmeyers de 100 mL contenant 25 mL de milieu TMP, placé à l'obscurité sous agitation constante (110 rpm). Les cultures ont été suivies pendant 3 jours et la densité optique à 800 nm a été déterminée au moins une fois par jour pour tracer les courbes de croissance et calculer le taux spécifique de croissance (μ), traduisant la tolérance des cellules pour chaque concentration en HTL-AP en comparaison à un contrôle positif (C+). Parallèlement, nous avons analysé la composition de la HTL-AP à l'aide d'une méthode colorimétrique pour la concentration en

PO₄³⁻ tel que décrit dans Corato et al., (2022) et enzymatique pour la composition en NH₄⁺(Ammonia Assay Kit, MegaZyme®) tel que décrit dans Perez Saura et al., (2024). Une méthode chromatographique (HPLC) a été employée pour l'analyse des composés organiques, à l'aide d'un détecteur à indice de réfraction (RID) pour les alcools, acides organiques et monosaccharides, et d'un détecteur à photodiode (PDA) pour le 5-hydroxyméthyl furfural (5-HMF) montrant un maximum d'absorbance à 284nm. La colonne et la méthode utilisée (Supelcogel C610-H, 35°C, 0.5 mL min⁻¹ de H₃PO₄ 0.1% en mode isocratique), à l'exception du détecteur qui pouvait varier pour le 5-HMF, sont identiques à celles décrites pour la mesure du glucose et du glycérol dans le milieu de culture [(Perez Saura et al., (2022)]. Les composés majoritairement détectés sont présentés dans le **Tableau 3**.

Comparée à d'autres études, la composition globale de la HTL-AP semblait prometteuse, car elle contenait peu de composés inhibiteurs, tout en offrant des taux satisfaisants d'ammonium, de phosphate et de carbone organique (Ramírez-Romero et al., 2023).

TABLEAU 3 : Composition de la phase aqueuse issue de la liquéfaction hydrothermale et méthode de détection. N.d. : le composé n'est pas détecté dans le milieu.

Compound	Content (g L ⁻¹)	Content (mMC)	Detection method
Lactic acid	0.75	24.87	HPLC-RI
Glycerol	3.02	98.41	HPLC-RI
Acetate	3.44	116.54	HPLC-RI
Levulinic acid	0.37	15.81	HPLC-RI
Ethanol	6.88	678.25	HPLC-RI
Propionate	2.12	92.19	HPLC-RI
5-HMF	n.q.	n.q.	HPLC-PDA
NH ₄ ⁺	3.14	/	Enzymatic
PO ₄ ³⁻	4.06	/	Colorimetric
n.q.: the compound was identified, but not quantified yet.			

Une première expérience de criblage a permis d'évaluer la capacité de croissance de *A. protothecoides* en présence de la HTL-AP (**Fig. 14A**). Les dilutions allant de 1/2000 à 1/5 ont été choisies sur la base d'études antérieures, ayant montré que des cellules non adaptées de *C. vulgaris* ne toléraient qu'une dilution de 1/400 dans une HTL-AP de composition similaire (Ramírez-Romero et al., 2023). De manière surprenante, comme le montre la **Fig. 14A**, aucun effet significatif sur la densité cellulaire globale n'a été observé du jour 0 au jour 3 pour des dilutions allant de 1/2000 à 1/25 par rapport au contrôle, tandis qu'aucune croissance n'a été enregistrée à une dilution de 1/5.

Une seconde expérience de criblage a porté sur les dilutions comprises entre 1/25 et 1/5 afin d'identifier les concentrations inhibant la croissance cellulaire (**Fig. 14B-D**). Il est à noter que la dilution 1/25 a présenté un taux de croissance spécifique supérieur aux autres concentrations, y compris au contrôle positif (1,71 j⁻¹ et 1,33 j⁻¹, respectivement), probablement en raison des nutriments contenus

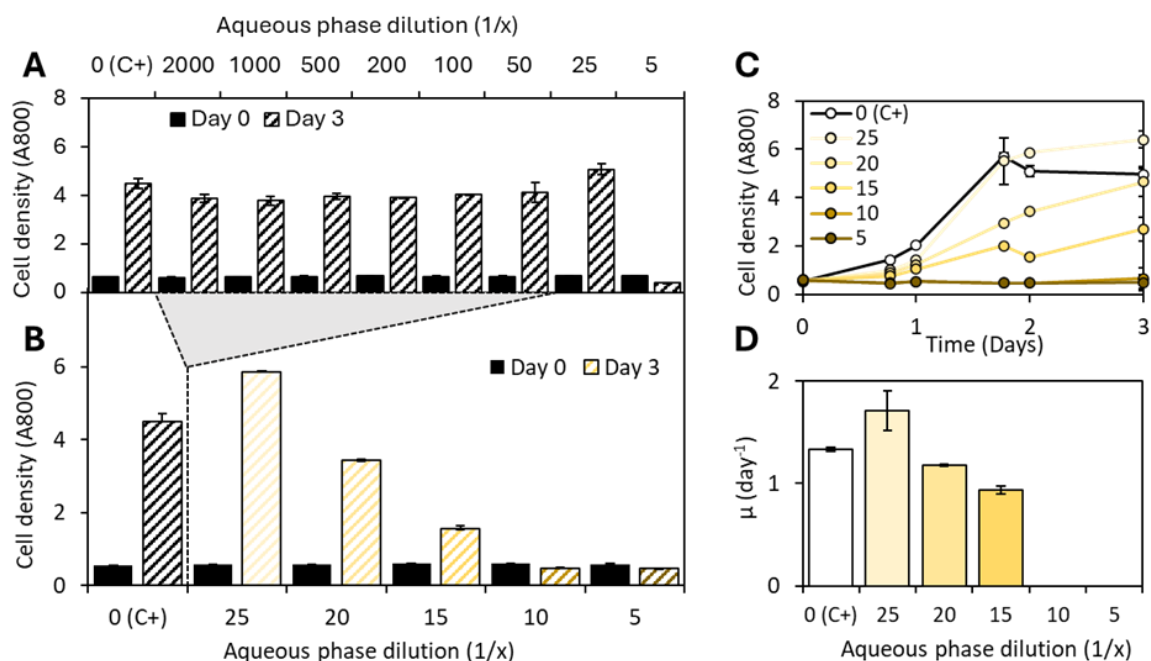


FIGURE 14 : Évolution de la densité cellulaire (A-C) et taux de croissance spécifique (D) de *A. protothecoides* cultivé en présence de HTL-AP dilué de 5X à 2000X dans un milieu TMP supplémenté en glucose, acétate et xylose. Le contrôle positif (C+) a été réalisé dans les mêmes conditions, sans ajout de HTL-AP. Les données sont exprimées en moyenne de trois réplicas indépendants. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la moyenne (\pm SD).

dans la HTL-AP, qui améliorent l'efficacité de production de biomasse (Fig. 14A-D, Tableau 3). À l'inverse, les dilutions plus faibles ont entraîné une diminution de la densité cellulaire et des taux de croissance spécifiques par rapport au contrôle positif, avec une inhibition complète de la croissance observée à partir d'une dilution de 1/10 et inférieure (Fig. 14B-D). Des composés tels que les furfurals (dont le 5-HMF) et les phénols sont suspectés d'être responsables de cette inhibition. À forte concentration, ces molécules peuvent induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant un stress oxydatif compromettant des fonctions cellulaires essentielles.

Globalement, la capacité de *A. protothecoides* à croître dans une dilution de 1/25 de HTL-AP, sans adaptation préalable à ces conditions, est remarquable. À titre de comparaison, d'autres études sur des espèces de Chlorelle ont rapporté des résultats optimaux pour des dilutions allant de 1/500 à 1/50 (Ramírez-Romero et al., 2023; Watson et al., 2020). En outre, des résultats préliminaires que nous n'avons pas exposés ici ont confirmé que l'ajout de sources d'azote et de phosphate n'étaient pas nécessaires pour favoriser la croissance de l'algue, confirmant donc que la HTL-AP est suffisamment riche pour permettre sa croissance. Ces résultats sont prometteurs pour la valorisation de la HTL-AP par *A. protothecoides*, facilitant ainsi le recyclage des nutriments pour une nouvelle production de biomasse microalgale.

Avec ces résultats prometteurs combinés à la capacité des souches étudiées à valoriser la biomasse lignocellulosique, d'autres perspectives sont à envisager. On pense par exemple à l'utilisation de HTL-AP pour la culture d'*A. protothecoides* en présence d'hydrolysats d'hémicellulose,

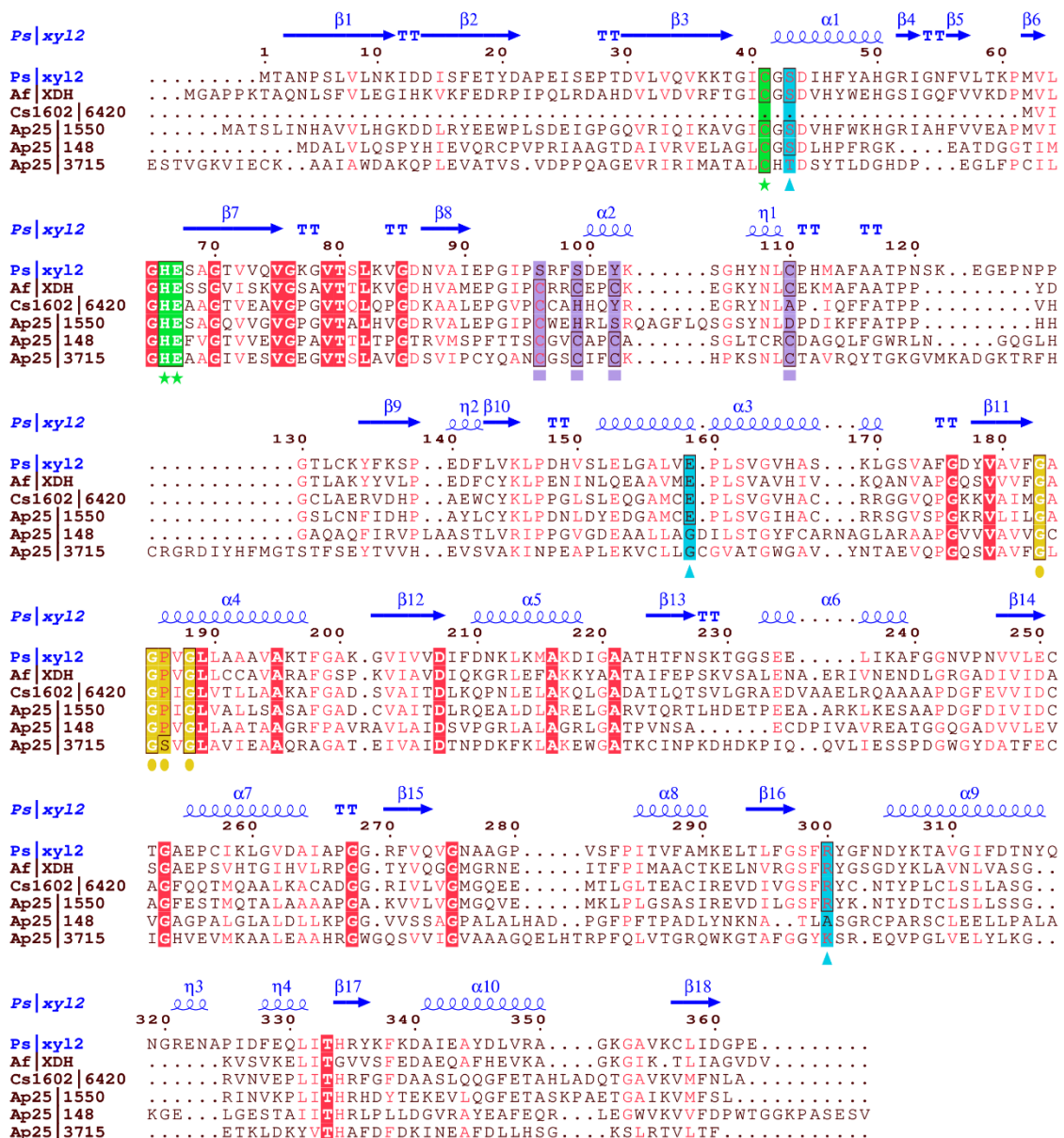
avec la valorisation successive du xylose résiduel par *G. sulphuraria*, qui pourrait également profiter des sources d'azote et de phosphate qui s'y trouvent. Nos expériences permettent de confirmer l'atout que peuvent représenter les microalgues dans la valorisation de composés variés, habituellement classées dans la catégorie des déchets.

6.4 Conclusion

Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur le métabolisme du glycérol, du glucose, de l'acétate et du xylose chez les microalgues, en mettant en évidence le potentiel de *A. protothecoides* pour la production de xylitol. Si l'acétate constitue un obstacle pour *G. sulphuraria*, des stratégies telles que la culture mixotrophe, la co-culture et l'ingénierie métabolique pourraient permettre d'optimiser la valorisation du xylose. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'intégration des microalgues dans les procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique, combinant bioproduction durable et valorisation de composés d'intérêt.

Annexes conclusions

Annexe 1 : Alignement de différentes enzymes à activité xylitol déshydrogénase (XDH) putative chez *A. protothecoides* UTEX25 (Ap|1550-148-3715) et *C. sorokiniana* (Cs1602|6420), avec des XDH caractérisées de *Pichia stipitis* (Ps|xyl2, Yoshiwara et al., 2023) et *Aspergillus flavus* (Af|XDH, Kumar et al., 2022). Les encadrés avec des caractères blancs en gras indiquent les résidus d'acides aminés strictement identiques. Les caractères rouges représentent les résidus d'acides aminés ayant une fonction conservée entre les groupes. Les triangles bleus indiquent les positions des résidus d'acides aminés impliqués dans la reconnaissance au substrat. Les étoiles vertes indiquent les positions des résidus d'acides aminés clés pour la liaison au zinc, indispensable à l'activité enzymatique. Les carrés violets indiquent les résidus d'acides aminés clés pour coordination structurale du zinc. Les cercles jaunes indiquent les résidus d'acides aminés clés pour la liaison au NAD⁺ (motif Rossmann Fold, GXGPXG). Les cadres noirs mettent en évidence les résidus d'acides aminés strictement conservés entre les groupes par rapport à Dn|akr2. Les structures secondaires principales trouvées dans Dn|akr2 sont marquées en bleu (Kumar et al., 2022; Yoshiwara et al., 2023)



BIBLIOGRAPHIE DE L'INTRODUCTION (CHAPITRE I) ET DE LA CONCLUSION (CHAPITRE VI)

- Abiusi, F., Moñino Fernández, P., Canziani, S., Janssen, M., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. (2022). Mixotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* for C-phycoerythrin and protein production. *Algal Research*, *61*, 102603. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102603>
- Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., & Nunes, J. (2022). A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *159*, 112247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112247>
- Ahmad, A., & Ashraf, S. S. (2023). Sustainable food and feed sources from microalgae : Food security and the circular bioeconomy. *Algal Research*, *74*, 103185. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103185>
- Akinterinwa, O., & Cirino, P. C. (2009). Heterologous expression of d-xylulokinase from *Pichia stipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli* growing on xylose. *Metabolic Engineering*, *11*(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.07.006>
- Amthor, J. S. (2023). ATP yield of plant respiration : Potential, actual and unknown. *Annals of Botany*, *132*(1), 133-162. <https://doi.org/10.1093/aob/mcad075>
- Angelini, F., Bellini, E., Marchetti, A., Salvatori, G., Villano, M., Pontiggia, D., & Ferrari, S. (2024). Efficient utilization of monosaccharides from agri-food byproducts supports *Chlorella vulgaris* biomass production under mixotrophic conditions. *Algal Research*, *77*, 103358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103358>
- Archibald, J. M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology*, *25*(19), R911-R921. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
- Avidan, O., & Pick, U. (2015). Acetyl-CoA synthetase is activated as part of the PDH-bypass in the oleaginous green alga *Chlorella desiccata*. *Journal of Experimental Botany*, *66*(22), 7287-7298. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv424>
- Azari, A., Noorpoor, A. R., & Bozorg-Haddad, O. (2019). Carbon footprint analyses of microalgae cultivation systems under autotrophic and heterotrophic conditions. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *16*(11), 6671-6684. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2072-5>
- Badary, A., Hidas, N., Ferrari, S., & Mayfield, S. P. (2024). Isolation and characterization of microalgae strains able to grow on complex biomass hydrolysate for industrial application. *Algal Research*, *78*, 103381. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103381>
- Baker-Austin, C., & Dopson, M. (2007). Life in acid : pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, *15*(4), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>
- Barbier, G. G., Zimmermann, M., & Weber, A. P. M. (2005). Genomics of the thermo-acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria* (R. B. Hoover, G. V. Levin, A. Y. Rozanov, & G. R. Gladstone, Éd.; p. 590609). <https://doi.org/10.1111/12.614532>
- Barone, R., De Napoli, L., Mayol, L., Paolucci, M., Volpe, M. G., D'Elia, L., Pollio, A., Guida, M., Gambino, E., Carraturo, F., Marra, R., Vinale, F., Woo, S. L., & Lorito, M. (2020). Autotrophic and Heterotrophic Growth Conditions Modify Biomolecule Production in the Microalga *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophyceae, Rhodophyta). *Marine Drugs*, *18*(3), 169. <https://doi.org/10.3390/md18030169>
- Barros, A., Pereira, H., Campos, J., Marques, A., Varela, J., & Silva, J. (2019). Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Scientific Reports*, *9*(1), 13935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50206-z>

- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2020). Anatomy of *Euglena gracilis*. In *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine* (p. 61-70). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00004-8>
- Basera, P., Chakraborty, S., & Sharma, N. (2024). Lignocellulosic biomass : Insights into enzymatic hydrolysis, influential factors, and economic viability. *Discover Sustainability*, 5(1), 311. <https://doi.org/10.1007/s43621-024-00543-5>
- Benoiston, A.-S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., & Bowler, C. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728), 20160397. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>
- Bhan, C., & Singh, J. (2020). Role of microbial lipases in transesterification process for biodiesel production. *Environmental Sustainability*, 3(3), 257-266. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00119-9>
- Bhattacharya, S., Coelho, R. S., Franco, T. T., Zuorro, A., Vyas, A., Mukherjee, T., Joshi, V. C., & Trif, M. (2025). Conversion of pentose sugars from lignocellulosic hydrolysate to isopropyl alcohol via integrated *Chlorella vulgaris* cultivation and yeast fermentation : An alternative fuel to diesel engines. *Algal Research*, 87, 103982. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2025.103982>
- Blaby-Haas, C. E., & Merchant, S. S. (2019). Comparative and Functional Algal Genomics. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 605-638. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095841>
- Blankenship, R. E. (2002). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (1^{re} éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470758472>
- Blum, J. J., & Wittels, B. (1968). Mannose as a Metabolite and an Inhibitor of Metabolism in *Euglena*. *Journal of Biological Chemistry*, 243(1), 200-210. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99344-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99344-0)
- Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R., & Summons, R. E. (1999). Archean Molecular Fossils and the Early Rise of Eukaryotes. *Science*, 285(5430), 1033-1036. <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1033>
- Brunet, C., Johnsen, G., Lavaud, J., & Roy, S. (2011). Pigments and photoacclimation processes. In S. Roy, C. A. Llewellyn, E. S. Egeland, & G. Johnsen (Éds.), *Phytoplankton Pigments* (1^{re} éd., p. 445-471). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511732263.017>
- Busi, M. V., Barchiesi, J., Martín, M., & Gomez-Casati, D. F. (2014). Starch metabolism in green algae. *Starch - Stärke*, 66(1-2), 28-40. <https://doi.org/10.1002/star.201200211>
- Caporgno, M. P., Haberkorn, I., Böcker, L., & Mathys, A. (2019). Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions. *Bioresource Technology*, 288, 121476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121476>
- Carreón-Rodríguez, O. E., Gosset, G., Escalante, A., & Bolívar, F. (2023). Glucose Transport in *Escherichia coli*: From Basics to Transport Engineering. *Microorganisms*, 11(6), 1588. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061588>
- Cenci, U., Chabi, M., Ducatez, M., Tirtiaux, C., Nirmal-Raj, J., Utsumi, Y., Kobayashi, D., Sasaki, S., Suzuki, E., Nakamura, Y., Putaux, J.-L., Roussel, X., Durand-Terrasson, A., Bhattacharya, D., Vercoutter-Edouart, A.-S., Maes, E., Arias, M. C., Palcic, M., Sim, L., ... Colleoni, C. (2013). Convergent Evolution of Polysaccharide Debranching Defines a Common Mechanism for Starch Accumulation in Cyanobacteria and Plants. *The Plant Cell*, 25(10), 3961-3975. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118174>
- Cerón-García, M. C., Macías-Sánchez, M. D., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. (2013). A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Applied Energy*, 103, 341-349. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.09.054>
- Chen, J., Liu, W., Hu, D., Wang, X., Balamurugan, S., Alimujiang, A., Yang, W., Liu, J., & Li, H. (2017). Identification of a malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase and its regulatory role in fatty

- acid biosynthesis in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(5), 620-626. <https://doi.org/10.1002/bab.1531>
- Chen, Y.-H., & Walker, T. H. (2011). Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology Letters*, 33(10), 1973-1983. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0672-y>
- Chen, Z., Zhu, J., Du, M., Chen, Z., Liu, Q., Zhu, H., Lei, A., & Wang, J. (2022). A Synthetic Biology Perspective on the Bioengineering Tools for an Industrial Microalga : *Euglena gracilis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 882391. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.882391>
- Chew, S. Y., Chee, W. J. Y., & Than, L. T. L. (2019). The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata* : Perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0546-5>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chisti, Y. (2013). Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology*, 167(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.020>
- Collos, Y., & Harrison, P. J. (2014). Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine Pollution Bulletin*, 80(1-2), 8-23. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.006>
- Cook, J. R., & Heinrich, B. (1965). Glucose vs. Acetate Metabolism in *Euglena* *. *The Journal of Protozoology*, 12(4), 581-584. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1965.tb03258.x>
- Cordoba, J., Perez, E., Van Vlierberghe, M., Bertrand, A. R., Lupo, V., Cardol, P., & Baurain, D. (2021). De Novo Transcriptome Meta-Assembly of the Mixotrophic Freshwater Microalga *Euglena gracilis*. *Genes*, 12(6), 842. <https://doi.org/10.3390/genes12060842>
- Cramer, M., & Myers, J. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of *euglena gracilis*. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 17(1-4), 384-402. <https://doi.org/10.1007/BF00410835>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Romani, A., Thevelein, J. M., & Domingues, L. (2019). Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>
- Curien, G., Lyska, D., Guglielmino, E., Westhoff, P., Janetzko, J., Tardif, M., Hallopeau, C., Brugière, S., Dal Bo, D., Decelle, J., Gallet, B., Falconet, D., Carone, M., Remacle, C., Ferro, M., Weber, A. P. M., & Finazzi, G. (2021). Mixotrophic growth of the extremophile *Galdieria sulphuraria* reveals the flexibility of its carbon assimilation metabolism. *New Phytologist*, 231(1), 326-338. <https://doi.org/10.1111/nph.17359>
- Dalli, S. S., Da Silva, S. S., Uprety, B. K., & Rakshit, S. K. (2017). Enhanced Production of Xylitol from Poplar Wood Hydrolysates Through a Sustainable Process Using Immobilized New Strain *Candida tropicalis* UFMG BX 12-a. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(3), 1053-1064. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2381-4>
- Danilov, R. A., & Ekelund, N. G. A. (2001). Effects of pH on the growth rate, motility and photosynthesis in *Euglena gracilis*. *Folia Microbiologica*, 46(6), 549-554. <https://doi.org/10.1007/BF02818001>
- Dasgupta, C. N., Suseela, M. R., Mandotra, S. K., Kumar, P., Pandey, M. K., Toppo, K., & Lone, J. A. (2015). Dual uses of microalgal biomass : An integrative approach for biohydrogen and biodiesel production. *Applied Energy*, 146, 202-208. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.070>
- De Freitas, B. C. B., Brächer, E. H., De Morais, E. G., Atala, D. I. P., De Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2019). Cultivation of different microalgae with pentose as carbon source and the effects on the carbohydrate content. *Environmental Technology*, 40(8), 1062-1070. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1417491>

- De La Hoz Siegler, H., McCaffrey, W. C., Burrell, R. E., & Ben-Zvi, A. (2012). Optimization of microalgal productivity using an adaptive, non-linear model based strategy. *Bioresource Technology*, *104*, 537-546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.029>
- Delgado Arcaño, Y., Valmaña García, O. D., Mandelli, D., Carvalho, W. A., & Magalhães Pontes, L. A. (2020). Xylitol : A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catalysis Today*, *344*, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060>
- Díaz-Santos, E., De La Vega, M., Vila, M., Vígara, J., & León, R. (2013). Efficiency of different heterologous promoters in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*, *29*(2), 319-328. <https://doi.org/10.1002/btpr.1690>
- Do Val Siqueira, L., Arias, C. I. L. F., Maniglia, B. C., & Tadini, C. C. (2021). Starch-based biodegradable plastics : Methods of production, challenges and future perspectives. *Current Opinion in Food Science*, *38*, 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.020>
- Domingues, R., Bondar, M., Palolo, I., Queirós, O., De Almeida, C. D., & Cesário, M. T. (2021). Xylose Metabolism in Bacteria—Opportunities and Challenges towards Efficient Lignocellulosic Biomass-Based Biorefineries. *Applied Sciences*, *11*(17), 8112. <https://doi.org/10.3390/app11178112>
- Dominguez, J. M., Cao, N., Gong, C. S., & Tsao, G. T. (1997). Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technology*, *61*(1), 85-90. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)84703-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)84703-7)
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2006). Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, *18*(6), 811-826. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2012). Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *Journal of Applied Phycology*, *24*(1), 35-43. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9643-2>
- El-Din Saad El-Beltagi, H., & Amin Mohamed, A. (2010). Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. *Grasas y Aceites*, *61*(2), 143-150. <https://doi.org/10.3989/gya.087009>
- Emerson, K., Russo, R. C., Lund, R. E., & Thurston, R. V. (1975). Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations : Effect of pH and Temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *32*(12), 2379-2383. <https://doi.org/10.1139/f75-274>
- Engelken, J., Brinkmann, H., & Adamska, I. (2010). Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 233. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-233>
- Facchinelli, F., & Weber, A. P. M. (2011). The Metabolite Transporters of the Plastid Envelope : An Update. *Frontiers in Plant Science*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00050>
- Farjallah, A., & Guéguen, C. (2023). Untargeted metabolomic analysis of heterotrophic *Euglena gracilis* cells in response to the organic carbon source. *Algal Research*, *76*, 103305. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103305>
- Fernandes, B. D., Dragone, G. M., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Light Regime Characterization in an Airlift Photobioreactor for Production of Microalgae with High Starch Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *161*(1-8), 218-226. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8783-9>
- Fernández-Rodríguez, R., Garro-Monge, G., Guerrero-Barrantes, M., & Gómez-Espinoza, O. (2020). Alpha-tubulin promoter from *Chlorella vulgaris* allows genetic transformation of green coccoid microalga. *Revista Tecnología en Marcha*, *33*(2) <https://doi.org/10.18845/tm.v33i2.4155>
- Feuzing, F., Mbakidi, J. P., Marchal, L., Bouquillon, S., & Leroy, E. (2022). A review of paramylon processing routes from microalga biomass to non-derivatized and chemically modified products. *Carbohydrate Polymers*, *288*, 119181. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119181>

- Freitas, B. C. B., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2017). *Chlorella minutissima* cultivation with CO₂ and pentoses : Effects on kinetic and nutritional parameters. *Bioresource Technology*, *244*, 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.125>
- Gao, C., Wang, Y., Shen, Y., Yan, D., He, X., Dai, J., & Wu, Q. (2014). Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes. *BMC Genomics*, *15*(1), 582. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-582>
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel : Human Health and Environmental Toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(3), 679. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
- Ghidossi, T., Marison, I., Devery, R., Gaffney, D., & Forde, C. (2017). Characterization and Optimization of a Fermentation Process for the Production of High Cell Densities and Lipids Using Heterotrophic Cultivation of *Chlorella protothecoides*. *Industrial Biotechnology*, *13*(5), 253-259. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0007>
- Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019). Bioproducts From *Euglena gracilis* : Synthesis and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*, 108. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>
- Gladue, R. M., & Maxey, J. E. (1994). Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *6*(2), 131-141. <https://doi.org/10.1007/BF02186067>
- Goold, H. D., Moseley, J. L., & Lauersen, K. J. (2024). The synthetic future of algal genomes. *Cell Genomics*, *4*(3), 100505. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2024.100505>
- Graham, L. E. (avec Graham, J. M., Wilcox, L. W., & Cook, M. E.). (2022). *Algae* (Fourth edition.). LJLM Press.
- Graverholt, O. S., & Eriksen, N. T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(1), 69-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>
- Graves, L. B., & Becker, W. M. (1974). Beta-Oxidation in Glyoxysomes from *Euglena* *. *The Journal of Protozoology*, *21*(5), 771-774. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03750.x>
- Gross, W., Lenze, D., Nowitzki, U., Weiske, J., & Schnarrenberger, C. (1999). Characterization, cloning, and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Gene*, *230*(1), 7-14. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00059-1)
- Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acidophilic Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant and Cell Physiology*, *36*(4), 633-638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803>
- Guiry, M. D. (2024). How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. *Journal of Phycology*, *60*(2), 214-228. <https://doi.org/10.1111/jpy.13431>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Metabolic Engineering for Pentose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. In L. Olsson (Éd.), *Biofuels* (Vol. 108, p. 147-177). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2007_062
- Hassall, K. A. (1958). Xylose as a Specific Inhibitor of Photosynthesis. *Nature*, *181*(4618), 1273-1274. <https://doi.org/10.1038/1811273a0>
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1411*(1), 21-35. <https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
- Heinrich, B., & Cook, J. R. (1967). Studies on the Respiratory Physiology of *Euglena gracilis* Cultured on Acetate or Glucose. *The Journal of Protozoology*, *14*(4), 548-553. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02041.x>
- Heron, E. J., & Caprioli, R. M. (1975). Classification of fructose-1,6-bisphosphate aldolases based on ¹⁸O retention in the cleavage reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, *403*(2), 563-572. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90085-6](https://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90085-6)

- Hosotani, K., Ohkochi, T., Inui, H., Yokota, A., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1988). Photoassimilation of Fatty Acids, Fatty Alcohols and Sugars by *Euglena gracilis* Z. *Microbiology*, *134*(1), 61-66. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-61>
- Houten, S. M., & Wanders, R. J. A. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *33*(5), 469-477. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9061-2>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production : Perspectives and advances. *The Plant Journal*, *54*(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Hyskova, V., & Ryslava, H. (2016). Unusual Properties and Functions of Plant Pyruvate, Orthophosphate Dikinase. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *05*(01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000e161>
- Inwongwan, S., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., & O'Neill, E. C. (2019). *Euglena* Central Metabolic Pathways and Their Subcellular Locations. *Metabolites*, *9*(6), 115. <https://doi.org/10.3390/metabo9060115>
- Iwasaki, K., Kaneko, A., Tanaka, Y., Ishikawa, T., Noothalapati, H., & Yamamoto, T. (2019). Visualizing wax ester fermentation in single *Euglena gracilis* cells by Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1471-2>
- Jans, F., Mignolet, E., Houyoux, P.-A., Cardol, P., Ghysels, B., Cuiné, S., Cournac, L., Peltier, G., Remacle, C., & Franck, F. (2008). A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(51), 20546-20551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806896105>
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(2), 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.001>
- Johnson, X., & Alric, J. (2013). Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii* : Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. *Eukaryotic Cell*, *12*(6), 776-793. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-12>
- Kataoka, N., Hirata, K., Matsutani, M., Ano, Y., Nguyen, T. M., Adachi, O., Matsushita, K., & Yakushi, T. (2021). Three ATP-dependent phosphorylating enzymes in the first committed step of dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(3), 1227-1236. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11092-6>
- Kato, N., McCuiston, C., Szuska, K. A., Lauersen, K. J., Nelson, G., & Strain, A. (2022). *Chlamydomonas reinhardtii* Alternates Peroxisomal Contents in Response to Trophic Conditions. *Cells*, *11*(17), 2724. <https://doi.org/10.3390/cells11172724>
- Kharel, H. L., Tan, M., Jha, L., & Selvaratnam, T. (2024). Removal of cadmium (II), lead (II), nickel (II), and zinc (II) from synthetic medium by extremophile red alga *Galdieria sulphuraria* : Investigating single and mixed metal systems. *Algal Research*, *83*, 103699. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103699>
- Knothe, G. (2009). Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy & Environmental Science*, *2*(7), 759. <https://doi.org/10.1039/b903941d>
- Kriechbaum, R., Loaiza, S. S., Friedl, A., Spadiut, O., & Kopp, J. (2023). Utilizing straw-derived hemicellulosic hydrolysates by *Chlorella vulgaris* : Contributing to a biorefinery approach. *Journal of Applied Phycology*, *35*(6), 2761-2776. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03082-0>
- Kumar, A., & Bera, S. (2020). Revisiting nitrogen utilization in algae : A review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports*, *12*, 100584. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584>
- Kumar, A., Li, J., Kondaveeti, S., Singh, B., Shanmugam, R., Kalia, V. C., Kim, I.-W., & Lee, J.-K. (2022). Characterization of a xylitol dehydrogenase from *Aspergillus flavus* and its application in l-xylulose production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 1001726. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1001726>

- Larkum, A. W. D., & Kühl, M. (2005). Chlorophyll d : The puzzle resolved. *Trends in Plant Science*, 10(8), 355-357. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.06.005>
- Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports*, 38(5), BSR20171492. <https://doi.org/10.1042/BSR20171492>
- Lauersen, K. J., Willamme, R., Coosemans, N., Joris, M., Kruse, O., & Remacle, C. (2016). Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 16, 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.026>
- Lee, J.-K., Koo, B.-S., & Kim, S.-Y. (2003). Cloning and Characterization of the *xy1* Gene, Encoding an NADH-Preferring Xylose Reductase from *Candida parapsilosis*, and Its Functional Expression in *Candida tropicalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6179-6188. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6179-6188.2003>
- Leite, G. B., Paranjape, K., Abdelaziz, A. E. M., & Hallenbeck, P. C. (2015). Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.117>
- Li, D.-W., Cen, S.-Y., Liu, Y.-H., Balamurugan, S., Zheng, X.-Y., Alimujiang, A., Yang, W.-D., Liu, J.-S., & Li, H.-Y. (2016). A type 2 diacylglycerol acyltransferase accelerates the triacylglycerol biosynthesis in heterokont oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of Biotechnology*, 229, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.005>
- Li, X., Gu, J., & Zhou, Q. (2015). Review of aerobic glycolysis and its key enzymes – new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 6(1), 17-24. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12148>
- Martin, W., & Herrmann, R. G. (1998). Gene Transfer from Organelles to the Nucleus : How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiology*, 118(1), 9-17. <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.9>
- Martínez-Alcalá, I., Clemente, R., & Bernal, M. P. (2020). Interactions between the Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* and *Brassica juncea* or *Lupinus albus* for Phytoextraction. *Agronomy*, 10(9), 1367. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091367>
- Martinez-Garcia, M., Kormpa, A., & Maarel, M. J. E. C. van der. (2017). The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. *Carbohydrate Polymers*, 169, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.004>
- Martinez-Garcia, M., & Van Der Maarel, M. J. E. C. (2016). Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress. *AMB Express*, 6(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0244-6>
- Martinez-Villarreal, S., Breitenstein, A., Nimmegeers, P., Perez Saura, P., Hai, B., Asomaning, J., Eslami, A. A., Billen, P., Van Passel, S., Bressler, D. C., Debecker, D. P., Remacle, C., & Richel, A. (2022). Drop-in biofuels production from microalgae to hydrocarbons : Microalgal cultivation and harvesting, conversion pathways, economics and prospects for aviation. *Biomass and Bioenergy*, 165, 106555. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106555>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, Nidia. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mayer, S. M., & Beale, S. I. (1992). Succinyl-Coenzyme A Synthetase and its Role in δ -Aminolevulinic Acid Biosynthesis in *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*, 99(2), 482-487. <https://doi.org/10.1104/pp.99.2.482>
- Mazur, O., Zayka, K., Yakovets, V., & Dovgopolyi, V. (2024). Length of growing season and height of soybean plants depending on pre-sowing treatment of seeds and fertilizer. *Agriculture and Forestry*, 4 (35), 38-47. <https://doi.org/10.37128/2707-5826-2024-4-4>
- Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis : Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 177(4), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.005>
- Miazek, K., Remacle, C., Richel, A., & Goffin, D. (2017). Beech wood *Fagus sylvatica* dilute-acid hydrolysate as a feedstock to support *Chlorella sorokiniana* biomass, fatty acid and pigment

- production. *Bioresource Technology*, 230, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.034>
- Morais Junior, W. G., Pacheco, T. F., Trichez, D., Almeida, J. R. M., & Gonçalves, S. B. (2019). Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *CANDIDA TROPICALIS* JA2 strain. *Yeast*, 36(5), 349-361. <https://doi.org/10.1002/yea.3394>
- Moroney, J. V. (2001). CARBON CONCENTRATING MECHANISMS IN AQUATIC PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS: A REPORT ON CCM 2001. *Journal of Phycology*, 37(6), 928-931. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.37601-2.x>
- Mu, J., Li, S., Chen, D., Xu, H., Han, F., Feng, B., & Li, Y. (2015). Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. *Bioresource Technology*, 185, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.082>
- Mukherjee, M., Chakraborty, T., Banerjee, S., & Pandit, S. (2024). Impact of Algal Biomass for Pharmaceutical Application. In N. Bharadvaja, L. Kumar, S. Pandit, S. Banerjee, & R. Anand (Éds.), *Recent Trends and Developments in Algal Biofuels and Biorefinery* (p. 311-335). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-52319-9_14
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., & Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.077>
- Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P.-C., Jayaraman, H., Alagarsamy, V., Pugazhendhi, A., & Ponnusamy, V. K. (2020). Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. *Process Biochemistry*, 91, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.027>
- Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., Ishibashi-Ohgo, N., & Suzuki, K. (2018). β -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 8-17. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.8>
- Nakazawa, M., Ando, H., Nishimoto, A., Ohta, T., Sakamoto, K., Ishikawa, T., Ueda, M., Sakamoto, T., Nakano, Y., Miyatake, K., & Inui, H. (2018). Anaerobic respiration coupled with mitochondrial fatty acid synthesis in wax ester fermentation by *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*, 592(24), 4020-4027. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13276>
- Nakazawa, M., Inui, H., Yamaji, R., Yamamoto, T., Takenaka, S., Ueda, M., Nakano, Y., & Miyatake, K. (2000). The origin of pyruvate : NADP+ oxidoreductase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*, 479(3), 155-156. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01882-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01882-2)
- Niu, Y.-F., Zhang, M.-H., Li, D.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Bai, W.-B., & Li, H.-Y. (2013). Improvement of Neutral Lipid and Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis by Overexpressing a Type 2 Diacylglycerol Acyltransferase in Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs*, 11(11), 4558-4569. <https://doi.org/10.3390/md11114558>
- Oborník, M. (2019). Endosymbiotic Evolution of Algae, Secondary Heterotrophy and Parasitism. *Biomolecules*, 9(7), 266. <https://doi.org/10.3390/biom9070266>
- Oda, Y., Miyatake, K., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1981). Subcellular Location and Some Properties of Isocitrate Dehydrogenase Isozymes in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2619-2621. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864934>
- Oesterhelt, C., Klocke, S., Holtgreffe, S., Linke, V., Weber, A. P. M., & Scheibe, R. (2007). Redox Regulation of Chloroplast Enzymes in *Galdieria sulphuraria* in View of Eukaryotic Evolution. *Plant and Cell Physiology*, 48(9), 1359-1373. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm108>
- Oliver, D. J., Nikolau, B. J., & Wurtele, E. S. (2009). Acetyl-CoA—Life at the metabolic nexus. *Plant Science*, 176(5), 597-601. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.005>
- Ono, K., Kondo, M., Osafune, T., Miyatake, K., Inui, H., Kitaoka, S., Nishimura, M., & Nakano, Y. (2003). Presence of Glyoxylate Cycle Enzymes in the Mitochondria of *Euglena gracilis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(2), 92-96. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00239.x>

- Patel, A., Mahboubi, A., Horváth, I. S., Taherzadeh, M. J., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2021). Volatile Fatty Acids (VFAs) Generated by Anaerobic Digestion Serve as Feedstock for Freshwater and Marine Oleaginous Microorganisms to Produce Biodiesel and Added-Value Compounds. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 614612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614612>
- Patron, N. J., Rogers, M. B., & Keeling, P. J. (2004). Gene Replacement of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Supports the Hypothesis of a Single Photosynthetic Ancestor of Chromalveolates. *Eukaryotic Cell*, *3*(5), 1169-1175. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1169-1175.2004>
- Perez Saura, P., Chabi, M., Corato, A., Cardol, P., & Remacle, C. (2022). Cell adaptation of the extremophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* to the availability of carbon sources. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 978246. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978246>
- Perez Saura, P., Gérin, S., Cardol, P., & Remacle, C. (2024). Xylose, glucose and acetate as feedstock for three microalgal species cultivated in heterotrophy. *Algal Research*, *83*, 103689. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103689>
- Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., Mussatto, S. I., & Domínguez, J. M. (2016). Xylitol production in immobilized cultures : A recent review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(4), 691-704. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1004660>
- Petre, M., & Petre, V. (2013). Environmental Biotechnology for Bioconversion of Agricultural and Forestry Wastes into Nutritive Biomass. In M. Petre (Éd.), *Environmental Biotechnology—New Approaches and Prospective Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55204>
- Phusunti, N., & Cheirsilp, B. (2020). Integrated protein extraction with bio-oil production for microalgal biorefinery. *Algal Research*, *48*, 101918. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101918>
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, *102*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- Plöhn, M., Scherer, K., Stagge, S., Jönsson, L. J., & Funk, C. (2022). Utilization of Different Carbon Sources by Nordic Microalgae Grown Under Mixotrophic Conditions. *Frontiers in Marine Science*, *9*, 830800. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.830800>
- Portillo, F. V.-L., Sierra-Ibarra, E., Vera-Estrella, R., Revah, S., Ramírez, O. T., Caspeta, L., & Martinez, A. (2022). Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy. *Algal Research*, *65*, 102752. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102752>
- Pourmir, A., Noor-Mohammadi, S., & Johannes, T. W. (2013). Production of xylitol by recombinant microalgae. *Journal of Biotechnology*, *165*(3-4), 178-183. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.002>
- Prabhu, A. A., Thomas, D. J., Ledesma-Amaro, R., Leeke, G. A., Medina, A., Verheecke-Vaessen, C., Coulon, F., Agrawal, D., & Kumar, V. (2020). Biovalorisation of crude glycerol and xylose into xylitol by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01378-1>
- Pratter, S. M., Eixelsberger, T., & Nidetzky, B. (2015). Systematic strain construction and process development : Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Candida tenuis* xylose reductase in wild-type or mutant form. *Bioresource Technology*, *198*, 732-738. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.046>
- Queiroz, S. S., Felipe, M. D. G. A., & Mussatto, S. I. (2024). An overview of xylose valorization through its conversion into high-value chemicals by yeast. *Biomass and Bioenergy*, *190*, 107428. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107428>
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A., & Posewitz, M. C. (2010). Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryotic Cell*, *9*(4), 486-501. <https://doi.org/10.1128/EC.00364-09>

- Raheem, A., Prinsen, P., Vuppaladadiyam, A. K., Zhao, M., & Luque, R. (2018). A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production : Recent developments. *Journal of Cleaner Production*, 181, 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.125>
- Ramírez-Romero, A., Martín, M., Boyer, A., Bolzoni, R., Matricón, L., Sassi, J.-F., Steyer, J.-P., & Delrue, F. (2023). Microalgae adaptation as a strategy to recycle the aqueous phase from hydrothermal liquefaction. *Bioresource Technology*, 371, 128631. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128631>
- Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., & Arumugam, M. (2015). Lipid Extraction Methods from Microalgae : A Comprehensive Review. *Frontiers in Energy Research*, 2. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061>
- Rao, J., Lv, Z., Chen, G., & Peng, F. (2023). Hemicellulose : Structure, chemical modification, and application. *Progress in Polymer Science*, 140, 101675. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675>
- Ren, X., Deschênes, J.-S., Tremblay, R., Peres, S., & Jolicoeur, M. (2019). A kinetic metabolic study of lipid production in *Chlorella protothecoides* under heterotrophic condition. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1163-4>
- Roles, J., Yarnold, J., Hussey, K., & Hankamer, B. (2021). Techno-economic evaluation of microalgae high-density liquid fuel production at 12 international locations. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01972-4>
- Romero-Estévez, D., Vaissayre, V., Morcillo, F., Montúfar, R., & Dussert, S. (2023). Exploring fruit lipid diversity in a neglected group of tropical palms : The tribe Phytelephea. *JSFA Reports*, 3(11), 549-560. <https://doi.org/10.1002/jsf2.158>
- Roncarati, A., Meluzzi, A., Acciarri, S., Tallarico, N., & Meloti, P. (2004). Fatty Acid Composition of Different Microalgae Strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) According to the Culture Phase and the Carbon Dioxide Concentration. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(3), 401-411. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00104.x>
- Ruiz, J., Wijffels, R. H., Dominguez, M., & Barbosa, M. J. (2022). Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae : Bringing some light into the everlasting cost controversy. *Algal Research*, 64, 102698. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102698>
- Salvador López, J. M., & Van Bogaert, I. N. A. (2021). Microbial fatty acid transport proteins and their biotechnological potential. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(6), 2184-2201. <https://doi.org/10.1002/bit.27735>
- Santaraitė, M., Sendzikiene, E., Makarevičienė, V., & Kazancev, K. (2020). Biodiesel Production by Lipase-Catalyzed in Situ Transesterification of Rapeseed Oil Containing a High Free Fatty Acid Content with Ethanol in Diesel Fuel Media. *Energies*, 13(10), 2588. <https://doi.org/10.3390/en13102588>
- Sartori, M. L., Pantoja, L. D. A., & Santos, A. S. (2024). Evaluation of xylose assimilation by a strain of *Desmodesmus* sp. And the use of sugarcane bagasse hydrolysate as a carbon source for algal biomass production. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5242180/v1>
- Sauer, N., & Tanner, W. (1989). The hexose carrier from *Chlorella* : cDNA cloning of a eucaryotic H⁺ - cotransporter. *FEBS Letters*, 259(1), 43-46. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81489-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81489-9)
- Scheepers, A., Joost, H., & Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT : Molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(5), 364-371. <https://doi.org/10.1177/0148607104028005364>
- Scherhag, P., & Ackermann, J. (2021). Removal of sugars in wastewater from food production through heterotrophic growth of *Galdieria sulphuraria*. *Engineering in Life Sciences*, 21(3-4), 233-241. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000075>

- Schilling, S., & Oesterhelt, C. (2007). Structurally reduced monosaccharide transporters in an evolutionarily conserved red alga. *Biochemical Journal*, 406(2), 325-331. <https://doi.org/10.1042/BJ20070448>
- Schönknecht, G., Chen, W.-H., Ternes, C. M., Barbier, G. G., Shrestha, R. P., Stanke, M., Bräutigam, A., Baker, B. J., Banfield, J. F., Garavito, R. M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S. A., Gagneul, D., Dickenson, N. E., Oesterhelt, C., Lercher, M. J., & Weber, A. P. M. (2013). Gene Transfer from Bacteria and Archaea Facilitated Evolution of an Extremophilic Eukaryote. *Science*, 339(6124), 1207-1210. <https://doi.org/10.1126/science.1231707>
- Schubert, S., & Yan, F. (1997). Nitrate and ammonium nutrition of plants : Effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H⁺ ATPase. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, 160(2), 275-281. <https://doi.org/10.1002/jpln.19971600222>
- Selvi Gökkaya, D., Sert, M., Sağlam, M., Yüksel, M., & Ballice, L. (2020). Hydrothermal gasification of the isolated hemicellulose and sawdust of the white poplar (*Populus alba* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 162, 104846. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104846>
- Sharma, P. K., Saharia, M., Srivstava, R., Kumar, S., & Sahoo, L. (2018). Tailoring Microalgae for Efficient Biofuel Production. *Frontiers in Marine Science*, 5, 382. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00382>
- Shih, P. M. (2015). Cyanobacterial Evolution : Fresh Insight into Ancient Questions. *Current Biology*, 25(5), R192-R193. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.046>
- Shih, P. M., & Matzke, N. J. (2013). Primary endosymbiosis events date to the later Proterozoic with cross-calibrated phylogenetic dating of duplicated ATPase proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12355-12360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305813110>
- Simonazzi, M., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Samorì, C., & Pistocchi, R. (2019). Use of waste carbon dioxide and pre-treated liquid digestate from biogas process for *Phaeodactylum tricorutum* cultivation in photobioreactors and open ponds. *Bioresource Technology*, 292, 121921. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121921>
- Stein, R., Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1997). Characterization of a xylitol dehydrogenase and a d -arabitol dehydrogenase from the thermo- and acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Planta*, 202(4), 487-493. <https://doi.org/10.1007/s004250050153>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism : Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927-963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Studart-Guimarães, C., Gibon, Y., Frankel, N., Wood, C. C., Zanor, M. I., Fernie, A. R., & Carrari, F. (2005). Identification and Characterisation of the α and β Subunits of Succinyl CoA Ligase of Tomato. *Plant Molecular Biology*, 59(5), 781-791. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-1004-1>
- Syrett, P. J., Merrett, M. J., & Bocks, S. M. (1963). Enzymes of the Glyoxylate Cycle in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*, 14(2), 249-264. <https://doi.org/10.1093/jxb/14.2.249>
- Taiz, L., Møller, I. M., Murphy, A., & Zeiger, E. (2023). *Plant Physiology and Development* (7^e éd.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/hesc/9780197614204.001.0001>
- Tanaka, Y., Goto, K., Luo, J., Nishino, K., Ogawa, T., Maruta, T., & Ishikawa, T. (2022). Identification of glucanases and phosphorylases involved in hypoxic paramylon degradation in *Euglena gracilis*. *Algal Research*, 67, 102829. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102829>
- Tanaka, Y., Ogawa, T., Maruta, T., Yoshida, Y., Arakawa, K., & Ishikawa, T. (2017). Glucan synthase-like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*, 591(10), 1360-1370. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12659>
- Ummalyma, S. B., & Sukumaran, R. K. (2014). Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresource Technology*, 165, 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.028>

- Vanlerberghe, G. C., Dahal, K., Alber, N. A., & Chadee, A. (2020). Photosynthesis, respiration and growth : A carbon and energy balancing act for alternative oxidase. *Mitochondrion*, *52*, 197-211. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.04.001>
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae : Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, *125*(3), 423-436. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>
- Vi, T. H., Ma, V. D., University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University, Dao, M. L., La, V. H., Truong, T. T., Tran, V. T., Tran, V. D., Nguyen, T. D., (2022). Determination of total protein and lipid contents in some soybean varieties. *Ministry of Science and Technology*, Vietnam, *64*(12), 65-68. [https://doi.org/10.31276/VJST.64\(12\).65-68](https://doi.org/10.31276/VJST.64(12).65-68)
- Vieira, F., Santana, H. E. P., Silva, D. P., & Ruzene, D. S. (2023). A Bibliometric Description of Organosolv Pretreatment for Coconut Waste Valorization. *BioEnergy Research*, *16*(4), 2115-2130. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10563-6>
- Vogel, K., & Barber, A. A. (1968). Degradation of Paramylon by *Euglena gracilis*. *The Journal of Protozoology*, *15*(4), 657-662. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1968.tb02189.x>
- Vogler, B. W., Starkenburg, S. R., Sudasinghe, N., Schambach, J. Y., Rollin, J. A., Pattathil, S., & Barry, A. N. (2018). Characterization of plant carbon substrate utilization by *Auxenochlorella protothecoides*. *Algal Research*, *34*, 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.001>
- Wang, C., Onyeaka, H., Miri, T., & Soltani, F. (2024). *Chlorella vulgaris* as a food substitute : Applications and benefits in the food industry. *Journal of Food Science*, *89*(12), 8231-8247. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17529>
- Wang, J., & Curtis, W. R. (2016). Proton stoichiometric imbalance during algae photosynthetic growth on various nitrogen sources : Toward metabolic pH control. *Journal of Applied Phycology*, *28*(1), 43-52. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0551-3>
- Watson, J., Wang, T., Si, B., Chen, W.-T., Aierzhati, A., & Zhang, Y. (2020). Valorization of hydrothermal liquefaction aqueous phase : Pathways towards commercial viability. *Progress in Energy and Combustion Science*, *77*, 100819. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2019.100819>
- Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(39), 16823-16827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011099107>
- Wei, A., Zhang, X., Wei, D., Chen, G., Wu, Q., & Yang, S.-T. (2009). Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *36*(11), 1383-1389. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0624-x>
- Winkler, U., Säftel, W., & Stabenau, H. (2003). A New Type of a Multifunctional β -Oxidation Enzyme in *Euglena*. *Plant Physiology*, *131*(2), 753-762. <https://doi.org/10.1104/pp.013151>
- Wu, L. F., Chen, P. C., & Lee, C. M. (2013). The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *85*, 506-510. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.016>
- Xie, W., Li, X., Xu, H., Chen, F., Cheng, K.-W., Liu, H., & Liu, B. (2023). Optimization of Heterotrophic Culture Conditions for the Microalgae *Euglena gracilis* to Produce Proteins. *Marine Drugs*, *21*(10), 519. <https://doi.org/10.3390/md21100519>
- Xie, Z., Lin, W., & Luo, J. (2016). Promotion of microalgal growth by co-culturing with *Cellvibrio pealriver* using xylan as feedstock. *Bioresource Technology*, *200*, 1050-1054. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.058>
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., & Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *78*(1), 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1285-1>
- Xue, J., Balamurugan, S., Li, D.-W., Liu, Y.-H., Zeng, H., Wang, L., Yang, W.-D., Liu, J.-S., & Li, H.-Y. (2017). Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in

- microalgae by enhancing NADPH supply. *Metabolic Engineering*, 41, 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.008>
- Xue, J., Chen, T., Zheng, J., Balamurugan, S., Liu, Y., Yang, W., Liu, J., & Li, H. (2020). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from the Oleaginous Microalga *Nannochloropsis* Uncovers Its Potential Role in Promoting Lipogenesis. *Biotechnology Journal*, 15(2), 1900135. <https://doi.org/10.1002/biot.201900135>
- Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 87-102. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2)
- Yang, S., Liu, G., Meng, Y., Wang, P., Zhou, S., & Shang, H. (2014). Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 172, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.122>
- Yao, R., & Kamagate, D. (2011). Production du palmier a huile (*elaeis guineensis* Jacq.) et taux d'extraction dans des conditions climatiques marginales au Nord-Est de la Cote d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, 22(2). <https://doi.org/10.4314/aga.v22i2.68363>
- Yap, J. K., Sankaran, R., Chew, K. W., Halimatul Munawaroh, H. S., Ho, S.-H., Rajesh Banu, J., & Show, P. L. (2021). Advancement of green technologies : A comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. *Chemosphere*, 281, 130886. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130886>
- Yoshioka, K., Suzuki, K., & Osanai, T. (2020). Effect of pH on metabolite excretion and cell morphology of *Euglena gracilis* under dark, anaerobic conditions. <https://doi.org/10.21203/rs.2.23456/v1>
- Yoshiwara, K., Watanabe, S., & Watanabe, Y. (2023). Molecular evolutionary insight of structural zinc atom in yeast xylitol dehydrogenases and its application in bioethanol production by lignocellulosic biomass. *Scientific Reports*, 13(1), 1920. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29195-7>
- Yu, S., Sun, J., Shi, Y., Wang, Q., Wu, J., & Liu, J. (2021). Nanocellulose from various biomass wastes : Its preparation and potential usages towards the high value-added products. *Environmental Science and Ecotechnology*, 5, 100077. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2020.100077>
- Zhang, L., He, M., Liu, J., & Li, L. (2015). Role of the mitochondrial alternative oxidase pathway in hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides*. *Planta*, 241(4), 1005-1014. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2231-y>
- Zhang, Y., & Fernie, A. R. (2023). The Role of TCA Cycle Enzymes in Plants. *Advanced Biology*, 7(8), 2200238. <https://doi.org/10.1002/adbi.202200238>
- Zhao, X.-C., Tan, X.-B., Yang, L.-B., Liao, J.-Y., & Li, X.-Y. (2019). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in anaerobic wastewater : The coupled effects of ammonium, temperature and pH conditions on lipids compositions. *Bioresource Technology*, 284, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.117>
- Zheng, Y., Yu, X., Li, T., Xiong, X., & Chen, S. (2014). Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. *Biotechnol Biofuels*, 7(1), 125. doi:0.1186/s13068-014-0125-7
- Zhu, J., & Wakisaka, M. (2020). Effect of two lignocellulose related sugar alcohols on the growth and metabolites biosynthesis of *Euglena gracilis*. *Bioresource Technology*, 303, 122950. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122950>