

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
IPHC/DSA/CNRS UMR 7178,
Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation
Moléculaire

THÈSE présentée par :
Emilie FRANCOIS-LOPEZ

Soutenue le : **23 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Chimie/Bioprocédés**

**Production de biohydrogène par
fermentation obscure : potentiel de
différentes biomasses et variabilité
microbienne**

THÈSE dirigée par :

Mme ERNST Barbara

Professeur, IPHC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BERNET Nicolas

Directeur de recherche, INRA, LBE

M. GUEDON Emmanuel

Directeur de recherche, LRGP, Université de Lorraine

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. GOUGEON Régis

Professeur, PAM, Université de Bourgogne

M. VUILLEUMIER Stéphane

Professeur, GMGM, Université de Strasbourg

Mme DUMAS Christine

Maître de conférences, IPHC, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord, Pr. Barbara Ernst, Directrice de thèse et Directrice de l'équipe RePSeM, pour avoir dirigé ce travail, pour sa disponibilité malgré son emploi du temps chargé, pour son enthousiasme et son optimisme tout au long de ce projet. Je la remercie également, pour son humanité et son exigence qui ont contribué au bon déroulement de ce projet.

Je remercie ensuite, Dr. Christine Dumas, qui m'a encadrée tout au long de ce projet. Je la remercie également pour sa disponibilité, son soutien sans faille, sa confiance, sa gentillesse et sa rigueur scientifique.

Je remercie les différents membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, et en particulier les rapporteurs de mon manuscrit, Dr. Nicolas Bernet et Dr. Emmanuel Guedon.

Je remercie l'Université de Strasbourg pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse et les missions d'enseignement, grâce à son financement.

Je remercie Pr. Stéphane Vuilleumier, Directeur de l'équipe adaptations et interactions microbiennes dans l'environnement au GMGM, pour m'avoir permis d'effectuer l'extraction, l'amplification et la purification de l'ADN microbien et également la préparation des échantillons pour l'électrophorèse capillaire, au sein de son laboratoire. Par la même occasion, je souhaite remercier toute l'équipe : Christelle, Pauline, Thierry et Omniae, pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur. Merci également, à Dr. Valérie Vivet-Boudou, Chargé de recherche à l'IBMC, qui nous a permis de passer nos échantillons à l'électrophorèse capillaire.

Je remercie également les différentes équipes du DSA pour leur accueil, leur aide ou leur implication dans ce projet : Pr. Laurence Sabatier, Dr. Véronique Delval-Dubois et Dr. Christine Carapito au LSMBO pour la protéomique ; Dr. Anne Boos et Pascale Ronot au RePSeM pour l'ICP-AES et la minéralisation ; et, Pr. Eric Marchioni et Dr. Minjie Zhao au CAMBA pour l'UPLC-ELSD.

Je remercie Pr. Régis Gougeon et Pr. Hervé Alexandre pour leurs contributions au projet tant au niveau logistique et analytique qu'au niveau intellectuel. Je remercie également le Domaine des Poncétys pour l'approvisionnement des biomasses bourguignonnes.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mélanie Pfister pour avoir eu la gentillesse de nous approvisionner, chaque année, en échantillons de biomasses viticoles issues du Domaine Pfister de Dahlenheim, et ce faisant en pleine période de vendanges.

Je remercie également Pascal Xanthopoulos pour nous avoir mis en relation avec Erginos Micromatis de Fibre Excellence et, Denis Sens et Lionel Fabre de Tembec, lesquels nous ont fourni en liqueurs noires et rouges.

Et bien sûr, je souhaite exprimer ma gratitude à tous ceux et celles que j'ai rencontré sur mon chemin au cours de ces trois dernières années et avec lesquels j'ai passé de bons moments au labo mais aussi à l'extérieur : les gentils, les optimistes, les flémards, les hypos, les silencieux, les Tryphon, les perfectionnistes, les cruciverbistes, les gourmands, les bons vivants, « les gros Falcon », les bavards, les sportifs, les maladroits, les maniaques-psycho-rigides, les bienveillants, mais aussi les cascadeurs-cyclistes, les cyclistes-autoroutiers-bricoleurs CASTO, les allongeurs de billards, les tricheurs-cruciverbistes, les buveurs-dormeurs, les amateurs de Caïpirinha ... et enfin, je terminerai cette longue litanie par une mention particulière à ma stagiaire et aux super-héros et leurs super-pouvoirs : l'Ikéamaniathécaire et son art de retenir tous les noms suédois de chaque article Ikéa, V3D et sa capacité à voyager au cœur de la 3^{ème} Dimension (laquelle est fortement ralentie) et le Sculpteur-musophile et son art de créer des personnages à partir de plaques et de muselets). Merci à Anne, Barbara, Bernadette, Christine, Déborah, Dominique, Guillaume, Jérémy, Luis, Marco, Matthieu, Maud, Pascale, Sylvie, Sylvia, Valentin, Véronique, Vijetha, Yvan.

Je souhaite également remercier mes parents, ma sœur, ma grand-mère, Julie et Alexis, qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse, qui ont cru en moi et qui ont répondu présents dans les bons comme les mauvais moments.

Enfin, je remercie tout particulièrement mon conjoint Walter qui a été doté d'une patience extrême et m'a supporté dans les moments de stress, mais aussi pour ne pas m'en avoir voulu de le laisser les weekends et les jours fériés le temps des prélèvements, et surtout pour m'avoir toujours soutenu.

SOMMAIRE

Chapitre I. Bibliographie	1
1. Du concept de bioraffinerie à la valorisation de la biomasse en biohydrogène	3
1.1. Introduction	3
1.2. Production d'hydrogène par voies conventionnelles	5
1.3. Production d'hydrogène par voies biochimiques	6
2. Production de biohydrogène par fermentation obscure	12
2.1. Les principales voies métaboliques impliquées dans la fermentation obscure	12
3. Améliorations du procédé de fermentation obscure : les micro-organismes	22
3.1. Les cultures pures	22
3.2. Les co-cultures	23
3.3. Les cultures mixtes	25
4. Améliorations du procédé de fermentation obscure : le bioprocédé	28
4.1. Le mode de fonctionnement et le type de bioréacteur	28
4.2. La combinaison de bioprocédés	31
4.3. Valorisation des co-produits	33
5. Améliorations du procédé de fermentation obscure : les facteurs abiotiques	34
5.1. HRT,SRT, SLR et OLR	34
5.2. La température et le pH	35
5.3. La pression partielle dans la phase gazeuse et la concentration en gaz dissous	37
5.4. Les macro et micro-nutriments	39
5.5. Les inhibiteurs	39
6. Améliorations du procédé de fermentation obscure : le substrat	41
6.1. Le substrat	41
6.2. Les microflore endogènes	43
6.3. Choix des biomasses agricoles issues de la viti-viniculture	43
7. Objectifs de la thèse et plan de travail	47
7.1. Objectifs de ce travail de thèse	47
7.2. Approche expérimentale et méthodologie	47
Chapitre II. Matériels et méthodes	49
1. Introduction	51
2. Fermentations en semi-batch	51
2.1. Fermentations exogènes	51
2.2. Fermentations endogènes	51
2.3. Protocoles expérimentaux	52

2.4.	Echantillonnage du milieu réactionnel	53
3.	Caractérisation de la biomasse	54
3.1.	Mesure des matières sèches et volatiles	54
3.2.	Mesure des matières en suspension et matières volatiles en suspension	54
3.3.	Mesure de la demande chimique en oxygène	55
3.4.	Mesure de la composition en sucres	55
3.5.	Mesure de la composition élémentaire	56
3.6.	Mesure de la concentration en protéines	56
4.	Analyses physico-chimiques	56
4.1.	Analyse de la composition du biogaz	56
4.2.	Analyse de la composition en acides gras volatils (AGV) et en alcools	57
4.3.	Analyse de la composition en acides organiques	57
4.4.	Mesure de la concentration en sucres	57
4.5.	Bilan de matière	58
4.6.	Modélisation de la production d'hydrogène cumulée	58
5.	Analyses microbiologiques	58
5.1.	Analyses microbiennes	58
5.2.	Analyses fongiques	63
6.	Analyse statistique	63
6.1.	Test de Student	63
6.2.	Test de corrélation de Pearson	63
Chapitre III. Etude de faisabilité de la production d'hydrogène par voie fermentaire endogène à partir de différentes biomasses		65
1.	Introduction	67
1.1.	Objectifs	67
1.2.	Mise en œuvre dans le bioréacteur	70
2.	Performances de production d'hydrogène par voie fermentaire	71
2.1.	Evolution de la production d'hydrogène par fermentation exogène	71
2.2.	Evolution de la production d'hydrogène par fermentation endogène	73
2.3.	Performances de production d'hydrogène	75
2.4.	Métabolisme	78
3.	Les structures des communautés microbiennes	84
3.1.	Evolution des structures microbiennes au cours de la fermentation exogène	84
3.2.	Evolution des structures microbiennes au cours de la fermentation endogène	84
3.3.	Comparaison des structures microbiennes des fermentations endogènes et exogènes	87
4.	Discussion	91

5. Conclusion	95
Chapitre IV. Influence des paramètres opératoires sur les performances de production d'hydrogène et sur les structures des communautés microbiennes endogènes	97
1. Introduction	99
1.1. Objectifs	99
1.2. Mise en œuvre dans le bioréacteur	101
2. Influence de la durée de stockage de la biomasse à -20°C	104
2.1. Evolution de la production d'hydrogène	104
2.2. Performances de production d'hydrogène	105
2.3. Métabolisme	107
2.4. Structure des populations microbiennes	112
2.5. Discussion	117
2.6. Conclusion	119
3. Influence du prétraitement et du gaz de balayage	121
3.1. Evolution de la production d'hydrogène	121
3.2. Performances de production d'hydrogène	122
3.3. Métabolisme	123
3.4. Structure des communautés microbiennes	126
3.5. Discussion	128
4. Influence du pH d'ajustement/de régulation	131
4.1. Evolution de la production d'hydrogène	131
4.2. Performances de production d'hydrogène	132
4.3. Métabolisme	133
4.4. Structure des communautés microbiennes	137
4.5. Discussion	140
5. Influence de la charge	145
5.1. Evolution de la production d'hydrogène	145
5.2. Performances de production d'hydrogène	146
5.3. Métabolisme	147
5.4. Structure des communautés microbiennes	150
5.5. Discussion	152
6. Conclusion	155
Chapitre V. Influence des caractéristiques endogènes des biomasses sur les performances de production d'hydrogène et sur les structures des communautés microbiennes	159
1. Introduction	161
1.1. Objectifs	161

1.2. Mise en œuvre dans le bioréacteur	162
2. Influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘bourbes’ sur la production d’hydrogène	164
2.1. Influence du cépage des bourbes sur la production d’hydrogène	164
2.2. Influence du mode de culture sur la production d’hydrogène	186
2.3. Influence de la variabilité annuelle sur la production d’hydrogène	198
3. Influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘marcs’ sur la production d’hydrogène	209
3.1. Influence du cépage et du mode de culture sur la production d’hydrogène	209
3.2. Influence de la variabilité annuelle et impact des rafles sur la production d’hydrogène	216
3.3. Comparaison des biomasses ‘marcs’ et ‘bourbes’	226
4. Influence de l’introduction de perturbations biotiques et influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ sur la production d’hydrogène	231
4.1. Perturbation biotique liée à l’ajout de la biomasse ‘eaux de rinçage’	231
4.2. Influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ sur la production d’hydrogène	243
5. Conclusion	251
Conclusion générale et perspectives	253

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Compositions des biomasses de différentes générations.	4
Figure 2 : Différentes voies de production d'hydrogène à partir de ressources fossiles, nucléaires et renouvelables.....	6
Figure 3 : Optimisations possibles des performances de production d'hydrogène.	11
Figure 4 : Etapes de la digestion anaérobie (adapté de Guo et al., 2010).....	12
Figure 5 : Diversité métabolique des micro-organismes anaérobies (adapté de Gonzalez-Cabaleiro et al., 2015 et de Hoelzle et al.,2014).....	15
Figure 6 : Voies métaboliques productrices d'hydrogène d'après Angenent et al., 2004.	18
Figure 7 : Les différents procédés d'amélioration du rendement en hydrogène et de la production de bioénergie.....	33
Figure 8 : Les différentes étapes de vinification en blanc (b) et en rouge (a).	44
Figure 9 : Représentation schématique du montage utilisé.....	53
Figure 10 : Représentation schématique du principe de la PCR/T-RFLP.....	61
Figure 11 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester le potentiel de production d'hydrogène de différentes biomasses en fermentation exogène avec ou sans prétraitement thermique.....	70
Figure 12 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester le potentiel de production d'hydrogène de différentes biomasses en fermentation endogène avec ou sans prétraitement thermique.	71
Figure 13 : Evolution de la production d'hydrogène en litre par litre de milieu réactionnel au cours du temps obtenue par fermentation exogène avec ou sans prétraitement thermique à partir de différentes biomasses.	71
Figure 14 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps obtenue par différentes biomasses utilisées comme substrat et consortium microbien avec ou sans prétraitement thermique..	73
Figure 15 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses 'bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris' utilisées en fermentation exogène ou endogène, avec ou sans prétraitement thermique : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).....	76
Figure 16 : Corrélations entre la concentration initiale en sucres et le volume d'hydrogène produit, et, entre le rendement en hydrogène et le volume d'hydrogène produit, obtenues par les différents tests de fermentations des 'bourbes'.	78
Figure 17 : Bilans de matière calculés pour les différents tests de fermentation à partir des biomasses 'bourbes Chardonnay' (couleur unie) et 'bourbes Pinot Gris' (couleur à points).....	79

Figure 18 : Distribution des métabolites et des gaz produits, et quantités initiales de sucres, pour les huit tests de fermentation à partir des biomasses ‘bourbes Chardonnay’ (couleur unie) et ‘bourbes Pinot Gris’ (couleur à points).	80
Figure 19 : Relation entre le temps de stockage de la biomasse et la quantité initiale d'éthanol dans la biomasse diluée dans le bioréacteur.	81
Figure 20. Exemple de profil de production d'hydrogène et évolution des populations microbiennes obtenus par fermentation exogène des ‘bourbes Pinot Gris’ avec prétraitement thermique. Les électrophorogrammes correspondent à la structure des populations microbiennes à l'état initial, après prétraitement thermique, puis à 5h, 20h, 28h et 43h de fermentation.	85
Figure 21. Exemple de profil de production d'hydrogène et évolution des populations microbiennes obtenus par fermentation endogène des ‘bourbes Pinot Gris’ sans prétraitement thermique. Les électrophorogrammes correspondent à la structure des populations microbiennes à l'état initial, puis à 20 h, 24 h, 28 h et 52 h de fermentation.	86
Figure 22 : Dynamiques des structures des populations microbiennes obtenues avec la biomasse ‘bourbes Chardonnay’ pendant les fermentations exogènes, endogènes avec et sans prétraitement thermique.....	88
Figure 23 : Dynamiques des structures des populations microbiennes obtenues avec la biomasse ‘bourbes Pinot Gris’ pendant les fermentations exogènes, endogènes avec et sans prétraitement thermique.....	89
Figure 24 : Classification taxonomique obtenue par pyroséquençage 454 à partir de l'échantillon prélevé à 24h de fermentation endogène des ‘bourbes Pinot Gris’.....	91
Figure 25 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence des conditions de stockage, des différents prétraitements thermiques et gaz de balayage utilisés.....	101
Figure 26 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence du pH sur la production d'hydrogène.....	102
Figure 27 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence de la charge sur la production d'hydrogène.	103
Figure 28 : Influence de la durée de stockage (35, 47, 63 et 115 jours) de la biomasse à -20°C sur le volume d'hydrogène (a) et le débit d'hydrogène (b) produit au cours du temps	104
Figure 29 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction de la durée de stockage de la biomasse à -20°C pendant 35, 47, 63 et 115 jours : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration initiale en substrat (c).	106
Figure 30 : Bilans de matière calculés pour les différents tests de fermentation à partir d'une biomasse stockée à -20°C pendant 35 jours, 47 jours, 63 jours et 115 jours.	107
Figure 31 : Distribution des métabolites et des gaz produits, et des quantités initiales de sucres en fonction de la durée de stockage (35, 47, 63 et 115 jours) de la biomasse à -20°C.	108

Figure 32 : Consommation/production des métabolites (a, b, c), et, des gaz et des sucres (d, e, f) au cours du temps de fermentation des biomasses stockées à -20°C pendant 35 jours, 47 jours et 63 jours.	111
Figure 33 : Classification taxonomique aux niveaux du phylum et de la famille (a et b) et indices de diversité des échantillons prélevés (représentés par des flèches) au cours de la fermentation des bourbes Pinot Gris lors du test '47 jours' (d).	113
Figure 34 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours'.....	116
Figure 35 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps en fonction de prétraitement effectué et du gaz de balayage utilisé entre crochets.....	121
Figure 36 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction du prétraitement et du gaz de balayage : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).	122
Figure 37 : Distribution des métabolites et des gaz produits, et les quantités initiales de sucres en fonction des prétraitements et du gaz de balayage.	124
Figure 38 : Rapports molaires butyrate/acétate (a), théorique (b) et H ₂ /CO ₂ (c) obtenus pour les différents tests de fermentation.	125
Figure 39 : Diversité microbienne obtenue pour les tests 'sans pt' et 'ptf + ptc'.....	126
Figure 40 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests 'sans pt', 'ptf' et 'ptf + ptc'.....	127
Figure 41 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps en fonction des pH _{initial} /pH _{régulé}	131
Figure 42 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction du pH.	132
Figure 43 : Corrélation entre la valeur de régulation du pH et la productivité maximale en hydrogène obtenue.	133
Figure 44 : Distribution des métabolites et des gaz produits et les quantités initiales de sucres en fonction du pH.....	134
Figure 45 : Rendements métaboliques en fonction du pH _{initial} /pH _{régulé}	135
Figure 46 : Rapports molaires butyrate/acétate (a), théorique (b) et H ₂ /CO ₂ (c) obtenus pour les différents tests de fermentation.	136
Figure 47 : Classification taxonomique au niveau de la famille (a, d) et indices de diversité (b, e) des échantillons prélevés (représentés par des flèches) au cours de la fermentation lors du test '7,0/5,7' (c) et '4,5/4,5' (f)..	138
Figure 48 : Equilibre entre NADH produit par la conversion des sucres en pyruvate et NADH consommé par la production des métabolites.....	143
Figure 49 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps en fonction de la charge de biomasse appliquée.....	145

Figure 50 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction de la charge de biomasse.	146
Figure 51 : Corrélations établies entre la charge initiale de substrat et la production d'hydrogène (a), et la vitesse de production d'hydrogène (b).	147
Figure 52 : Distribution des métabolites et des gaz produits et les quantités initiales de sucres en fonction de la charge de biomasse.....	147
Figure 53: Corrélation entre la quantité de butyrate produit et la charge initiale en sucres.	148
Figure 54: Rendements métaboliques en fonction de la charge appliquée.....	149
Figure 55 : Rapports molaires butyrate/acétate (a) et H ₂ /CO ₂ (b) obtenus pour les différents tests de fermentation.	150
Figure 56 : Indices de diversité microbienne de Shannon et Simpson obtenus en fonction de la charge appliquée.	150
Figure 57 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests '14 g DCO/L', '28 g DCO/L', '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L'.....	151
Figure 58 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence des caractéristiques endogènes des 'bourbes' et des 'marcs' sur la production d'hydrogène.....	163
Figure 59 : Représentation schématique de la production viti-vinicole des différentes biomasses utilisées.....	163
Figure 60 : Caractérisation des matières sèches, volatiles, minérales et en suspension des différentes bourbes Pinot Gris (BPG), Gewurztraminer (BGw), Riesling (BRi) et Muscat (BMu).....	164
Figure 61 : Répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble des bourbes pour les différents cépages : Pinot Gris (a), Gewurztraminer (b), Riesling (c) et Muscat (d) ; et composition biochimique de la DCO soluble.	165
Figure 62 : Teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes pour les différents cépages : Pinot Gris (BPG), Gewurztraminer (BGw), Riesling (BRi) et Muscat (BMu).	167
Figure 63 : Répartition élémentaire moyenne de la fraction totale (a) et soluble (b) des bourbes Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling et celles des bourbes Muscat seules (c) et (d).	168
Figure 64 : Teneurs des macro- et micro-nutriments présents dans les fractions totales (FT) et solubles (Sol) des bourbes Pinot Gris (BPG), Gewurztraminer (BGw), Riesling (BRi) et Muscat (BMu).	169
Figure 65 : Volume d'hydrogène produit au cours du temps à partir des bourbes stockées à 4°C et à -20°C pour les différents cépages : Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling et Muscat.....	171
Figure 66 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses 'bourbes' de différents cépages : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration initiale en substrat (c).	172
Figure 67 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des biomasses de différents cépages.	174

Figure 68 : Profil de production d'hydrogène et structure des populations microbiennes obtenues avec deux enzymes de restriction <i>aluI</i> et <i>hhaI</i>	177
Figure 69 : Indices de diversité microbienne de Shannon et Simpson obtenus en fonction des cépages et du stockage des biomasses.	178
Figure 70 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation excepté pour les 'bourbes Pinot Gris' congelées dont l'échantillon a été prélevé à 31 h.....	178
Figure 71 : Relation entre l'abondance relative de <i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerickii</i> , <i>butyricum</i>) et la quantité d'hydrogène produit.....	183
Figure 72 : Répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble des bourbes Chardonnay Durable (a), Eco-phytosanitaire (b) et Biologique (c) ; et composition biochimique de la DCO soluble.....	187
Figure 73 : Influence du mode de culture sur les teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes Chardonnay Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique.....	187
Figure 74 : Répartition élémentaire moyenne des fractions totales (a) et solubles (b) des bourbes Chardonnay Durable et Eco-phytosanitaire (moyenne), et celle des bourbes Chardonnay Biologique (c) et (d).....	188
Figure 75 : Teneur des macro- et micro-nutriments des bourbes dans les fractions totales (FT) et solubles (Sol) des bourbes Chardonnay Durable (BChDur), Eco-phytosanitaire (BChEP) et Biologique (BChBio).....	189
Figure 76 : Volume d'hydrogène produit au cours du temps à partir des bourbes Chardonnay issue de différents modes de culture.	190
Figure 77 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des bourbes Chardonnay issues de différents modes de culture (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique) : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).....	191
Figure 78 : Métabolites et gaz produits à partir des bourbes Chardonnay issue de différents modes de culture.....	192
Figure 79 : Classification taxonomique obtenue par séquençage d'échantillons prélevés à 24 h de fermentation en fonction des modes de culture.....	193
Figure 80 : Métabolites et biogaz produits en cours de fermentation des bourbes Chardonnay pour chaque mode de culture.....	195
Figure 81 : Corrélation entre la productivité en hydrogène et la teneur initiale en fer et en potassium pour tous les cépages (a et c) et les cépages Muscat et Riesling exclus (b et d).	197
Figure 82 : Caractérisation des matières sèches, volatiles, minérales et en suspension des bourbes Pinot Gris (BPG) issues des vendanges 2013 et 2014.	198
Figure 83 : Répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble des bourbes Pinot Gris issues des vendanges 2013 (a) et 2014 (b) ; et composition biochimique de la DCO soluble.....	199

Figure 84 : Influence de l'année de vendange sur la teneur en protéines des fractions solubles et totales des bourbes Pinot Gris (BPG).	199
Figure 85 : Répartition élémentaire de la fraction totale (a et c) et soluble (b et d) des bourbes Pinot Gris 2013 (a et b) et 2014 (c et d).	200
Figure 86 : Volume cumulé d'hydrogène produit au cours du temps à partir des bourbes Pinot Gris issues des vendanges 2013 et 2014 stockées à 4°C ou à -20°C.	202
Figure 87 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses Pinot Gris issues des vendanges 2013 et 2014 : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).	203
Figure 88 : Quantités de métabolites et de gaz produits à partir des bourbes Pinot Gris stockées à 4°C et -20°C pour les vendanges 2013 et 2014.	205
Figure 89 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes Pinot Gris issues des vendanges 2013 et 2014.	206
Figure 90: Volume cumulé d'hydrogène produit au cours du temps à partir des biomasses 'marcs' de cépages et de modes de cultures différents, provenant des terroirs d'Alsace (A) et de Bourgogne (B).	209
Figure 91 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des marcs pour différents cépages et modes de culture : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).	211
Figure 92 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des biomasses 'marcs' de différents cépages.	212
Figure 93 : Production de citrate et de succinate par les Enterobacteriaceae en anaérobie, d'après Langelier et al., 2009.	214
Figure 94 : Volume cumulé d'hydrogène produit au cours du temps à partir des marcs Pinot Gris et Muscat issus des vendanges 2012, 2013 et 2014 stockées à -20°C.	216
Figure 95 : Influence de la variabilité annuelle et impact des rafles sur les performances de production d'hydrogène : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).	217
Figure 96 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des marcs avec ou sans rafles et issus des vendanges 2012 à 2014.	219
Figure 97. Profil de production d'hydrogène et structure des populations microbiennes obtenues avec deux enzymes de restriction <i>aluI</i> et <i>hhaI</i>	221
Figure 98 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des marcs Muscat 2012 et 2013, et des marcs Pinot Gris 2013 et 2014.	222
Figure 99 : Métabolites produits et profils de production du biogaz au cours de la fermentation des marcs Pinot Gris 2013 et 2014.	224

Figure 100 : Comparaison des performances de production d'hydrogène obtenues à partir des marcs et des bourbes (les barres correspondent aux écarts-types).....	226
Figure 101 : Comparaison de la répartition gazeuse et métabolique entre les marcs et les bourbes...	227
Figure 102 : Corrélations entre la production d'hydrogène et les quantités d'acétate et de butyrate produits à partir des biomasses 'bourbes' (a) et les quantités d'acétate et d'éthanol produits à partir des biomasses 'marcs' (b).....	228
Figure 103 : Corrélation entre la production molaire d'hydrogène et la quantité de butyrate produit obtenue à partir de la biomasse 'bourbes'.....	228
Figure 104 : Corrélation entre la production de butyrate et la quantité initiale de sucres à partir de la biomasse 'bourbes'.....	228
Figure 105 : Corrélation entre la production molaire d'hydrogène et la quantité d'acétate produit obtenue à partir de la biomasse 'marcs'.....	229
Figure 106 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des mélanges de biomasses : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).	232
Figure 107 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des bourbes (B), des marcs (M) ou des eaux de rinçage (ER) seuls, ou des mélanges 'bourbes + eaux de rinçage' et 'marcs + eaux de rinçage' sur des biomasses réfrigérées ou congelées.	234
Figure 108. Profil de production d'hydrogène et structure des populations microbiennes obtenus avec deux enzymes de restriction <i>aluI</i> et <i>hhaI</i>	236
Figure 109 : Classification taxonomique au niveau de la famille, de chaque microflore endogène appartenant aux différentes biomasses, réfrigérées (à gauche du trait jaune) ou congelées (à droite)..	238
Figure 110 : Influence des eaux de rinçage sur le profil de production de biogaz pour les bourbes (Gewurztraminer) avec (a) et sans (b) ajout des eaux de rinçage.....	240
Figure 111 : Influence des eaux de rinçage sur le profil de production de biogaz pour les marcs (Pinot Gris) avec (a) et sans (b) ajout des eaux de rinçage.	241
Figure 112 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des différentes biomasses : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).	243
Figure 113 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des différentes biomasses.	245
Figure 114 : Caractérisation des structures microbiennes, au niveau de la famille, de chaque microflore endogène appartenant aux biomasses congelées bourbes, gâteau et lies.....	246
Figure 115 : Concentration des métabolites et des sucres au cours de la fermentation des biomasses gâteau et lies.	248
Figure 116 : Quantité totale de métabolites produits au cours de la fermentation des biomasses bourbes, gâteau et lies, en fonction de la quantité initiale sommée de tartrate et de sucres.....	248
Figure 117 : Somme des abondances relatives de <i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerickii</i> , <i>butyricum</i>) et <i>Enterococcus villorum</i> en fonction de la quantité initiale de tartrate.	249

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir de différents bioréacteurs.....	30
Tableau 2 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir de différents substrats.	42
Tableau 3 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par pyroséquençage 454 à partir de l'échantillon prélevé à 24h de fermentation endogène des 'bourbes Pinot Gris'.....	92
Tableau 4 : Comparaison des résultats obtenus dans cette étude à ceux obtenus dans la littérature.....	94
Tableau 5 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours'.....	117
Tableau 6 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests 'sans pt' et 'ptf + ptc'.....	127
Tableau 7 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés lors des tests '7,0/5,7' et '4,5/4,5'.....	139
Tableau 8 : Métabolites produits, co-facteurs et énergie associés lors de la fermentation.....	143
Tableau 9 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests '14 g DCO/L', '28 g DCO/L', '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L'.....	152
Tableau 10 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes de différents cépages.	179
Tableau 11 : Produits et traitements phytosanitaires utilisés en fonction du mode de culture. Les données entre parenthèses correspondent au nombre de répétitions du traitement appliqué.	186
Tableau 12 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests en fonction du mode de culture.....	193
Tableau 13 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes issues des vendanges 2013 et 2014.....	206
Tableau 14 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation des tests 'marcs Pinot Gris', 'marcs Muscat' et 'marcs Chardonnay Ecophytosanitaire'.....	213
Tableau 15 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation des différents tests.....	239
Tableau 16 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation des différents tests.....	247

LISTE DES ABREVIATIONS

AAF : aéro-anaérobie facultative
AcétylCoA : acétyl coenzyme A
AS : anaérobie stricte
ADP : adénosine diphosphate
AGLC : Acide gras à longue chaîne
AGV : acide gras volatil
AFBR : anaerobic fluidized bed reactor
ATP : adénosine triphosphate
BCh : bourbes Chardonnay
BChBio : bourbes Chardonnay biologique
BChDur : bourbes Chardonnay durable
BChEP : bourbes Chardonnay éco-phytosanitaire
BGw : bourbes Gewurztraminer
BMu : bourbes Muscat
BPG : bourbes Pinot Gris
BRi : bourbes Riesling
BSU : boues de station d'épuration urbaines
Coa : coenzyme A
CSTR : continuous stirred tank reactor
DCO : demande chimique en oxygène
FAD : flavine adénine dinucléotide
Fd : ferrédoxine
FT : fraction totale
HRT : temps de séjour hydraulique
LiN : liqueurs noires
LiR : liqueurs rouges
MBR : membrane bioreactor
MES : matière en suspension
Mi : matière minérale
MS : matière sèche
MV : matière volatile
NADH : nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OLR : organic loading rate
PBR : packed bed reactor
Pdhc : complexe pyruvate-déshydrogénase
Pfl : pyruvate-formiate liase
Pfo : pyruvate-ferrédoxine-oxydoréductase
Pi : phosphate inorganique
PS : photosystème
Pt : prétraitement thermique
Ptc : prétraitement thermique chaud
Ptf : prétraitement thermique froid
SLR : sludge loading rate
Sol: fraction soluble
SRB : sulfate reducing bacteria
SRT : solid retention time
UASB : up-flow anaerobic sludge blanket reactor

Chapitre I. BIBLIOGRAPHIE

1. Du concept de bioraffinerie à la valorisation de la biomasse en biohydrogène

1.1. Introduction

Face à l'accroissement démographique mondial du dernier siècle, le déséquilibre entre le marché et la demande énergétique s'est creusé (INED, 2008 ; IEA, 2010). Les répercussions économiques, énergétiques et environnementales de la surexploitation des énergies fossiles qui en résultent sont majeures (Barnham *et al.*, 2006). Elles aboutissent non seulement à un épuisement des ressources en hydrocarbures mais également à un changement global du climat associé aux émissions anthropogéniques de gaz à effet de serre, en particulier le dioxyde de carbone (CO₂). En effet, ce dernier a quasiment doublé entre 1970 et 2010 passant de 15 à 32 gigatonnes d'équivalent CO₂ émis mondialement et annuellement par les activités humaines (Intergovernmental Panel on Climate Change 2014). Une des clés pour sortir de cette crise économique, énergétique et environnementale, est de développer des bioraffineries qui permettent l'accès à une production combinée de produits valorisables par les industries agro-alimentaires et chimiques, de carburants et d'énergie, à partir de biomasses. Le concept de 'bioraffinerie' ne se limite pas à valoriser la biomasse pour la production de différents produits à haute valeur ajoutée, mais elle englobe la valorisation de chaque sous-produit, intermédiaire, extrait de la biomasse brute ou produit lors du procédé de transformation de cette biomasse. Ainsi, la biomasse peut être principalement valorisée sous forme d'énergie, de carburants et également de produits chimiques. On parlera alors de « bioénergie », « biocarburants » et de « bioproduits ». La biomasse est une ressource qualifiée de carbone-neutre, c'est-à-dire que la production pendant sa valorisation s'équilibre avec l'incorporation de CO₂ par la plante lors de sa croissance. Ainsi, les biomolécules produites sont en général plus « propres » que celles produites à partir de ressources fossiles. Strassberger *et al.* (2014) ont démontré que pour que les procédés des bioraffineries soient économiquement faisables et carbone-neutres, il était nécessaire que ces unités soient de petites tailles et flexibles pour surmonter les problèmes liés au transport des biomasses utilisées mais aussi celui des bioproduits, bioénergie et biocarburants générés.

La biomasse est définie comme étant l'ensemble des matières organiques présentes dans la nature, qu'elle soit sous forme de plante, tout ou partie, sous forme de déchet végétal ou animal ou qu'elle soit microbienne. Les principaux éléments constituant la biomasse sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le phosphore et le soufre (CHONPS). Les principales sources de biomasses sont non seulement issues de l'agriculture, de la sylviculture et de l'algoculture, mais aussi issues des rejets des collectivités et des industries. Une classification des biomasses peut être effectuée en fonction de leur composition biochimique, de leur nature et du type de biocarburant produit à partir de celles-ci. Ainsi, la biomasse de première génération (1G) représente la biomasse composée de sucres simples comme le glucose, de polysaccharides tels que le saccharose ou l'amidon et/ou de lipides qui constituent les réserves métaboliques de la plante. Parmi les plantes 1G, on retrouve la betterave, la

canne à sucre, mais également la pomme de terre, les graines de colza, ... L'augmentation des prix de ces denrées alimentaires liée à la concurrence directe de l'industrie agro-alimentaire et de la production de carburants à partir de biomasse 1G, a eu pour conséquence de s'intéresser à d'autres biomasses. La biomasse de deuxième génération (2G), la biomasse lignocellulosique, a fait l'objet de nombreuses études sur l'extraction des sucres plus simples, à partir de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, pour la production de composés à haute valeur ajoutée. En effet, la lignocellulose représente environ 70 % de la biomasse totale de la plante et constitue les parois cellulaires des végétaux. La lignocellulose contient des microfibrilles de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Les microfibrilles de cellulose sont les composants les plus facilement extractibles car celles-ci ne sont liées à la structure que par des liaisons faibles (hydrogène). L'hémicellulose, servant de connexion entre la lignine et la cellulose, confère une rigidité de la structure globale plus importante. C'est d'ailleurs cette caractéristique qui permet à la plante de résister à des stress biotiques et abiotiques subis pendant l'évolution. Il est donc nécessaire de prétraiter physiquement, chimiquement ou biologiquement la biomasse afin d'en extraire des composés plus simples (Kamm & Kamm, 2004). Les plantes qui ne sont pas cultivées sur des terres arables telles que le miscanthus, et les résidus issus de l'agriculture tels que les bagasses de canne à sucre, ne concurrencent donc pas la filière alimentaire et l'industrie agroalimentaire et font partie des biomasses 2G. Enfin, la biomasse algale représente la biomasse de troisième génération (3G). Les déchets et sous-produits issus des municipalités (boues de station d'épuration), des industries (papetières, agro-alimentaires, ...), agricoles (lisiers,...) sont des biomasses non prises en compte dans les précédentes générations. Il serait alors judicieux de les regrouper sous le terme de biomasse de 4^{ème} génération (4G). L'utilisation de l'ensemble de ces biomasses reflète le concept de bioraffinerie (figure 1).

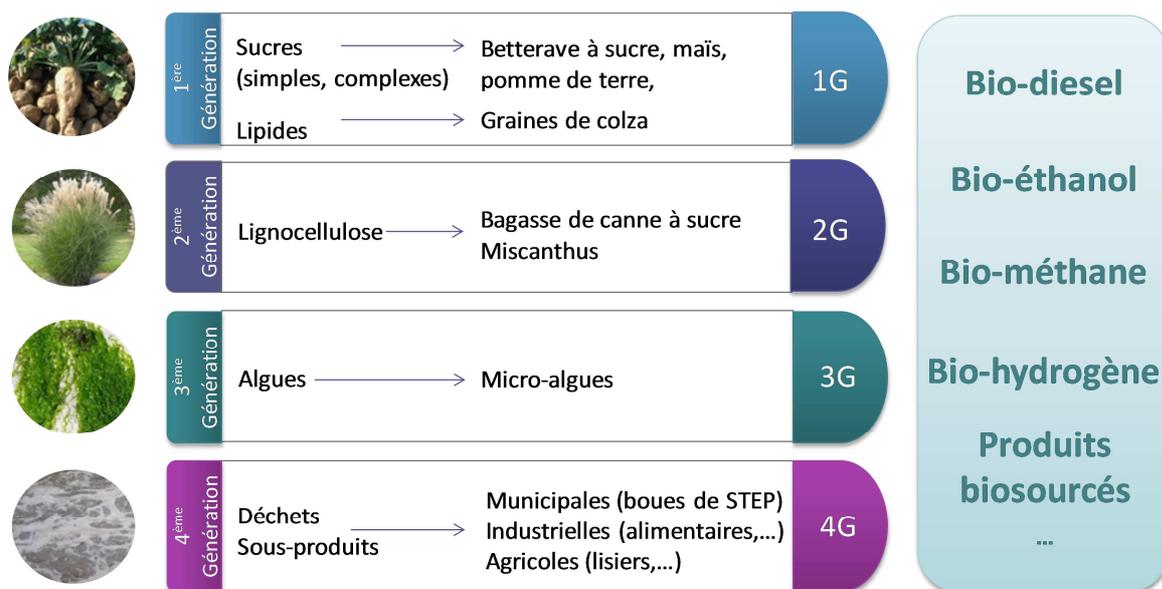


Figure 1 : Compositions des biomasses de différentes générations.

En effet, l'approche de production en bioraffinerie consiste à générer à partir de la biomasse différents produits par le biais de différentes technologies combinées (Fitzpatrick *et al.*, 2010). La conversion de

la biomasse en électricité, en carburants, ou en produits chimiques, nécessite des prétraitements préalables de la biomasse brute (Kamm & Kamm, 2004). La biomasse végétale est composée environ de 75 % de sucres comprenant le glucose, la cellulose, l'amidon, de 20 % de lignine et d'environ 5 % d'autres composés tels que les protéines, les lipides, ... Une attention particulière doit donc être attribuée aux sucres. Les polysaccharides nécessitent un prétraitement afin d'être décomposés en sucres simples, en hexoses et/ou en pentoses. Les sucres simples sont les substances clés qui permettent d'accéder à de nombreux produits biosourcés, qui sont des intermédiaires clés utilisés pour l'industrie. Parmi ceux-ci, l'hydrogène est un intermédiaire utilisé majoritairement dans l'industrie pétrochimique. Même, si l'hydrogène n'a pas été classé dans le top 10 des produits biosourcés, celui-ci n'en est pas moins intéressant. En effet, en 2003, la liste établie par le Pacific Northwest National Laboratory et National Renewable Energy Laboratory, excluait l'hydrogène par le fait que la production d'hydrogène à partir du gaz naturel était économiquement la voie la plus compétitive. Toutefois, la crise économique, énergétique et environnementale que nous traversons a stimulé le développement des énergies renouvelables quelles qu'elles soient. L'Union Européenne s'est notamment engagée sur l'atteinte, par chaque état membre, d'ici à 2020, du quadruple objectif suivant : (1) diminuer de 20 % la consommation d'énergie en améliorant l'efficacité énergétique, (2) augmenter de 20 % la production des énergies renouvelables, (3) augmenter de 10 % la part des biocarburants dans le transport et (4) diminuer de 20 % les émissions de gaz à effet de serre. Ainsi, même si au départ les coûts de production des énergies renouvelables à partir de biomasses sont élevés, il n'en reste pas moins que l'investissement dans la recherche et le développement de ces technologies puisse aboutir industriellement à plus ou moins moyen terme. Ainsi, l'hydrogène produit à partir de la biomasse, connaît depuis une dizaine d'années, un regain d'intérêt.

1.2. Production d'hydrogène par voies conventionnelles

La production mondiale d'hydrogène en 2013 a été estimée à plus de 50 millions de tonnes/an (DOE, 2013). L'hydrogène est majoritairement utilisé dans la synthèse de l'ammoniac et du méthanol, ainsi que dans le raffinage du pétrole. Bien qu'il soit abondant à l'état naturel, l'hydrogène doit être sous sa forme moléculaire, association deux atomes (H_2), pour être énergétiquement disponible, ce qui n'est pas le cas dans la nature. A l'heure actuelle, 96 % de l'hydrogène mondial est produit, à partir d'énergies fossiles, que ce soit à partir de gaz naturel (49 %), de charbon (18 %) ou d'hydrocarbures liquides (29 %). Les 4 % restants représentent l' H_2 produit à partir de l'électrolyse (Boyer, 2012). La figure 2 résume les différentes voies de production d'hydrogène à partir des ressources fossiles, nucléaires et renouvelables.

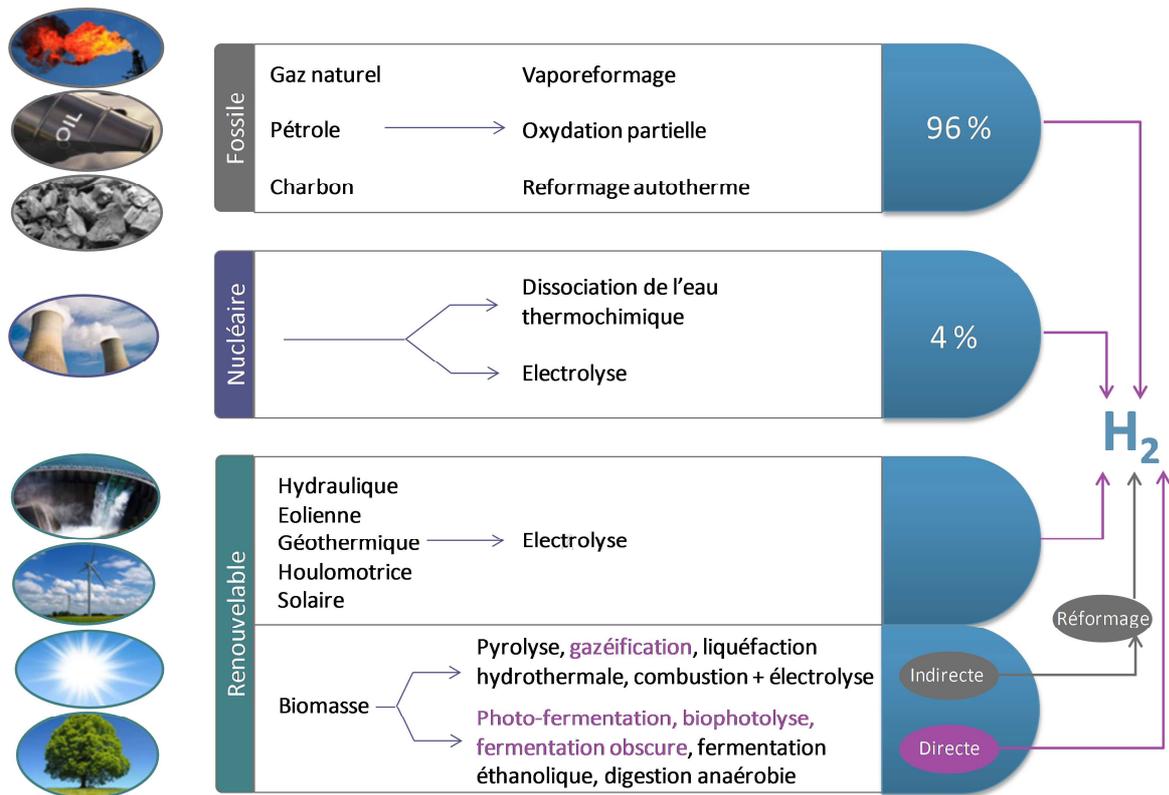


Figure 2 : Différentes voies de production d'hydrogène à partir de ressources fossiles, nucléaires et renouvelables.

Outre les voies conventionnelles utilisant les ressources fossiles, l'hydrogène peut être produit à partir de biomasses par des procédés thermochimiques (pyrolyse, gazéification, liquéfaction hydrothermale, combustion) ou des procédés biochimiques (biophotolyse directe/indirecte, photo-fermentation, fermentation obscure, estérification, digestion anaérobie). Hormis le procédé de gazéification, seules les techniques de photo-fermentation, de biophotolyse de l'eau et de fermentation obscure permettent de produire directement de l'hydrogène à partir de biomasses sans passer par une étape de reformage, étape catalytique à haute température (Muradov & Veziroğlu, 2008). Les deux premières techniques sont des procédés dépendants de la lumière alors que la dernière en est indépendante.

1.3. Production d'hydrogène par voies biochimiques

Comme énoncé précédemment, l'hydrogène est non seulement un vecteur énergétique du futur, mais il est également très convoité chez les micro-organismes car il représente également pour eux une source d'énergie. C'est pourquoi, il n'existe qu'à l'état de traces dans l'atmosphère, puisqu'après sa formation géologique, il est rapidement consommé par les communautés microbiennes environnantes. Les procédés de production d'hydrogène par les voies biochimiques sont fondés sur l'hydrogénase, biocatalyseur permettant la formation d'hydrogène à partir de protons selon la réaction suivante (équation 1) :



Cette réaction est réversible et son sens dépend du potentiel rédox des éléments qui sont capables d'interagir avec l'hydrogénase (Vignais *et al.*, 2001). En présence d'un accepteur d'électrons, le sens de la réaction se déplacera vers la consommation de l'hydrogène alors qu'en présence d'un donneur d'électrons de faible potentiel, la production d'hydrogène sera favorisée. Afin de comprendre la manière dont les micro-organismes métabolisent l'hydrogène, il est nécessaire de présenter la structure, la classification et les différentes propriétés des hydrogénases.

1.3.1 Les hydrogénases, enzymes clés dans la formation d'hydrogène

Les hydrogénases peuvent être classées en trois catégories principales : les hydrogénases [Fe-Fe], les hydrogénases [Ni-Fe] et les hydrogénases [Fe], chacune de ces classes étant caractérisée par une fonction distinctive (Vignais *et al.*, 2007).

Les hydrogénases [Ni-Fe] sont des métalloenzymes hétérodimères composées d'au moins deux sous-unités : la sous-unité α contient le site actif bimétallique nickel-fer, alors que la sous-unité β contient les clusters Fe-S qui permettent de transférer les électrons entre le site actif et le site de liaison des accepteurs/donneurs d'électrons. Elles se déclinent en quatre groupes distincts ayant des sous-unités différentes associées à des fonctions différentes. Les hydrogénases [Ni-Fe] fonctionnent dans les deux sens de réaction, mais elles consomment en général l'hydrogène. Une autre particularité de ces enzymes est d'être plus tolérante à la présence de CO et d'O₂, contrairement aux hydrogénases [Fe-Fe]. Elles sont présentes chez les bactéries et notamment le phylum *Proteobacteria*, les archées et les cyanobactéries.

Les hydrogénases [Fe-Fe] sont des métalloenzymes qui peuvent être monomères, dimères, trimères ou tétramères. Les plus nombreuses connues sont les hydrogénases [Fe-Fe] monomériques composées d'une unité catalytique constituée du centre bi-ferrique [Fe-Fe] lié à un cluster [4Fe-4S] par un pont cystéine. Contrairement aux hydrogénases [Ni-Fe], les hydrogénases [Fe-Fe] sont sensibles à la présence d'O₂ et de CO et sont généralement impliquées dans la production d'hydrogène. Les *Clostridiales* possèdent de nombreuses hydrogénases [Fe-Fe] différentes leur permettant de s'adapter rapidement à un changement d'environnement (Calusinska *et al.*, 2010). Ces enzymes sont présentes chez les bactéries mais également chez les eucaryotes.

Les hydrogénases [Fe] sont des métalloenzymes contenant un seul atome de fer au niveau du site actif. Ces enzymes catalysent la consommation irréversible de l'hydrogène. Elles sont présentes chez les archées.

Un dernier type d'enzymes, qui ne fait pas partie des hydrogénases, mais qui intervient dans la production biologique d'hydrogène, est les nitrogénases. Ce sont des métalloenzymes qui peuvent être constituées de molybdène, de vanadium ou de fer, situé au niveau du site actif. Elles peuvent produire

de l'hydrogène en l'absence de substrats azotés, en se comportant comme des hydrogénases ATP-dépendantes ou bien catalyser la réaction de l'azote en ammoniac, en présence d'azote. La réduction des protons en hydrogène n'étant pas leur fonction principale, les rendements en hydrogène obtenus par les nitrogénases sont inférieurs à ceux obtenus par les hydrogénases (Hallenbeck & Benneman, 2002). Elles sont présentes chez les bactéries et les archées.

1.3.2 La biophotolyse de l'eau

La biophotolyse directe est réalisée par les algues vertes et les cyanobactéries. Ces organismes sont dits phototrophes oxygéniques car ils utilisent la lumière comme source d'énergie qu'ils convertissent en énergie chimique, en produisant de l'oxygène et de l'hydrogène à partir d'eau (équation 2). Ces organismes phototrophes possèdent des pigments (la chlorophylle) situés au niveau des membranes photosynthétiques, qui se composent de deux photosystèmes (PSI et PSII) dont la fonction est d'absorber la lumière à de plus ou moins grandes longueurs d'ondes. Ainsi, les photons absorbés via les antennes de la chlorophylle excitent les centres réactionnels des PSII et PSI. PSII étant très électropositif, il va transférer les électrons produits par le clivage de l'eau en oxygène et en protons vers une succession de molécules avant d'atteindre le PSI, qui, grâce à la chaîne de transport électronique, réduit à son tour la ferrédoxine (fd_{red}) qui est un accepteur d'électron.



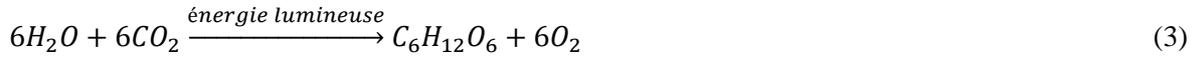
La fd_{red} est ensuite réoxydée soit par les hydrogénases [Fe-Fe] chez les algues et les nitrogénases chez les cyanobactéries, soit grâce à la ferrédoxine-NADP-oxydo-réductase avec la réduction du $NADP^+$ en NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotidephosphate). Ce dernier étant alors réoxydé via les hydrogénases [Ni-Fe] chez les cyanobactéries. En parallèle, le transport d'électrons allant du PSII vers le PSI, génère une force protons motrice qui permet de produire de l'énergie chimique sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate). Lorsqu'il n'est pas réoxydé par les hydrogénases [Ni-Fe], le NADPH est utilisé avec consommation d'un ATP pour fixer le CO_2 pour la formation des sucres sous formes de glycogène ou d'amidon pour le stockage de la cellule.

L'avantage de ce procédé réside dans le fait que seule l'eau est nécessaire en tant que substrat en présence d'énergie photonique. De plus, aucun gaz à effet de serre n'est produit. En revanche, les productivités restent faibles : de 0,12 à 11,7 mL/L/h (0,005 à 0,49 mmol/L/h) (Brentner *et al.*, 2010), notamment à cause de l' O_2 produit qui est un inhibiteur irréversible de l'activité catalytique des hydrogénases [Fe-Fe] et des nitrogénases (Manish *et al.*, 2008).

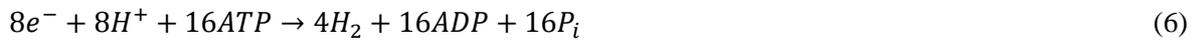
1.3.3 La biophotolyse indirecte de l'eau

La biophotolyse indirecte diffère de la biophotolyse directe par le fait que la production d'hydrogène est séparée de la photosynthèse, temporellement grâce aux cycles diurne/nocturne chez les cyanobactéries ne possédant pas d'hétérocyste et/ou spatialement grâce aux hétérocystes que certaines

cyanobactéries possèdent (Turner *et al.*, 2008). En l'absence de lumière, le PSII est inhibé, ce qui provoque l'arrêt de la production d'O₂. La cellule convertit ensuite les sucres stockés préalablement en hydrogène par fermentation. Les réactions globales sont les suivantes (équations 3 et 4) :



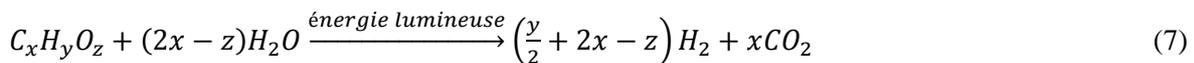
Certaines cyanobactéries possèdent des cellules végétatives capables de se différencier en hétérocystes, cellules à parois épaisses dépourvues de PSII qui sont interconnectées avec des cellules végétatives. C'est dans ces cellules spécifiques que l'azote est fixé par la nitrogénase qui produit de l'hydrogène (équation 5), de l'ammoniac, de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi) et de manière encore plus importante en absence d'azote dans le milieu (équation 6).



Les productivités en hydrogène obtenues par biophotolyse indirecte sont plus élevées que celles obtenues par biophotolyse directe. En effet, elles sont comprises entre 4,4 et 13,8 mL/L/h (0,18 à 0,57 mmol/L/h) (Brentner *et al.*, 2010).

1.3.4 La photo-fermentation

La photo-fermentation consiste à utiliser des substrats organiques tels que le glucose ou les acides organiques à chaînes courtes, comme source de carbone en présence d'énergie lumineuse. C'est le cas des bactéries pourpres non soufrées, qui, ne possédant pas de PSII, ne peuvent pas cliver l'eau et produire de l'O₂. En conditions anaérobies, les bactéries photo-fermentaires réduisent les acides organiques en produisant des électrons, des protons et du CO₂. Les protons sont pompés à travers la membrane permettant de former un gradient ce qui active l'ATPase et génère de l'ATP. Celui-ci est utilisé pour le transport d'électrons vers la ferrédoxine et permet la réoxydation de la ferrédoxine réduite, par la nitrogénase en produisant de l'hydrogène. La réaction globale est la suivante (équation 7) :



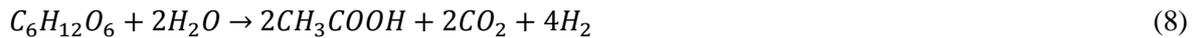
L'avantage de ce procédé est l'utilisation de déchets organiques pour produire de l'hydrogène (et du CO₂) sans co-produits. Les productivités en hydrogène obtenues vont de 1,66 à 38,2 mL/L/h (0,07 à 1,59 mmol/L/h) (Brentner *et al.*, 2010).

L'inconvénient majeur des photo-bioprocédés (biophotolyse directe/indirecte et photo-fermentation) est le rendement de conversion de l'énergie lumineuse qui est faible jusqu'à 6,2 % (Brentner *et al.*, 2010). C'est pourquoi, la conception du bioréacteur est coûteuse car elle doit permettre l'optimisation

de ce rendement de conversion de l'énergie lumineuse en offrant un grand rapport surface sur volume de réacteur exposé à la lumière.

1.3.5 La fermentation obscure

La fermentation obscure consiste en la conversion par des micro-organismes anaérobies des matières métabolisables, principalement les sucres selon deux principales voies : « la voie butyrate » et « la voie acétate », en produisant des acides organiques, de l' H_2 et CO_2 en l'absence d'énergie photonique (équations 8 et 9).



Les productivités en hydrogène sont comprises entre 56 et 541 mL/L/h (2,33 et 22,49 mmol/L/h) (Brentner *et al.*, 2010). L'avantage de ce bioprocédé est l'absence de nécessité d'énergie lumineuse et la possibilité d'utiliser des déchets comme substrat et des cultures mixtes comme consortium microbien.

1.3.6 Comparaison des procédés biologiques de production d'hydrogène

Chaque procédé décrit ci-dessus présente des avantages et des inconvénients. Le procédé de biophotolyse de l'eau présente l'avantage de pouvoir transformer de l'eau en produits simples, hydrogène et oxygène, via l'utilisation de l'énergie photonique. Ce procédé ne nécessite pas une eau très pure et peut être remplacée par des eaux usées à faibles teneurs en matières en suspension. Ce procédé présente toutefois, des rendements et des vitesses de production en hydrogène faibles. De plus, lorsque la biophotolyse est directe, l'oxygène produit à partir de l'eau inhibe les hydrogénases.

Tout comme la biophotolyse, le procédé de photo-fermentation dépend de l'énergie photonique pour la production d'hydrogène. Ainsi, ces photo-bioprocédés nécessitent des bioréacteurs spécifiques permettant à la lumière d'atteindre les organismes phototrophes. Le rendement et la productivité en hydrogène obtenus avec le procédé de photo-fermentation sont plus élevés que ceux obtenus par la biophotolyse. Le procédé de fermentation obscure présente les meilleures vitesses de production d'hydrogène comparativement aux autres procédés. Il présente non seulement des taux de conversion de la biomasse en hydrogène les plus élevés (33 %) comparativement à la photofermentation et à la photolyse de l'eau, mais également, offre la possibilité d'exploiter des déchets organiques et de les convertir en ressources énergétiques (Muradov & Veziroğlu, 2008). De plus, la mise en œuvre (le bioréacteur) de ce bioprocédé peut s'effectuer par les technologies existantes pour la production de biogaz par digestion anaérobie. Malgré cela, ce bioprocédé présente un inconvénient principal qui est de produire de nombreux co-produits (acides organiques) ou des composés de voies concurrentes (par exemple, alcools). Les acides organiques peuvent cependant être utilisés comme substrats et convertis

par photo-fermentation pour une production supplémentaire d'hydrogène ou par digestion anaérobie pour la production de méthane.

A ce jour, le bioprocédé de fermentation obscure est considéré comme le meilleur pour la production d'hydrogène du fait de ces nombreux avantages. Dans une optique de production à plus grande échelle que celle du laboratoire, il est nécessaire d'optimiser les performances de production d'hydrogène. Pour cela, la suite de ce chapitre est consacrée à la présentation des voies métaboliques impliquées dans la fermentation obscure, puis, aux améliorations possibles via les micro-organismes (cultures pures, co-cultures, cultures mixtes), via le bioprocédé (fermentation obscure qui peut être couplée à la photo-fermentation, à la cellule d'électrolyse microbienne ou à la digestion anaérobie et pour laquelle les co-produits formés peuvent être valorisés), via les facteurs abiotiques (environnementaux : pH, température, ...) et via l'origine du substrat avec ou sans prétraitement (figure 3).

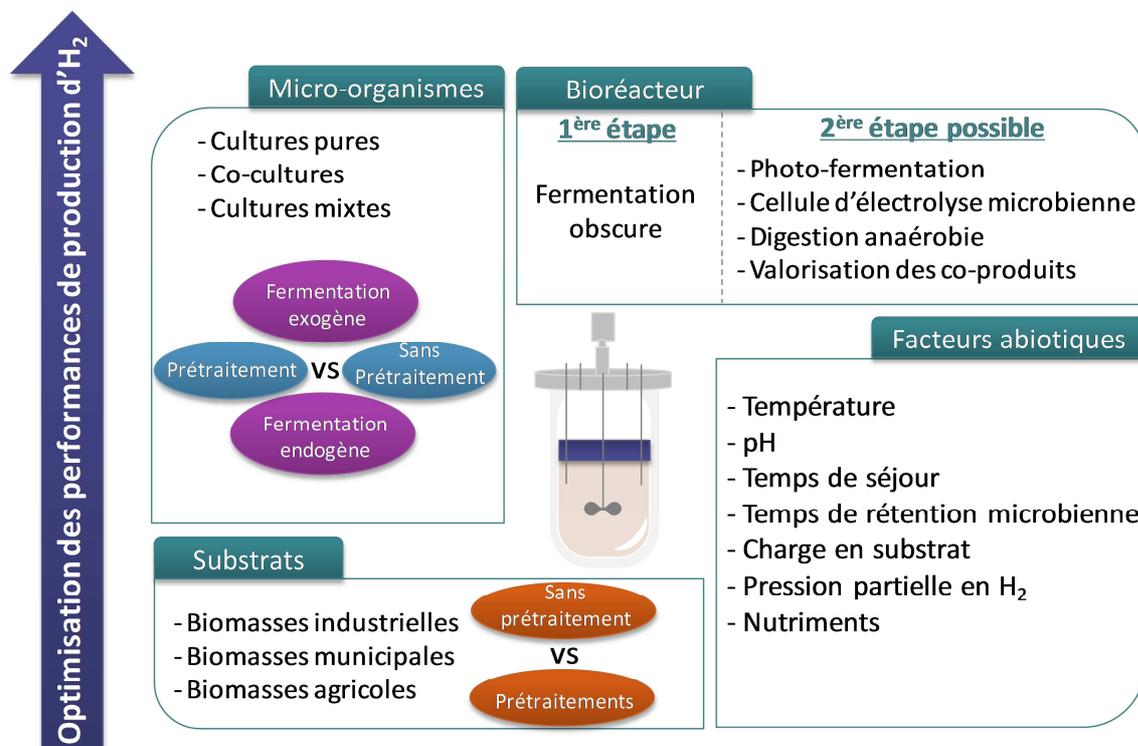


Figure 3 : Optimisations possibles des performances de production d'hydrogène.

(AGLC)) assimilables par la plupart des bactéries. Plus la matière organique est complexe, telle que la biomasse lignocellulosique, et plus l'étape d'hydrolyse est longue et limitante.

Les composés monomériques solubles libérés par l'étape d'hydrolyse pénètrent à l'intérieur des cellules microbiennes acidogènes où ils sont métabolisés. Les monosaccharides sont transformés par la voie de la glycolyse en glycéraldéhyde-3-phosphate, puis, en acide pyruvique, plaque tournante du métabolisme microbien. Le pyruvate est ensuite, fermenté en acides gras volatils (AGV), en alcools, en acides organiques, en dioxyde de carbone et en hydrogène par des micro-organismes fermentaires (*Enterobacteriaceae* sp., *Bacillus* sp. et *Clostridium* sp.). Les acides aminés sont convertis à 90 % (Ramsay & Pullammanappallil, 2001) grâce aux réactions couplées d'oxydo-réduction de Stickland (Nisman, 1954). Deux acides aminés, l'un accepteur et l'autre donneur d'un atome de carbone, sont simultanément dégradés pour former du dioxyde de carbone, de l'ammonium et des AGV. Les AGLC sont dégradés en acides gras plus courts et en hydrogène au cours de l'hélice de Lynen (Lynen & Ochoa, 1953). Cette étape est rapide et la production d'acides abaisse le pH du milieu, qui peut devenir une source d'inhibition.

L'acétogénèse correspond à l'oxydation des différents composés obtenus à l'étape précédente en acétate, par des bactéries acétogènes. Les réactions ayant lieu au cours de cette étape sont endergoniques mais deviennent exergoniques grâce à la consommation de l'hydrogène par les micro-organismes syntrophes (homo-acétogènes, les méthanogènes, les bactéries sulfato et nitrate-réductrices). La méthanogénèse correspond à la conversion de l'acétate et/ou du CO₂ et de l'H₂ en méthane par les *Archeae*. La production de méthane et de dioxyde de carbone par digestion anaérobie à partir de biomasses agricoles, industrielles et municipales est largement utilisée à l'heure actuelle. En effet, le méthane, une fois purifié, peut être utilisé comme combustible pour produire de la chaleur ou de l'électricité. L'inconvénient majeur de ce procédé, est la conversion du méthane en dioxyde de carbone lors de l'étape de combustion. En revanche, si l'on s'arrête aux deux premières étapes, l'hydrogène produit peut, après purification, être utilisé comme combustible générant de la vapeur d'eau ou converti en électricité via les piles à combustible. Un des avantages majeurs est la production uniquement d'eau lors de la production d'énergie.

L'hydrogène étant un intermédiaire clé consommé dans le processus naturel de digestion anaérobie, les deux premières étapes de la digestion anaérobie seront donc déterminantes pour sa production, puisqu'il s'agit de les favoriser tout en limitant les étapes hydrogénotrophes d'acétogénèse et de méthanogénèse.

2.1.2 La diversité métabolique

Le métabolisme est la somme de toutes les réactions biochimiques réalisées par un organisme vivant. Ces réactions sont réalisées dans deux buts : fournir de l'énergie aux micro-organismes, on parle alors de catabolisme et synthétiser du nouveau matériel cellulaire, on parle alors d'anabolisme.

Dans tout système microbien, les sucres monomériques sont convertis en pyruvate, ATP (Adénosine 5'-Tri-Phosphate) et NADH (Nicotinamide Adénine Dinucleotide réduit). Ce processus est la glycolyse et peut s'effectuer selon trois principales voies qui ont lieu chez les micro-organismes hétérotrophes (Romano & Conway, 1996) : la voie d'Embden-Meyerof-Parnas (EMP), la voie d'Entner-Douroroff (EDP) et la voie de la phosphokétolase (PPK) (équations 10 à 12). A partir du sucre monomérique le plus utilisé par les micro-organismes, le glucose (hexose), voici les équations résumant les trois voies métaboliques :



Le pyruvate est la plaque tournante du métabolisme du carbone. L'ATP est la molécule qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques thermodynamiquement non favorables par son hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP) et en phosphate inorganique (Pi). Le NAD(H) et NADP(H) sont des transporteurs d'électrons utilisés dans les réactions d'oxydoréduction cellulaires, du catabolisme dans le cas du NAD(H) et de l'anabolisme dans le cas du NADP(H). L'ATP et le NAD(P)H existent en quantités intracellulaires limitées et leurs productions sont égales à leurs consommations. Chez les micro-organismes fermentaires, l'ATP est principalement produit par la phosphorylation au niveau du substrat. Ce processus consiste au transfert d'un groupement phosphate d'un composé hautement phosphorylé à haut potentiel d'hydrolyse (très exergonique) vers l'ADP pour former l'ATP (Madigan *et al.*, 2012).

La glycolyse peut être scindée en deux parties. La première partie est un investissement énergétique de deux ATP afin de transporter le glucose à l'intérieur de la cellule, d'éviter sa fuite vers le milieu externe et d'activer le processus. La deuxième partie est en revanche, très exergonique et libère quatre ATP. La glycolyse globale permet donc de produire un total de deux ATP avec une enthalpie libre standard de $\Delta G'_0 = -112\text{kJ/mol}$.

Pendant la glycolyse, deux NADH sont également générés et doivent être réoxydés pour permettre à la glycolyse de continuer. Dans les conditions anaérobies, la cellule bactérienne est capable de régénérer le NADH en NAD^+ selon plusieurs voies métaboliques (figure 5). Même si la plupart de l'énergie libre associée aux équations de production des métabolites est favorable, certaines sont couplées à la formation d'ATP (acétate et butyrate). C'est un facteur important pour le métabolisme de la cellule car

si elle n'est pas capable de conserver son énergie en ATP, elle perd sa faculté à renouveler son matériel cellulaire (biosynthèse).

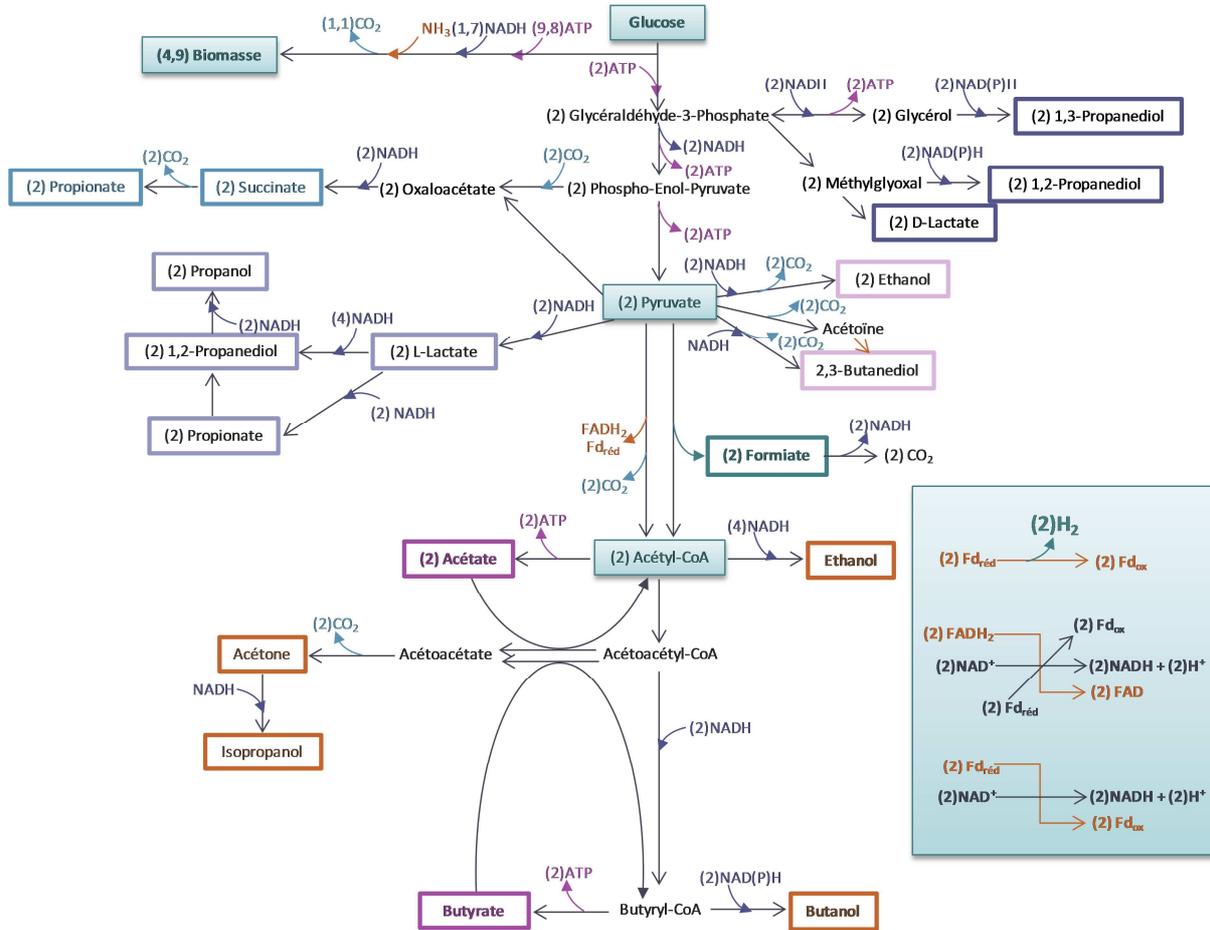


Figure 5 : Diversité métabolique des micro-organismes anaérobies (adapté de Gonzalez-Cabaleiro et al., 2015 et de Hoelzle et al., 2014).

En principe, les micro-organismes ne peuvent pas utiliser tous les réseaux métaboliques présentés dans la figure 5, mais en général, ils ont tout de même la capacité à cataboliser le pyruvate de plus d'une façon. De cette manière, les micro-organismes peuvent synthétiser de l'ATP en fonction des conditions de croissance. La diversité métabolique présentée ci-après est fondée en partie sur le travail de Hoelzle et al. (2014).

La première façon de recycler le NADH produit en NAD^+ , est la production de glycérol, 1,3-propanediol, 1,2-propanediol et D-lactate, à partir du Glycéraldéhyde-3-Phosphate. Le glycérol est produit par *Saccharomyces* (Pagliardini et al., 2013), *Bacillus* (Skraly et al., 1998) et *Lactobacillus* pour le stockage de l'énergie lors de l'osmorégulation ou du maintien de l'équilibre rédox. *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Lactobacillus* and *Enterobacter* sont capables de consommer le glycérol en 1,3-propanediol (Saxena et al., 2009). Le méthylglyoxal bypass est une voie métabolique conservée et utilisée lorsque le milieu est limité en phosphate et lorsque le flux de carbone de la glycolyse est plus

élevé que la capacité métabolique de la cellule (Booth *et al.*, 2003). Toutefois, le méthylglyoxal étant très toxique pour la cellule, des mécanismes de détoxification sont induits pour éviter la mort de celle-ci. Un de ces mécanismes est l'hydratation de ce composé toxique en D-lactate (Ferguson *et al.*, 1998). Un autre mécanisme de détoxification utilisé par les *Clostridium* est de réduire le méthylglyoxal en 1,2-propanediol (Huang *et al.*, 1999 ; Liyanage *et al.*, 2001).

Une autre manière de régénérer le NAD^+ à partir du NADH produit est la production de propionate et/ou de succinate à partir du phosphoénol-pyruvate et/ou pyruvate, par le cycle de carboxylation. C'est le cas des espèces appartenant au genre *Propionibacterium* (Suwannakham *et al.*, 2005). Ce cycle fonctionne de manière analogue à l'inverse du cycle de l'acide citrique pour le métabolisme aérobie, en réduisant l'oxaloacétate en succinate via le L-malate et le fumarate. La production de propionate est le résultat du transfert du coenzyme-A (CoA) via le pyruvate alors que le succinate est le résultat de l'entrée du phosphoénol-pyruvate dans le cycle de carboxylation. De plus, la production de propionate est liée à la dernière étape de production d'ATP via la glycolyse. La production du succinate utilise une mole de CO_2 et régénère 2NAD^+ . Ainsi, par extension, la production de propionate régénère 2NAD^+ uniquement car il produit une mole de CO_2 , ce qui annule celle produite précédemment par la production de succinate.

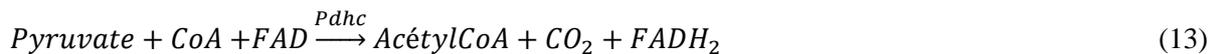
Une autre façon de recycler le NADH produit en NAD^+ consiste à convertir le pyruvate en L-lactate. C'est le cas des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*. La conversion du pyruvate en L-lactate régénère un NAD^+ mais est généralement efficace pour le recyclage d'électrons car le L-lactate possède le même état d'oxydation au niveau des carbones que celui du glucose. Toutefois, certaines espèces microbiennes sont capables de métaboliser le L-lactate en produit plus réduit que le glucose, permettant alors le recyclage des électrons en plus d'un deuxième NAD^+ régénéré. C'est le cas de *Clostridium propionicum* (Luo *et al.*, 2012), *Megasphaera elsdenii* (Kim *et al.*, 2004) et *Prevotella ruminicola* (Capsi, 2014) qui utilisent la voie acrylate, en réduisant le L-lactate en propionate. *Lactobacillus buchneri* (Oude-Elferink *et al.*, 2001) réduit le L-lactate en 1,2-propanediol. Ce dernier pouvant être à son tour réduit en propanol ou bien converti en propionate pour produire de l'ATP, c'est le cas de *Listeria innocua* et des espèces appartenant au genre *Salmonella* (Xue *et al.*, 2008).

Une autre manière de régénérer le NAD^+ à partir du NADH produit, est de convertir le pyruvate en éthanol, acétoïne et 2,3-butanediol. Dans cette portion du métabolisme, l'éthanol est produit par la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde qui est ensuite réduit en éthanol. Cette voie métabolique est utilisée par *Zymomonas mobilis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Lin & Tanaka, 2006). L'acétoïne est produite par la décarboxylation de l' α -acétolactate pendant la phase exponentielle de croissance des bactéries telles que *Bacillus subtilis* et *Klebsiella aerogenes* en tant que molécule à pH neutre stockant l'énergie qui pourra être consommée pendant la phase stationnaire de croissance (Xiao & Xu, 2007).

L'acétoïne peut également être produite à partir de la décarboxylation du pyruvate par les espèces appartenant au genre *Saccharomyces* (Chen & Jordan, 1984). 2,3-butanediol est un des métabolites produits à partir de la reconsommation de l'acétoïne par les espèces *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* et *Pseudomonas* (Xiao & Xu, 2007 ; Garg & Jain, 1995).

La production d'acétyl-CoA via la décarboxylation du pyruvate, est une autre manière de réguler le catabolisme du glucose. Les voies métaboliques appartenant à cette portion du métabolisme sont les voies les plus actives dans la fermentation à partir de cultures mixtes (Decker *et al.*, 1970) notamment grâce à leur capacité de générer de l'ATP à partir de la phosphorylation du substrat. Ces voies sont capables de réguler efficacement l'énergie produite, le recyclage des électrons et les co-facteurs par le choix de la formation des métabolites finaux (Wood, 1986).

L'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA peut être effectuée par trois enzymes : le complexe pyruvate-déshydrogénase (Pdhc), la pyruvate-formiate liase (Pfl) et la pyruvate-ferrédoxine-oxydoréductase (Pfo) (Demuez *et al.*, 2007 ; Noth *et al.*, 2013 ; Snoep *et al.*, 1990). Pdhc est un complexe enzymatique qui oxyde le pyruvate en plusieurs étapes en libérant du CO₂ et en réduisant le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) (équation 13). Ce complexe est présent chez *Escherichia*, *Enterococcus* et *Azobacter*, et est actif aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose.



Pfo oxyde le pyruvate en acétyl-CoA de manière similaire à la Pdhc, c'est-à-dire, en produisant du CO₂ et en réduisant à l'aide d'un co-facteur qui est la ferrédoxine dans ce cas (équation 14). Cette enzyme est présente chez les bactéries anaérobies strictes telles que *Clostridium* et est inhibée par l'oxygène.



Enfin, la Pfl oxyde directement le pyruvate en formiate et acétyl-CoA (équation 15). Cette enzyme est présente chez *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Clostridium* et est inhibée par l'oxygène. A faible pH, le formiate peut à son tour être converti en CO₂ grâce à la réduction du NAD⁺.



La régénération des transporteurs d'électrons : FADH₂, Fd_{red}, NADH peut notamment dans certains cas produire de l'hydrogène grâce aux hydrogénases. Gonzalez-Cabaleiro *et al.* (2015) ont cependant, reporté que seule l'oxydation de la ferrédoxine est capable de produire de l'hydrogène, lors de sa régénération après avoir effectué la conversion du pyruvate en acétyl-CoA.

Les différents produits dérivés de l'acétyl-CoA sont : l'acétate, le butyrate, l'éthanol, le butanol, l'acétone et l'isopropanol. Les voies acétate et butyrate sont les principales sources de production d'ATP dans les systèmes fermentaires. Les voies butyrate, éthanol et butanol permettent de recycler

les électrons en régénérant le NADH en NAD⁺. La reconsumation du butyrate et de l'acétate en butyryl-CoA et acétyl-CoA, respectivement, permet la production d'acétone via la décarboxylation de l'acétoacétate. La production d'acétone s'accompagne de la production d'éthanol et de butanol dans la solvantogénèse, phénomène observé chez les espèces bactériennes *Clostridium* sp. De plus, certaines d'entre elles, telles que *Clostridium beijerinckii* sont capables de réduire l'acétone en isopropanol, ce qui permet de recycler davantage d'électrons (Survase *et al.*, 2011). La proportion de produits réduits, éthanol et acétate, varie de manière à maximiser la production d'ATP.

La régénération du NADH en NAD⁺ peut s'effectuer à travers différentes voies métaboliques, qui dépendront d'une part de l'énergie produite (ATP), mais également des conditions environnementales, du substrat et des micro-organismes (Cai *et al.*, 2011). Ainsi, le rendement maximal théorique produisant 12 moles d'hydrogène (équation 4) à partir d'une mole de glucose n'est jamais atteint dans les systèmes biologiques *in vivo*. En effet, la production d'hydrogène est systématiquement accompagnée de métabolites produits. Ces contraintes réduisent le rendement d'hydrogène maximum à partir d'hexose à 4 mol/mol (voie acétate) selon les voies métaboliques empruntées.



2.1.3 Les voies métaboliques de production d'hydrogène

Les voies de production d'hydrogène sont fonction de la pression partielle en hydrogène (p_{H_2}) (Angenent *et al.*, 2004). Lorsque la $p_{H_2} < 60$ Pa, l'hydrogène est produit via la voie acétate, grâce à l'oxydation de la ferrédoxine réduite lors de la conversion du pyruvate en acétate, mais également grâce à l'oxydation des NADH produits lors de la conversion du glucose en pyruvate (figure 6). A l'inverse, lors que la $p_{H_2} > 60$ Pa, l'hydrogène est produit via la voie butyrate, uniquement grâce à l'oxydation de la ferrédoxine réduite lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA.

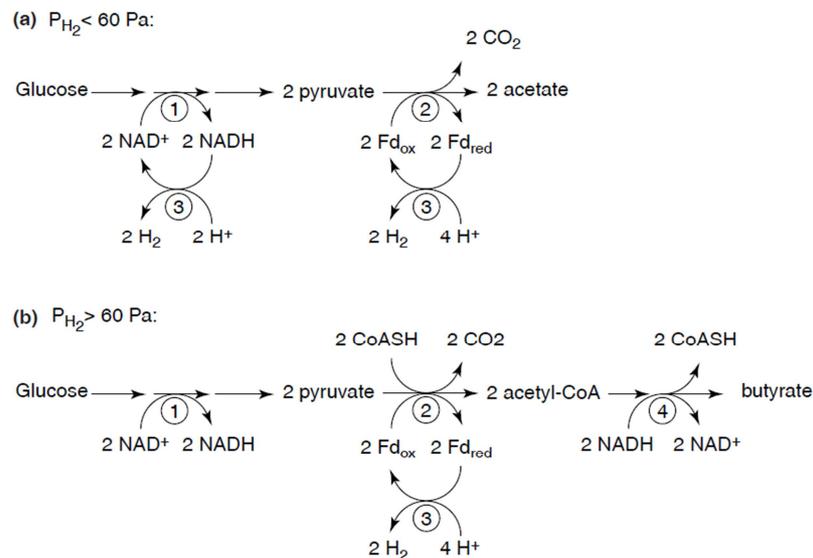


Figure 6 : Voies métaboliques productrices d'hydrogène d'après Angenent *et al.*, 2004.

Les équations globales de production d'hydrogène via les voies acétate (équation 8), butyrate (équation 9) et formiate (équation 16) sont :



La formiate hydrogène-lyase a une activité maximale lorsque le pH est situé entre 5,8 et 6,3 (Axley et al., 1990).

2.1.4 Les micro-organismes hydrogénotrophes et les voies métaboliques associées

Il existe plusieurs types de micro-organismes hydrogénotrophes : les bactéries homoacétogènes, les bactéries sulfate- ou nitrate-réductrices, les archées méthanogènes et les bactéries propioniques.

Les bactéries homo-acétogènes sont anaérobies strictes et produisent de l'acétate à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone (équation 17). Ces micro-organismes ont une croissance rapide et ont la possibilité de former des spores. Les bactéries homo-acétogènes appartiennent aux genres : *Acetobacterium*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* et *Sporomusa*. Ces micro-organismes hydrogénotrophes sont dits facultatifs, c'est-à-dire qu'ils peuvent croître de manière autotrophe à partir de H_2/CO_2 , ou du monoxyde de carbone (CO) et/ou de manière hétérotrophe à partir de composés organiques tels que les sucres, les alcools,... Ils produisent de l'acétate, du lactate, du succinate et de l'éthanol. *Clostridium aceticum* est un exemple d'espèce homo-acétogène. Il n'est pas possible de les inhiber par prétraitement thermique puisque certaines d'entre elles, ont la capacité de sporuler (Saady, 2013). En revanche, diminuer la pression partielle en hydrogène en extrayant les gaz produits est une possibilité de limiter (mais non d'inhiber) les bactéries homo-acétogènes. Un traitement acide peut en revanche les inhiber, mais de façon temporaire.



Les bactéries sulfate-réductrices (SRB) telles que *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus* et *Desulfobotulus*, sont des micro-organismes anaérobies utilisant les réactions de fermentation et acétogènes en plus de la réduction sulfate. En l'absence de sulfate, les SRB croissent grâce à un transfert d'hydrogène inter-espèces par la phosphorylation du substrat avec *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* et *Desulfobotulus*, qui sont très compétiteurs pour l'hydrogène (équation 18). *Desulfovibrio* est un micro-organisme qui domine même en l'absence de sulfate. Cela s'explique par le fait que ces micro-organismes peuvent croître à partir d'une variété de co-produits issus de la fermentation, en les utilisant comme électron donneur alors qu'ils utilisent le sulfate en très faible concentration comme électron accepteur. Certaines SRB ont la capacité de former des spores. C'est le cas de *Desulfotomaculum geothermicum* qui a été retrouvée dans une culture acidogène thermophile.

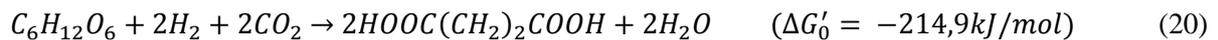


Cette réaction est très exergonique et une concentration très faible d'hydrogène, d'environ 4 mPa est requise pour qu'elle forme du sulfure d'hydrogène (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005). En plus de la consommation d'hydrogène pour sa production, le sulfure d'hydrogène est un gaz très toxique et corrosif. Seule l'utilisation d'un pH inférieur à 6,0 inhibe significativement la respiration sulfate.

Les archées méthanogènes hydrogénotrophes produisent du méthane à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone (équation 19). De nombreux prétraitements permettent d'inactiver ces micro-organismes, notamment le prétraitement thermique qui est le plus utilisé (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005).

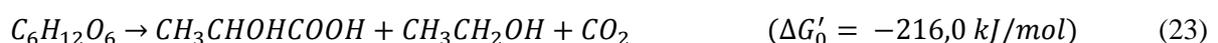


D'autres micro-organismes tels que *Propionibacterium* utilisent la voie acrylate productrice de succinate (équation 20) et/ou de propionate (équation 21), consommant de l'hydrogène. Les bactéries entériques hétéro-fermentaires produisent ces deux métabolites de manière minoritaire en parallèle de l'acétate et de l'éthanol. Le propionate peut également être produit par *Clostridium*. Les *Propionibacterium* sont inactivés par un prétraitement thermique.



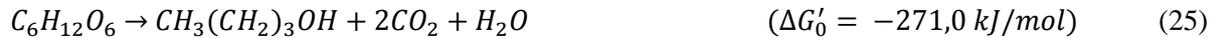
2.1.5 Les bactéries concurrentes à la production d'hydrogène et leurs voies métaboliques

Les bactéries lactiques homo-fermentaires (équation 22) ou hétéro-fermentaires (équation 23) sont concurrentes à la production d'hydrogène. De plus, certaines de ces bactéries lactiques telles que *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentoshensis*, *Enterococcus durans* ont en plus la capacité à produire des bactériocines qui inhibent des bactéries productrices d'hydrogène telles que *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium butyricum*. L'augmentation de 2,3 à 4,4 g/L d'acide lactique diminue de 31 % le rendement en hydrogène (Wang & Zhao, 2009). L'activité des bactéries lactiques peut être limitée par la fermentation thermophile (> 50°C), mais ce n'est pas toujours le cas. En effet, *Bacillus racemilacticus* et *Bacillus myxolacticus* sont des bactéries lactiques retrouvées dans des fermentations thermophiles. De plus, des bactéries lactiques ont été signalées lors de l'utilisation d'une charge organique élevée. Le lactate peut également être produit par *Clostridium* notamment lorsque les hydrogénases sont inhibées par du monoxyde de carbone (CO) pour se régénérer les NADH ou quand les cellules sont dépourvues de fer (Wood, 1986).



L'éthanol et le butanol peuvent être produits (équations 24 et 25) par *Clostridium* notamment lorsque le pH n'est pas régulé. En effet, l'acidité des métabolites (butyrique et acétique) devient toxique

(concentrations de 60 mM) pour les cellules microbiennes (Van Ginkel *et al.*, 2005), ce qui favorise la solvantogénèse, mécanismes de détoxification de la cellule pour éviter les effets inhibiteurs (Jones *et al.*, 1986).

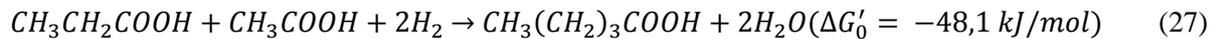


Les bactéries entériques ont également la capacité de produire de l'éthanol.

Sporomusa sont capables de produire de l'acétate homo-fermentaire (équation 26).



Les formations de valérate, d'isovalérate et d'hexanoate (Jeon *et al.*, 2010) ne sont pas à ce jour clairement établies. Certains auteurs attribuent la formation de valérate et d'isovalérate à partir des acides aminés (Woods, 1993) ; d'autres (Thauer, 1977) attribuent la formation de valérate à partir du propionate (équation 27).



Toutes ces voies métaboliques se conjuguent dans un système de cultures mixtes. On distinguera les voies productrices d'hydrogène (acétate et butyrate), de celles consommatrices d'hydrogène (propionate, succinate et potentiellement valérate et succinate) et de celles directement en concurrence avec les voies productrices d'hydrogène (éthanol, butanol, lactate et acétate homo-fermentaire).

3. Améliorations du procédé de fermentation obscure : les micro-organismes

Qu'ils soient responsables de la production d'hydrogène, compétiteurs de la consommation du sucre, ou hydrogénotrophes, les micro-organismes sont les acteurs principaux pouvant jouer un rôle dans l'amélioration du procédé de fermentation obscure.

3.1. Les cultures pures

Une culture pure est définie comme étant l'incubation d'une souche microbienne spécifique dans des conditions stériles (Bader *et al.*, 2010). En fonction des bactéries productrices d'hydrogène utilisées en cultures pures, les performances de production d'hydrogène obtenues seront différentes, de même que les métabolites co-produits.

Elsharnouby *et al.* (2013) ont publié une revue dans laquelle ils ont recensé 195 publications utilisant des cultures pures. Parmi celles-ci, ils ont distingué des bactéries anaérobies strictes, des bactéries aéro-anaérobies facultatives et des bactéries thermophiles et extrémophiles.

Chez les bactéries anaérobies strictes, on retrouve différents genres de bactéries mésophiles appartenant à la classe *Clostridia*. Parmi les espèces appartenant au genre *Clostridium*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. paraputrificum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* sont les plus étudiées pour la production d'hydrogène. Les valeurs de rendements et de productivités en hydrogène obtenues avec ces espèces sont comprises entre 0,6 – 3,35 mol/mol et entre 0,4– 21,3 L/L/jour (0,7 – 36,9 mmol/L/h). Le rendement le plus élevé a été obtenu par *Clostridium* sp. DMHC-10 qui a été isolée d'une boue obtenue par le traitement des déchets d'une distillerie (Kamalaskar *et al.*, 2010). En revanche, la productivité la plus élevée a été obtenue par *Clostridium acetobutylicum* X9 cultivée à partir de cellulose microcristalline (Wang *et al.*, 2008). Les métabolites produits par *Clostridium* sont diverses mais l'acétate et le butyrate sont majoritaires.

Ethanoligenens harbinense est une espèce bactérienne convertissant le sucre en acétate et éthanol, H₂ et CO₂, avec des valeurs de rendement et productivité comprises entre 1,3 – 2,3 mol/mol et entre 1,7 – 19,6 L/L/jour (2,9 – 34,0 mmol/L/h).

Chez les bactéries aéro-anaérobie facultatives, on retrouve les bactéries mésophiles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les espèces *Enterobacter clocae* et *Enterobacter aerogenes* sont très étudiées pour la production d'hydrogène avec des rendements et des productivités en hydrogène compris entre 0,2 – 3,8 mol/mol et 1,3– 15,8 L/L/jour (2,3 – 27,4 mmol/L/h). Les métabolites co-produits à partir des sucres sont variés : acétate, lactate, éthanol (Kumar *et al.*, 2000).

Escherichia coli est également souvent étudiée pour produire de l'hydrogène avec des rendements et des productivités en hydrogène relativement faibles compris entre 0,2 – 1,5 mol/mol, et 0,3 – 0,6 L/L/jour (0,5 – 1,0 mmol/L/h). Les co-produits sont l'éthanol et l'acétate, majoritairement.

Les espèces *Klebsiella pneumoniae* sont moins étudiées mais produisent de l'hydrogène avec un rendement de 1,3 – 1,6 mol/mol et 8,4 – 11,1 L/L/jour (14,6 – 19,2 mmol/L/h).

Les bactéries thermophiles et extrémophiles sont également capables de produire de l'hydrogène avec des rendements et des productivités similaires aux bactéries mésophiles 0,4 – 3,8 mol/mol et 0,6 – 18,3 L/L/jour. Parmi ces espèces, on retrouve *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Thermotoga neopolitana*, *Thermoanaerobacter* sp. et *Clostridium thermocellum*.

L'avantage d'utiliser les cultures pures est la valeur de rendement en hydrogène obtenue qui est proche de celle du rendement théorique *in vivo*. Une des principales raisons avancées est que ce sont des substrats simples qui sont utilisés le plus fréquemment tels que le glucose. En revanche, l'utilisation de cultures pures présente de nombreux inconvénients. En effet, le maintien des conditions d'anaérobiose stricte, pour les bactéries ne tolérant pas l'oxygène, représente un coût dans l'utilisation d'agent réducteur ; mais aussi l'obligation d'utiliser des substrats simples et donc coûteux ; ou bien de maintenir des conditions stériles, qui à grande échelle, représente un coût (Elsharnouby *et al.*, 2013 ; Pachapur *et al.*, 2015).

3.2. Les co-cultures

Une co-culture peut être définie comme l'association de deux ou plusieurs cultures pures (Bader *et al.*, 2010). L'utilisation de co-culture a été motivée par deux facteurs : économique et technique (Elsharnouby *et al.*, 2013). D'un point de vue économique, des co-cultures d'espèces anaérobies strictes et aéro-anaérobies facultatives ont été étudiées afin d'éviter l'utilisation d'agents réducteurs. En effet, les micro-organismes anaérobies strictes sont extrêmement sensibles au dioxygène, qui inhibe les hydrogénases et donc leur capacité à produire de l'hydrogène, d'où la nécessité d'utiliser un agent réducteur coûteux tel que la L-cystéine. Une façon de s'affranchir de l'utilisation d'un agent réducteur est l'utilisation d'une espèce bactérienne aéro-anaérobie facultative ayant la capacité de consommer le dioxygène lorsqu'il est présent dans un milieu. Par exemple, Yokoi *et al.* (1995) ont observé que l'utilisation de la co-culture *Enterobacter aerogenes* et *Clostridium butyricum* permettait non seulement d'atteindre les conditions anaérobies en un temps plus court, grâce à la consommation du dioxygène présent par *Enterobacter aerogenes*, mais en plus de fournir une stabilité au système dans le recouvrement de la production d'hydrogène en cas d'une arrivée d'air inattendue (mauvaise étanchéité). De plus, ces auteurs ont observé une diminution du temps de latence d'un facteur 4 et une augmentation de la production d'hydrogène de 1,75 fois celle de la culture pure *Clostridium butyricum*.

L'association de micro-organismes acidophiles producteurs d'hydrogène avec des espèces bactériennes hautement productrices d'hydrogène, est motivée par un facteur coût et un facteur technique. Lors de la production d'hydrogène, le pH du milieu diminuant fortement avec la co-

production d'acides organiques, jusqu'à une valeur pouvant être inhibitrice pour la bactérie. Ainsi, pour optimiser la production d'hydrogène, le pH du milieu est souvent régulé soit par apport externe de solution basique soit grâce à une solution tamponnée faisant partie intégrante du milieu. De ce fait, associer une levure produisant de l'hydrogène à un pH faible avec une bactérie produisant de manière très efficace de l'hydrogène mais à un pH optimal plus élevé, permet d'optimiser la production d'hydrogène tout en diminuant les coûts. Par exemple, *Enterobacter aerogenes* et *Candida maltosa* ont été associées induisant une légère amélioration de 17 % le rendement en H₂ (passant de 1,87 à 2,19 mol/mol) et de 8 % la productivité en hydrogène (passant de 5,8 à 6,3 L/L/j soit 10,0 à 10,9 mmol/L/h) (Lu *et al.*, 2007).

L'association de micro-organismes dégradant des substrats complexes tels que la cellulose ou des déchets lignocellulosiques, avec des micro-organismes hautement producteurs d'hydrogène permet d'optimiser le procédé en limitant les coûts. En effet, pour que la production d'hydrogène par voie biologique soit économiquement viable, une des clés est le substrat. Comme discuté précédemment, le substrat doit être peu cher, disponible et ne doit pas rentrer en compétition avec le secteur de l'agro-alimentaire. Ainsi, la biomasse lignocellulosique est de plus en plus étudiée pour son utilisation en tant que substrat mais tous les micro-organismes ne sont pas capables de dégrader ces matériaux lignocellulosiques. Ainsi, la possibilité d'associer un micro-organisme capable de cette dégradation avec un autre capable d'utiliser les substrats simplifiés produits pour produire de l'hydrogène est particulièrement intéressante. Par exemple, les associations de *Clostridium acetobutylicum* et *Ethanoligenens harbinense* pour les bactéries mésophiles ont permis d'augmenter le rendement en hydrogène de 2,2 fois (passant de 0,59 à 1,32 mol/mol) (Wang *et al.*, 2008). Parmi les bactéries thermophiles, la co-culture de *Clostridium thermocellum* et *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, a permis d'augmenter d'un facteur 33 la productivité en hydrogène (passant de 0,01 à 0,33 L/L/j) et de 2,25 le rendement en hydrogène (passant de 0,8 à 1,8 mol/mol) (Liu *et al.*, 2008).

Enfin, l'association de micro-organismes dégradant des acides organiques produit par un autre micro-organisme permet de valoriser d'une part les acides organiques produits, et d'autre part, d'améliorer les performances de production d'hydrogène. Par exemple, Masset *et al.* (2012) ont étudié différentes co-cultures de *Clostridium* spp. dont certaines étaient capables non seulement d'utiliser le lactate produit par d'autres mais aussi de reconsommer le formiate produit en hydrogène.

Les co-cultures sont finalement très inspirées des synergies observées dans les cultures mixtes mais avec un meilleur contrôle.

3.3. Les cultures mixtes

Contrairement aux cultures pures ou co-cultures, les cultures mixtes sont définies comme l'incubation de différents micro-organismes qui ne sont pas toujours connus et qui est conduite dans des conditions non stériles (Bader *et al.*, 2010). Les cultures mixtes sont retrouvées dans la nature (sols, boues, compost, sédiments). Dans un habitat, différents micro-organismes peuvent entrer en compétition pour les substrats ou bien agir de manière syntrophique. Certaines bactéries ont développé des mécanismes de défense contre les compétiteurs de substrats. D'un point de vue économique et technologique, il est plus intéressant d'utiliser les cultures mixtes que les cultures pures ou co-cultures (Wang *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2007 ; Temudo *et al.*, 2007). En effet, mis à part le fait que les cultures mixtes contiennent des bactéries productrices d'hydrogène, elles contiennent également d'autres micro-organismes qui participent à l'efficacité de la production d'hydrogène, notamment en réduisant le dioxygène du milieu, en créant des congglomérats, en hydrolysant la matière organique complexe... De plus, une culture mixte peut utiliser un large spectre de substrats tels que les boues de station d'épuration, les eaux usées industrielles, les déjections d'animaux... Enfin, les cultures mixtes sont en général abondantes, disponibles et ne nécessitent pas d'être stérilisées, ce qui participe au fait que le coût est réduit par rapport à une culture pure. Par ailleurs, les cultures mixtes ont une plus grande faculté d'adaptation et sont robustes face aux changements de conditions environnementales, contrairement aux cultures pures ou co-cultures qui sont susceptibles d'être contaminées. Enfin, les cultures mixtes peuvent fournir de nouvelles voies métaboliques permettant de convertir au mieux les substrats complexes en hydrogène (Cheng *et al.*, 2011).

En revanche, l'inconvénient majeur réside dans la composition de ces différents micro-organismes. En effet, tous les micro-organismes présents dans la culture mixte ne coopèrent pas bénéfiquement : certains, peuvent entrer en compétition pour le substrat et utiliser d'autres voies métaboliques que celles productrices d'hydrogène ; d'autres, peuvent consommer l'hydrogène produit. Il devient donc nécessaire d'effectuer un prétraitement sur les cultures mixtes afin d'éviter ces interactions non bénéfiques et favoriser l'émergence des bactéries productrices d'hydrogène (Wang *et al.*, 2009). Enfin, la production d'hydrogène à partir de cultures mixtes peut être représentée comme une « boîte noire » car il est difficile de savoir quel micro-organisme est responsable de la production de tel métabolite selon telle voie. Toutefois, certains auteurs ont étudié la structure, la diversité et les interactions entre les différents micro-organismes des communautés microbiennes retrouvées dans des cultures mixtes (Valdez-Vazquez *et al.*, 2009 ; Hung *et al.*, 2011 ; Cheng *et al.*, 2011 ; Rafrafi *et al.*, 2013).

3.3.1 Les prétraitements

Les principales sources de cultures mixtes sont les boues de station d'épuration, qu'elles proviennent du digesteur anaérobie ou qu'elles soient des boues activées ; les eaux usées issues de différents types d'industrie : laitière, municipale, alimentaire ; le compost ; le sol ; les sédiments (Hawkes *et al.*, 2007 ;

Akutsu *et al.*, 2009 ; Baghchehsaraee *et al.*, 2008 ; Pachapur *et al.*, 2016 ; Vankata Mohan *et al.*, 2008). Les cultures mixtes étant nombreuses et variées, les prétraitements utilisés afin d'inactiver et/ou de limiter les micro-organismes défavorables à la production d'hydrogène tels que les méthanogènes ou homo-acétogènes et de favoriser les bactéries productrices d'hydrogène, sont nombreux. Le prétraitement effectué peut être : physique (rayons gamma, micro-ondes, ultra-sons, ultra-violet, déshydratation), chimique (chloroforme, acétylène, 2-BromoEthaneSulfonate, iodopropane), acide/basique, thermique (à chaud, à froid), gazeux (avec aération, avec CO₂) (Ren *et al.*, 2008 ; Valdez *et al.*, 2006 ; Sinah *et al.*, 2015 ; Singh *et al.*, 2015 ; Yin *et al.*, 2016). Parmi tous ces prétraitements, le prétraitement thermique à chaud est celui le plus utilisé car c'est une méthode simple, efficace et peu chère bien qu'énergivore (Li et Fang, 2007). Le prétraitement thermique permet de favoriser les bactéries productrices d'hydrogène ayant la capacité de sporuler en limitant les bactéries non sporulées productrices de propionate (*Propionibacterium*) (Cohen *et al.*, 1984), mais également en inhibant temporairement les méthanogènes (Kim *et al.*, 2006). En revanche, les bactéries acétogènes et homo-acétogènes (*Acetobacterium*, *Clostridium* spp.), certaines bactéries lactiques (*Sporolactobacillus*) et propioniques (*Clostridium propionicum*) ainsi que les bactéries sulfate-réductrices (*Desulfotomaculum*), ne seront pas inactivées par ce prétraitement (Madigan *et al.*, 2009).

Toutefois, le prétraitement optimal dépend du type de cultures mixtes utilisé (Wang *et al.*, 2009), mais doit également prendre en compte les coûts opérationnels, la faisabilité des méthodes et leurs complexités ainsi que le temps utilisé pour effectuer ces prétraitements (Ghimire *et al.*, 2015).

3.3.2 Les micro-organismes des cultures mixtes

Les bactéries appartenant au genre *Clostridium* sont les micro-organismes les plus retrouvés dans la production d'hydrogène à partir de cultures mixtes. En effet, ceux-ci ont la capacité de sporuler et passer dans une phase de dormance lorsque les conditions ne leur sont pas favorables, par exemple, en présence d'oxygène ou encore pendant le prétraitement thermique, puis à germer et passer sous forme végétative au retour de conditions plus favorables (Setlow, 2003). Les espèces dominantes les plus retrouvées dans les cultures mixtes sont *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium propionicum*.

D'autres micro-organismes tels que *Clostridium* et *Enterobacter* représentant soit des bactéries sous-dominantes soit des populations minoritaires, ne participent pas toujours directement à la production d'hydrogène, mais leur présence au sein de la culture mixte bénéficie à l'espèce productrice d'hydrogène (commensalisme). Certains micro-organismes tels que *Sporolactobacillus racemicus*, *Clostridium butyricum*, *Streptococcus* sp. ont la capacité de produire des substances exopolysaccharidiques formant des agrégats bactériens qui aident à la formation granulaire (Fang *et al.*, 2002 ; Hung *et al.*, 2010). Ceci permet donc une meilleure rétention de la biomasse dans des bioréacteurs fonctionnant en mode continu, ce qui participe indirectement à améliorer les performances de production

d'hydrogène. Dans le cas de *Clostridium butyricum*, c'est la concentration élevée en glucose qui induit la formation d'agrégats. D'autres micro-organismes maintiennent un environnement anoxique. C'est le cas des bactéries aéro-anaérobie facultatives telles que *Klebsiella* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia* sp., *Bacillus* sp. qui en consommant le dioxygène présent dans le milieu permettent aux micro-organismes anaérobie stricte de produire de l'hydrogène (Yokoi *et al.*, 1998 ; Hung *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2010). Certaines espèces microbiennes telles que *Bifidobacterium* sp., *Cytophagales*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellulosi*, *Clostridium stercorarium* peuvent dégrader la matière organique complexe telle que la cellulose ou l'amidon, en monomères simplifiés assimilables notamment par les bactéries productrices d'hydrogène (Ueno *et al.*, 2006 ; Cheng *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2009 ; Nissila *et al.*, 2011). *Selemonas* sp., *Megasphaera* sp., *Anaerotruncus* sp., *Pectinatus* sp., *Acetanaerobacterium elongatum* sont des bactéries potentiellement productrices d'hydrogène pouvant co-exister avec des bactéries du genre *Clostridium* (Luo *et al.*, 2008 ; Castello *et al.*, 2009 ; Ren *et al.*, 2007). *Micrococcus* participe à la production hydrogène (Zhang *et al.*, 2007) mais de manière beaucoup plus faible que *Enterobacter* ou *Clostridium*.

Après avoir présenté plusieurs phénomènes de commensalisme présent dans la production d'hydrogène à partir de cultures mixtes, les interactions suivantes impactent négativement sur la production d'hydrogène. C'est le cas de *Lactobacillus* sp. et *Sporolactobacillus* sp. qui sont capables d'excréter des bactériocines dans le milieu, ce qui peut provoquer une réorientation du métabolisme microbien des bactéries productrices d'hydrogène voir même une inhibition de leur croissance. *Schwartzia succinivorans* et *Megasphaera sueciensis* quant à elles, sont consommatrices de l'hydrogène produit (Kawagoshi *et al.*, 2005 ; Saraphirom *et al.*, 2010 ; Koskinen *et al.*, 2007). Le potentiel de production d'hydrogène peut être affecté par des bactéries compétitrices pour le substrat. Ainsi, *Bacillus racemilacticus* consomme les sucres pour produire du lactate (Kim *et al.*, 2006) ; *Lactococcus* sp. semble inhiber la production d'hydrogène en produisant de l'éthanol (Ren *et al.*, 2007) ; *Prevotella* sp., *Olsenella* sp., *Bulleidia* sp., *Mitsoukella* sp., *Selemonas* sp. peuvent être considérées comme compétiteurs au niveau du substrat (Lin *et al.*, 2010 ; Castello *et al.*, 2009).

Pour des raisons techniques de robustesse et d'adaptabilité des micro-organismes à des substrats complexes, notre choix s'est porté sur l'utilisation de cultures mixtes dans nos études.

4. Améliorations du procédé de fermentation obscure : le bioprocédé

4.1. Le mode de fonctionnement et le type de bioréacteur

Le mode de fonctionnement et le type de réacteur sont des paramètres fondamentaux à ne pas négliger car ils peuvent considérablement optimiser la production d'hydrogène en termes de production, rendement, productivité en hydrogène et également de rapport H_2/CO_2 . En effet, la configuration du bioréacteur joue un rôle primordial dans la répartition de la biomasse microbienne, de la répartition et de l'utilisation du substrat. Le transfert de matière du biogaz produit de la phase liquide à la phase gazeuse est également un paramètre à prendre en compte dans le design du bioréacteur. En effet, plus le transfert de l'hydrogène du milieu liquide au milieu gazeux est rapide et moins l'hydrogène sera consommé ou deviendra inhibiteur. La stabilité du système est un critère indispensable dans le choix de la configuration du bioréacteur. La diversité microbienne est enfin fortement influencée par le type de bioréacteur.

Il existe trois différents modes de fonctionnement des bioréacteurs : le mode discontinu (batch), semi-continu (semi-batch) et le mode continu.

Les bioréacteurs fonctionnant **en mode batch** ou bioréacteurs discontinus sont des bioréacteurs qui ne sont alimentés qu'une seule fois, c'est-à-dire, que le substrat et l'inoculum sont disposés à l'intérieur du bioréacteur, et le bioréacteur est fermé sous agitation. Le biogaz produit reste dans le ciel gazeux. L'avantage de ce type de bioréacteur réside dans sa simplicité de mise en œuvre, de fonctionnement et de contrôle (Wang *et al.*, 2009 ; Jung *et al.*, 2011) mais également sa flexibilité (Elsharnouby *et al.*, 2013). L'inconvénient de ce mode de fonctionnement est que l'hydrogène produit n'est pas extrait du bioréacteur. Ainsi, l'hydrogène produit peut être reconsommé par les micro-organismes hydrogénotrophes, malgré les éventuels prétraitements reçus par les cultures mixtes, et/ou augmenter la pression partielle en hydrogène ce qui peut inhiber les hydrogénases. Les performances de production d'hydrogène en bioréacteur fonctionnant en mode batch, ne sont donc pas optimales. Ces éléments sont en faveur du développement d'études sur l'extraction des gaz produits ; on peut parler alors de bioréacteur fonctionnant en mode semi-batch.

Les bioréacteurs fonctionnant en **mode semi-batch** sont fondés sur le fonctionnement des bioréacteurs en mode batch hormis l'extraction des gaz produits en cours de fermentation. Pour ce faire, un gaz inerte généralement l'azote, bulle dans le milieu liquide réactionnel, ce qui permet d'assurer non seulement les conditions anaérobies mais aussi d'extraire les gaz produits. Ce système permet d'améliorer les performances de production d'hydrogène (Mizuno *et al.*, 2000 ; Liang *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006 ; Clion *et al.*, 2014). Il est généralement utilisé dans des études d'optimisation des paramètres opératoires tels que la température, le pH, la vitesse d'agitation ou dans les études de comparaison de biomasses, de substrats ou d'inocula. Malgré les avantages considérables des modes

de fonctionnement en batch ou semi-batch des bioréacteurs, le mode de fonctionnement continu est le plus adapté pour la production d'hydrogène à grande échelle non seulement pour des considérations pratiques telles que la gestion de la biomasse, mais également pour une faisabilité économique (Wang *et al.*, 2009 ; Ntaikou *et al.*, 2010 ; Guo *et al.*, 2010).

Ainsi, les bioréacteurs fonctionnant en **mode continu** sont les bioréacteurs les plus utilisés. En effet, ce système peut améliorer les performances de production d'hydrogène pour plusieurs raisons. D'une part, l'alimentation continue en substrat et en inoculum permet le maintien d'une biomasse productive. En effet, le fait de renouveler le substrat permet à la biomasse de continuer sa croissance, tout en éliminant la biomasse épuisée, mais également, le milieu épuisé en sucres et les éventuels inhibiteurs (métabolites, toxines, antibiotiques, produits de dégradation de substrats complexes). Il est possible de classer les bioréacteurs fonctionnant en mode continu en deux catégories : les bioréacteurs à biomasse suspendue (**Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR**) et les bioréacteurs à biomasse immobilisée (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket reactor, Packed Bed Reactor et Anaerobic Fluidized Bed Reactor, Membrane BioReactor).

Le bioréacteur ouvert agité continu (**CSTR**) est le plus simple à mettre en œuvre et le plus utilisé (Li *et al.*, 2007 ; Younesi *et al.*, 2008 ; Ding *et al.*, 2010). L'avantage de ce type de bioréacteur est qu'il permet la mise en suspension de la biomasse et l'homogénéité du milieu en termes de température et pH (Li *et al.*, 2007). En général, l'inoculum est mélangé au substrat utilisé, ce qui induit donc un même temps de rétention, ce qui n'est pas toujours favorable pour la production d'hydrogène (Li *et al.*, 2007). Un temps de séjour trop court, peut lessiver la biomasse productrice d'hydrogène et gaspiller du substrat qui ne sera pas entièrement consommé, alors qu'un temps de séjour trop long mène à l'autolyse des cellules productrices d'hydrogène et l'épuisement du substrat. Ces deux inconvénients conduisent à une instabilité du système et à des vitesses de production d'hydrogène et volumes d'hydrogène produit limités (Chen, 2003). Lors de fermentations réalisées en bioréacteurs CSTR, les bactéries productrices d'hydrogène peuvent flocculer et créer des granules. Ce phénomène est favorisé par la présence de cations divalents et d'une concentration élevée de sucres (Jung *et al.*, 2011). De plus, certaines conditions facilitent la création de ces granules, telles que l'acidification du milieu (Zhang *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2007) et Fang *et al.* (2002) ont observé que la formation de granules permettait d'augmenter la concentration de la biomasse dans le bioréacteur d'un facteur 30, une augmentation de la productivité, du volume d'hydrogène produit et du rendement en résulterait. Cette rétention de la biomasse permet ainsi de découpler le temps de séjour hydraulique avec le temps de rétention des solides, ce qui a pour conséquence la possibilité de jouer sur le paramètre du temps de séjour pour optimiser le procédé sans se soucier du lessivage de la biomasse.

Les bioréacteurs anaérobie à flux ascendant (**Up-flow Anaerobic Sludge Blanket reactor, UASB**) permettent la rétention de la biomasse. La biomasse bactérienne est en suspension grâce au flux de

substrat ascendant à faible vitesse. Puis, cette biomasse s'auto-granule et produit du biogaz. Les granules ayant atteint une taille optimale sédimentent dans le bas du réacteur et constitue le lit. Les nouvelles particules bactériennes qui s'agrègent (au-dessus de ce lit) et produisent du biogaz sont mis en mouvement notamment grâce aux collisions particules-particules et au biogaz produit (Bhunia *et al.*, 2008). Ce dernier est collecté en haut du réacteur. L'avantage de ce type de réacteur est sa stabilité dans le temps à convertir efficacement le substrat en hydrogène à des productivités stables (Hawkes *et al.*, 2007 ; Jung *et al.*, 2011 (tableau 1)). L'inconvénient est la chronophagie de la formation des granules.

Tableau 1 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir de différents bioréacteurs.

Bioréacteur	Substrat	HRT	pH	Température	Rendement	Productivité	Références
CSTR	CDMW	12-6 h	5,5	35°C	0,32 mol/mol	0,34 L/L/h	Jung <i>et al.</i> , 2010
UASB	CDMW	12-6 h	-	35°C	1,78 mol/mol	2,76 L/L/h	Jung <i>et al.</i> , 2010
UASB	Glucose	5 h	5,2-5,5	35°C	1,54 mol/mol	0,32 L/L/h	Jung <i>et al.</i> , 2013
UASB	Glucose	24-12 h	-	37°C	1,44 mol/mol	0,12 L/L/h	Si <i>et al.</i> , 2015
PBR	Glucose	24-12 h	-	37°C	0,67 mol/mol	0,05 L/L/h	Si <i>et al.</i> , 2015
AFBR	Glucose	8-1 h	-	30°C	2,76 mol/mol	1,21 L/L/h	Barros <i>et al.</i> , 2010
AFBR	Glucose	8-1 h	-	23°C	2,11 mol/mol	0,55 L/L/h	Barros <i>et al.</i> , 2012
AFBR	Glucose	8-1 h	-	30°C	2,45 mol/mol	0,95 L/L/h	Shida <i>et al.</i> , 2012

CDMW* : Coffee Drink Manufacturing Wastewater

Le bioréacteur à lit fixe (**Packed Bed Reactor, PBR**) met en œuvre une biomasse immobilisée sur un support soit sous forme de granules ou de biofilm, ou bien piégée dans un milieu garni (Kothari *et al.*, 2012), traversée par un flux entrant. Les supports utilisés sont variés (éponge, charbon actif, gel d'alginate, bille de céramique,...). Ce type de bioréacteur retient la biomasse, ce qui diminue le lessivage à un temps de séjour court (Keskin *et al.*, 2012). En revanche, la configuration de ce type de bioréacteur augmente la résistance au transfert de matière, ce qui résulte en de faibles conversions du substrat et volumes d'hydrogène produit (Show *et al.*, 2011), par rapport à l'UASB comme montré par Si *et al.*, (2015) (tableau 1).

Le bioréacteur à lit fluidisé (**Anaerobic Fluidized Bed Reactor, AFBR**) consiste en une colonne garnie d'un support mis en suspension par un flux liquide (fluidisation). Selon le débit entrant, les particules forment un lit plus ou moins dense se comportant comme un milieu poreux. Lorsque le débit entrant est faible, le lit reste compact, on parle de lit fixe. En revanche, plus le débit est élevé et plus le lit est fluidisé. La biomasse forme un biofilm sur les supports solides (garnissage) (Zhang *et al.*, 2008 ; Barros *et al.*, 2010), similaires à ceux utilisés dans les PBR. La réduction de lessivage de micro-organismes à des temps de séjour courts constitue le principal avantage et participe à l'augmentation de la production d'hydrogène (tableau 1).

La rétention de la biomasse microbienne peut se faire sur une membrane, on parle alors de bioréacteur membranaire (**Membrane BioReactor, MBR**). Il y a deux types de MBR : le bioréacteur à membrane

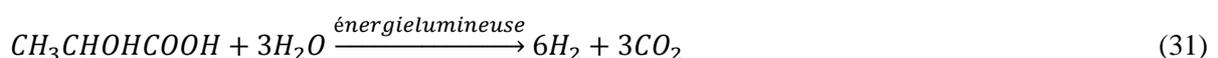
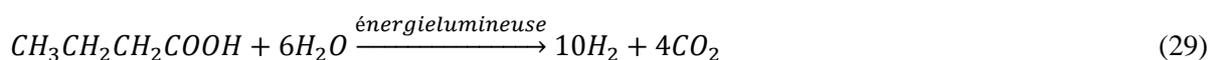
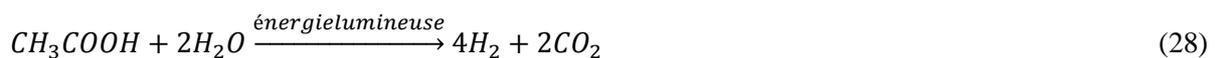
externe (*ex situ*) et le bioréacteur à membrane immergée (*in situ*). L'avantage de ce dernier MBR est la capacité à maintenir une concentration élevée de la biomasse à de courts temps de séjour par la formation d'un biofilm sur la membrane, il en résulte une consommation plus élevée du substrat et une réduction des micro-organismes dans l'effluent liquide sortant liée à la rétention des bactéries par les membranes (Oh *et al.*, 2004). La possibilité d'appliquer un long temps de rétention pour les solides et un court temps de séjour hydraulique est connue pour améliorer l'efficacité de la production d'hydrogène (Hafez *et al.*, 2009) avec toutefois, un effet inverse parfois observé, provoquant une diminution des performances de production d'hydrogène (Lee *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2011). De plus, le temps de rétention des solides est également corrélé avec l'accumulation d'exopolysaccharides (biofilm), responsable du colmatage des membranes (Galluci *et al.*, 2013 ; Lin *et al.*, 2013) limitant l'utilisation de ce type de bioréacteur (Lee *et al.*, 2010 ; Bakyoni *et al.*, 2014).

La simplicité de mise en œuvre du bioréacteur semi-batch permettant à la fois d'assurer les conditions anaérobies tout en extrayant les gaz produits ainsi que la facilité de contrôle des paramètres clés, ont orienté notre choix, qui s'est porté sur l'utilisation d'un bioréacteur en mode semi-batch dans nos études.

4.2. La combinaison de bioprocédés

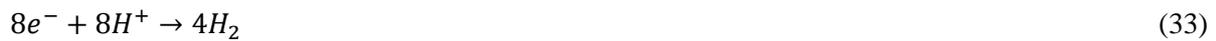
La fermentation obscure ne permettant pas de convertir totalement le substrat et produisant en revanche, de nombreux co-produits, ce bioprocédé peut être économiquement amélioré. Il est possible d'utiliser au mieux la biomasse organique en combinant la fermentation obscure avec un autre bioprocédé producteur d'hydrogène, telle que la photo-fermentation, les cellules d'électrolyse microbienne, ou bien producteur de méthane, telle que la digestion anaérobie.

Comme cela a été décrit dans le paragraphe 1.3.4., le principe de **la photo-fermentation** est le suivant : les bactéries pourpres non soufrées utilisent l'énergie lumineuse capturée pour produire de l'ATP et des électrons à haute énergie via un flux inverse d'électrons qui réduit la ferrédoxine. L'ATP produit et la ferrédoxine réduite conduisent à la réduction de protons en hydrogène via la nitrogénase. L'intérêt de la photo-fermentation est que les micro-organismes peuvent utiliser des substrats variés tels que ceux produits par la fermentation obscure (équations 28 à 31) et les convertir avec des rendements élevés.



La combinaison de la fermentation obscure suivie de la photo-fermentation permet d'augmenter considérablement le rendement en hydrogène. Par exemple, Su *et al.*, (2009) ont obtenu un rendement total de 5,48 mol/mol alors qu'il n'était que de 1,32 mol/mol avec la fermentation obscure seule. L'inconvénient de la photo-fermentation est la demande énergétique lumineuse associée à la nitrogénase dont la conversion n'est pas efficace. De plus, la turbidité du milieu diminue la pénétration de la lumière, ce qui augmente encore davantage la demande en énergie lumineuse. Par ailleurs, pour mener à bien la photo-fermentation, l'absence de dioxygène et de faibles concentrations en ammoniac sont requises. Des améliorations du procédé photofermentaire sont nécessaires afin de surpasser ces difficultés.

La cellule d'électrolyse microbienne (Microbial Electrolysis Cell, MEC) met en œuvre des micro-organismes qui oxydent l'acétate dans le compartiment de l'anode, grâce à un circuit électrique fournissant l'énergie nécessaire. Les électrons générés sont transférés par le circuit électrique au compartiment de la cathode, pendant que les protons traversent la membrane échangeuse d'ions qui sépare les deux compartiments. Dans le compartiment de la cathode, les électrons réduisent les protons en hydrogène (équations 32 et 33).



La combinaison de la fermentation obscure avec la MEC permet d'augmenter le rendement en hydrogène. Par exemple, Lalaurette *et al.* (2009) ont obtenu un rendement total de 9,95 mol/mol, alors qu'il n'était que de 1,64 mol/mol avec la fermentation obscure seule. L'inconvénient de cette combinaison est le développement des archées méthanogènes, ce qui affecte négativement la production d'hydrogène.

Le dernier procédé qui peut être utilisé à la suite des deux précédents est **la digestion anaérobie** car il permet de valoriser au maximum les co-produits, non pas en hydrogène mais en méthane. A la différence de la fermentation obscure, la digestion anaérobie ne s'arrête pas à l'étape de production d'hydrogène mais continue jusqu'à la méthanogénèse. Dans le cas de la combinaison des deux procédés, ce sont les acides organiques co-produits par la fermentation obscure qui seront convertis en méthane par la méthanogénèse. L'avantage est que l'abattement de la DCO est total. L'inconvénient est que la digestion anaérobie n'augmente pas le rendement en hydrogène mais produit cependant du méthane valorisable énergétiquement.

La figure 7 résume les différents procédés permettant d'améliorer les rendements en hydrogène et la production de bioénergie.

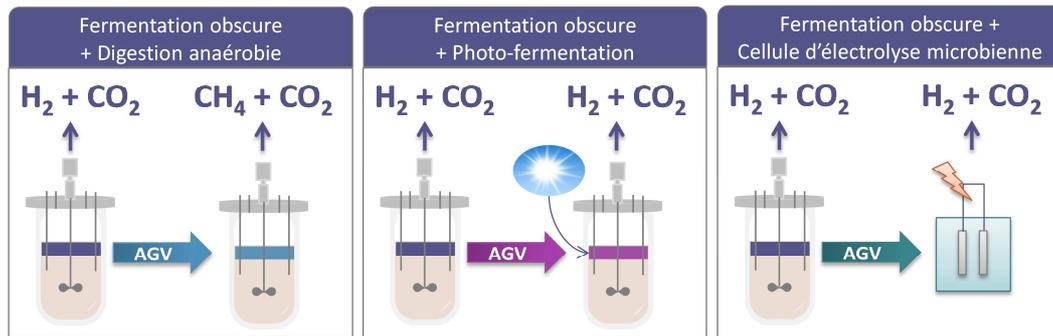


Figure 7 : Les différents procédés d'amélioration du rendement en hydrogène et de la production de bioénergie.

4.3. La valorisation des co-produits

A l'issue de la fermentation obscure ou de la combinaison des bioprocédés, une ultime valorisation s'inscrit dans le concept de bioraffinerie : c'est la valorisation des co-produits de fermentation. En effet, même si cette valorisation ne permet pas l'amélioration de rendement énergétique, elle participe à la production de composés biosourcés. Parmi tous les acides organiques (acétique, butyrique, propionique, succinique, lactique, formique, valérique et hexanoïque) et les alcools (éthanol, butanol, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol,...) pouvant être produits par fermentation, l'acide acétique et l'acide butyrique sont actuellement produits par l'industrie pétrochimique et sont utilisés comme précurseurs pour de nombreux produits dérivés tels que l'acétate de vinyle ou le poly-3-hydroxybutyrate (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015).

5. Améliorations du procédé de fermentation obscure : les facteurs abiotiques

Se dit facteur abiotique, tout paramètre physico-chimique indépendant des micro-organismes. Dans un milieu naturel, les conditions environnementales sont des facteurs abiotiques.

5.1. HRT, SRT, SLR et OLR

Ces quatre paramètres sont utilisés lorsque le bioréacteur fonctionne en mode continu.

Le temps de séjour hydraulique (HRT) est le temps moyen qu'une molécule liquide (ou entraînée par le liquide) reste dans le bioréacteur, depuis son entrée jusqu'à sa sortie. Le temps de séjour hydraulique est défini comme étant le rapport volume de bioréacteur/débit volumique traversant le bioréacteur. Etant donné que les taux de croissance diffèrent d'un micro-organisme à un autre, les bioréacteurs CSTR peuvent sélectionner les populations microbiennes qui ont un taux de croissance supérieur au taux de renouvellement du milieu réactionnel. Dans le cas contraire, les populations microbiennes sont lessivées. Par exemple, le taux de croissance spécifique des archées méthanogènes est environ de $0,017-0,020 \text{ h}^{-1}$ alors que celui des bactéries productrices d'hydrogène est d'environ $0,083-0,172 \text{ h}^{-1}$ (Lo *et al.*, 2009). Ainsi, à un temps de séjour court (entre 6 et 12 h), la production d'hydrogène sera plus élevée qu'à un temps de séjour long où la croissance des archées méthanogènes sera favorisée.

Il n'existe pas de valeur universelle de temps de rétention de la biomasse car celui-ci dépend à la fois de la géométrie du réacteur, de l'inoculum, des différents supports utilisés ou non pour immobiliser les bactéries, mais également du type de substrat utilisé (Wang *et al.*, 2009). Dans les bioréacteurs à biomasse immobilisée (AFBR, PBR, MBR) ou bien lorsque la biomasse microbienne forme des granules (UASB), le temps de rétention de la biomasse (**Solid Retention Time, SRT**) est découplé du temps de séjour hydraulique. Dans ces systèmes, le temps de rétention de la biomasse est beaucoup plus élevé que dans les systèmes CSTR, ce qui permet non seulement d'éviter le lessivage de la biomasse microbienne, mais en plus d'adapter le temps de séjour hydraulique du substrat. En revanche, un SRT trop élevé favorise l'installation de micro-organismes consommateurs d'hydrogène et ceux compétiteurs pour le substrat (Wang & Zhao, *et al.*, 2009).

OLR (Organic Loading Rate) est la quantité massique de matière organique par unité de volume de bioréacteur, pouvant être convertie sur une période donnée (kg DCO/L/h). **SLR (Sludge Loading Rate)** est la quantité massique de matière organique soumise à la biomasse bactérienne sur une période donnée (kg DCO/kg VSS/h). C'est ce dernier paramètre qui détermine le fonctionnement du bioréacteur, bien que très peu renseigné dans la littérature en faveur du paramètre OLR qui est plus facilement quantifiable (Arimi *et al.*, 2015). La valeur optimale de l'OLR dépend de plusieurs facteurs tels que le SLR, le pH, les co-produits, le type et la concentration du substrat, mais aussi la température et le type de réacteur. Ainsi, l'OLR peut influencer à la fois la productivité en hydrogène

mais également le rendement en hydrogène et la structure des populations microbiennes. En effet, Hafez *et al.* (2010) ont montré qu'à des valeurs de 6,5 et 25,7 g DCO/L/j, l'analyse des populations microbiennes a montré une prédominance des bactéries productrices d'hydrogène : *Clostridium acetobutyricum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium butyricum* et *Clostridium pasteurianum*. En revanche, à des valeurs très élevées d'OLR (154 et 206 g DCO/L/j), il y a eu un changement de structure de populations microbiennes avec la co-présence de bactéries non productrices d'hydrogène telles que *Lactococcus sp.* et *Pseudomonas sp.*

L'optimisation des différents paramètres HRT, SRT, OLR et SLR en fonctionnement continu est à prendre en considération pour optimiser les performances de production d'hydrogène car ces paramètres optimisés sont propres à chaque fermentation dont le type de bioréacteur, le substrat et/ou l'inoculum utilisés peuvent différer.

5.2. La température et le pH

La température et le pH sont les paramètres les plus importants de la fermentation car ce sont eux qui impactent le plus les bactéries, aussi bien au niveau de leur croissance qu'au niveau de leur métabolisme et expression enzymatique (Dabrock *et al.*, 1992 ; Fang *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2011).

En condition anaérobie, les bactéries productrices d'hydrogène peuvent croître à différentes températures : entre 25 et 40°C pour les micro-organismes mésophiles, entre 40 et 65°C pour ceux thermophiles, entre 65 et 80°C pour les extrémophiles, et supérieures à 80°C pour les hyperthermophiles (Levin *et al.*, 2004).

La fermentation mésophile (30-40°C) est en général la plus employée car sa dépense énergétique est plus faible. De plus, nombreux sont les micro-organismes mésophiles présents dans la nature (Madigan *et al.*, 2012). Une étude réalisée sur les cultures mixtes mésophiles (Mu *et al.*, 2006), a montré que le rendement en hydrogène augmentait d'un facteur 1,7 (de 0,97 à 1,67 mol/mol) en passant d'une température de 33°C à 41°C, mais que la production d'hydrogène spécifique augmentait (de 2112 à 3922 mL/g_{biomasse sèche}/j soit de 3,7 à 6,8 mmol/g_{biomasse sèche}/h) en passant d'une température de 33°C à 39°C. Au-delà de 39°C, les enzymes microbiennes se dénaturent, et une température supérieure à 41°C peut causer le déclin des micro-organismes.

La fermentation thermophile est néanmoins de plus en plus utilisée en raison de l'obtention de performances de production d'hydrogène plus élevée. Lorsque le substrat utilisé est complexe, la fermentation thermophile est avantageuse car une température plus élevée favorise l'hydrolyse des substrats complexes, ce qui les rend plus disponibles (solubles) pour la biomasse bactérienne et améliore ainsi la production d'hydrogène. Toutefois, cela peut également libérer des inhibiteurs qui impacteront alors négativement les performances de production d'hydrogène. Par ailleurs, les

températures thermophiles empêchent la croissance des méthanogènes hydrogénotrophes. De plus, les micro-organismes thermophiles sont plus tolérants aux fortes pressions partielles d'hydrogène. Des résultats contradictoires sont obtenus concernant la productivité. Certains auteurs (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005) ont observé des vitesses de production plus élevées en fermentation thermophile que mésophile, tandis que d'autres (Wang *et al.*, 2008) ont observé l'inverse justifiant que la croissance bactérienne étant limitée à haute température, la productivité restait faible.

La température joue également un rôle au niveau du métabolisme. Différentes redirections du métabolisme microbien ont été observées dans la littérature en fonction de la température appliquée. En effet, Valdez-Vazquez *et al.* (2005) ont montré que le butyrate était majoritaire à 37°C et l'acétate à 55°C avec une production plus élevée d'éthanol et de propionate. Yu *et al.* (2002) ont reporté que l'acétate était majoritaire à 20°C mais diminuait à 55°C, pour laquelle les productions de butyrate, de propionate et d'éthanol étaient plus élevées. Mu *et al.* (2006) ont observé que plus la température de fermentation était élevée et plus la voie productrice de butyrate était favorisée au détriment de la voie productrice d'éthanol ; ce qui par conséquent, améliorait le rendement en hydrogène.

Le pH est un autre paramètre clé de la fermentation obscure car il a un impact déterminant non seulement, sur la croissance bactérienne et la synthèse d'enzymes, mais aussi sur l'activité enzymatique, le potentiel d'oxydo-réduction, le réseau métabolique, la population bactérienne dominante et la biodisponibilité du substrat (Dabrock *et al.*, 1992 ; Lay, 2000 ; Fang *et al.*, 2002 ; Guimire *et al.*, 2015 ; Sinha *et al.*, 2016).

La plupart des bactéries productrices d'hydrogène (*Clostridium*, bactéries entériques) sont neutrophiles, c'est-à-dire, que leur pH optimal de croissance se situe entre 5,5 et 8,0 (Madigan *et al.*, 2012). Le pH optimal de croissance étant propre à chaque micro-organisme, il n'existe pas de valeur universelle, et c'est d'autant plus vrai dans les cultures mixtes car plusieurs micro-organismes co-existent. Nombreuses sont les enzymes impliquées dans la production d'hydrogène. Pour que ces enzymes aient une activité maximale, il est nécessaire qu'elles soient à un pH optimal. Andersch *et al.* (1983) ont montré que l'activité *in vivo* des hydrogénases d'une culture acidogène maintenue à pH 5,8 était 2,2 fois supérieure à celle d'une culture maintenue à pH 4,5. Lorsque le pH est trop faible, l'activité de l'hydrogénase est inhibée. La production d'hydrogène étant toujours accompagnée de la production d'acides, le pH du milieu diminue au cours de fermentation. Il est donc nécessaire de réguler le pH avec des solutions basiques pour maintenir une productivité et un rendement en hydrogène élevés. Dans la littérature aucun auteur n'a étudié l'influence du pH initial sur la fermentation avec un pH opératoire régulé. Soit les auteurs se sont intéressés à l'influence du pH initial sur la fermentation dont le pH opératoire n'est pas contrôlé, soit ils ont étudié l'effet du pH opératoire sur la fermentation. Le pH optimal opératoire pour la production d'hydrogène est en général compris entre 5,0 et 6,5 (Khanal *et al.*, 2004 ; Kawagoshi *et al.*, 2005 ; Hawkes *et al.*, 2007).

Cependant, il arrive que certaines études aient obtenu un pH optimal à 4,5 (Bastidas *et al.*, 2012). La large gamme de pH optimaux est notamment due à la différence de substrat. Le pH optimal pour les substrats simples est situé entre 5,0 et 6,0 (Li & Fang, 2007). Le pH optimal utilisé pour des substrats agro-industriels est compris entre 4,5 et 7,0 alors qu'il est compris entre 6,5 et 7,0 pour des substrats lignocellulosiques, ou encore à pH 7,0 pour des substrats de type fumier/lisier (Guimire *et al.*, 2015). Par ailleurs, le choix du pH influe sur l'orientation métabolique. Un pH inférieur ou égal à 4,5 induit un transfert du métabolisme vers la solvantogénèse (Van Ginkel *et al.*, 2005). Oh *et al.* (2003) ont observé un transfert du métabolisme vers la production d'éthanol à un pH inférieur à 5,6. Fang et Liu (2002) ont montré que la production d'acétate était favorisée à un pH de 6,5 alors que celle de butyrate était favorisée à un pH inférieur à 6,0. Liu *et al.* (2006) ont montré que la production d'acétate était optimale à un pH de 5,2 mais que contrairement à Fang et Liu (2002), le butyrate s'accumulait en dessous d'une valeur de pH de 4,8. La production de propionate augmente à des valeurs de pH supérieures ou égales à 7-8 d'après Horiuchi *et al.* (2002) ou 5-6 d'après Hwang *et al.* (2004). Enfin, l'acide formique produit augmente à un pH supérieur à 5,5, alors qu'il est décomposé en hydrogène et dioxyde de carbone à un pH inférieur à 5,5 (Temudo *et al.*, 2007). De plus, le pH peut influencer la diversité microbienne. Ainsi, l'activité méthanogénique est inhibée lorsque le pH est compris entre 5,2 et 5,6 (Li & Fang, 2007). Zoetemeyer *et al.* (1982) ont montré qu'un pH supérieur à 7,0 favorisait l'homo-acétogénèse.

Les valeurs de températures et de pH optimales diffèrent donc d'une étude à l'autre, c'est pourquoi il est nécessaire d'étudier ces deux paramètres à chaque nouveau changement apporté à la fermentation, que ce soit en termes de substrat, d'inoculum, et de configuration du bioréacteur.

Notre étude s'est portée sur l'impact du pH initial, ainsi que du pH de régulation sur les performances de production d'hydrogène dans des conditions de températures mésophiles.

5.3. La pression partielle dans la phase gazeuse et la concentration en gaz dissous

Lors de la fermentation obscure, la production d'hydrogène et de dioxyde de carbone génère la sursaturation de ces gaz dans le milieu liquide qui favorise la formation de bulles de gaz diffusant vers la phase gazeuse (Pauss *et al.*, 1990 ; Kraemer *et al.*, 2004). Cette sursaturation en hydrogène dissous et la pression partielle en hydrogène conditionne thermodynamiquement les réactions de production d'hydrogène grâce aux transporteurs d'électrons et aux hydrogénases (Tanisho *et al.*, 1998 ; Mizuno *et al.*, 2000 ; Hallenbeck, 2005). Angenent *et al.* (2004) estiment que la pression partielle en hydrogène ne doit pas dépasser 0,3 bar lorsque la ferrédoxine réduite est oxydée libérant de l'hydrogène ; 0,6 bar lorsque le transporteur d'électron NADH est oxydé en NAD⁺. Certains auteurs (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012) constatent que la valeur maximale à atteindre pour que la production d'hydrogène soit possible est beaucoup plus faible : 0,03 bar ; alors que d'autres considèrent que la limite maximale doit être encore inférieure : 0,001 bar (Hallenbeck, 2009).

Un certain nombre de techniques ont été développées afin de faciliter le transfert d'hydrogène de la phase liquide vers la phase gazeuse. Lay *et al.* (2000) ont notamment étudié l'influence de l'agitation sur la production d'hydrogène, ce qui leur a permis d'optimiser le rendement en hydrogène de 0,74 à 1,70 mol/mol d'hexoses en passant d'une agitation de 100 tr/min à 500 tr/min. L'utilisation d'une membrane perméable à l'hydrogène, placée en série avec le bioréacteur a permis d'améliorer le rendement de 4,68 à 5,14 mmol H₂/g glucose (0,84 à 0,92 mol/mol) en réduisant la pression partielle en hydrogène du milieu (Liang *et al.*, 2002).

Enfin, l'utilisation d'un gaz de balayage inerte bullant dans le milieu liquide permet également de faciliter le transfert d'hydrogène des phases liquide à gazeuse, en plus qu'il permet de diluer l'hydrogène produit, ce qui permet d'augmenter considérablement le rendement en hydrogène (Tanisho *et al.*, 1998). Mizuno *et al.* (2000) ont réussi à passer d'un rendement de 0,85 mol/mol à 1,43 mol/mol en utilisant un flux d'azote à 15 mL/min/L. Kraemer & Bagley (2008) ont également doublé leur rendement en hydrogène atteignant 2,00 mol/mol en utilisant un flux d'azote optimisé à 13 mL/min/L. Enfin, Bastidas *et al.* (2012) ont obtenu une amélioration de rendement de 1,00 à 3,25 mol/mol en utilisant un flux d'azote à 40,6 mL/min, non pas bullé dans la phase liquide mais dans le ciel gazeux. Kim *et al.* (2006) ont quant à eux, utilisé un flux de dioxyde de carbone 60 mL/min/L qui a permis d'améliorer le rendement en hydrogène en passant de 0,77 mol/mol à 1,68 mol/mol. L'inconvénient de cette méthode est la dilution de l'hydrogène produit qui nécessitera une énergie plus importante pour sa purification ultérieure (Latrille *et al.*, 2011).

Mis à part le fait que la réduction de la pression partielle en hydrogène améliore les rendements en hydrogène, la composition des gaz produits influence le métabolisme (Tanisho *et al.*, 1998). Bastidas *et al.* (2012) ont observé que la lactate hydrogénase, la NADH hydrogénase et les réactions d'homoacétogénèse sont impactées par de faibles pressions partielles. L'homoacétogénèse est défavorable à des pressions partielles inférieures à 0,02 bar et à des concentrations en acétate supérieures à 10 mM. La production d'hydrogène via l'oxydation du NADH n'est pas favorable à des pressions partielles supérieures à 0,4 bar, c'est-à-dire, lorsqu'il n'y a pas de flux d'azote utilisé (Stams, 1994). La réaction devient favorable lorsque la pression partielle diminue et ce davantage avec un rapport NAD⁺/NADH faible.

Afin de diminuer la pression partielle en hydrogène dans le bioréacteur, nous avons choisi dans cette étude d'utiliser un gaz de balayage pour extraire les gaz produits par un mode de fonctionnement semi-batch.

5.4. Les macro- et micro-nutriments

Les nutriments sont composés d'éléments chimiques et sont nécessaires à la croissance microbienne. Les nutriments requis en grande quantité sont appelés macro-nutriments, alors que ceux qui sont nécessaires à l'état de traces, sont des micro-nutriments.

En plus de la matière organique utilisée comme source de carbone, l'azote est indispensable à la croissance microbienne. L'azote constitue 13 % de la cellule bactérienne, c'est pourquoi, il est nécessaire à la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des co-facteurs enzymatiques et d'autres substances cellulaires. Utilisé généralement sous forme d'ammonium, l'azote a une concentration optimale qui varie entre 0,01 et 7 g/L selon les études (Wang *et al.*, 2009) mais dépend de la concentration en carbone. Li & Fang (2007) ont répertorié des études dont le rapport carbone/azote optimal variait entre 3,3 et 130. En plus du carbone et de l'azote, d'autres éléments sont nécessaires à la cellule mais en quantité plus faible. C'est le cas du phosphore, élément clé de la biosynthèse des acides nucléiques et des phospholipides qui est généralement utilisé sous forme de phosphates. De plus, ces derniers ont un pouvoir tampon permettant de limiter les variations de pH induites par la production d'acides lors de la production d'hydrogène (Wang *et al.*, 2009). Parmi les micro-nutriments, le fer et le nickel sous leurs formes respectives Fe^{2+} et Ni^{2+} , sont des co-facteurs essentiels pour les hydrogénases (hydrogénases [Ni-Fe] et hydrogénases [Fe-Fe]) qui composent leurs sites actifs (Frey *et al.*, 2002). Fe^{2+} a été le plus étudié, et les teneurs optimales obtenues varient entre 10 et 1760 mg/L (Lee *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008 ; Karadag *et al.*, 2010). Quant au Ni^{2+} , les teneurs optimales sont plus faibles et comprises entre 0,1 et 25 mg/L (Wang *et al.*, 2008 ; Karadag *et al.*, 2010). Plus récemment, des nano-particules de fer et de nickel ont également été utilisées (Mohanraj *et al.*, 2014 ; Taherdanak *et al.*, 2015). En présence d'oxygène, les métaux sont oxydés en Fe^{2+} et Ni^{2+} , ce qui a l'avantage de réduire les traces éventuelles d'oxygène dans le milieu. Toutefois, Fang *et al.* (2002) ont rapporté que le nickel faisait partie des six métaux lourds avec le cuivre, le zinc, le chrome, le cadmium et le plomb, qui impactaient négativement la production d'hydrogène liée à leurs teneurs dans le milieu réactionnel.

Dans nos études, nous avons choisi de ne pas ajouter de nutriments supplémentaires autres que ceux intrinsèques aux biomasses utilisées.

5.5. Les inhibiteurs

Comme énoncé précédemment, certains métaux lourds ont été reportés comme inhibiteurs de la production d'hydrogène (Fang *et al.*, 2002).

Quéméneur *et al.* (2008) ont étudié l'impact de trois composés dérivés de la lignocellulose libérés lors du prétraitement physico-chimique de la biomasse lignocellulosique : les dérivés furaniques, les composés phénoliques et les lignines. Ils ont observé un impact négatif sur les rendements en

hydrogène plus élevé avec les dérivés furaniques (diminution entre 69 et 80 %) qu'avec les composés phénoliques (diminution entre 17 % et 23 %). Salerno *et al.*, (2006) ont mis en évidence l'influence des ions ammonium, issus de la dégradation de la matière organique, sur la production d'hydrogène. Ils ont notamment conclu qu'au-delà d'une concentration de 2 g équivalent d'azote/L, la production d'hydrogène était inhibée.

6. Améliorations du procédé de fermentation obscure : le substrat

6.1. Le substrat

La nature du substrat est un élément fondamental à prendre en compte car il détermine les voies métaboliques, les acides gras volatils produits et le rendement en hydrogène de la fermentation (Arimi *et al.*, 2015). Plus le substrat est facilement métabolisable, et meilleurs sont les productivités et les rendements en hydrogène (Hallenbeck *et al.*, 2009). C'est pourquoi, de nombreuses d'études se sont intéressées à la production de biohydrogène à partir de substrats simples tels que le glucose et le saccharose. Ces substrats modèles ne peuvent toutefois, être utilisés à grande échelle car ils concurrencent l'industrie alimentaire. Pour que la production d'hydrogène par voie fermentaire puisse rivaliser avec les procédés traditionnels de production d'hydrogène, il est nécessaire d'utiliser des substrats abondants, disponibles, peu chers et riches en sucres (Guo *et al.*, 2010). Les biomasses correspondantes à ces critères sont des sous-produits de l'industrie agro-alimentaire (de boisson, d'huile de palme ou d'olive, laitière, sucrière), de l'industrie papetière ou des déchets du traitement des eaux usées et distilleries et de l'agriculture (résidus forestiers, déjections animales, résidus lignocellulosiques issues de cultures).

Les biomasses issues de l'industrie alimentaire ou des distilleries et les eaux usées sont riches en composés biodégradables dont une partie représente des sucres fermentescibles. Ces biomasses ne nécessitent pas toujours de prétraitement pour obtenir des rendements en hydrogène élevés (Ntaikou *et al.*, 2010). En revanche, il est souvent nécessaire de diluer ces biomasses brutes afin de diminuer la concentration en sucres, paramètre pouvant être inhibiteur pour la production de biohydrogène (Koutrouli *et al.*, 2006 ; Davila-Vazquez *et al.*, 2008). De plus, ces biomasses peuvent avoir une composition chimique assez complexe, incluant différentes substances organiques et inorganiques avec des concentrations variables, ce qui peut limiter la reproductibilité du bioprocédé. Au contraire, certains substrats complexes nécessitent des prétraitements afin d'être assimilables par les micro-organismes producteurs d'hydrogène. Le tableau 2 met en évidence la diversité des substrats utilisés dans la littérature pour la production d'hydrogène et leurs performances.

Tableau 2 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir de différents substrats.

Substrat	Cultures mixtes	Bioréacteur	Rendement	Productivité	Références
Eaux usées d'une production de café	Mésophile	Continu	1,78 mol/mol	14,13 mmol/L/h	Jung <i>et al.</i> , 2010
Présure de fromage	Mésophile	Batch	5,9 mol/mol lactose	8,10 mmol/L/h	Davila-Vazquez <i>et al.</i> , 2008
Cosse de caroubes	Mésophile	Continu	0,43 mol/mol	1,53 mmol/L/h	Mishra <i>et al.</i> , 2015
Présure de fromage + déchets de fruits/légumes	Mésophile	Batch	449,84 mL/g DCO	10,68 mmol/L/h	Gomez-Romero <i>et al.</i> , 2014
Pulpe de manioc	Mésophile	Batch	342 mL/g DCO	5,86 mmol/L/h	Phowan <i>et al.</i> , 2014
Résidus de canne à sucre	Thermophile	Batch	49,55 mL/g DCO	32,43 mmol/L/h	Santos <i>et al.</i> , 2014
Vinasse de canne à sucre	Thermophile	Continu	68,80 mL/g DCO	17,88 mmol/L/h	Santos <i>et al.</i> , 2014
Mélasses de betterave à sucre + purin de porcs	Mésophile	Continu	1,57 mol/mol sucres	3,86 mmol/L/h	Wu <i>et al.</i> , 2013
Mélasses concentrées solubles	Mésophile	Continu	2,1 mol/mol	6,38 mmol/L/h	Lay <i>et al.</i> , 2010
Eaux usées d'industrie sucrière	Thermophile	Continu	2,6 mol/mol	7,62 mmol/L/h	Ueno <i>et al.</i> , 1996
Eaux usées d'industrie vinicole de riz	Mésophile	Continu	2,14 mol/mol	6,60 mmol/L/h	Yu <i>et al.</i> , 2002
Effluent de distillerie de riz	Mésophile	Batch	220,58 mL/g DCO	11,10 mmol/L/h	Mishra <i>et al.</i> , 2015

Parmi tous les substrats cités dans le tableau 2 pour lesquels la liste est non exhaustive, on remarque que ceux issus de l'industrie sucrière (résidus ou vinasse de canne à sucres, mélasses) ont obtenu les productivités en hydrogène les plus élevées alors que ceux issus de l'industrie agro-alimentaire obtiennent les rendements en hydrogène les plus élevés.

Les différents prétraitements utilisés peuvent être chimiques (acides, bases, solvant), physiques (broyage, irradiation, eau liquide chaude, ultrasons, micro-ondes), physico-chimiques (oxydant, traitement à la vapeur d'eau) ou biologiques (champignons, enzymes) (Ntaikou *et al.*, 2010 ; Cheng *et al.*, 2011). L'avantage d'effectuer un prétraitement sur la biomasse, est d'augmenter la biodisponibilité du substrat, ce qui participe à l'amélioration du rendement et de la production en hydrogène. L'inconvénient majeur du prétraitement est de libérer des composés inhibiteurs de la production d'hydrogène tels que les composés furaniques (5-hydroxy-méthylfurfural, furfural), les composés phénoliques, les acides faibles (acide formique et acide acétique) (Quémeneur *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2015). Le seul prétraitement qui ne libère pas ces composés est le prétraitement biologique (Kumar *et al.*, 2015). S'il n'est pas possible d'éviter la formation de ces composés pendant le prétraitement (chimiques, physiques, physico-chimiques) de la biomasse lignocellulosique, il est néanmoins possible de la limiter en optimisant les conditions (temps, température, pression,...). Les composés inhibiteurs peuvent affecter aussi bien la croissance microbienne que l'activité métabolique. Les composés phénoliques sont les plus toxiques car ils peuvent endommager les membranes cellulaires. Les dérivés furaniques interagissent avec les enzymes impliquées dans la fermentation. Les acides faibles non

dissociés ont la capacité à entrer dans le cytoplasme intracellulaire de la bactérie, ce qui provoque un changement de pH non favorable (Quémeneur *et al.*, 2012). L'impact de ces composés dépend essentiellement de leurs concentrations et de la tolérance des micro-organismes.

La concentration initiale en sucres est un facteur important pouvant améliorer considérablement la production d'hydrogène mais à concentration trop élevée, impacter négativement cette production. Une fois encore, la concentration optimale en sucres identifiée dans la littérature n'est pas la même pour chaque étude. Ceci dépend en effet du type de substrat, du type de consortium microbien utilisé, mais également de la configuration du bioréacteur utilisé. C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier l'influence de la charge initiale en substrat en testant diverses concentrations (10-100 g éq. DCO/L).

6.2. Les microflores endogènes

Les biomasses riches en composés fermentescibles contiennent également une microflore endogène. Ainsi, certains auteurs utilisent la biomasse à la fois comme substrat mais également comme cultures mixtes : on parle alors de fermentation endogène ou de « self-fermentation ». Cette fermentation n'est que très peu étudiée. Kim *et al.* l'ont utilisé avec succès pour la première fois en 2009 à partir de déchets alimentaires. Ils ont obtenu des rendements en hydrogène de 1,98 mol/mol et une productivité de 7,98 mmol/L/h. D'autres auteurs avaient déjà utilisé la fermentation endogène avant Kim *et al.* (2009), mais les rendements en hydrogène obtenus étaient faibles : en 2004, Cai *et al.* ont produit 9,14 mL d'hydrogène par gramme de boues de station d'épuration ; en 2008, Antonopoulou *et al.*, ont obtenu un rendement de 0,9 mol/mol à partir de ferments de fromage ou de sorghum sucré ; en 2008, Shimizu *et al.* ont produit 90 mL d'hydrogène par gramme de matière sèche à partir de déchets alimentaires. Plus récemment, en 2012 et 2014, Marone *et al.* ont obtenu des rendements également faibles de, respectivement, 21,95 mL d'hydrogène par g de matière sèche et de 24 mL d'hydrogène par gramme de matière volatile, à partir de déchets de légumes. En revanche, ils ont obtenu de bien meilleurs rendements (1,6 à 2,2 mol/mol glucose ajouté) en utilisant le glucose comme substrat avec des cultures pures de bactéries productrices d'hydrogène isolées de leurs précédentes expériences.

L'avantage est que les micro-organismes contenus dans la biomasse sont déjà adaptés au milieu et au substrat. L'inconvénient est que l'on ne peut pas dissocier (directement) la biomasse microbienne et le substrat, ce qui peut représenter un obstacle pour les procédés continus.

6.3. Le choix des biomasses agricoles issues de la viti-viniculture

6.3.1 Introduction

D'après l'analyse du cycle de vie établie par Romagnoli *et al.* (2011), la production d'hydrogène par voie fermentaire à partir de biomasse a un coût de 3 €/kg d'hydrogène. Lorsque l'on compare ce coût à celui des procédés traditionnels de production d'hydrogène, celui-ci est trois fois plus élevé. Cependant, actuellement le transport de l'hydrogène correspond à un pourcentage élevé du coût total

et fonction de l'éloignement du site de production à l'utilisateur. C'est sur ce paramètre qu'il faut jouer pour rendre compétitif la production biologique d'hydrogène, d'où la volonté de produire de l'hydrogène localement à partir de biomasses locales et riches en composés fermentescibles. C'est dans cette logique que le laboratoire s'est orienté vers la valorisation de biomasses issues de la viti-viniculture.

6.3.2 Procédés de production du vin et de ses sous-produits

Dans ce paragraphe sont décrits les procédés de production du vin afin de comprendre l'origine des sous-produits viti-vinicoles valorisables.

En fonction du type de vin produit (blanc ou rouge), la vinification, c'est-à-dire, la transformation du jus de raisin en vin, sera différente. La figure 8 représente les différentes étapes de production du vin rouge (figure 8a) et du vin blanc (figure 8b).

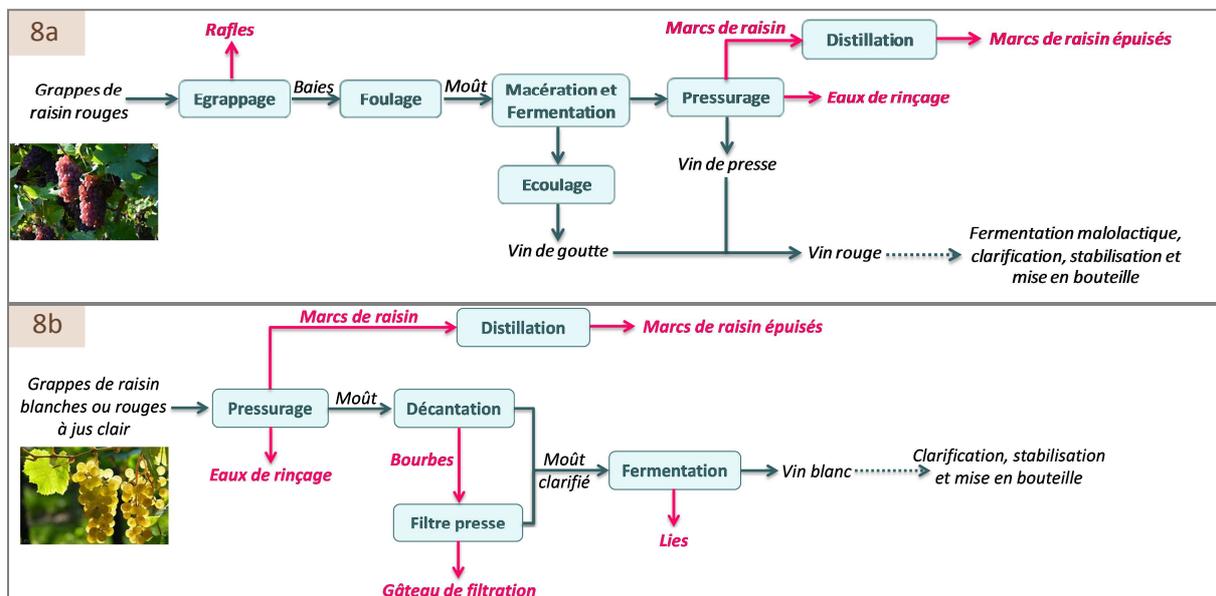


Figure 8 : Les différentes étapes de vinification en blanc (b) et en rouge (a).

Après leur récolte à maturation, les grappes de raisin sont débarrassées des rafles (égrappage) dans le cas de la vinification en rouge (figure 8a), puis les baies sont éclatées (foulage), ce qui permet de récupérer la pulpe et le jus de raisin (moût). Le moût est laissé en contact avec la peau afin que les matières colorantes, les tanins et les arômes diffusent dans le moût (macération). Le temps de macération est variable en fonction du type de vin recherché. Dans le même temps, la fermentation alcoolique est réalisée au cours de laquelle, les levures transforment les sucres en alcool (éthanol). Puis, la macération est stoppée en séparant les particules solides (rafles, pépins, peaux) du vin de goutte par gravité (écoulage). Les marcs imbibés sont simultanément pressés afin de récupérer le vin de presse. Ces deux types de vins seront assemblés ce qui constituera le vin rouge qui sera ensuite soumis à une deuxième fermentation (malolactique), à une clarification, stabilisation et filtration avant la mise en bouteille.

La vinification en blanc (figure 8b) diffère par son absence d'égrappage et de macération. Après avoir été récoltées à maturation, les grappes de raisin blanc ou rouge à jus clair sont pressées, ce qui permet de séparer les marcs du moût trouble. Une étape de décantation permet de séparer par gravité les particules en suspension du moût (débouillage). Les bourbes obtenues peuvent être pressées par un système de filtre presse afin d'en extraire un maximum de moût clair (étape facultative). Le moût clair est ensuite fermenté, ce qui permet de produire le vin blanc qui sera ensuite clarifié, stabilisé, filtré et mis en bouteille.

A partir des procédés de production de vin, les sous-produits obtenus riches en matières organiques sont : les marcs, les bourbes, le gâteau de filtration (résidus solides obtenu à partir de la filtration des bourbes), les lies (particules en suspension constituées essentiellement de levures récupérées dans les cuves en fin de fermentation) et les eaux de rinçage (récupérées après rinçage des pressoirs).

La France est le plus gros producteur de vin : 50 millions d'hectolitres produits en moyenne par an entre 2000 et 2011 (OIV, 2013). La génération des sous-produits cités ci-dessus est considérée comme l'un des problèmes les plus importants auxquels doit faire face l'industrie mondiale du vin (Christ *et al.*, 2013). Les marcs de raisin représentent 27 % du rendement moyen du vignoble qui se situe autour de 7000 kg/ha en France, et sont composés de 4,5 % de pépins de raisin, 19,5 % de peau de raisin et 3 % de rafles (FAOSTAT, 2013 ; Toscano *et al.*, 2013). Environ 850000 tonnes de marcs de raisin et 1,4 millions d'hectolitres de lies de vin et de bourbes sont collectés chaque année dans les 50 distilleries viticoles françaises (IFVV, 2013). Compte tenu des quantités élevées produites chaque année par l'industrie du vin, le décalage croissant entre problèmes environnementaux et pénurie de combustibles fossiles, la valorisation des sous-produits est envisageable.

La richesse en matières organiques des sous-produits viticoles et leurs abondances, ont orienté nos choix d'explorer le potentiel des biomasses viticoles pour produire de l'hydrogène par fermentation obscure.

6.3.3 Valorisation des sous-produits par des procédés biologiques

Dans ce paragraphe, sont décrites les diverses voies de valorisations actuelles des sous-produits viti-vinicoles par des procédés biologiques autre que la fermentation obscure.

Hang *et al.* (1986) ont utilisé pour la première fois les marcs de raisin pour la production d'**acide citrique** par fermentation en milieu solide avec *Aspergillus niger*. Ils ont obtenu un rendement de 90 g d'acide citrique/kg de marcs de raisin soit un rendement de 60 % à partir des sucres consommés.

Stredonsky & Conty (1999) ont utilisé les marcs de raisin pour produire de la **gomme xanthane** (exopolysaccharides) avec *Xanthomonas campestris* par fermentation en milieu solide. Ils ont obtenu de faibles rendements (10 g/L) et le justifient par le fait que les marcs de raisin sont non seulement pauvres en sucres, ce qui est relatif, mais ont une capacité d'absorption faible.

Botella *et al.* (2006) ont utilisé les marcs de raisin pour produire les **enzymes xylanase et pectinase** par fermentation en milieu solide avec *Aspergillus awamori*. Ces enzymes sont notamment utilisées pour faciliter la clarification du vin et des jus de fruits. Les marcs de raisins ont été congelés, puis, déshydratés, broyés et stérilisés avant d'être utilisés pour la fermentation en milieu solide.

Hang *et al.* (1986) ont également utilisé pour la première fois les marcs de raisin pour la production de **bioéthanol** par fermentation en milieu solide avec la microflore naturelle des marcs. Ils ont obtenu un rendement de 53 g d'éthanol/kg de marcs de raisin, soit un rendement de 80 % par rapport aux sucres consommés. Plus récemment, Rodriguez *et al.* (2010) ont produit 50 g d'éthanol/kg de marcs stérilisés soit un rendement de 73 % par rapport aux sucres consommés avec *Saccharomyces cerevisiae* par fermentation en milieu solide.

Dinuccio *et al.* (2010) ont utilisé les marcs de raisins en présence d'un inoculum externe pour la **production de méthane** par digestion anaérobie. Ils ont produit 116 mL de méthane/g de matière sèche.

7. Objectifs de la thèse et plan de travail

7.1. Objectifs de ce travail de thèse

Le principal verrou technologique du bioprocédé de fermentation obscure est l'obtention de faibles productivités et rendements en hydrogène. La bibliographie fait l'état des lieux des différentes voies possibles d'optimisation du bioprocédé de fermentation obscure en termes de performances de production d'hydrogène que ce soit par le biais des micro-organismes, du bioprocédé, des facteurs abiotiques ou du substrat. Les améliorations liées aux micro-organismes passent notamment par l'utilisation de co-cultures ou de cultures mixtes ; celles liées au bioprocédé concernent le type de bioréacteur et la combinaison de plusieurs bioprocédés ; celles liées aux facteurs abiotiques sont l'utilisation d'une température et d'un pH les mieux adaptés à la biomasse utilisée, et de macro- et micro-nutriments nécessaires aux bactéries productrices d'hydrogène, tout en limitant la pression partielle en hydrogène et teneurs des inhibiteurs présents dans le milieu ; enfin, les améliorations liées au substrat concernent l'utilisation de substrats riches en matières fermentescibles, disponibles et abondants ne nécessitant pas de prétraitement particulier. L'étude bibliographique a mis en évidence qu'il n'y avait pas de conditions optimales universelles pour la production d'hydrogène à partir de différents substrats et micro-organismes.

Dans le but ultime de développer un procédé de production continue d'hydrogène pour lequel les productivités et les rendements en hydrogène sont maximisés, les objectifs de ce travail de thèse sont :

- d'étudier le potentiel de biomasses riches en matières métabolisables non encore explorées et de proposer un procédé de production d'hydrogène le plus adapté à ces biomasses ;
- d'étudier l'influence des paramètres opératoires sur les performances de production d'hydrogène et d'identifier les structures des communautés microbiennes endogènes ;
- d'étudier l'influence des caractéristiques endogènes des biomasses sur les performances de production d'hydrogène et de démontrer l'adaptabilité des communautés microbiennes endogènes à la biomasse.

7.2. Approche expérimentale et méthodologie

D'un point de vue expérimental, ce travail de thèse s'est appuyé sur le fonctionnement optimisé d'un bioréacteur semi-batch. Ainsi, les paramètres opératoires tels que la température, l'agitation, la valeur de régulation du pH, l'extraction des gaz produits par un gaz de balayage, ont été considérés comme optimaux.

L'étude exploratoire (chapitre III) consiste dans un premier temps, à tester le potentiel de production d'hydrogène des biomasses issues de la viti-viniculture et de l'industrie papetière en tant que substrat en présence de cultures mixtes prétraitées thermiquement. Dans un second temps, ces biomasses ont

été testées contrairement à la littérature, à la fois en tant que substrat et cultures mixtes (fermentation endogène) sans ajout de nutriments additionnels.

Les paramètres abiotiques tels que le prétraitement thermique, le gaz de balayage, le pH initial et le pH de régulation ainsi que la charge en substrat, ont ensuite été testés lors de la fermentation endogène de la biomasse d'intérêt afin de déterminer leur influence sur les performances de production d'hydrogène, sur les voies métaboliques et sur les populations microbiennes endogènes (chapitre IV).

Enfin, dans un dernier chapitre (chapitre V), les biomasses d'intérêt ont été caractérisées au niveau de leurs compositions physico-chimiques, biochimiques et élémentaires afin de déterminer si leurs caractéristiques endogènes sont liées à leur provenance ou à l'année de récolte et ont un impact sur la production d'hydrogène et sur les populations bactériennes. Différents types de biomasses d'intérêt ont également été testés afin de mettre en évidence l'influence de leurs caractéristiques endogènes sur les performances de production d'hydrogène et sur les populations microbiennes.

Chapitre II. MATERIELS ET METHODES

1. Introduction

Ce chapitre est composé de cinq parties. La première concerne le matériel et les conditions utilisés pour réaliser des fermentations exogènes et endogènes en semi-batch. La deuxième partie décrit les techniques et méthodes utilisées pour caractériser la biomasse. La troisième partie expose les analyses physico-chimiques réalisées pour déterminer la composition du biogaz et des métabolites produits, ainsi que les concentrations en sucres et les paramètres de production d'hydrogène. La quatrième partie porte sur les analyses microbiennes et levuriennes réalisées. Enfin, la dernière partie concerne les analyses statistiques utilisées dans ce manuscrit.

2. Fermentations en semi-batch

2.1. Fermentations exogènes

Ce type de fermentation consiste à ajouter un inoculum externe à la biomasse utilisée comme substrat. Alors que différents substrats et donc différentes biomasses ont été utilisés dans ce travail, un seul type d'inoculum externe a été mis en œuvre lors des fermentations exogènes.

2.1.1 *Inoculum externe*

Des boues activées provenant de la zone anoxie de la station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg exploitée par la société Valorhin ont été utilisées comme inoculum externe lors des fermentations exogènes.

2.1.2 *Substrats*

Deux types de biomasses ont été utilisés en tant que substrats : des biomasses issues de la viti-viniculture et des biomasses issues d'une papeterie.

❖ Biomasses viti-vinicoles

La biomasse 'bourbes' est issue de l'étape de décantation du jus de raisin obtenu après pressage des grappes de raisin. Les bourbes Chardonnay proviennent du domaine des Poncétys, en Bourgogne, quant aux bourbes Pinot Gris, elles proviennent du domaine Pfister à Dalhenheim, en Alsace.

❖ Biomasses papetières

Les biomasses 'liqueur noire' et 'liqueur rouge' utilisées proviennent du papetier Tambec. Ces biomasses sont obtenues lors de la fabrication de pâte à papier soit à partir de bois résineux au niveau du procédé au bisulfite (liqueur rouge), soit à partir de matières lignocellulosiques au niveau du procédé kraft (liqueur noire).

2.2. Fermentations endogènes

Dans cette partie, les fermentations sont réalisées à partir de microflore endogènes aux biomasses, c'est-à-dire sans ajout d'inoculum externe, seules les biomasses sont utilisées en tant que substrat,

nutriments et consortium microbien. Outre, celles citées en 1.1.2., plusieurs autres biomasses ont été utilisées provenant de la viti-viniculture.

La biomasse ‘marcs de raisin’ est le résidu solide obtenu après pressage des grappes de raisin. Cette biomasse est constituée des grains de raisin épuisés de leur jus, des pépins et des rafles.

La biomasse ‘eaux de rinçage’ est obtenue en collectant les eaux utilisées pour nettoyer les pressoirs dans lesquels le raisin est pressé.

La biomasse ‘gâteau de filtration’ est le rétentat obtenu après filtration des bourbes par filtre presse.

La biomasse ‘lies’ est issue du fond de la cuve de fermentation et est composée essentiellement d’agglomérats de levures, de cristaux de tartre et de matière colloïdale précipitée.

Les biomasses de cépages Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling, Muscat et Auxerrois proviennent du domaine Pfister à Dalhenheim, en Alsace ; quant aux Chardonnay, Pinot Noir, Pinot Noir/Chardonnay et Aligoté, ils proviennent du domaine des Poncétys à Davayé, en Bourgogne.

Le Pinot Noir est le seul cépage utilisé dans notre étude pour la production de vin rouge.

2.3. Protocoles expérimentaux

Les tests de fermentation ont été réalisés dans un seul réacteur double enveloppe de 1 L (Büchi AG) agité, utilisé avec un volume de 0,7 L de milieu réactionnel. Selon les tests, un prétraitement thermique de 1h à 70°C a été appliqué au mélange biomasse/inoculum ou biomasse/eau de l’Eurométropole de Strasbourg avec un rapport volumique de 1 :14. Le pH du mélange, prétraité thermiquement ou non, est ajusté à 7,0 à l’aide d’une solution de soude à 3M. Le mélange neutralisé est ensuite placé sous flux d’azote à 50 mL/min régulé par un débitmètre massique (5850E Brooks), sous température contrôlée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sous agitation à 220 tr/min et à l’obscurité. Ce flux d’azote permet à la fois d’assurer des conditions anaérobies et d’extraire les gaz produits. Le pH est régulé à une valeur $\geq 5,7$ par ajout de soude sous forme de pulses d’un volume de 0,5 mL d’une solution de NaOH à 1M pour la biomasse ‘marcs’ et à 3M pour les autres biomasses, grâce à un régulateur de pH (BL 7916 Hanna Instruments). Toutes les conditions opératoires énoncées ci-dessus ont été antérieurement optimisées (Clion *et al.*, 2015).

Le biogaz produit pendant la fermentation est réfrigéré afin de piéger l’eau et les sous-produits condensables et est reliée à un micro-chromatographe en phase gazeuse pour les analyses. La représentation schématique du montage utilisé lors de ce travail est présentée sur la figure 9.

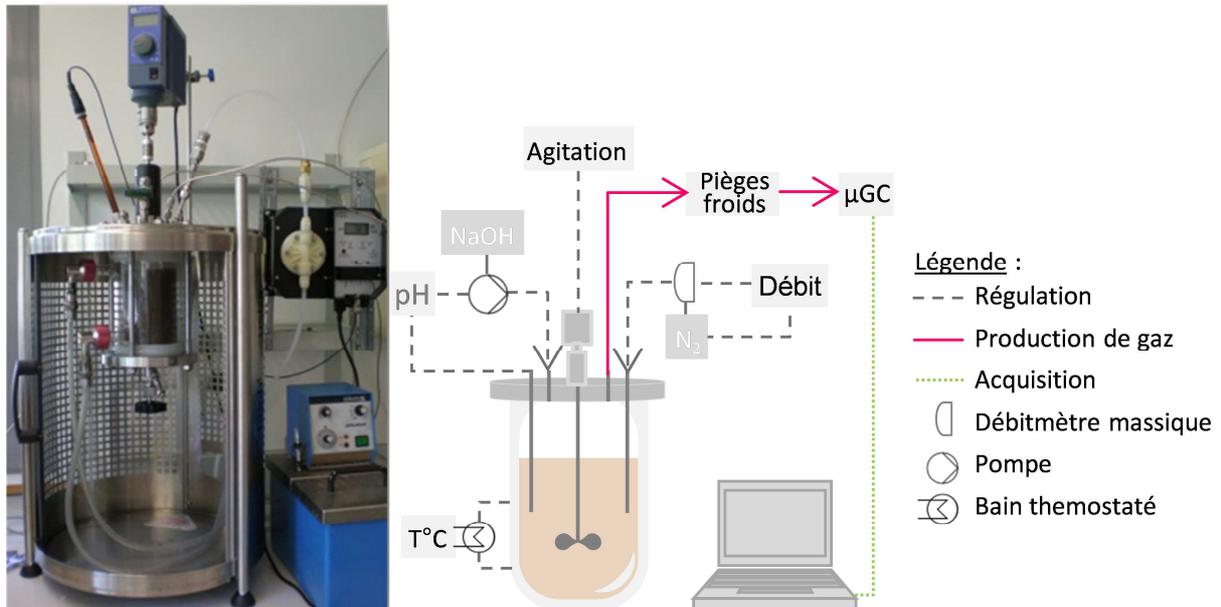


Figure 9 : Représentation schématique du montage utilisé.

Les protocoles expérimentaux ont été modifiés selon les différentes études. Dans le Chapitre III, les mélanges initiaux biomasse/inoculum ou biomasse/eau de l'Eurométropole de Strasbourg prétraités thermiquement ou non, ont été testés.

Les tests de fermentation n'ont pas été systématiquement répétés pour des raisons pratiques de durée de fermentation (un test dure environ 72 h) et de matériel (un seul bioréacteur).

2.4. Echantillonnage du milieu réactionnel

Lors de la fermentation, des prélèvements réguliers de 10 mL sont réalisés par la vanne de purge du réacteur et sont centrifugés à 4500 tr/min pendant 30 min. Les surnageants et culots obtenus sont séparés et stockés à -20°C.

3. Caractérisation de la biomasse

Seules les biomasses de type ‘bourbes’ ont été caractérisées avec toutes les analyses présentées ci-dessous. Les autres biomasses, ‘marcs de raisin’, ‘lies de vin’, ‘gâteau de filtration’ et ‘eaux de rinçage des pressoirs’, ont été partiellement caractérisées.

3.1. Mesure des matières sèches et volatiles

Les matières ont été déterminées selon la norme NFT 90 105.

Une masse m_1 de biomasse est ajoutée à un creuset en porcelaine préalablement séché et taré m_0 , puis, l'ensemble est incubé à 105°C pendant 24 h. L'eau s'étant évaporée, la masse restante dans le creuset correspond aux matières sèches (MS). Le creuset est donc pesé après refroidissement dans un dessiccateur m_2 . Les matières sèches (MS) se calculent à partir de l'équation suivante :

$$MS (g/kg) = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} * 1000 \quad (1)$$

Le creuset est ensuite incubé dans un four à moufle à 550°C pendant 2 h. La matière restante dans le creuset correspond aux matières minérales (Mi). Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur m_3 . Les matières minérales (Mi) se calculent à partir de l'équation suivante :

$$Mi (g/kg) = \frac{(m_3 - m_0)}{(m_1 - m_0)} * 1000 \quad (2)$$

La différence de masse entre les MS et Mi correspond aux matières volatiles (MV).

3.2. Mesure des matières en suspension et matières volatiles en suspension

Un volume de biomasse (correspondant à une masse m) est filtré sous vide sur un filtre constitué de microfibrilles de verres ayant un diamètre de pore de 0,45 μm et est ajouté à un creuset en porcelaine (l'ensemble filtre neuf et creuset préalablement séché et taré m'_0), puis, l'ensemble est incubé à 105°C pendant 24 h. L'eau s'étant évaporée, la masse restante dans le creuset correspond à la matière en suspension totale (MES). Le creuset est donc pesé après refroidissement dans un dessiccateur m'_1 . Le rapport de la différence de masse entre le creuset vide et la masse de la biomasse séchée dans le creuset sur la masse (m) correspondant au volume de biomasse correspond aux MES contenues dans l'échantillon.

$$MES(g/kg) = \frac{(m'_1 - m'_0)}{m} * 1000 \quad (3)$$

Le creuset est ensuite incubé à 550°C pendant 2 h. La matière restante dans le creuset correspond aux matières minérales particulaires (MiS). Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur m'_2 . Les matières minérales particulaires (MiS) se calculent à partir de l'équation suivante :

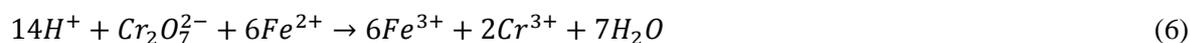
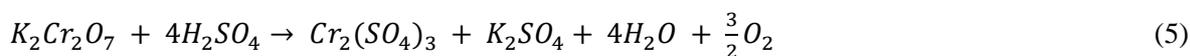
$$MiS(g/kg) = \frac{(m'_2 - m'_0)}{m} * 1000 \quad (4)$$

La différence de masse entre les MES et MiS correspond aux matières volatiles en suspension (MVS).

3.3. Mesure de la demande chimique en oxygène

La demande chimique en oxygène (DCO) représente la mesure de la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder complètement la matière organique.

Les mesures de DCO sont réalisées par une macro-méthode, sur la fraction soluble obtenue après centrifugation à 4500 tr/min pendant 30 min, et sur la fraction totale de la biomasse de type 'bourbes'. La matière organique contenue dans la biomasse est oxydée à chaud par un mélange de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) et de sulfate d'argent ($AgSO_4$). L'excès de dichromate de potassium qui n'a pas été réduit en ions chrome Cr^{3+} par les matières réductrices (équation 5), est réduit par une solution titrée de sulfate de fer II et d'ammonium (équation 6). L'échantillon de biomasse est dilué pour que la mesure de la DCO soit comprise entre 300 et 700 mg O_2/L . 10 mL d'échantillon dilué ou d'eau déminéralisée (contrôle négatif), 5 mL de $K_2Cr_2O_7$ à 0,04 mol/L et 15 mL d'une solution commerciale H_2SO_4 - $AgSO_4$ concentrée, sont introduits dans un matras. Une canne réfrigérante est placée sur chaque matras et l'ensemble est ensuite disposé sur un bloc chauffant Büchi Digest Automat K-438 à 150°C pendant 1h30. Une fois les matras refroidis, environ 70 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés aux cannes réfrigérantes pour récupérer les éventuelles traces de dichromate de potassium entraînées par la vapeur. Le contenu du matras ainsi que les eaux de rinçage sont transvasés dans un erlenmeyer et 3 gouttes de ferroïne sont ajoutées pour titrer l'excès de $K_2Cr_2O_7$ par une solution de sels de Mohr (virage du bleu-vert au rouge).



3.4. Mesure de la composition en sucres

La composition en sucres de la phase soluble de la biomasse : fructose, glucose et saccharose, a été analysée par chromatographie en phase liquide (Waters ACQUITY UPLC) avec un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD) et une colonne ACQUITY UPLC BEH Amide (1,7 μm , 2,1 x 100 mm) composée de particules de silice à pont éthylène (ethylene bridge hybrid, BEH) liées à des fonctions amides tertiaires comme phase stationnaire. Les échantillons sont préalablement centrifugés à 15000 tr/min pendant 15 min, puis sont dilués avec un mélange de 75 % Acétonitrile/25 % eau ultrapure et filtrés à l'aide de filtres seringues ayant un diamètre de pores de 0,22 μm . 2 μL du mélange filtré sont injectés dans la colonne placée à une température de 22°C. Le débit de la phase mobile composée d'un mélange 75 % Acétonitrile/25 % eau ultrapure/triéthylamine à 0,2 % est de 0,13 mL/min. Les conditions relatives au détecteur ELSD sont : un gain de 200, une pression de 40 psi, une température de 40°C du drift tube et un nébuliseur « cooling ». L'éluant de la colonne mélangé à de l'azote est d'abord nébulisé sous forme de fines gouttelettes, puis évaporé dans le tube de chauffage afin de ne laisser que les solutés. Enfin, la diffusion de la lumière produite par le passage des solutés au travers d'une source lumineuse est mesurée dans une cellule optique.

Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier les différents sucres solubles présents dans les échantillons.

3.5. Mesure de la composition élémentaire

L'analyse de la composition élémentaire de la biomasse a été réalisée par spectrométrie d'émission atomique par torche plasma (ICP-AES = Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry). Seule la fraction soluble obtenue après centrifugation et filtration sur un filtre de 0,45 μm est analysée directement par ICP-AES, la fraction totale ou le culot de centrifugation de la biomasse nécessitent quant à eux une minéralisation préalable.

3 mL d'acide nitrique (HNO_3) Trace Select (Sigma) sont ajoutés à 0,5 g de biomasse, puis, l'ensemble est minéralisé par le minéraliseur micro-ondes Eco (Anton Paar) à 200°C pendant 25 minutes. L'échantillon mélangé à l'argon est nébulisé sous forme de fines gouttelettes et est ensuite entraîné vers le plasma d'argon à couplage inductif dont la très haute température (8000°C) permet d'ioniser et d'exciter les ions présents dans l'échantillon. Les radiations émises lors de la désexcitation des ions sont séparées via un polychromateur, puis détectées par un spectrophotomètre ICPAES 720ES (Varian).

Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier les éléments présents dans les échantillons.

3.6. Mesure de la concentration en protéines

La détermination de la teneur en protéines des biomasses a été réalisée par le kit Qubit® Protein Assay de ThermoFisher dont la détection est réalisée par fluorimétrie, en suivant le protocole recommandé par le fabricant.

4. Analyses physico-chimiques

4.1. Analyse de la composition du biogaz

La composition du biogaz produit est analysée en ligne par un micro-chromatographe en phase gazeuse (Agilent M200) composé de deux modules. Le premier module (module A) permet de séparer N_2 , O_2 , H_2 , CO et CH_4 grâce à une colonne tamis moléculaire 5Å (10 m x 0,32 mm x 30 μm) maintenue à 110°C. Le gaz vecteur utilisé est l'argon à une pression de 1,7 bar. Le deuxième module (module B) permet de détecter et quantifier CO_2 et CH_4 grâce à une colonne capillaire PoraPlot U (8 m x 0,32 mm x 10 μm) constituée de divinylbenzène éthylène glycol comme phase stationnaire et maintenue à 85°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à une pression de 1,6 bar. Le détecteur utilisé est un détecteur à conductivité thermique. L'acquisition des données est effectuée au cours de la fermentation toutes les 10 minutes avec 3 mesures de 90 secondes chacune.

4.2. Analyse de la composition en acides gras volatils (AGV) et en alcools

La composition en acides gras volatils (AGV) et en alcools de la phase liquide : acétate (C2), propionate (C3), butyrate et isobutyrate (C4 et iC4), valérate et isovalérate (C5 et iC5), hexanoate (C6), éthanol et butanol, a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890Q GC) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne DB-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 µm) utilisant le polyéthylène glycol modifié avec de l'acide nitrotéréphtalique comme phase stationnaire. Les échantillons (surnageants) sont préalablement centrifugés à 15000 tr/min pendant 15 min, puis, sont dilués au quart avec de l'eau ultrapure et mélangés avec de l'acide trifluoroacétique à une concentration de 0,03M avec un rapport volumique 1:1. Ces échantillons sont ensuite filtrés à l'aide de filtres seringues ayant un diamètre de pores de 0,22 µm. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement, de 220°C et 250°C. Quant à la colonne, la température est dans un premier temps maintenue à 70°C pendant trois minutes, puis, est augmentée avec une rampe de 10°C/min jusqu'à 200°C et enfin, est à nouveau maintenue à 200°C pendant 4 min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 0,4 mL/min et une pression initiale de 3,6 bar (le profil de pression évolue avec le profil de température). Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier les AGV et alcools présents dans les échantillons.

4.3. Analyse de la composition en acides organiques

La composition en acides organiques de la phase liquide : citrate, pyruvate, succinate, lactate, formiate, tartrate, acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate, isovalérate, et hexanoate, a été analysée par chromatographie en phase liquide haute performance (Agilent 1260 Infinity LC) avec un détecteur ultra-violet (UV) et une colonne Hi-Plex H (300 x 7,7 mm, 8 µm) composée d'une résine échangeuse de cations constituée de billes de styrène-divinylbenzène greffé de groupements d'acide sulfonique ayant un diamètre de 7 à 11 µm. Une pré-colonne PL Hi-Plex (50 x 7,7 mm, 8 µm) a été disposée en amont de la colonne afin de protéger la colonne d'éventuels contaminants et ainsi augmenter sa durée de vie. Le débit de la phase mobile, composée de 92 % d'acide sulfurique à 5 mM et de 8 % d'acétonitrile, est de 0,6 mL/min. Les échantillons sont préalablement centrifugés à 15000 tr/min pendant 15 min, puis, sont filtrés à l'aide de filtres seringues ayant un diamètre de pores de 0,22 µm. 20 µL d'échantillon/standards sont injectés dans la colonne placée à une température de 65°C. La détection des acides organiques est réalisée à 210 nm. Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier les acides organiques présents dans les échantillons.

4.4. Mesure de la concentration en sucres

La mesure de la concentration en sucres s'effectue par la méthode colorimétrique à l'antrone (Dreywood, 1946). Ce dosage permet de mesurer les sucres totaux réducteurs. Le dosage à l'antrone (oxo-9-dihydro-10-anthracène) mesure les fonctions carbonyles. Il est basé sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide, à chaud. Les dérivés furfuraliques obtenus se condensent

avec l'anthrone pour donner des produits colorés verts dont l'intensité est proportionnelle à la concentration glucidique. La mesure de la concentration en sucres s'effectue sur le surnageant obtenu après centrifugation à 4500 tr/min pendant 30 min. L'échantillon est ensuite dilué pour que sa concentration soit comprise dans la gamme d'étalonnage (20-100 mg/L) réalisée avec le glucose. Le réactif à l'anthrone (2 % d'anthrone dans de l'acide sulfurique à 95 %) préparé extratemporanément est ajouté aux tubes en verre contenant les échantillons/étalons avec un rapport volumique 1:2. Ces tubes sont ensuite plongés dans un bain thermostaté à 80°C pendant 20 min, puis, la réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans de la glace à l'obscurité. L'absorbance des échantillons/étalons est ensuite mesurée à 625 nm avec le spectrophotomètre thermostaté double-faisceau UV-Visible Cary3 (Varian).

Les teneurs en sucres des fractions solubles en début et en fin de fermentation nous permettent de calculer un rendement en hydrogène en moles d'hydrogène produit par mol d'hexoses consommés (mol/mol).

4.5. Bilan de matière

La transformation de la matière organique au cours de la fermentation obscure est conservée. Des bilans de matières ont ainsi, été réalisés entre la composition organique soluble initiale et finale. Pour cela, les sucres, les métabolites et les gaz produits ont été convertis en équivalent DCO (g éq. DCO/mol) grâce à la réaction d'oxydation de la matière organique (équation 7) établie par (Angelidaki & Sanders, 2004).



4.6. Modélisation de la production d'hydrogène cumulée

La production d'hydrogène cumulée peut être modélisée en utilisant l'équation de Gompertz modifiée. La productivité en hydrogène a été calculée à partir de l'équation suivante (Lay *et al.*, 1999 ; Zwietering *et al.*, 1990) :

$$H = H_m \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{H_m} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (8)$$

où H est la production d'hydrogène cumulée (mmol/L_{reacteur}), H_m la production maximale d'hydrogène cumulée (mmol/L_{reacteur}), R_m la productivité en hydrogène (mmol/L_{reacteur}/h), λ le temps de latence (h), t le temps d'incubation (h) et e l'exponentielle de 1.

5. Analyses microbiologiques

5.1. Analyses microbiennes

Les analyses microbiennes ont été réalisées, à partir des culots de centrifugation (4500 tr/min, 30 min)

stockés à -20°C, à l'Institut Botanique, UMR 7156 Génétique Moléculaire Génomique Microbiologique, Département Micro-organismes, Génomes, Environnement, Equipe Adaptation et Interactions Microbiennes dans l'Environnement.

5.1.1 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait et purifié en utilisant le kit E.Z.N.A. Soil DNA (Omega) pour la première campagne d'échantillons et le kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP) pour les campagnes suivantes, en suivant les protocoles recommandés par les fabricants.

La concentration d'ADN génomique extrait a été déterminée en utilisant le kit Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen).

5.1.2 Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR est une technique rapide d'amplification permettant de copier jusqu'à 10^9 fois des segments d'ADN contenus dans un tube. L'amplification *in vitro* d'une courte séquence d'ADN située entre deux amorces d'environ 20 nucléotides chacune s'effectue grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable l'ADN polymérase (Taq polymérase). Dans notre cas, les gènes codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiés en utilisant le couple d'amorces universelles suivantes : l'amorce 27f marquée en 5' avec la 6-carboxyfluorescéine (27f*) de séquence 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3' (Weisburg, *et al.*, 1991) et l'amorce 927r non marquée de séquence 5'- CCGTCAATTCCTTTGAGTTT -3' (Schwieger & Tebbe, 1998).

Chaque mix PCR (volume total de 50 µL) contient 10 µL de tampon iProof 1X (Bio-Rad), 200 µM de chaque déoxynucléotide triphosphate (dNTP), 0,8 µM de chaque amorce, 1 U de Taq polymérase iProof (Bio-Rad) et 50 ng d'ADN (ou moins si l'échantillon est peu concentré). Les cycles PCR ont été effectués à l'aide du Mastercycler thermal cycler (Eppendorf). Les conditions sont les suivantes : une dénaturation initiale de l'ADN à 98°C pendant 2 min, puis, 20 cycles répétés d'une phase de dénaturation à 98°C pendant 30 s, d'une phase d'hybridation à 52 °C pendant 30 s et d'une phase d'élongation à 72°C pendant 30 s, suivies d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 2 min.

La dénaturation à chaud de l'ADN permet d'obtenir de l'ADN monobrin. La diminution de la température permet aux amorces, présentes en excès et complémentaires des séquences encadrant la région à amplifier, à se lier à l'ADN simple brin (hybridation). Puis, l'augmentation de la température à 72°C permet à l'ADN polymérase d'effectuer une élongation des brins d'ADN à partir des amorces. Ce cycle est répété plusieurs fois afin d'amplifier plus largement les séquences d'ADN.

Chaque échantillon ADN extrait est amplifié en triplicat. Les produits PCR obtenus (triplicats) sont ensuite réunis dans un tube Eppendorf de 200 µL, puis, sont stockés à 4°C avant d'être utilisés.

Les gènes codant pour l'ARNr 16S amplifiés (0,9 kb) sont ensuite concentrés avec un concentrateur

sous vide SpeedVac Concentrator (Savant) afin d'obtenir un volume final de 30 μL , puis sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % en présence d'un marqueur moléculaire pour s'assurer du bon déroulement de l'amplification. Les bandes d'intérêt sont ensuite découpées et purifiées avec le kit GeneClean® Turbo (Mp) selon les recommandations du fabricant. Puis, les échantillons sont digérés avec 20 U des enzymes de restriction *AluI* (AG[^]CT) ou *HhaI* (GC[^]GC) (Fermentas) pendant 16 h à 37°C. Les produits digérés sont ensuite purifiés avec le kit QIAquick Nucleotide Removal (Quiagen) selon les recommandations du fabricant.

5.1.3 Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

La T-RFLP est une technique d'empreinte moléculaire qui permet de déterminer la structure des communautés microbiennes. Cette technique permet de comparer très rapidement et de manière visuelle des modifications de structures des populations microbiennes liées à des modifications de paramètres au niveau de la fermentation par exemple.

6 μL d'ADN digéré et purifié ont été ajoutés à 12 μL d'un mélange de Hi-Di™ formamide et de standard MapMarker 1000 marqué par la carboxy-X-rhodamine (ROX) (Applied Biosystems/Bioventures Inc) avec un rapport volumique 1:20. Le mélange ADN/formamide/ROX a ensuite été dénaturé à 95°C pendant 5 min, avant d'être refroidi dans la glace pendant 5 min, et enfin, centrifugé à 12 000 tr/min pendant 15 min à 4°C.

Les fragments de restriction dénaturés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire ABI Prism 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) en utilisant un polymère (POP-7™, Applied Biosystems). Chaque amorce 27f* marquée est détectée, ce qui permet d'obtenir un pic ayant une amplitude proportionnelle au nombre de fragments de restriction d'une taille donnée. Chaque pic représente une population microbienne donnée. Les structures de communautés microbiennes sont présentées sous forme de graphique représentant la fluorescence en fonction de la taille des fragments de restriction (T-RF) obtenus pour chaque échantillon (figure 10).

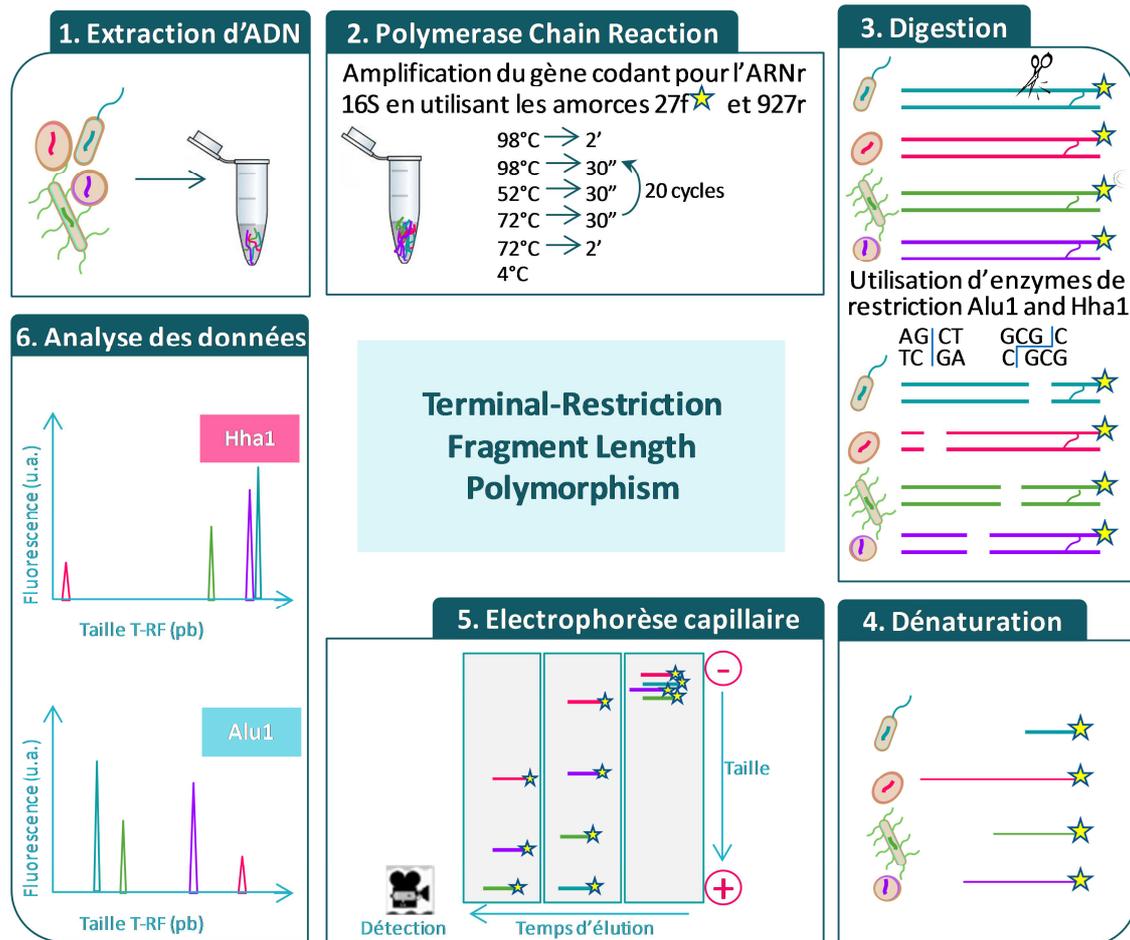


Figure 10 : Représentation schématique du principe de la PCR/T-RFLP.

5.1.4 Traitement et alignement des données de T-RFLP

Pour comparer et aligner les structures de communautés microbiennes des différents échantillons, une normalisation au niveau de la taille des T-RF et de la fluorescence a été nécessaire.

Les électrophorégrammes contenant à la fois un standard interne composé de T-RF de taille connue et les T-RF de l'échantillon de taille inconnue, ont été analysés avec le logiciel PeakScanner V1.0 (Applied Biosystems) en utilisant la méthode 'Local Southern' simplifiée. Cette méthode consiste à calculer des équations quadratiques trois points par trois points d'étalonnage à partir des tailles et temps connus du standard interne. La taille des T-RF inconnus est ensuite déterminée grâce à une équation choisie pour que la valeur du temps du T-RF inconnu soit comprise entre un point inférieur et deux points supérieurs de la gamme d'étalonnage. Ensuite, une dernière correction sur la taille des T-RF calculée est apportée pour tenir compte du fluorochrome. En effet, chaque électrophorégramme contient un standard interne marqué avec le fluorochrome ROX et des T-RF de l'échantillon marqués avec le fluorochrome FAM. Pour cela, des équations ont été déterminées à partir de données collectées sur 294 échantillons marqués indépendamment avec les fluorochromes FAM et ROX.

Pour normaliser la fluorescence, chaque valeur de fluorescence a été divisée par la valeur maximale de

fluorescence respective à chaque échantillon. Ces traitements ont permis d'aligner les pics communs aux différents échantillons.

5.1.5 Abondance relative des pics de T-RFLP

Les hauteurs des pics compris entre 50 et 1000 paires de base (pb), et ayant une fluorescence supérieure à 50 RFU ont été sommées pour chaque profil. La valeur de fluorescence de chaque pic a ensuite été normalisée en la divisant par la somme des hauteurs des pics et en la multipliant par 100 pour obtenir l'abondance relative de chaque pic.

5.1.6 Le séquençage des échantillons d'intérêt

Le séquençage des séquences d'échantillon d'intérêt a été réalisé par INRA Transfert Environnement à Narbonne à partir de l'ADN total extrait. Les régions variables V4-V5 des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S ont été amplifiées par PCR grâce à des amorces spécifiques.

La première campagne d'échantillons a été séquencée avec le séquenceur Roche 454 GS FLX+ System (XLR 70 sequencing chemistry) alors que les campagnes d'échantillons suivantes ont été séquencées avec le séquenceur MiSeq (Illumina).

Les analyses de séquençage ont été traitées et nettoyées (suppression des amorces, des séquences chimériques,...) par un pipeline informatique développé par l'INRA fonctionnant sous Mothur (version 1.33.2). Les séquences obtenues présentant 97 % d'homologie entre elles, ont été regroupées en séquences uniques, puis en Operational Taxonomic Unit (OTU). L'identification de chaque séquence au niveau taxonomique (phylum et genre) a été réalisée sur la base de la taxonomie SILVA regroupant des séquences de références des espèces bactériennes. Les séquences majoritaires représentatives des OTU ont été comparées et affiliées aux séquences de références de la base de données *Genbank*, aidé par le logiciel Mothur.

L'identification des espèces microbiennes a été réalisée au laboratoire en utilisant le logiciel en ligne NCBI Nucleotide Blast et les bases de données *Nucleotide collection (nr_nt)* et *16S ribosomal RNA sequences*. Seules les séquences présentant un pourcentage de similarité supérieur à 97 % sont considérées comme appartenant au même phylotype.

La diversité microbienne a été estimée via les indices de Shannon et de Simpson. L'indice de diversité de Shannon (H) estime la diversité des taxons contenus dans un échantillon environnemental, en tenant compte du nombre de séquences obtenues pour chaque taxon (Mouillot & Leprêtre, 1999). Plus sa valeur augmente plus la population observée possède une diversité élevée.

L'indice de Simpson (D) aussi appelé indice de dominance, tient compte du nombre de taxons observés et de la part de chaque taxon dans la population totale. Cet indice donne plus de poids aux

taxons les plus représentés. Plusieurs indices de diversité sont déclinés à partir de cette définition. Celui utilisé dans cette étude (1-D) rend compte de la probabilité de sélectionner aléatoirement deux séquences appartenant à deux OTUs différents. Autrement dit, plus cette probabilité est élevée, plus la diversité de l'échantillon est élevée.

5.2. Analyses levuriennes

Les analyses levuriennes ont été réalisées à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Equipe VALMiS, à l'Université de Bourgogne. L'identification levurienne a été réalisée par PCR/RFLP.

6. Analyse statistique

6.1. Test de Student

Afin de déterminer si les valeurs de performances étaient significativement différentes ou non, le test de Student ou t-test a été utilisé. Ce test désigne un test d'hypothèse où la statistique calculée suit une loi de Student lorsque l'hypothèse nulle est vraie. Son principe est le suivant : on veut déterminer si la valeur d'espérance μ d'une population de distribution normale et d'écart type σ non connu est égale à une valeur déterminée μ_0 . Pour cela, on tire de cette population un échantillon de taille n dont on calcule la moyenne x_{moy} et l'écart-type empirique s . Selon l'hypothèse nulle, la distribution d'échantillonnage de cette moyenne se distribue elle aussi normalement avec un écart type $\sigma = s/\sqrt{n}$. La variable ci-dessous suit alors une loi de Student avec $n-1$ degrés de liberté :

$$t = \frac{x_{moy} - \mu_0}{s/\sqrt{n}} \quad (9)$$

6.2. Test de corrélation de Pearson

La corrélation de linéarité entre deux variables x et y a été estimée par le coefficient de Pearson :

$$r = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{\sum x_i^2 - n \bar{x}^2} \sqrt{\sum y_i^2 - n \bar{y}^2}} \quad (10)$$

Puis, la significativité a été déterminée selon la formule ci-dessous avec $n-2$ degrés de liberté :

$$t = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} \quad (11)$$

**Chapitre III. ETUDE DE FAISABILITE DE LA
PRODUCTION D'HYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE
ENDOGENE A PARTIR DE DIFFERENTES
BIOMASSES**

1. Introduction

1.1. Objectifs

La bibliographie fait l'état des lieux des possibilités pour optimiser les performances de production d'hydrogène. L'une d'elles est l'amélioration de la production d'hydrogène par la sélection du substrat.

Le sucre étant la principale source à partir de laquelle l'hydrogène est produit, nombreuses sont les études où le glucose et le saccharose ont été utilisés comme substrats pour produire de l'hydrogène (Chen *et al.*, 2003 ; Fang *et al.*, 2002). Toutefois, leur utilisation à grande échelle pour la production de biocarburants a eu pour effet indirect d'augmenter le prix des ressources alimentaires notamment par l'utilisation de voies fermentaires sur des biomasses sucrières (canne à sucre) pour la production de bioéthanol. Par conséquent, nombreuses sont les études où les auteurs utilisent désormais des biomasses organiques agricoles (résidus de canne à sucre, cosse de caroube,...), industrielles (présures de fromage, eaux usées d'industrie sucrière,...) ou municipales (déchets ménagers, eaux usées,...) contenant des matières métabolisables mais considérées comme déchets (Chong *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2010 ; Li & Fang, 2007a ; Urbaniec & Bakker, 2015), afin de ne pas concurrencer le secteur agro-alimentaire (Das *et al.*, 2008). Les biomasses possédant les critères suivants (Guo *et al.*, 2010) : riches en sucres fermentescibles, abondantes, disponibles et peu coûteuses, sont des candidates idéales pour produire de l'hydrogène à partir de ressources renouvelables. Répondant à ces critères et pour cette étude exploratoire, nous avons sélectionné un type principal de biomasse non encore explorée à ce jour pour la production d'hydrogène par fermentation obscure : la biomasse 'bourbes' de raisin, issue de la viniculture. Pour rappel, les bourbes de raisins sont issues de l'étape de décantation du jus de raisin obtenu après pressage des grappes de raisin.

Jusqu'à ce jour, les études réalisées sur la fermentation obscure se sont focalisées, non seulement, sur le prétraitement de la biomasse complexe utilisée (Cheng *et al.*, 2011; Ntaikou *et al.*, 2010), mais également sur l'ajout, presque systématique, d'un inoculum bactérien prétraité (Ren *et al.*, 2008 ; Singh & Wahid, 2015 ; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006 ; Yin & Wang, 2016) ainsi que de macronutriments (N, P, S) et éléments traces (Fe, K, Mg, Ni, Ca, B, Mo, Zn, Co, Cu, Mn) (Hawkes *et al.*, 2007) à la biomasse utilisée comme substrat. Seules quelques études, se sont essayées à ne pas utiliser d'inoculum microbien externe mais uniquement la microflore bactérienne endogène contenue dans des biomasses (Kim *et al.*, 2009 ; Marone *et al.*, 2014 ; Shimizu *et al.*, 2008).

Hwang *et al.* (2011) ont étudié la faisabilité de produire de l'hydrogène par fermentation obscure à partir de fruits mûrs (raisins, pommes et poires), biomasse proche de celle utilisée dans notre étude bien qu'elle concurrence l'alimentation humaine. Dans leur étude, des fruits mûrs sont mélangés à de l'eau distillée avant d'être broyés et utilisés comme biomasse en présence d'un inoculum externe

(boues issues d'un digesteur anaérobie d'une station d'épuration) prétraité thermiquement auquel des nutriments (N, P, S, K, Mg, Mn, Fe, Cu, Co, Na) sont additionnés. Ils obtiennent les plus faibles valeurs de volumes d'hydrogène produit et de rendements en hydrogène à partir des grappes de raisin (respectivement, $0,31 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$ et $0,1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ d'hydrogène par mol de glucose) en comparaison aux pommes ou aux poires (respectivement, 3,8 à 4,5 $\text{L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$ et 1,4 à 2,2 $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$). Ils justifient l'obtention de ces faibles valeurs par le fait que selon *Goñi et al.*, 2005, les pépins et/ou les pellicules des raisins pourraient inhiber la production d'hydrogène notamment par leurs teneurs élevées en polyphénols et en fibres. Toutefois, lorsque l'on regarde les concentrations totales en métabolites (éthanol, acétate, propionate, butyrate et valérate) produits et la quantité de sucres consommés, on s'aperçoit que les concentrations totales en métabolites sont plus faibles pour les grappes de raisins que les pommes ou les poires, mais les quantités de sucres consommés sont identiques aux autres fruits voire même légèrement supérieures. Par ailleurs, aucun bilan carbone n'a été réalisé. Ces observations permettent de conclure quant à la présence d'autres métabolites représentatifs de bactéries consommatrices de sucres, tels que le lactate.

Guo et al. (2014) ont étudié la potentialité d'utiliser des substrats organiques solides encore jamais explorés pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. Parmi ces substrats, des marcs de raisin ont été testés après les avoir cryo-lyophilisés dans une atmosphère dépressurisée, puis, broyés. Les broyats de marcs de raisin, mélangés à une solution tampon et à un inoculum externe (boues de digesteur anaérobie traitant la vinasse) prétraité thermiquement à 90°C pendant 10 min puis, stocké à -20°C et sans ajout de nutriments additionnels ont permis d'obtenir le volume d'hydrogène le plus faible parmi toutes les biomasses testées (pommes, déchets de légumes, tiges de topinambour,...) et égale à $1 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{matière sèche}}$. Les auteurs justifient cette faible production par le fait que ce substrat soit particulièrement riche en protéines, ce qui n'est pas favorable à la production d'hydrogène. D'autres études corroborent également le fait que des substrats riches en protéines produisent peu ou pas d'hydrogène lors de la fermentation (*Dong et al.*, 2009 ; *Kapdan & Kargi*, 2006).

Dans les études de *Hwang et al.* (2011) et *Guo et al.* (2014), les raisons évoquées pour justifier les faibles valeurs de productions et de rendements en hydrogène obtenues à partir des grappes de raisin mûres et des marcs de raisin, ne sont pas clairement établies. En effet, est-ce le prétraitement effectué sur la biomasse qui libère des composés inhibiteurs de la production d'hydrogène ? Ou bien est-ce l'utilisation d'un inoculum externe qui n'est pas adapté à la biomasse (substrat) ?

Kim et al. (2009) ont étudié pour la première fois avec succès, la faisabilité de produire de l'hydrogène par fermentation endogène de la biomasse, c'est-à-dire, que la biomasse est utilisée à la fois comme substrat et consortium microbien. La biomasse utilisée était constituée des déchets alimentaires issus d'une cafétéria qui ont été broyés, puis, prétraités thermiquement ou chimiquement.

Aucun nutriment additionnel n'a été ajouté. Ils concluent sur la faisabilité de produire de l'hydrogène à partir de déchets alimentaires prétraités à 90°C pendant 20 min avec des valeurs de rendements de $2,05 \pm 0,35 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose consommé}}$ et de volumes d'hydrogène produit de $153 \pm 24 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{matière sèche}}$.

D'autres auteurs (Marone *et al.*, 2014 ; Shimizu *et al.*, 2008) ont étudié la faisabilité d'utiliser des déchets de fruits et/ou de légumes pour produire de l'hydrogène par fermentation endogène sans effectuer de prétraitement thermique ni ajout de nutriments additionnels. Ils concluent que la fermentation endogène est faisable à partir de ces déchets sans production de méthane et dans les conditions indiquées précédemment mais avec des valeurs faibles de production d'hydrogène : respectivement $90 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{matière sèche}}$ et $24 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{matière volatile}}$.

Par ailleurs, Kim *et al.* (2009), Shimizu *et al.* (2008) et Marone *et al.* (2014) ont montré, très récemment, la faisabilité d'utiliser le consortium microbien endogène de la biomasse pour la production d'hydrogène. Toutefois, la nécessité d'utiliser un prétraitement thermique semble être nécessaire à l'obtention de meilleures performances de production d'hydrogène.

Compte tenu de ces études antérieures, nous avons choisi de ne pas ajouter de nutriments additionnels au milieu réactionnel afin de tester d'une part, le potentiel de production en hydrogène de différentes biomasses riches en sucres fermentescibles et non encore explorées à ce jour, en présence d'un inoculum externe prétraité thermiquement ou non et d'autre part, de tester la faisabilité d'utiliser la biomasse comme substrat et consortium microbien en effectuant ou non un prétraitement thermique.

Ce chapitre, est composé de deux parties. La première partie porte, d'une part, sur la possibilité d'utiliser différentes biomasses issues de la filière viticole et de l'industrie papetière en tant que substrat (fermentation exogène), et d'autre part, sur le potentiel de production d'hydrogène de différentes biomasses en tant que substrat et consortium microbien (fermentation endogène). Les performances de production d'hydrogène et les métabolites produits obtenus ainsi que les structures des communautés microbiennes identifiées en fonction des différents tests de fermentation sont abordés.

Les biomasses viticoles et papetières ont été choisies pour leurs compositions riches en matières fermentescibles ainsi que leurs accessibilités et leurs abondances.

Ce travail est fondé sur les postulats suivants :

- (i) les biomasses utilisées étant issues de l'agriculture et de l'industrie ne sont pas stériles, elles contiennent une flore microbienne endogène ;
- (ii) cette microflore endogène est adaptée à la biomasse, elle permet de la biodégrader de manière plus aisée par rapport à un inoculum externe ;

(iii) la diversité microbienne des biomasses pouvant être élevée, il est nécessaire d'effectuer un prétraitement thermique afin d'éliminer les micro-organismes consommateurs d'hydrogène.

1.2. Mise en œuvre dans le bioréacteur

Cette étude préliminaire et exploratoire s'appuie sur le fonctionnement optimisé du bioréacteur semi-batch (Clion *et al.*, 2015). Les paramètres opératoires considérés comme optimaux sont : une température de fermentation de 37°C, une agitation de 220 tours par minute (tr/min), un débit de 50 mL/min d'azote utilisé comme gaz de balayage pour extraire les gaz produits par bullage dans le milieu fermentaire. Le pH a été régulé à une valeur supérieure ou égale à 5,7 et le pH initial a été ajusté à une valeur égale à 7,0.

Dans la première partie de l'étude, les biomasses ont été utilisées en tant que substrat en présence d'un inoculum externe. Ce type de fermentation sera appelé fermentation exogène. Les inocula utilisés sont des boues activées provenant de la zone anoxie de la Station d'épuration Urbaine (BSU) de l'Eurométropole. Les biomasses agricoles et industrielles testées comme substrats sont : les biomasses de type 'bourbes' Chardonnay (BCh) provenant du domaine de Poncétys, en Bourgogne et Pinot Gris (BPG) provenant du domaine Pfister, en Alsace, issues des vendanges 2012 ; les biomasses de type 'liqueurs' rouges (LiR) et noires (LiN) provenant de l'industrie papetière Tambec afin de tester un déchet de l'industrie. La figure 11 résume les fermentations réalisées avec les différentes biomasses.

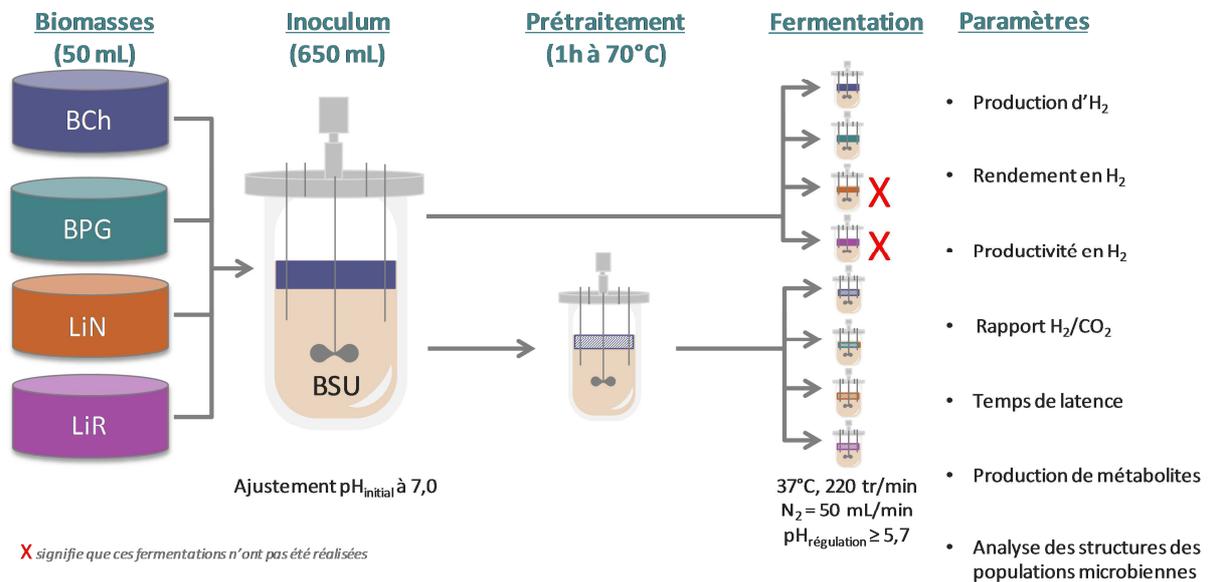


Figure 11 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester le potentiel de production d'hydrogène de différentes biomasses en fermentation exogène avec ou sans prétraitement thermique.

Dans la deuxième partie de l'étude, les biomasses ont été testées à la fois en tant que substrats mais également, en tant que consortia microbiens (figure 12). Ce type de fermentation sera qualifié de fermentation endogène.

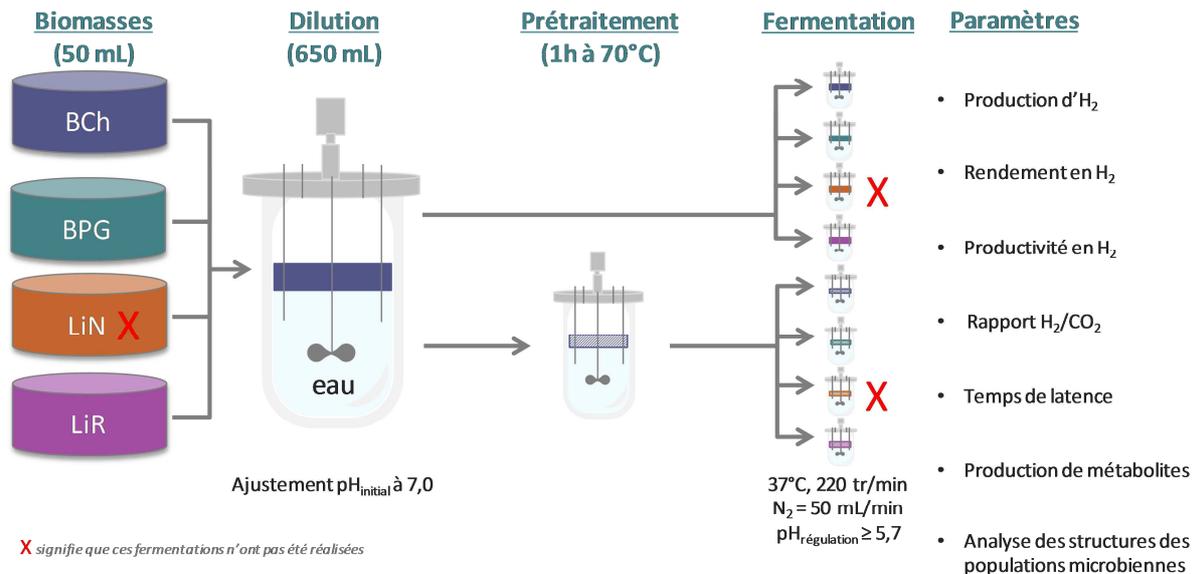


Figure 12 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester le potentiel de production d'hydrogène de différentes biomasses en fermentation endogène avec ou sans prétraitement thermique.

Lorsque le prétraitement thermique de 1h à 70°C a été utilisé, il a été réalisé sur le mélange substrat/consortium microbien, sans gaz de balayage.

2. Performances de production d'hydrogène par voie fermentaire

2.1. Evolution de la production d'hydrogène par fermentation exogène

La figure 13 représente l'évolution de la production d'hydrogène au cours du temps, obtenue par fermentation exogène, en fonction des différentes biomasses utilisées comme substrats complexes après avoir effectué ou non un prétraitement thermique.

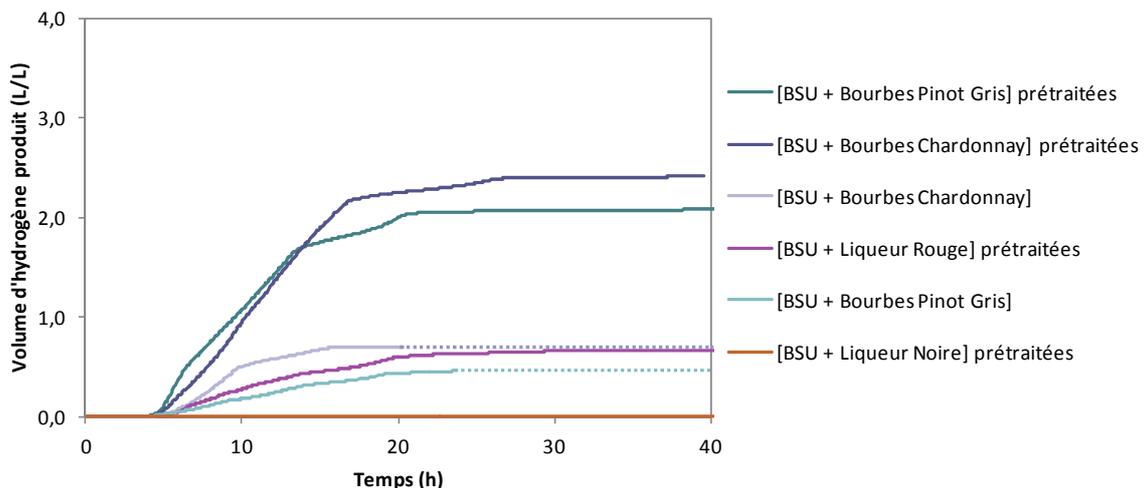


Figure 13 : Evolution de la production d'hydrogène en litre par litre de milieu réactionnel au cours du temps obtenue par fermentation exogène avec ou sans prétraitement thermique à partir de différentes biomasses. (BSU = Boues de Station d'épuration Urbaine)

La figure 13 montre d'une part l'influence du prétraitement thermique sur la production d'hydrogène, et d'autre part l'influence du type de substrat complexe sur le potentiel de production d'hydrogène. L'allure générale des courbes est similaire : après un temps de latence d'environ 5 h, le consortium

microbien produit de l'hydrogène avec une productivité maximale pendant quelques heures à une dizaine d'heures en fonction des tests, puis la production d'hydrogène est ralentie jusqu'à devenir nulle. Cette allure de courbe, liée à la courbe de croissance microbienne (Zwietering *et al.*, 1990) est transposée à la production d'hydrogène. La production finale d'hydrogène obtenue par fermentation exogène (avec consortium microbien externe) est différente en fonction des tests et peut être regroupée en trois niveaux de production : un premier niveau composé des 'bourbes' (Chardonnay et Pinot Gris) prétraitées thermiquement ayant les productions d'hydrogène les plus élevées (respectivement 2,4 et 2,1 $L_{H_2}/L_{réacteur}$) ; un deuxième niveau composé des biomasses 'bourbes' (Chardonnay et Pinot Gris) non prétraitées thermiquement et 'liqueur rouge' prétraitée thermiquement ayant des volumes de production d'hydrogène trois fois plus faibles que le 1^{er} niveau (entre 0,5 et 0,7 $L_{H_2}/L_{réacteur}$) ; et, enfin un dernier niveau composé de la biomasse 'liqueur noire' prétraitée thermiquement ayant une production en hydrogène quasiment nulle (0,01 $L_{H_2}/L_{réacteur}$).

Lorsque le prétraitement thermique est réalisé, on remarque que seules les biomasses agricoles permettent de produire des volumes d'hydrogène élevés respectivement de 2,1 et 2,4 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ pour les biomasses 'bourbes Pinot Gris' et 'bourbes Chardonnay', contre respectivement 0,01 et 0,7 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ pour les biomasses 'liqueur noire' et 'liqueur rouge'. Ceci peut s'expliquer par le fait que les biomasses industrielles sont faiblement concentrées en sucres solubles. En effet, les biomasses 'liqueurs' sont composées de polysaccharides complexes alors que les biomasses 'bourbes' sont, quant à elles, composées majoritairement de glucose et fructose (analyse réalisée par UPLC-ELSD), hexoses directement assimilables par les bactéries productrices d'hydrogène. La biomasse 'liqueur rouge' est composée majoritairement de polysaccharides : lignine, hémicellulose et cellulose ; et minoritairement (jusqu'à 10 %) de sucres solubles. En revanche, la liqueur noire est composée principalement de lignine et d'hémicellulose (Petit-Conil, 1999), sucres non assimilables directement par les bactéries, ce qui peut expliquer le potentiel de production d'hydrogène quasiment nul. Un prétraitement additionnel libérant des sucres solubles de ces polysaccharides serait alors requis pour utiliser cette biomasse pour la production d'hydrogène, tel qu'il est pratiqué actuellement sur les déchets lignocellulosiques par des agents de traitements chimiques (acides, bases, solvant), physiques (broyage, irradiation, eau liquide chaude, ultrasons, micro-ondes), physico-chimiques (oxydant, traitement à la vapeur d'eau) ou biologiques (champignons, enzymes) (Cheng *et al.*, 2011 ; Ntaikou *et al.*, 2010). Les concentrations en sucres étant équivalentes pour les biomasses 'bourbes' et 'liqueur rouge', la différence de volumes d'hydrogène produit peut s'expliquer par le fait que le prétraitement effectué sur la biomasse 'liqueur rouge' libère des produits de dégradation tels que des dérivés furaniques, des composés phénoliques ou de la lignine, inhibiteurs à partir d'une concentration de 1 g/L de la production d'hydrogène (Quéménéur *et al.*, 2012).

Concernant l'influence du prétraitement sur la production d'hydrogène, on remarque que les

productions d'hydrogène sont trois fois plus élevées avec prétraitement thermique que sans (respectivement 2,1 et 2,4 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ contre 0,5 et 0,7 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ pour les biomasses 'bourbes Pinot Gris' et 'bourbes Chardonnay'). Ceci est en accord avec la littérature (Wang *et al.*, 2011 ; Baghchehsaraee *et al.*, 2008). En effet, les boues de station d'épuration sont constituées d'une abondante flore microbienne comprenant notamment des micro-organismes consommateurs d'hydrogène et/ou en compétition vis-à-vis des sucres présents dans le milieu. Même si la non détection de méthane suggère l'absence d'*Archeae*, cela ne permet pas d'affirmer l'absence d'autres micro-organismes hydrogénotrophes (bactéries homo-acétogènes,...), ni de micro-organismes compétiteurs (bactéries lactiques,...) vis-à-vis du sucre.

Cette première étude exploratoire montre clairement la faisabilité d'utiliser les biomasses 'bourbes' et 'liqueur rouge' en tant que substrat par les micro-organismes exogènes producteurs d'hydrogène après avoir effectué un prétraitement thermique. De plus, on notera une activité microbienne sans traitement thermique de la biomasse 'bourbes', certes trois fois plus faible en volume d'hydrogène produit, mais tout de même significative. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré qu'un volume de 37,1 $mL/L_{réacteur}$ a été produit à partir des boues de station d'épuration seules.

2.2. Evolution de la production d'hydrogène par fermentation endogène

L'activité microbienne des mélanges non prétraités thermiquement de biomasses et boues étant significative, nous nous sommes intéressés au potentiel de production d'hydrogène de la biomasse seule sans apport d'inoculum externe (fermentation endogène).

La figure 14 représente l'évolution de la production d'hydrogène, au cours du temps, obtenue par fermentation endogène, en fonction des différentes biomasses utilisées à la fois comme substrat et consortium microbien, après avoir effectué ou non un prétraitement thermique.

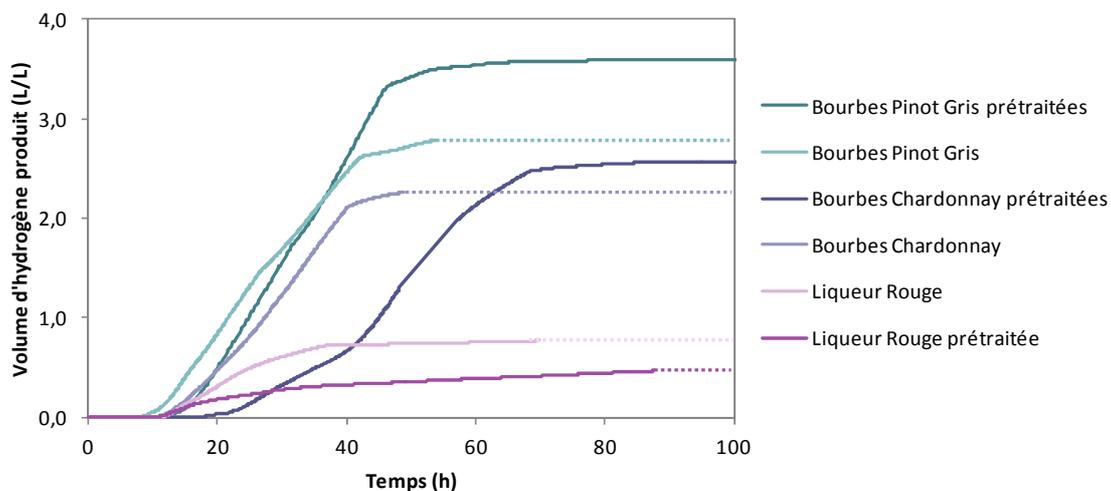


Figure 14 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps obtenue par différentes biomasses utilisées comme substrat et consortium microbien avec ou sans prétraitement thermique.

L'allure générale des courbes est similaire au paragraphe précédent, mis à part pour le temps de latence qui est plus élevé et varie entre 10 h et 20 h en fonction des biomasses. Lors de la fermentation exogène, ce temps de latence était réduit à 4 h ou 5 h car les micro-organismes producteurs d'hydrogène étaient plus nombreux, provenant à la fois de la biomasse (volume de 50 mL) mais aussi, des boues (volume de 650 mL). En revanche, lors de la fermentation endogène, la source de micro-organismes provient uniquement de la biomasse (volume de 50 mL). Par conséquent, le temps nécessaire à la croissance microbienne est plus élevé lorsque la taille du consortium bactérien est réduite (Swinnen *et al.*, 2004). Deux groupes se distinguent au niveau de la production finale cumulée en hydrogène : un premier niveau de production d'hydrogène compris entre 2,3 et 3,6 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ constitué par les biomasses agricoles (avec et sans prétraitement thermique) et un deuxième niveau de production d'hydrogène compris entre 0,5 et 0,8 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ composé de la biomasse 'liqueur rouge' (avec et sans prétraitement thermique). Ces volumes conséquents d'hydrogène constituent un point majeur et permettent de valider contre toute attente une activité microbienne productrice d'hydrogène émergente avec traitement thermique mais également sans traitement thermique.

Comme observé précédemment, les biomasses prétraitées 'bourbes' montrent des potentiels de production d'hydrogène plus élevés que la biomasse prétraitée 'liqueur rouge' : respectivement 3,6 et 2,6 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ contre 0,5 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ obtenus pour les biomasses prétraitées 'bourbes Pinot Gris', 'bourbes Chardonnay' et 'liqueur rouge'. Lorsque l'on compare ces résultats aux valeurs précédemment obtenues avec un inoculum externe prétraité thermiquement (respectivement 2,1 ; 2,4 ; 0,7 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ pour les biomasses 'bourbes Pinot Gris', 'bourbes Chardonnay' et 'liqueur rouge'), ils sont supérieurs pour les biomasses agricoles et inférieures pour la biomasse industrielle. De ce fait, il est mis en évidence que les biomasses agricoles contiennent un consortium microbien sélectionné par le traitement thermique plus performant que les boues de station d'épuration ; alors que le consortium microbien endogène de la biomasse 'liqueur rouge' est moins performant que celui des boues de station d'épuration. D'autre part, il est important de noter que les fermentations ont été réalisées sans ajout additionnel de nutriments. En conséquence, les biomasses contiennent non seulement un consortium microbien actif pour la production d'hydrogène mais également les nutriments nécessaires à leurs croissances et leurs métabolismes.

En comparant les biomasses prétraitées à celles qui n'ont pas été prétraitées, on remarque que seule la biomasse 'liqueur rouge' a un potentiel de production d'hydrogène plus élevé sans prétraitement qu'avec prétraitement thermique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la biomasse 'liqueur rouge' contienne des micro-organismes non sporulés producteurs d'hydrogène mais thermo-sensibles. Par ailleurs, la valeur de production d'hydrogène obtenue par la biomasse 'liqueur rouge' est identique à celle précédemment obtenue avec un inoculum prétraité (0,7 $L_{H_2}/L_{réacteur}$). Ainsi, le consortium endogène non prétraité de la biomasse 'liqueur rouge' a un potentiel de production d'hydrogène aussi

élevé que celui de l'inoculum externe prétraité. Malgré cela, les valeurs de production d'hydrogène obtenues par cette biomasse restent tout de même quatre fois inférieures à celles obtenues par les biomasses agricoles.

Concernant les biomasses agricoles, les valeurs de production d'hydrogène sont respectivement 14 % et 30 % inférieures pour les 'bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris' à celles ayant subi un prétraitement thermique, mais supérieures ou égales à celles obtenues par fermentation exogène avec prétraitement thermique, ce qui est remarquable. De plus, les valeurs obtenues par fermentation endogène sans prétraitement thermique (respectivement 2,3 et 2,8 $L_{H_2}/L_{réacteur}$ pour les biomasses 'bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris') sont environ 10 fois supérieures à celles de la littérature (Hwang *et al.*, 2011) pour des raisins mûrs mixés testés en présence d'un inoculum externe prétraité thermiquement. Par ailleurs, on remarque que le temps de latence est plus faible lorsque la biomasse n'est pas prétraitée et cela est d'autant plus vrai avec la biomasse 'bourbes Chardonnay'. Ceci met en évidence une adaptation déjà acquise des consortia microbiens endogènes à leurs milieux, ce qui leur permet de dégrader plus rapidement les sucres en hydrogène. En conséquence, ce procédé peut s'affranchir du prétraitement thermique, dépense énergétique coûteuse.

Ces résultats montrent clairement et pour la première fois la faisabilité d'utiliser les biomasses 'bourbes' et 'liqueur rouge' à la fois en tant que substrat mais également en tant que consortium microbien, sans ajout de nutriment additionnel, ni d'utilisation de prétraitement thermique, pour la production d'hydrogène avec des volumes produits supérieurs ou égaux à ceux obtenus par fermentation exogène avec prétraitement thermique.

Les biomasses agricoles ayant des potentiels de production d'hydrogène beaucoup plus importants que les biomasses industrielles 'liqueur rouge' ou 'liqueur noire', seules celles-là seront étudiées au niveau de leurs performances de production, et analysées au niveau des métabolites produits et des structures des communautés microbiennes (T-RFLP).

2.3. Performances de production d'hydrogène

Les performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses 'bourbes' utilisées en tant que substrat et/ou consortium microbien, prétraitées ou non, ont été regroupées dans la figure 15.

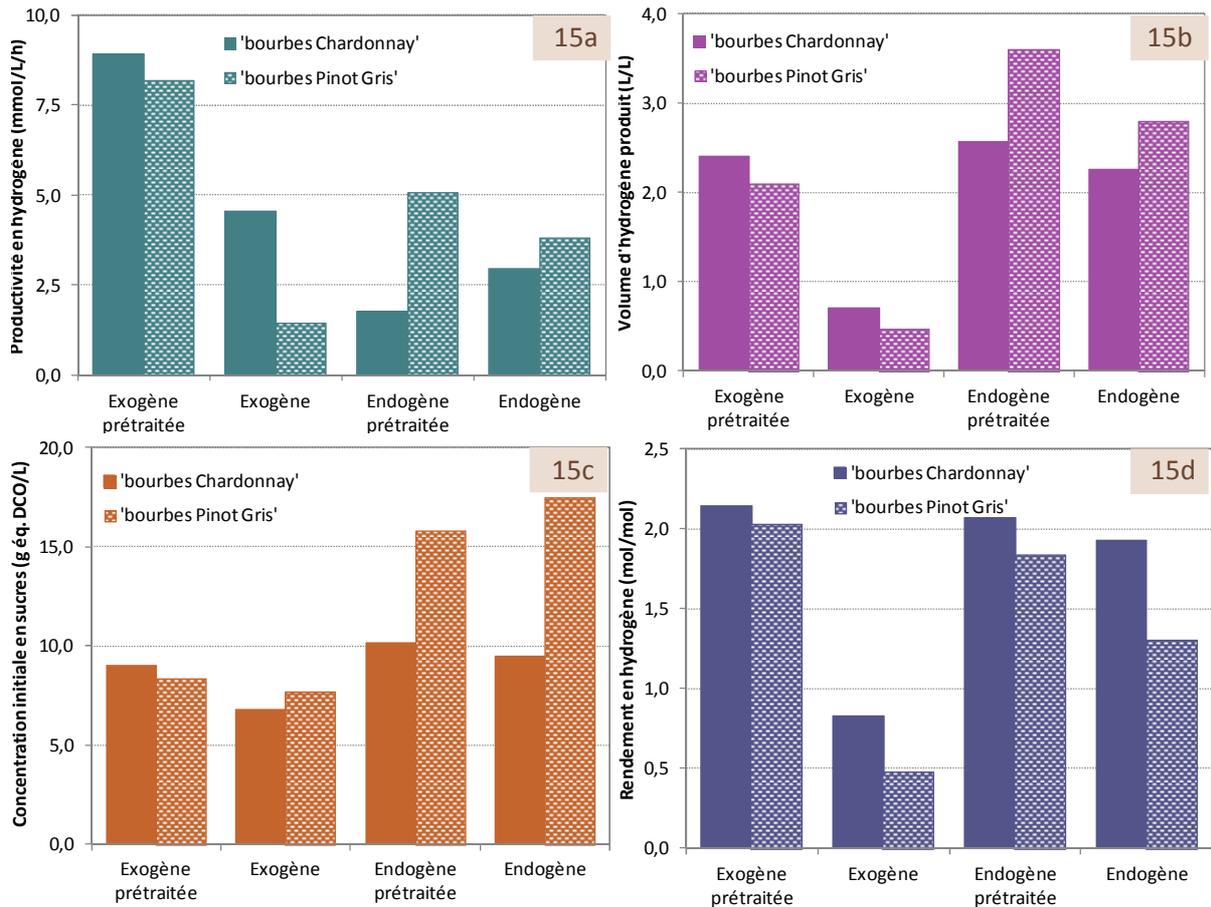


Figure 15 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses 'bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris' utilisées en fermentation exogène ou endogène, avec ou sans prétraitement thermique : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

Les résultats de la figure 15a indiquent que la fermentation exogène de la biomasse prétraitée a obtenu les productivités les plus élevées, que ce soit pour les 'bourbes Chardonnay' ou les 'bourbes Pinot Gris' : respectivement 8,91 mmol/L/h et 8,18 mmol/L/h. Les valeurs de productivités des autres fermentations sont 2 à 5 fois plus faibles que celle obtenue par la fermentation exogène de la biomasse prétraitée. Les valeurs de productivités en hydrogène respectivement obtenues en fermentation endogène à partir des 'bourbes Chardonnay' et des 'bourbes Pinot Gris' sont égales à 2,97 mmol/L/h et 3,80 mmol/L/h, ce qui est cohérent puisque *a priori* la taille du consortium microbien est quatorze fois plus petite en fermentation endogène qu'en fermentation exogène. Enfin, les productivités obtenues en fermentation exogène sans prétraitement de la biomasse et en fermentation endogène avec prétraitement de la biomasse diffèrent en fonction de la biomasse. Les 'bourbes Chardonnay' ont obtenu la productivité la plus faible en fermentation endogène avec prétraitement (1,78 mmol/L/h) et une productivité intermédiaire en fermentation exogène (4,54 mmol/L/h). A l'inverse, les 'bourbes Pinot Gris' ont obtenu la productivité la plus faible en fermentation exogène (1,43 mmol/L/h) et une productivité intermédiaire en fermentation endogène avec prétraitement (5,05 mmol/L/h). Une des hypothèses qui permettrait d'expliquer en partie ce phénomène est la présence de bactéries productrices d'hydrogène particulièrement thermosensibles dans les 'bourbes Chardonnay', d'où la

productivité en hydrogène faible obtenue en fermentation endogène avec prétraitement thermique. Par ailleurs, il est à noter que les valeurs de productivité ne sont pas corrélées aux volumes d'hydrogène produit. En effet, les vitesses de production d'hydrogène les plus élevées sont obtenues par fermentation exogène avec prétraitement thermique, alors que les volumes d'hydrogène produit les plus élevés sont obtenus par fermentation endogène avec prétraitement thermique.

Les résultats de la figure 15b et 15c indiquent que les 'bourbes Pinot Gris' ont un potentiel de production plus élevé que les 'bourbes Chardonnay' en fermentation endogène (avec et sans prétraitement) qui est corrélé à une concentration initiale en sucres plus élevée. En effet, les 'bourbes Pinot Gris' produisent en moyenne $3,2 \pm 0,6 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$ avec des concentrations initiales en sucres de $17 \pm 1 \text{ g éq. DCO/L}_{\text{réacteur}}$ en moyenne, alors que les 'bourbes Chardonnay' produisent en moyenne $2,4 \pm 0,2 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$ avec des concentrations initiales en sucres de $9,8 \pm 0,5 \text{ g éq. DCO/L}_{\text{réacteur}}$ en moyenne. Ces concentrations initiales en sucres élevées peuvent également justifier les plus fortes productivités en hydrogène obtenues en fermentation endogène (avec et sans prétraitement) par les bourbes 'Pinot Gris'. Rappelons que les biomasses viticoles ont été stockées à 4°C après avoir été récoltées lors des vendanges, afin de limiter leur maturation. Néanmoins, on remarque que les concentrations initiales en sucres diminuent au cours du temps, ce qui montre une évolution des biomasses lors du stockage. Cette tendance sera à confirmer ou infirmer en multipliant le nombre de tests sur divers échantillons dans le chapitre V.

Enfin, les résultats de la figure 15d indiquent des rendements en hydrogène non significativement différents ($p > 0,02$; t-test) avec une moyenne de $2,00 \pm 0,12 \text{ mol/mol}$ pour les fermentations exogènes/endogènes avec prétraitement ('bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris') et la fermentation endogène des 'bourbes Chardonnay'. Les 'bourbes Chardonnay' et les 'bourbes Pinot Gris' se comportent, au niveau du rendement en hydrogène obtenu, de façon similaire en fonction des fermentations, à l'exception de la fermentation endogène pour laquelle un rendement significativement plus faible est obtenu pour les 'bourbes Pinot Gris' ($1,30 \text{ mol/mol}$). Enfin, les rendements en hydrogène les plus faibles sont obtenus par fermentation exogène sans prétraitement thermique (respectivement $0,83 \text{ mol/mol}$ et $0,48 \text{ mol/mol}$ pour les 'bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris'). Lorsqu'un faible rendement est associé à un faible volume d'hydrogène produit, cela est le signe de la présence de micro-organismes hydrogénotrophes avec ou sans la présence de bactéries compétitrices pour le substrat (mais dans une moindre mesure), alors que lorsqu'un faible rendement n'est pas accompagné d'une faible production d'hydrogène, cela est le signe de la présence de micro-organismes compétiteurs pour le substrat avec ou sans la présence de micro-organismes hydrogénotrophes (mais dans une moindre mesure).

A partir des résultats obtenus pour l'ensemble des fermentations endogènes et exogènes, avec ou sans prétraitement thermique, le test statistique de Pearson a permis de déceler une corrélation positive

linéaire ($r = 0,992$ sur quatre observations) significative au seuil de 1 % entre les valeurs de concentrations initiales en sucres et celles de volumes d'hydrogène produit, pour les tests ayant subi un prétraitement thermique, et une corrélation positive linéaire ($r = 0,995$ sur quatre observations) significative au seuil de 1 % entre les valeurs de rendements en hydrogène et celles de volumes d'hydrogène produit, pour les tests de fermentation exogène (figure 16).

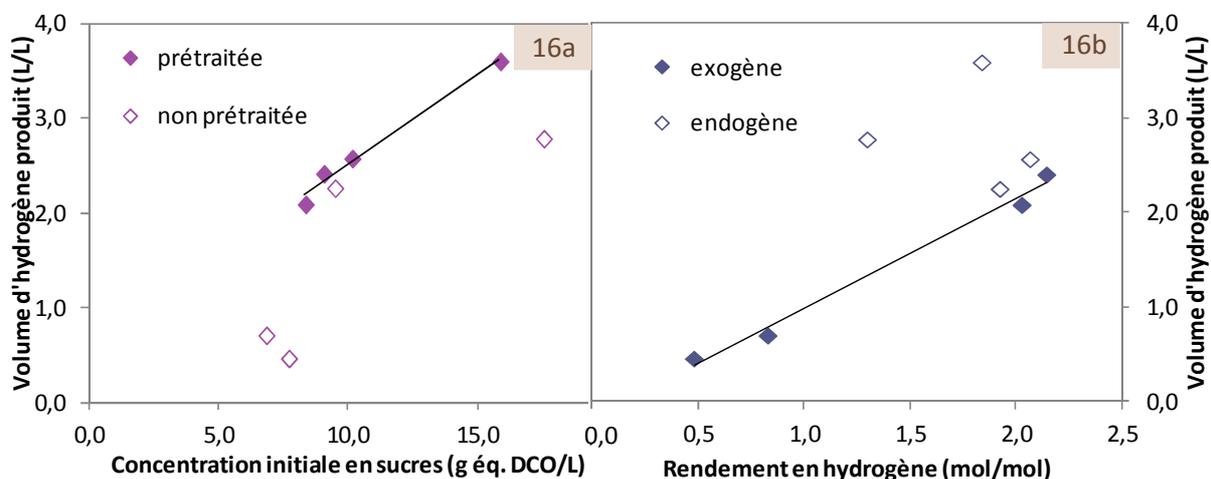


Figure 16 : Corrélations entre la concentration initiale en sucres et le volume d'hydrogène produit, et, entre le rendement en hydrogène et le volume d'hydrogène produit, obtenues par les différents tests de fermentations des 'bourbes'.

La figure 16a nous permet d'émettre la remarque suivante : plus la quantité initiale de sucres est élevée et plus il y a de substrat disponible pour, non seulement, les bactéries productrices d'hydrogène, mais également celles compétitives à la voie de production d'hydrogène et les micro-organismes hydrogénotrophes quand aucun traitement n'a été effectué sur la biomasse. En revanche, le prétraitement thermique effectué sur la biomasse permet de sélectionner les bactéries ayant la capacité à sporuler et inactiver les micro-organismes n'ayant pas cette capacité tels que les archées méthanogènes et certaines bactéries productrices de propionate. C'est pourquoi, il existe une corrélation linéaire entre la concentration initiale en sucres et le volume d'hydrogène produit lorsque la biomasse a été prétraitée thermiquement.

La production d'hydrogène proportionnelle au rendement en hydrogène (figure 16b) met en évidence l'efficacité du prétraitement thermique sur l'inoculum externe (fermentation exogène) pour lequel la diversité microbienne a été réduite. En revanche, la production d'hydrogène par le consortium microbien endogène sur quatre observations est indépendante de son efficacité (rendement). Cela met en évidence l'activité d'un consortium microbien pour la production d'hydrogène même en l'absence d'un traitement thermique.

2.4. Métabolisme

Lors de cette série de tests de fermentation, l'analyse des métabolites produits réalisée par GC-FID permettra d'établir les voies métaboliques utilisées par les consortia bactériens des fermentations endogènes et exogènes, avec ou sans prétraitement thermique, dans les conditions de fonctionnement

du bioréacteur en mode semi-batch. Ces analyses permettront également de calculer les bilans de matière en convertissant les métabolites produits en équivalent DCO (demande chimique en oxygène), usuellement utilisée pour représenter la totalité de la matière carbonée. Les sucres et les métabolites ont été convertis en DCO grâce aux facteurs de conversion issus de la littérature (Angelidaki & Sanders, 2004 ; Miron *et al.*, 2000).

La figure 17 représente les bilans de matière calculés sur la DCO initiale et finale. Les quantités initiales de métabolites et d'hexoses ont été converties en équivalent DCO et leurs sommes représentent la DCO initiale. L'équivalent DCO finale est calculé à partir de l'hydrogène, des métabolites produits et des sucres non consommés. Les bilans de matière calculés sont compris entre 51 % et 74 %. Cela signifie que l'équivalent DCO finale n'a pas été complètement identifié pour certains tests de fermentation. Cela peut s'expliquer en partie par le fait que la biomasse microbienne ne soit pas quantifiée. Toutefois, la littérature montre que la proportion représentée par celle-ci (ayant pour formule $C_5H_7NO_2$) ne dépasse en généralement pas les 10 %. Par conséquent, cela signifie que tous les métabolites produits n'ont pas été identifiés dans cette partie de l'étude par analyse GC-FID.

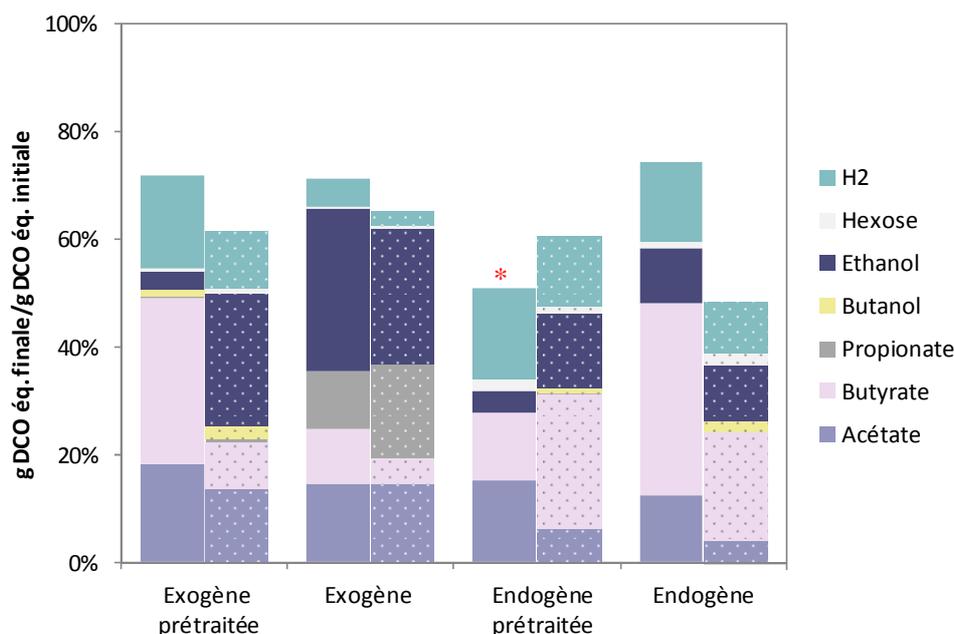


Figure 17 : Bilans de matière calculés pour les différents tests de fermentation à partir des biomasses 'bourbes Chardonnay' (couleur unie) et 'bourbes Pinot Gris' (couleur à points). * signifie que les métabolites initiaux n'ont pas été mesurés.

Les bilans de matière incomplets calculés à partir de l'analyse des métabolites par GC-FID ont mis en évidence la nécessité d'utiliser une technique analytique complémentaire basée sur l'analyse des acides organiques par HPLC-UV. Ces analyses permettront de compléter ces bilans de matière et seront réalisées dans les études ultérieures de ce manuscrit.

La figure 18 représente la distribution des métabolites et des gaz produits, normalisée par la quantité initiale en sucres, pour les huit tests de fermentation précédents. Le choix de la normalisation se justifie par le fait que les quantités initiales en sucres varient trop fortement d'une fermentation à

l'autre entre 6,8 et 17,5 g éq. DCO/L. Une consommation de métabolite est représentée par une barre d'histogramme négative, alors qu'une production est représentée par une barre d'histogramme positive.

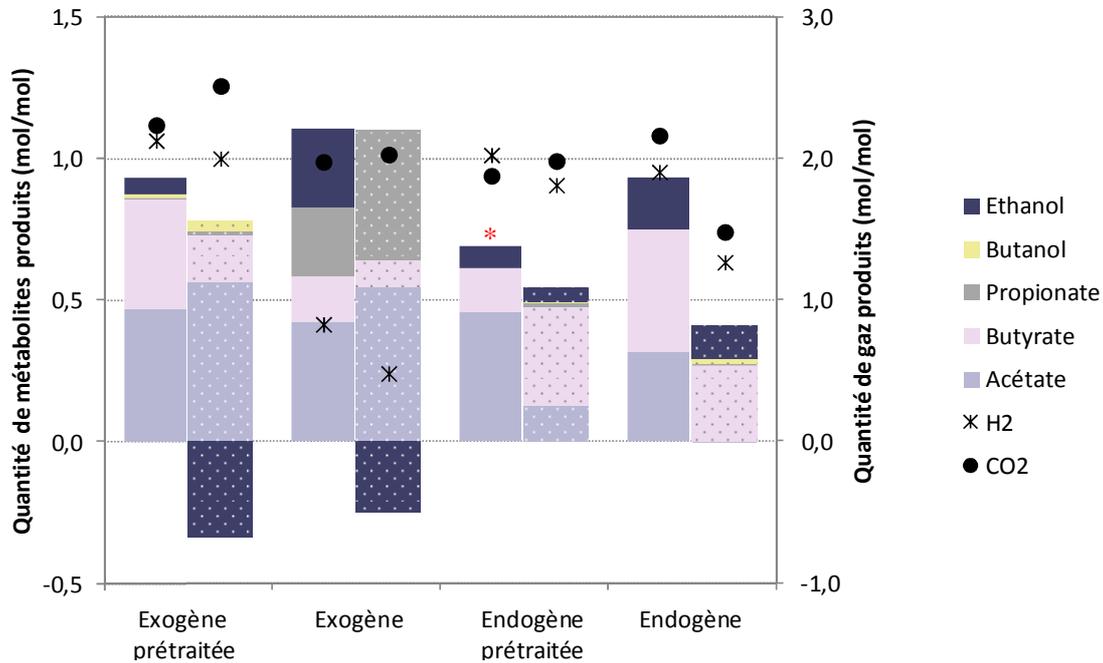


Figure 18 : Distribution des métabolites et des gaz produits, et quantités initiales de sucres, pour les huit tests de fermentation à partir des biomasses 'bourbes Chardonnay' (couleur unie) et 'bourbes Pinot Gris' (couleur à points). *signifie que les métabolites initiaux n'ont pas été mesurés.

Quelles que soient les biomasses et les conditions utilisées, l'acétate et le butyrate sont les métabolites majoritairement produits mais en quantités différentes (respectivement, entre 0,13 et 0,56 mol_{acétate}/mol_{hexoses initiaux}, et, entre 0,10 et 0,43 mol_{butyrate}/mol_{hexoses initiaux}) à l'exception des fermentations exogènes sans prétraitement thermique pour lesquelles la quantité de propionate devient co-majoritaire avec l'acétate et l'éthanol. L'éthanol et le butanol sont les métabolites minoritairement produits avec des quantités respectives inférieures ou égales à 0,18 mol_{éthanol}/mol_{hexoses initiaux} et 0,04 mol_{butanol}/mol_{hexoses initiaux}.

Le test de fermentation endogène avec prétraitement thermique des 'bourbes Chardonnay' est le seul test pour lequel l'analyse des métabolites initiaux n'a pas été réalisée. Ainsi, l'histogramme représente uniquement les métabolites mesurés en fin de fermentation. La biomasse 'bourbes' contenant à la fois des bactéries et des levures, l'éthanol peut être produit soit par la réduction de l'acétaldéhyde (levures) et/ou par la conversion de l'acétyl-CoA (bactéries). La figure 19 représente les quantités d'éthanol initiales en fonction de la durée de stockage de la biomasse à 4°C. A partir de cette figure (le test de fermentation ayant été réalisé sur la biomasse après 21 jours de stockage à 4°C), on peut affirmer que l'éthanol présent initialement est en faible quantité, ce qui a peu d'impact sur les métabolites produits.

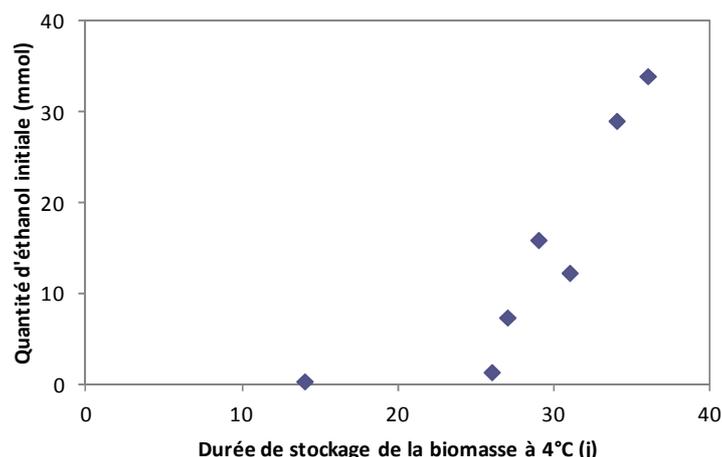


Figure 19 : Relation entre le temps de stockage de la biomasse et la quantité initiale d'éthanol dans la biomasse diluée 'bourbes' dans le bioréacteur.

Par ailleurs, on remarque qu'à partir de 30 mmol d'éthanol présent initialement dans la biomasse 'bourbes', une partie est reconsommée au cours de la fermentation. C'est pourquoi, on observe des barres d'histogramme négatives (figure 18) pour la fermentation exogène des 'bourbes Pinot Gris'.

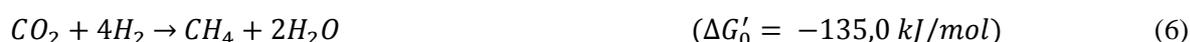
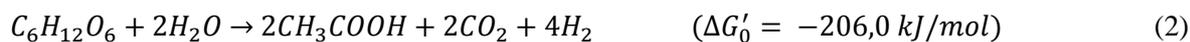
❖ Influence du prétraitement thermique sur les fermentations exogènes

La figure 8 indique que le prétraitement thermique appliqué sur le consortium externe permet d'inactiver les bactéries productrices de propionate. En effet, lors de la fermentation exogène sans prétraitement, des quantités élevées de propionate sont produites (en moyenne $0,35 \pm 0,15$ mol_{propionate}/mol_{hexoses initiaux} contre $0,010 \pm 0,001$ mol_{propionate}/mol_{hexoses initiaux} avec prétraitement), lesquelles sont accompagnées de faibles quantités d'hydrogène produit ($0,7 \pm 0,2$ mol_{H₂}/mol_{hexoses initiaux} contre $2,1 \pm 0,1$ mol_{H₂}/mol_{hexoses initiaux} avec prétraitement). Ceci est en accord avec la réaction de production du propionate (équation 1), ce qui permet d'expliquer les faibles rapports molaires H₂/CO₂ et rapports molaires H₂/[2*(butyrate + acétate)] obtenus en fermentation exogène sans prétraitement thermique (moyennes respectives de $0,33 \pm 0,13$ contre $0,87 \pm 0,11$ avec prétraitement ; de $0,54 \pm 0,24$ contre $1,31 \pm 0,09$ avec prétraitement).



Pour rappel, la production d'hydrogène est réalisée principalement par les voies métaboliques productrices d'acétate et de butyrate (équations 2 et 3). Il est ainsi possible de calculer la quantité d'hydrogène théorique produite à partir des quantités molaires d'acétate et de butyrate produit : $2*(butyrate + acétate)$. Une valeur du rapport de la quantité d'hydrogène mesurée sur la quantité d'hydrogène théorique $H_2/[2*(butyrate + acétate)]$ égale à 1, indique que les voies butyrate et acétate sont les voies métaboliques majoritaires utilisées pour produire l'hydrogène ; une valeur supérieure à 1 indique qu'une partie de l'hydrogène mesuré est produite par une autre voie métabolique que les voies acétate et butyrate ; et/ou qu'une partie de l'acétate/butyrate peut être reconsommée pour la production d'autres métabolites, c'est le cas par exemple de la voie acétone lorsque les conditions

sont propices à la solvantogénèse ; enfin, une valeur inférieure à 1 indique qu'une partie de l'hydrogène produit a été reconsommée via d'autres voies métaboliques, telles que la voie propionate (équation 1), la voie homo-acétogène (équation 4), la voie sulfato-réductrice (équation 5) ou la voie méthanogène (équation 6), et/ou qu'une partie de l'acétate mesuré est produit par une autre voie métabolique non productrice d'hydrogène, c'est le cas par exemple de la voie homo-fermentaire (équation 7).



Dans le cas de la fermentation exogène sans prétraitement, le rapport molaire $H_2/[2*(\text{butyrate} + \text{acétate})]$ inférieur à 1 est dû à la consommation d'une partie de l'hydrogène produit pour la production de propionate. Toutefois, les bilans de matière obtenus étant incomplets (respectivement 71 % et 65 % pour les 'bourbes Chardonnay' et les 'bourbes Pinot Gris'), il n'est pas à exclure que d'autres voies hydrogénotrophes aient été utilisées telles que la voie homo-acétogène (équation 4) et la voie sulfato-réductrice (équation 5) ; la voie méthanogène (équation 6) étant écartée en raison de la non détection de méthane lors des fermentations.

❖ Influence du prétraitement thermique sur les fermentations endogènes

En ce qui concerne les fermentations endogènes, le prétraitement thermique effectué sur la biomasse n'a que peu d'influence sur les métabolites produits analysés par GC-FID. On remarque surtout une différence au niveau du cépage. Le prétraitement thermique effectué sur les 'bourbes Chardonnay' diminue d'un facteur 3,0 la quantité de butyrate produit, mais sans affecter pour autant la production d'hydrogène. On note toutefois, une inversion du rapport H_2/CO_2 qui devient supérieur à 1 avec le prétraitement thermique (respectivement 1,08 contre 0,88, avec et sans prétraitement thermique). Le prétraitement thermique effectué sur les 'bourbes Pinot Gris' augmente les quantités d'acétate et de butyrate produit d'un facteur respectif de 8,9 et 1,3, ce qui a pour conséquence d'augmenter la production d'hydrogène d'un facteur 1,4. Les bilans de matière étant incomplets, cela met en évidence la présence d'autres voies compétitrices pour le substrat telles que le lactate, qu'il sera nécessaire de confirmer ou d'infirmer en effectuant des analyses de métabolites par d'autres techniques d'analyse.

❖ Influence des bactéries endogènes

La comparaison des fermentations endogènes aux fermentations exogènes (avec et sans prétraitement) indique une différence au niveau des proportions des voies acétate et butyrate. En effet, les rapports

molaires butyrate/acétate indiquent que la voie butyrate est plus utilisée que la voie acétate lorsque la fermentation est endogène (valeurs comprises entre 1,38 et 19,07), à l'exception de la fermentation endogène avec prétraitement des 'bourbes Chardonnay' (0,33), et, inversement pour la fermentation exogène (valeurs comprises entre 0,18 et 0,81). Une faible valeur de rapport molaire butyrate/acétate peut indiquer la présence de bactéries acétogènes homo-fermentaires ou bien homo-acétogènes. Les rapports $H_2/[2*(butyrate + acétate)]$ montrent que les fermentations endogènes ($1,77 \pm 0,41$) utilisent la voie formiate en plus des voies butyrate et acétate pour produire l'hydrogène, car il est peu probable qu'une partie de l'acétate et du butyrate ait été reconvertie pour produire de l'acétone puisque le pH était régulé à une valeur supérieure ou égale à 5,7, valeur trop élevée pour induire la solvantogénèse (Jones *et al.*, 1986). En revanche, la présence de butanol dans le milieu peut être le signe qu'il y ait eu production d'acétone. Toutefois, les quantités de butanol produit étant très faibles, cela signifie que celles de l'acétone le sont également, et donc l'impact sur les rapports $H_2/[2*(butyrate + acétate)]$ ne serait pas significatif. L'utilisation supplémentaire de la voie formiate aux voies butyrate et acétate est donc la plus plausible. Ceci est en accord avec les bilans de matières calculés pour les fermentations endogènes qui sont incomplets. Ces hypothèses pourront être confirmées ou infirmées par leurs mesures avec d'autres techniques d'analyses.

En conclusion, les analyses de performances de production d'hydrogène et des voies métaboliques utilisées ont montré que la production d'hydrogène était liée aux voies métaboliques utilisées par les micro-organismes présents. On a notamment mis en évidence que le prétraitement thermique avait une action d'inactivation des bactéries hydrogénotrophes productrices de propionate lors des fermentations exogènes. Ceci indique que ces bactéries provenaient des boues de station d'épuration urbaine. On a également montré que les différences de production d'hydrogène par fermentation endogène avec ou sans prétraitement thermique étaient liées à leurs caractéristiques endogènes (cépage), favorisant certaines voies métaboliques de consommation de sucres selon les cas.

3. Les structures des communautés microbiennes

3.1. Evolution des structures microbiennes au cours de la fermentation exogène

Un exemple de l'évolution des populations microbiennes obtenues au cours de la fermentation exogène de la biomasse 'bourbes Pinot Gris' prétraitée thermiquement, est représenté sur la figure 20, au travers des électrophorégrammes. La comparaison de la structure des populations microbiennes de la biomasse initiale avec celle obtenue après prétraitement thermique, montre l'intérêt du prétraitement thermique. En effet, les boues étant constituées d'une flore bactérienne abondante, les analyses par T-RFLP montrent une grande diversité microbienne représentée par de nombreux pics avant prétraitement thermique ; alors qu'après celui-ci, l'abondance relative des pics a diminué et plus spécifiquement avec la deuxième enzyme de restriction (hhaI). Puis, au cours de la fermentation, on observe l'émergence d'un ou deux pic(s) majoritaire(s) et quelques pics minoritaires, que ce soit pour les enzymes de restriction aluI ou hhaI. Ainsi, à 5 h de fermentation, on observe l'émergence de deux populations microbiennes représentées par des longueurs de fragments de restriction respectives de 60 ± 2 pb et 239 ± 3 pb avec aluI et 233 ± 3 pb avec hhaI, les abondances relatives associées étant de 37 %, 56 % et 100 %. Entre 5 h et 28 h de fermentation, les structures microbiennes se maintiennent. Puis, en fin de fermentation, à 43 h, une émergence de nouveaux pics et une diminution des pics précédemment majoritaires sont observées, impliquant ainsi une nouvelle dynamique de la diversité microbienne.

3.2. Evolution des structures microbiennes au cours de la fermentation endogène

Un exemple de l'évolution des populations microbiennes obtenues au cours de la fermentation endogène sans prétraitement thermique de la biomasse 'bourbes Pinot Gris', est représenté sur la figure 21, au travers des électrophorégrammes. Comme remarqué précédemment, un changement de structure des populations microbiennes est observé au cours de la fermentation. En effet, la biomasse initiale présente une population microbienne majoritaire, 74 ± 2 pb avec aluI et 374 ± 3 pb avec hhaI, ayant une abondance relative respective de 67 % et 61 %, et quelques populations microbiennes minoritaires, ayant des abondances relatives inférieures à 15 %. Puis, à 20 h de fermentation, on observe un changement de cette structure microbienne, avec la diminution des pics initialement majoritaires et l'émergence de nouveaux pics majoritaires : respectivement 239 ± 3 pb et 231 ± 3 pb, ayant une abondance relative de 38 % et, 73 %, avec les enzymes de restriction aluI et hhaI. Cette structure des populations microbiennes est conservée jusqu'à un temps compris entre 28 h et 52 h. En effet, à 52 h, on observe une reprise de la diversité microbienne avec la présence de nombreux pics (74 ± 2 pb avec aluI, et, 189 ± 2 pb, 225 ± 3 pb et 584 ± 5 pb avec hhaI) ayant une abondance relative respective inférieure à 31 % et 37 % avec aluI et hhaI.

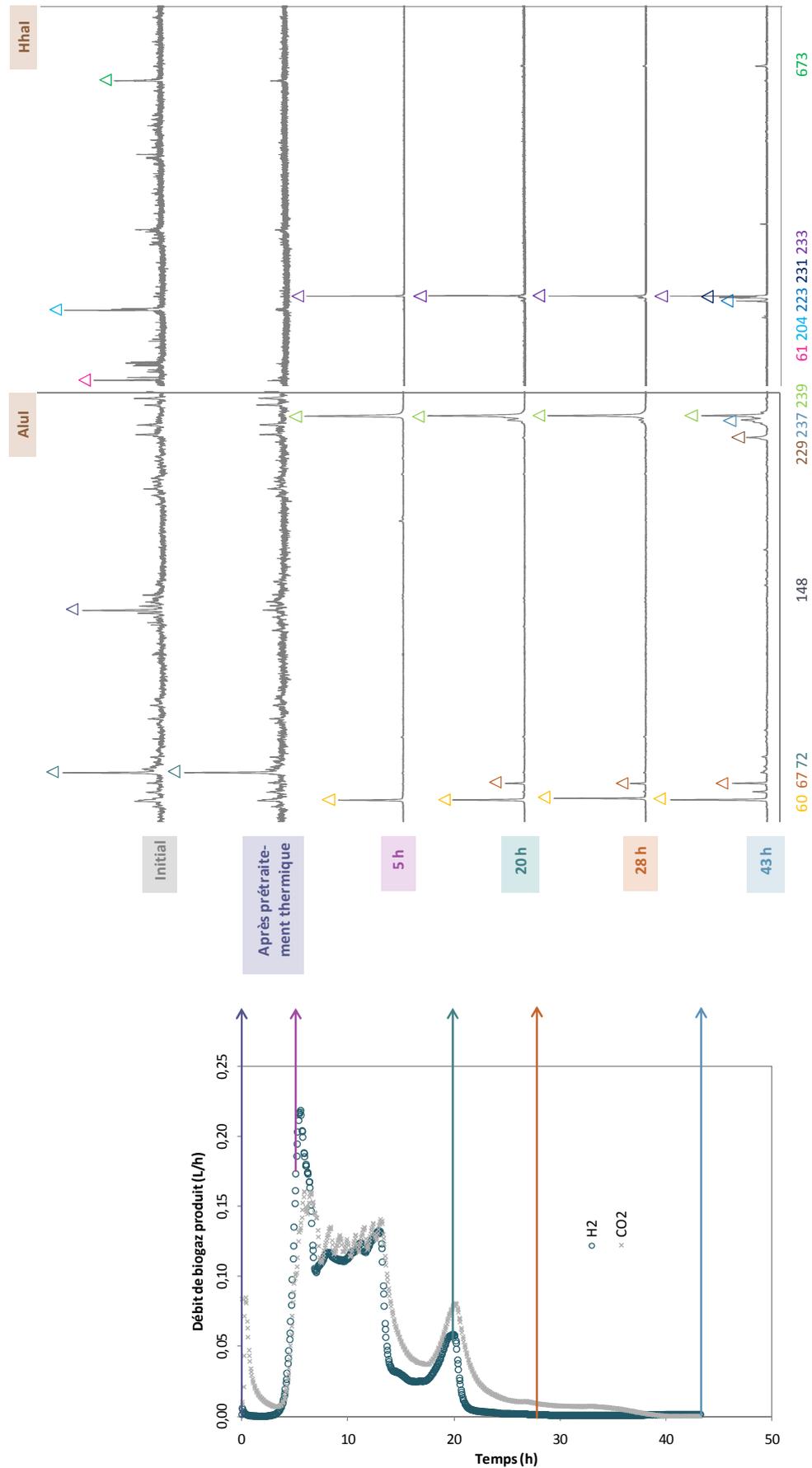


Figure 20. Exemple de profil de production d'hydrogène et évolution des populations microbiennes obtenus par fermentation exogène des 'bourbes Pinot Gris' avec prétraitement thermique. Les électrophorogrammes correspondent à la structure des populations microbiennes à l'état initial, après prétraitement thermique, puis à 5 h, 20 h, 28 h et 43 h de fermentation.

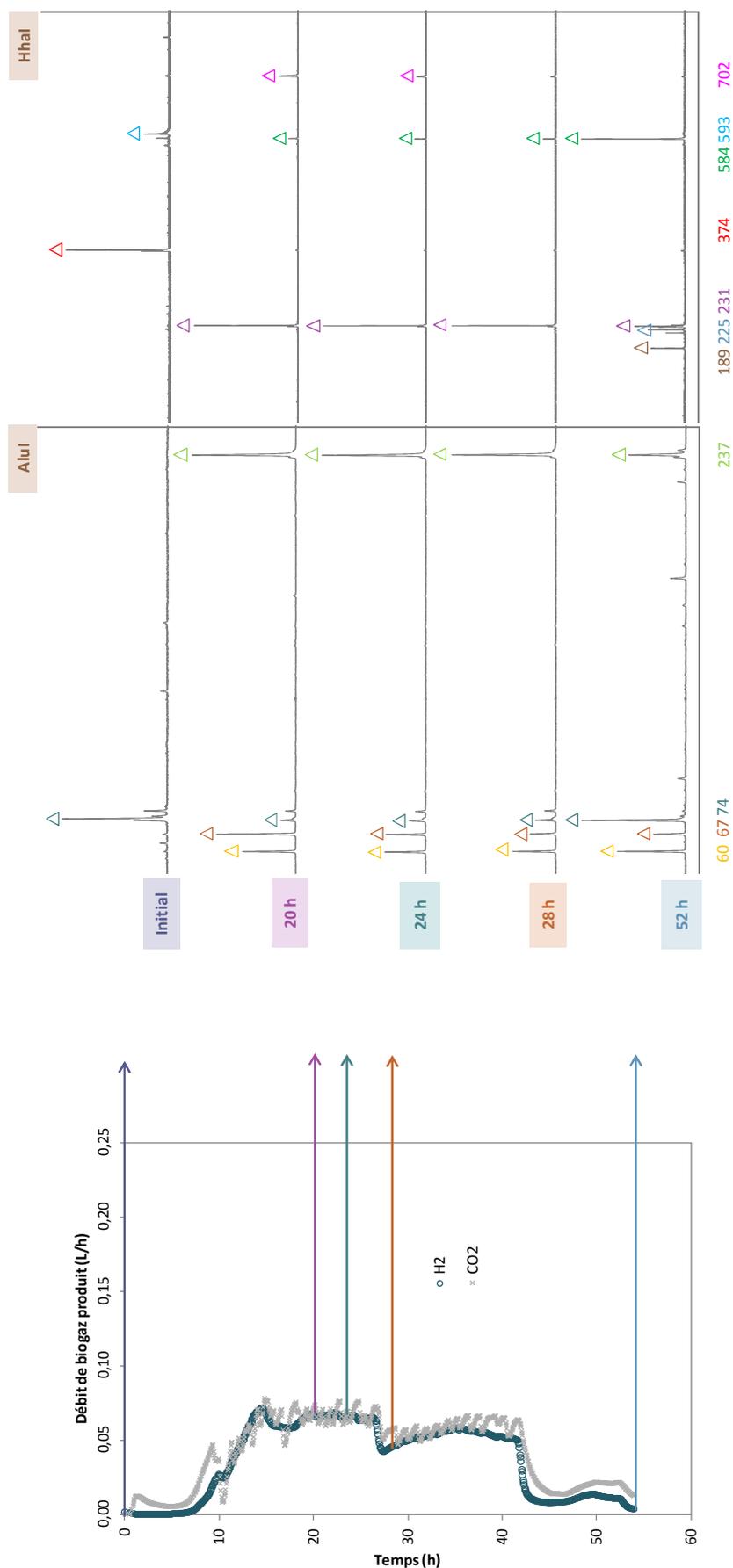


Figure 21. Exemple de profil de production d'hydrogène et évolution des populations microbiennes obtenus par fermentation endogène des 'bourbes Pinot Gris' sans prétraitement thermique. Les électrophorégrammes correspondent à la structure des populations microbiennes à l'état initial, puis à 20 h, 24 h, 28 h et 52 h de fermentation.

3.3. Comparaison des structures microbiennes des fermentations endogènes et exogènes

Les structures des populations microbiennes obtenues lors des fermentations endogènes et exogènes à partir des biomasses 'bourbes Chardonnay' et 'bourbes Pinot Gris', avec ou sans prétraitement thermique sont représentées sur les figures 22 et 23. Les échantillons sélectionnés à un temps de fermentation donné correspondent à un choix répondant aux critères suivants : analyse du consortium microbien proche du maximum de production d'hydrogène et qualité de l'électrophorégramme. La représentation de la structure des populations microbiennes correspondant à la biomasse prétraitée 'bourbes Pinot Gris' n'a pu être réalisée que pour les prélèvements initial et final. Par conséquent, elle n'est pas représentée sur la figure 23.

❖ Influence du prétraitement thermique sur les fermentations exogènes

Les figures 22 et 23 présentent des électrophorégrammes relativement simples, lorsque le prétraitement thermique a été effectué, alors que sans prétraitement thermique les structures des populations microbiennes sont complexes. En effet, avec le prétraitement thermique, les structures se composent d'une à deux population(s) microbienne(s) majoritaire(s) ayant des abondances relatives supérieures à 37 %, alors que sans prétraitement thermique, il n'y a pas de population microbienne dominante mais de nombreuses populations microbiennes sous-dominantes ayant des abondances relatives inférieures à 27 %. Le prétraitement thermique semble donc inactiver certaines populations microbiennes et favoriser l'émergence d'une à deux population(s) microbienne(s).

❖ Influence du prétraitement thermique sur les fermentations endogènes

Contrairement à ce qui a été observé avec les fermentations exogènes, le prétraitement thermique n'a que peu d'influence sur les communautés microbiennes (figure 22). En effet, que ce soit avec ou sans prétraitement thermique, les structures sont composées d'une à deux population(s) microbienne(s) dominante(s) ayant des abondances relatives supérieures à 50 %, d'une population sous-dominante ayant une abondance relative comprise entre 20 % et 38 %, et, de quelques unes minoritaires ayant des abondances relatives inférieures à 6 %. La biomasse 'bourbes' (Chardonnay) est donc composée de bactéries résistantes au prétraitement thermique.

❖ Influence des bactéries endogènes

La figure 22 montre des structures de populations microbiennes similaires entre la fermentation endogène avec prétraitement thermique et la fermentation exogène avec prétraitement thermique, avec des abondances relatives différentes. Ceci signifie que la distribution des populations microbiennes dominantes/sous-dominantes est modifiée en présence d'un inoculum externe.

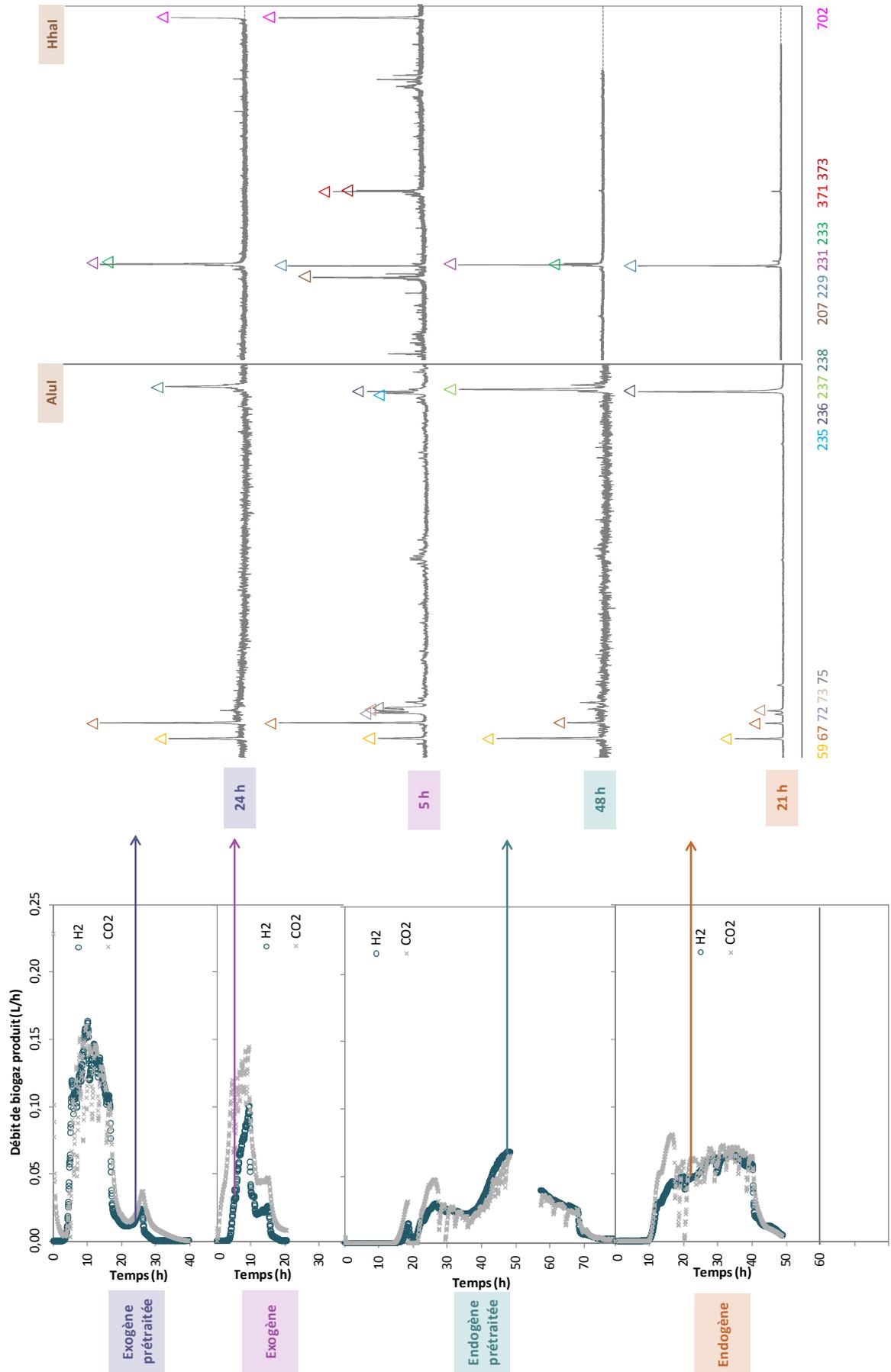


Figure 22 : Dynamiques des structures des populations microbiennes obtenues avec la biomasse 'bourbes Chardonnay' pendant les fermentations exogènes, endogènes avec et sans prétraitement thermique.

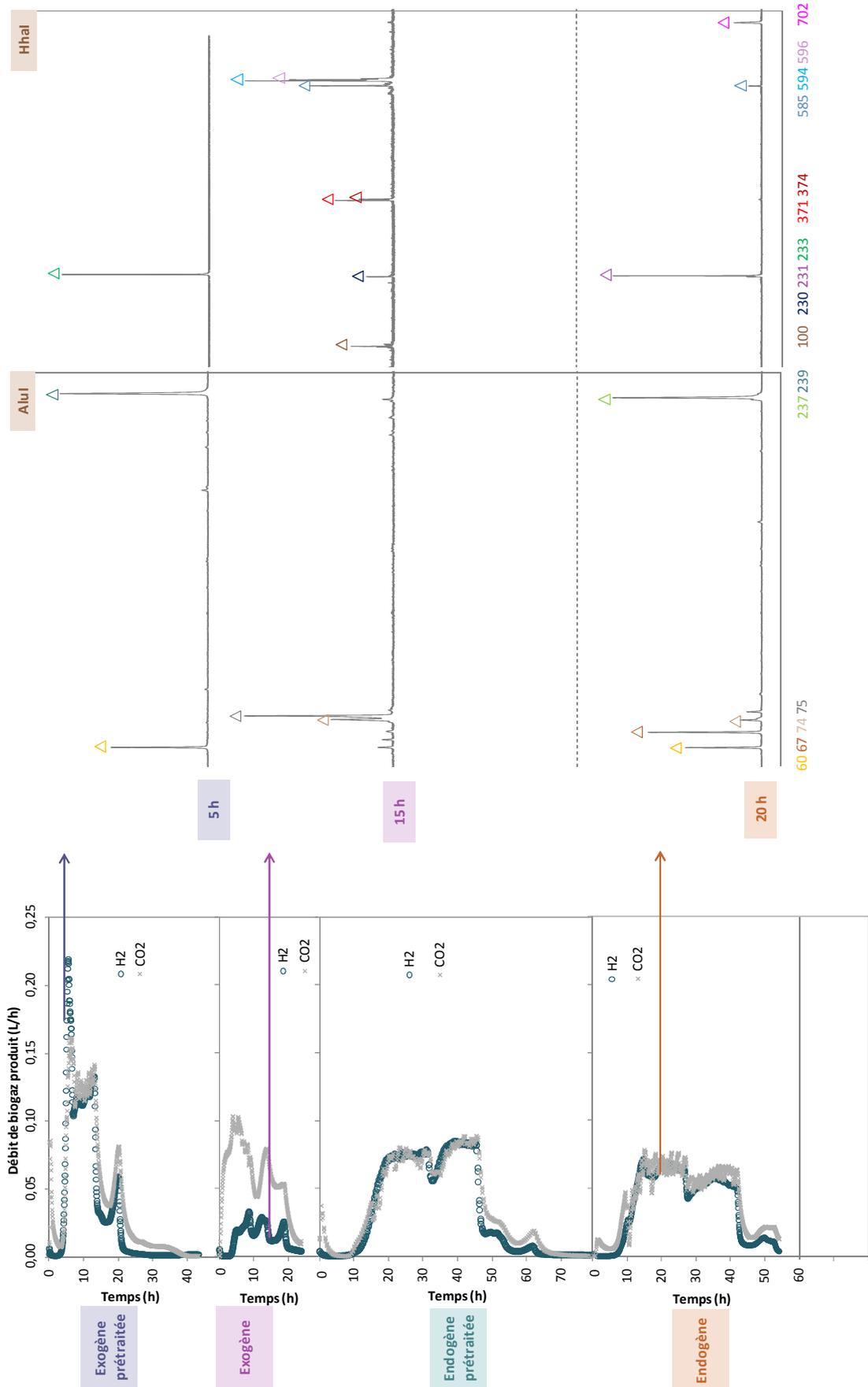


Figure 23 : Dynamiques des structures des populations microbiennes obtenues avec la biomasse 'bourbes Pinot Gris' pendant les fermentations exogènes, endogènes avec et sans prétraitement thermique.

Ainsi, les analyses par T-RFLP ont montré que le prétraitement thermique avait une influence différente sur les structures microbiennes, selon le type de fermentation (endogène ou exogène). En fermentation exogène, le prétraitement thermique permet d'inactiver certaines populations microbiennes et d'en favoriser d'autres. Dans le cas de la fermentation endogène, le prétraitement thermique a peu d'influence sur la structure des populations microbiennes. D'autre part, ces analyses ont montré qu'une diversité microbienne plus importante était liée à la présence de boues (non prétraitées thermiquement). Les diversités microbiennes des bourbes sont, quant à elles modérées, ce qui montre la possibilité de s'affranchir de l'étape du prétraitement thermique, qui est une dépense énergétique supplémentaire.

Les longueurs de fragments de restriction majoritaires ont été analysées par un logiciel interne au Département des Sciences Analytiques et comparées à la base de données obtenue à partir du site www.trflp.info (2013), ce qui nous a permis d'associer les couples de fragments de restriction à une classification taxonomique. La classification taxonomique donne une information sur le genre bactérien et lorsque cela a été possible, permet d'avancer de façon assurée l'espèce bactérienne.

Tous les couples de fragments de restriction majoritaires identifiés sont associés au phylum *Firmicutes* comprenant des bactéries appartenant aux genres *Anaerobacter*, *Anaeroplasma*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* ou *Pasteuria*. Des espèces bactériennes présentes dans toutes les fermentations réalisées à partir des 'bourbes Chardonnay', quels que soient le prétraitement thermique ou le type de fermentation, appartiennent au genre *Clostridium* et sont représentées par les fragments de restriction 67 ± 2 pb avec AluI et 231 ± 3 pb avec HhaI. Ce couple est également retrouvé dans la fermentation endogène à partir des 'bourbes Pinot Gris'. Une espèce microbienne bien connue dans la fermentation obscure a été clairement identifiée lors de la fermentation exogène avec prétraitement thermique des 'bourbes Chardonnay' et lors de la fermentation endogène des 'bourbes Pinot Gris' : *Clostridium butyricum* représentée par les fragments de restriction 67 ± 2 pb avec AluI et 702 ± 7 pb avec HhaI.

La classification taxonomique obtenue à partir des longueurs de fragments de restriction majoritaires, ne nous permet pas de discuter quant à la cohérence des différences observées entre les différents tests de fermentation au niveau des voies métaboliques compétitives à la production d'hydrogène, ou celles impliquées dans la consommation de l'hydrogène produit ou encore celles permettant la production d'hydrogène. Elle est cependant révélatrice d'une évolution des communautés microbiennes en cours de fermentation dans différentes conditions de fonctionnement du bioréacteur. Son apport ne peut être couplé qu'avec une analyse biomoléculaire menée ultérieurement.

4. Discussion

La discussion fondée sur la cohérence entre les performances de production d'hydrogènes et les métabolites obtenus (*cf.* 2.3.) a permis de donner des orientations quant aux voies métabolites majoritairement utilisées pour chaque fermentation.

Les analyses par T-RFLP ont montré la nécessité d'effectuer un prétraitement thermique lorsque la fermentation était exogène, ce qui permet d'inactiver certaines bactéries et d'en favoriser d'autres. Ceci se traduit par l'inhibition de voies consommatrices d'hydrogène telle que la voie propionate. En revanche, les analyses par T-RFLP ont montré que l'on pouvait s'affranchir d'effectuer un prétraitement thermique lorsque la fermentation était endogène car il y avait peu ou pas d'influence sur les structures des populations microbiennes développées dans le milieu réactionnel. Il est difficile de déterminer l'influence du prétraitement thermique sur les voies métaboliques avec l'analyse de métabolites par GC-FID uniquement. En effet, les voies de production d'hydrogène (voies acétate, butyrate et formiate) et les voies compétitrices vis-à-vis des sucres (mises en évidence mais non identifiées) sont utilisées en proportions différentes en fonction du prétraitement thermique et du cépage. Ceci permettrait d'expliquer le changement remarqué au niveau des abondances relatives entre les profils des fermentations endogènes avec et sans prétraitement thermique. Des analyses complémentaires, telles que le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et l'analyse de métabolites par HPLC-UV, effectuées sur les différentes fermentations auraient permis d'affirmer ou d'infirmer ce raisonnement.

Dans cette étude préliminaire, l'échantillon obtenu à 24 h de fermentation endogène à partir des 'bourbes Pinot Gris' a été séquençé. La classification taxonomique au niveau de la famille obtenue pour la biomasse est représentée sur la figure 24.

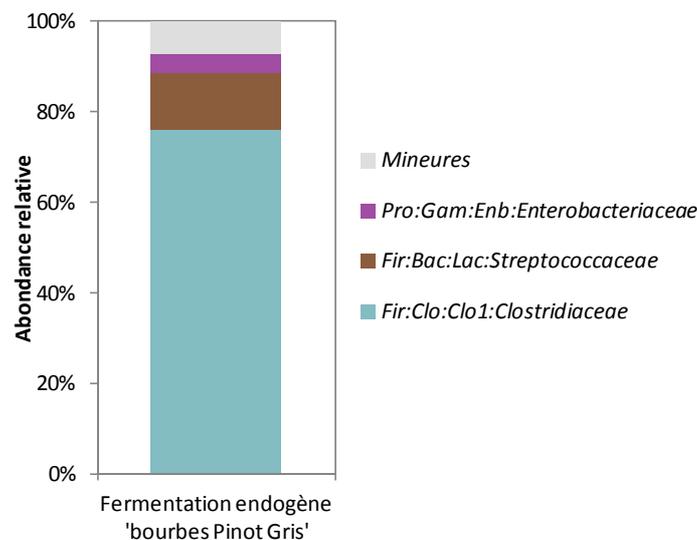


Figure 24 : Classification taxonomique obtenue par pyroséquençage 454 à partir de l'échantillon prélevé à 24 h de fermentation endogène des 'bourbes Pinot Gris'. Fir = Firmicutes ; Pro = Proteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Gam = Gammaproteobacteria ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales ; Enb = Enterobacteriales.

La figure 24 montre l'appartenance de 88,3 % des bactéries présentes, lors de la fermentation endogène des 'bourbes Pinot Gris', au phylum *Firmicutes* et plus minoritairement, 4,3 %, au phylum *Proteobacteria*. Parmi les *Firmicutes*, 76,1 % des séquences sont associées à la famille *Clostridiaceae* et 12,2 % à la famille *Streptococcaceae*. La présence majoritaire de bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes* confirme ce qui a été exposé précédemment au travers des profils T-RFLP. Par ailleurs, le séquençage montre une abondance relative de 4,4 % des séquences affiliées à la famille minoritaire des *Enterobacteriaceae*.

L'affiliation des séquences à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par pyroséquençage 454 à partir de l'échantillon prélevé à 24h de fermentation endogène des 'bourbes Pinot Gris'.

	Similarité	Abondance relative
<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	98,0 %	37,5 %
<i>Clostridium</i> spp. (<i>saccharoperbutylacetonicum</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>puniceum</i> , <i>diolis</i> , <i>roseum</i>)	100,0 %	14,2 %
<i>Streptococcus</i> spp. (<i>lutetiensis</i> , <i>infantarius</i> , <i>equinus</i> , <i>luteciae</i>)	99,6 %	11,4 %
<i>Clostridium butyricum</i>	100,0 %	11,3 %
<i>Clostridium intestinale</i>	100,0 %	3,8 %

L'espèce affiliée à la séquence représentative de l'OTU dominant est *Clostridium saccharobutylicum* avec une abondance relative de 37,5 %. Les autres bactéries sont sous-dominantes et associées à *Clostridium* spp. (*saccharoperbutylacetonicum*, *beijerinckii*, *puniceum*, *diolis*, *roseum*) avec une abondance relative de 14,2 %, à *Streptococcus* spp. (*lutetiensis*, *infantarius*, *equinus*, *luteciae*) avec des abondances relatives de 11,4 %, à *Clostridium butyricum* avec des abondances relatives de 11,3 %. Les bactéries minoritaires sont *Clostridium intestinale* (ayant une abondance relative de 3,8 %).

Ainsi, il semble que *Clostridium saccharobutylicum* soit la bactérie dominante majoritairement responsable de la production d'hydrogène. Les bactéries sous-dominantes *Clostridium butyricum* et *Clostridium* spp. (*saccharoperbutylacetonicum*, *beijerinckii*, *puniceum*, *diolis*, *roseum*) et les bactéries minoritaires *Enteric_Bacteria_cluster*, également connues dans la littérature pour produire de l'hydrogène, peuvent donc participer à la production d'hydrogène (Koskinen *et al.*, 2007 ; Nandi 1998 ; Davila-Vazquez *et al.*, 2007). Comme expliqué dans le chapitre I, il y a deux voies enzymatiques différentes impliquées dans la production d'hydrogène dépendant du type de métabolisme : la pyruvate-formiate-lyase (PFL) retrouvée chez les bactéries entériques (*Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*) (Hallenbeck, 2005) et chez les *Clostridium* (Sparling *et al.*, 2006) ; et le complexe pyruvate-ferrédoxine oxydo-réductase (PFOR) retrouvé également chez les *Clostridium* (Hallenbeck, 2005). Le paragraphe 2.3. ayant démontré la production d'hydrogène via les voies formiate, acétate et butyrate, la possibilité que les bactéries sous-dominantes participent à la production d'hydrogène est cohérente.

Par ailleurs, même si les autres micro-organismes sous-dominants ou minoritaires, appartenant aux genres *Streptococcus* et *Enteric_Bacteria_cluster*, ne participent pas toujours à la production d'hydrogène, il n'en reste pas moins qu'ils peuvent jouer un rôle dans la production d'hydrogène (Rafrafi *et al.*, 2013). *Clostridium butyricum*, *Streptococcus* sp. ont la capacité de produire des substances exopolysaccharidiques formant des agrégats bactériens qui aident à la formation granulaire (Fang *et al.*, 2002 ; Hung *et al.*, 2011). Dans le cas de *Clostridium butyricum*, c'est la concentration élevée en glucose qui induit la formation d'agrégats. D'autres bactéries anaérobies facultatives telles que *Streptococcus* sp. et *Enteric_Bacteria_cluster*, souvent positionnées en périphérie de la granule, consomment l'oxygène présent dans le milieu fermentaire, ce qui permet aux micro-organismes anaérobie stricte, telles que les bactéries du genre *Clostridium* présentes au centre de la granule, de produire de l'hydrogène (Huang *et al.*, 2010 ; Hung *et al.*, 2011 ; Yokoi *et al.*, 1998). L'analyse des métabolites et des performances de production d'hydrogène, a permis d'émettre l'hypothèse que la voie consommatrice de sucres et compétitive à la production d'hydrogène était la voie lactate. La présence de bactéries appartenant au genre *Streptococcus*, bactéries connues pour utiliser la voie lactate homo-fermentaire, va dans le sens de cette hypothèse. Enfin, le rôle de *Clostridium intestinale* dans la production d'hydrogène n'a pas été clairement déterminé à ce jour dans la littérature. Lee *et al.* ont isolé cette espèce bactérienne anaérobie aéro-tolérante en 1989 sans mettre en évidence son potentiel en production d'hydrogène. Toutefois, Gößner *et al.*, (2006) ont isolé, à partir du jonc, une espèce bactérienne étant affiliée à 99 % à *Clostridium intestinale* productrice d'hydrogène par la voie butyrate en condition anaérobie et productrice de lactate par la voie homo-fermentaire en condition aérobie.

Ayant généré une analyse fine sur le consortium microbien spécifique de la biomasse 'bourbes' et ayant calculé les performances de ces micro-organismes pour la production d'hydrogène, le tableau 4 compare nos résultats obtenus à ceux de la littérature.

Tableau 4 : Comparaison des résultats obtenus dans cette étude à ceux obtenus dans la littérature.

Description	Production H ₂ (L/L)	Rendement (mol/mol)	Espèces bactériennes (abondance relative)	Références
Fermentation exogène Avec prétraitement thermique 'Eaux usées' d'une industrie de boisson Batch	2,38 ± 0,05	1,92 ± 0,05	<i>Clostridium</i> spp. (<i>butyricum</i> , <i>tertium</i> , <i>perfringens</i>)	Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014
Fermentation exogène Avec prétraitement thermique 'Raisins mûrs mixés' Continu	0,31	0,1	-	Hwang <i>et al.</i> , 2011
Fermentation exogène Avec prétraitement thermique 'Pommes mûres mixées' Continu	4,24	2,1	-	Hwang <i>et al.</i> , 2011
Fermentation exogène Avec prétraitement thermique 'bourbes' Semi-batch	2,2 ± 0,2	2,26 ± 0,07	-	Cette étude
Fermentation endogène Sans prétraitement thermique 'déchets de légumes' Batch	0,40	24 mL _{H₂} /g _{matière} volatile (MV)	<i>Enterobacteriaceae</i> et <i>Streptococcaceae</i>	Marone <i>et al.</i> , 2014
Fermentation endogène Sans prétraitement thermique 'bourbes Pinot gris' Semi-batch	2,8	1,18 145 mL _{H₂} /g _{MS} 209 mL _{H₂} /g _{MV}	<i>Clostridiaceae</i> (76 %) <i>Streptococcaceae</i> (12%)	Cette étude

Lorsque l'on compare nos résultats issus de la fermentation exogène avec prétraitement thermique à ceux obtenus par Hwang *et al.* (2011) qui utilisent des raisins mûrs comme substrat, nous obtenons des productions et des rendements très largement supérieurs. Nos productions d'hydrogène obtenues sont du même ordre de grandeur que la biomasse 'eaux usées' d'une industrie de boisson (Sivagurunathan *et al.*, 2014) mais plus faibles que la biomasse 'pommes mûres mixées' avec un prétraitement thermique dans un réacteur continu (Hwang *et al.*, 2011). En revanche, les rendements obtenus dans notre étude sont supérieurs aux autres auteurs cités dans le tableau. En ce qui concerne les résultats obtenus par fermentation endogène sans prétraitement thermique, nos résultats sont 3,5 fois supérieurs en volume d'hydrogène produit dépassant même les valeurs obtenues par les autres études en fermentation exogène en batch. La comparaison avec la biomasse la plus proche de notre biomasse viticole qui est 'raisins mûrs mixés', met en évidence un rendement en hydrogène vingt fois supérieur lorsque des boues sont additionnées aux bourbes avec prétraitement thermique (fermentation exogène) et dix fois supérieur lorsque les bourbes sont seules et sans prétraitement thermique.

Dans notre étude, *Clostridiaceae* représente 76 % des séquences obtenues par séquençage et *Streptococcaceae* représente 12 %. Ce premier genre est retrouvé également dans la fermentation exogène avec prétraitement thermique à partir de la biomasse 'eaux usées' d'une industrie de boisson (Sivagurunathan *et al.*, 2014). Le deuxième genre est quant à lui retrouvé dans la fermentation endogène à partir des 'déchets de légumes' de Marone *et al.* (2014).

5. Conclusion

Au cours de cette étude, il a été montré que l'extraction des gaz produits par bullage d'un gaz de balayage dans la phase liquide était suffisante même sans effectuer de prétraitement thermique et permettait d'éviter la consommation de l'hydrogène pour la production de méthane. Cette étude a montré la faisabilité d'utiliser les biomasses 'bourbes' et 'liqueur rouge' en tant que substrat par les micro-organismes exogènes producteurs d'hydrogène après avoir effectué un prétraitement thermique avec un potentiel plus fort pour les biomasses viticoles. En effet, les analyses microbiennes effectuées sur la biomasse 'bourbes' à l'état initial et au cours de la fermentation ainsi que les analyses métaboliques, ont permis de montrer l'importance du prétraitement thermique dans la fermentation exogène quant à l'inactivation de bactéries consommatrices d'hydrogène (les bactéries productrices de propionate). De plus, le prétraitement thermique a permis de sélectionner spécifiquement les bactéries appartenant au genre *Clostridium*, bactéries sporulantes productrices d'hydrogène à partir des voies acétate/butyrate. Par ailleurs, des corrélations significatives entre la quantité initiale de sucres et le volume d'hydrogène produit, ainsi qu'entre le rendement en hydrogène et le volume d'hydrogène produit, obtenues respectivement à partir des tests réalisés avec prétraitement thermique et des tests réalisés par fermentation exogène, ont mis en évidence d'une part, que le prétraitement thermique a une action d'inactivation des micro-organismes hydrogénotrophes et d'autre part, que le rendement en hydrogène obtenu par fermentation exogène est proportionnel au volume d'hydrogène produit. Cette étude a également permis d'affirmer que les biomasses 'bourbes' contiennent une microflore endogène, adaptée à leur milieu, qui permet de biodégrader les sucres présents initialement en hydrogène de manière aussi efficace comparativement à un inoculum externe prétraité thermiquement, et ceci sans dépense énergétique supplémentaire. En effet, les analyses microbiologiques par PCR/T-RFLP ont permis de montrer qu'une sélection « naturelle » des bactéries productrices d'hydrogène parmi la microflore endogène, s'effectue grâce au fonctionnement du bioréacteur semi-batch. L'émergence de populations bactériennes majoritaires en cours de fermentation et la reprise de la diversité microbienne en fin de fermentation, attestent de cette sélection. L'analyse par séquençage d'un échantillon obtenu à partir de la fermentation endogène sans prétraitement thermique des 'bourbes Pinot Gris' a montré l'appartenance de 76 % des séquences à la famille *Clostridiaceae*, 12 % à la famille *Streptococcaceae* et 4 % à la famille *Enterobacteriaceae*. Ces analyses ont permis d'établir l'espèce dominante (37 %) responsable de la production d'hydrogène : *Clostridium saccharobutylicum*. La présence de *Streptococcus* a permis de confirmer l'utilisation de voie métabolique lactate suspectée par les bilans de matières incomplètes. Enfin, cette étude ouvre la voie sur l'utilisation des biomasses viticoles par fermentation endogène par la démonstration d'une efficacité de production de l'hydrogène huit fois supérieure aux résultats de la littérature.

Chapitre IV. INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LES PERFORMANCES DE PRODUCTION D'HYDROGENE ET SUR LES STRUCTURES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ENDOGENES

1. Introduction

1.1. Objectifs

Après avoir montré la faisabilité de production de l'hydrogène avec succès à partir de la biomasse vinicole par les micro-organismes endogènes, l'optimisation des paramètres opératoires est nécessaire afin d'améliorer la production d'hydrogène.

En effet, de nombreux paramètres impactent la production d'hydrogène tels que la température, le pH, le prétraitement de l'inoculum/du substrat, la pression partielle en hydrogène ou encore la concentration initiale en sucres (Wang *et al.*, 2009 ; Khanal *et al.*, 2004 ; Mandal *et al.*, 2006).

La température et le pH sont les paramètres les plus importants de la fermentation car ce sont eux qui impactent le plus les bactéries, aussi bien au niveau de leur croissance qu'au niveau de leur métabolisme et expression enzymatique (Dabrock *et al.*, 1992 ; Fang *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2011). L'étude bibliographique a montré que les valeurs optimales de température et de pH étaient spécifiques à chacun des micro-organismes et des conditions expérimentales utilisées. C'est pourquoi, la plupart des études sur l'influence de la température ou du pH concluent sur des valeurs optimales différentes. Les gammes de températures et de pH utilisées vont de 25°C à plus 80°C (Levin *et al.*, 2004), et de 4,5 à 7,0 (Ghimire *et al.*, 2015). De plus, peu d'auteurs ont étudié l'influence du pH initial sur la production d'hydrogène et se concentrent plus sur la régulation d'un pH opérationnel. La possibilité de découpler le pH initial du pH de régulation est intéressante car le pH initial affecte principalement le temps de latence, la croissance des micro-organismes, mais également la synthèse d'enzymes et la germination de spores lorsque l'inoculum subit un prétraitement physico-chimique (Fan *et al.*, 2004). En revanche, le pH opérationnel influence la production d'hydrogène en agissant sur le pH intracellulaire de la cellule, sur l'activité de l'hydrogénase, le réseau métabolique et la population bactérienne dominante (Booth, 2013 ; Dabrock *et al.*, 1992 ; Fang & Liu, 2002).

Le prétraitement de l'inoculum et du substrat est comme énoncé dans le chapitre précédent, presque systématiquement utilisé avant la fermentation. Le prétraitement utilisé le plus souvent est le prétraitement thermique notamment parce qu'il est efficace (Wang *et al.*, 2008), mais d'autres prétraitements tels que les prétraitements acide ou basique, chimique, ultrasonique, ou bien utilisant le cycle de congélation-décongélation ou encore l'aération sont également utilisés (Wang *et al.*, 2011 ; Mohan *et al.*, 2008 ; Baghchehsaraee *et al.*, 2008 ; Cui *et al.*, 2012). L'étude bibliographique a montré qu'il n'y avait pas de prétraitement idéal, et que chacun permettait d'agir sur l'inhibition de la croissance de bactéries consommatrices d'hydrogène et/ou sur la sélection des bactéries productrices d'hydrogène. La sélection du prétraitement à utiliser doit également prendre en compte certains critères tels que la dépense énergétique, le coût et la possibilité d'utilisation à l'échelle industrielle.

La pression partielle en hydrogène influence directement la production d'hydrogène, non seulement

parce qu'une faible pression facilite le transfert de masse de l'hydrogène de la phase liquide vers la phase gazeuse, mais également, parce qu'elle modifie le métabolisme et la consommation en hydrogène (Angenent *et al.*, 2004). Les techniques permettant de limiter ces phénomènes aboutissant à une faible pression partielle en hydrogène sont : une forte agitation, le bullage d'un gaz inerte, l'utilisation de membrane sélective à l'hydrogène immergée dans la phase liquide (Beckers *et al.*, 2015 ; Liang *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2009 ; Mizuno *et al.*, 2000). Le choix de la technique est fondé sur le volume d'hydrogène produit, le coût impliqué par la technique et son post traitement.

L'objectif de ce chapitre est d'améliorer la production et les performances de production d'hydrogène en optimisant les valeurs des paramètres opératoires tels que le pH ou la charge, et en sélectionnant les prétraitements adaptés à la biomasse.

Nous avons choisi de travailler dans des conditions mésophiles (37°C) dans un bioréacteur semi-batch afin de favoriser la microflore naturelle de la biomasse viticole et de limiter la dépense énergétique. La biomasse viticole a été congelée afin de limiter sa fermentation intrinsèque et de comparer les différents tests de fermentation entre eux.

- Ainsi, une étude préliminaire sur l'influence de la durée de stockage de la biomasse à -20°C a été nécessaire. Les prétraitements sélectionnés afin de comparer leur influence sur la production d'hydrogène comparativement à une biomasse stockée à 4°C sont des prétraitements thermiques : à -20°C d'une part, et à 70°C pendant 1h d'autre part.
- Le bullage du dioxyde de carbone dans la phase liquide a été sélectionné pour être comparé à celui de l'azote. Cette technique permet non seulement de diminuer la pression partielle en hydrogène, mais également d'assurer les conditions anaérobies et d'extraire les gaz produits. De plus, différentes techniques existent de post traitements des gaz produits, tels que le procédé *Pressure Swing Adsorption* ou la cryogénie qui permettent de séparer l'hydrogène du CO₂ produit. Le test effectué sur l'utilisation du dioxyde de carbone en tant que gaz de balayage permet le recyclage d'une part du CO₂ produit et jouera un rôle sur le pH du milieu.
- Enfin, les valeurs de pH testées ont été sélectionnées afin de couvrir la gamme de 4,5 à 5,7 pour le pH opérationnel et de 4,5 à 7,0 pour le pH initial.

A ces différentes études paramétriques, nous avons également choisi d'étudier l'influence de la charge de biomasse sur la production d'hydrogène afin de connaître les limites de notre procédé par fermentation endogène de la biomasse viticole 'bourbes'. En effet, la production d'hydrogène par fermentation endogène ne permet pas de dissocier les bactéries productrices d'hydrogène du substrat, ce qui a pour conséquence de limiter la variation possible du rapport 'substrat/micro-organismes'. Par conséquent, nous avons souhaité connaître jusqu'à quelle concentration en sucres, la productivité en hydrogène était maximale.

1.2. Mise en œuvre dans le bioréacteur

Cette étude s'appuie sur le fonctionnement optimisé du bioréacteur semi-batch (Clion *et al.*, 2015). Les paramètres opératoires considérés comme optimaux sont : une température de fermentation de 37°C, une agitation de 220 tr/min, un débit de 50 mL/min d'azote utilisé comme gaz de balayage pour extraire les gaz produits du milieu fermentaire.

Dans les différentes parties composant ce chapitre, la biomasse viticole 'bourbes Pinot Gris' (BPG) provenant d'Alsace et issue des vendanges 2014 a été fractionnée en deux : une première fraction a été stockée à 4°C et une seconde à -20°C. Seule la fraction stockée à 4°C a été testée dans la deuxième partie de ce chapitre et comparée à celle stockée à -20°C. La biomasse stockée à -20°C a été utilisée en fermentation endogène pour les études paramétriques de ce chapitre.

Ce chapitre est composé de quatre parties comprenant : (I) l'étude de l'influence du stockage de la biomasse à -20°C ; (II) l'étude de l'influence du prétraitement thermique et du gaz de balayage utilisés ; (III) l'étude de l'influence des pH initial et de régulation ; (IV) l'étude de l'influence de la charge initiale en biomasse.

Dans la première et la deuxième étude, la biomasse a été diluée pour obtenir une concentration initiale en sucres d'environ 14 g équivalent DCO/L. Le pH a initialement été ajusté à 7,0, puis régulé à une valeur égale ou supérieure à 5,7. Dans la première étude, la biomasse a été stockée pendant 35 jours, 43 jours, 67 jours et 115 jours à -20°C. Dans la deuxième étude, la biomasse stockée à 4°C 'sans pt' est comparée à la biomasse stockée à -20°C 'ptf', à la biomasse stockée à -20°C et ayant subi un prétraitement thermique à 70°C pendant 1h 'ptf + ptc'. Lors de ces différents tests, le gaz de balayage utilisé est l'azote avec un débit de 50 mL/min. Enfin, la biomasse stockée à -20°C a été utilisée dans deux tests de fermentation afin de comparer l'azote au dioxyde de carbone utilisés comme gaz de balayage. La figure 25 résume les fermentations réalisées dans les deux premières études.

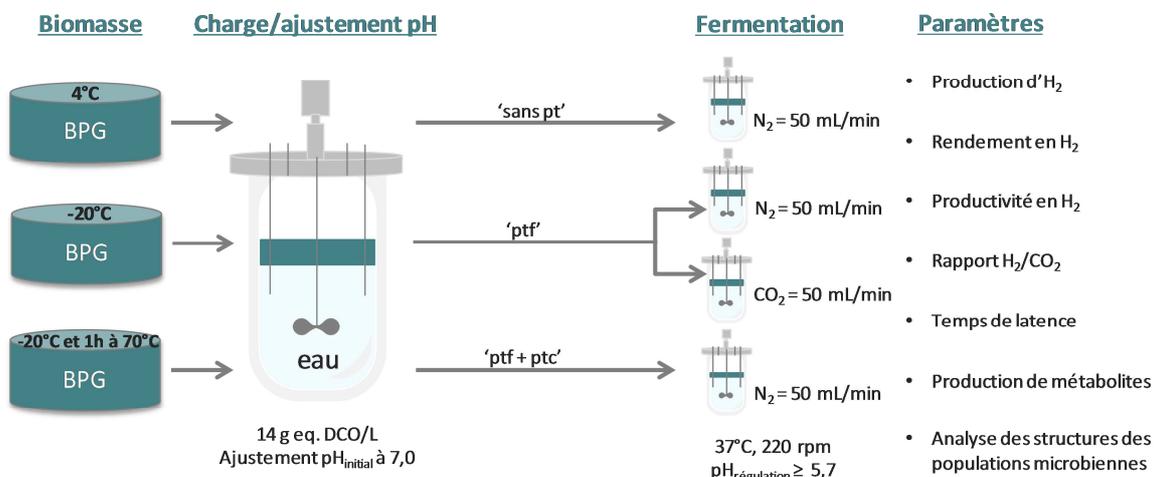


Figure 25 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence des conditions de stockage, des différents prétraitements thermiques et gaz de balayage utilisés. (pt = prétraitement thermique ; ptf = prétraitement thermique froid ; ptc = prétraitement thermique chaud)

Dans la troisième partie de ce chapitre, la biomasse a également été diluée pour obtenir une concentration initiale en sucres d'environ 14 g équivalent DCO/L. L'azote a été utilisé comme gaz de balayage avec un débit de 50 mL/min. Les pH initial et de régulation ont été testés à différentes valeurs afin de mettre en évidence leur influence sur la production d'hydrogène ainsi que sur les structures des populations microbiennes. Il est important de rappeler que le pH n'est régulé que lorsqu'il est inférieur à une valeur donnée grâce à une pompe injectant de la soude à 1M. Ainsi, une régulation à une valeur de 5,7, correspond en fait à une valeur égale ou supérieure à 5,7. Les différents tests effectués sont : '7,0/5,7' ; '5,7/5,7' ; '5,0/5,0' et '4,5/4,5' respectivement pour la valeur de pH d'ajustement initiale et celle de régulation. La figure 26 résume les fermentations réalisées pour l'étude de l'influence du pH sur la production d'hydrogène.

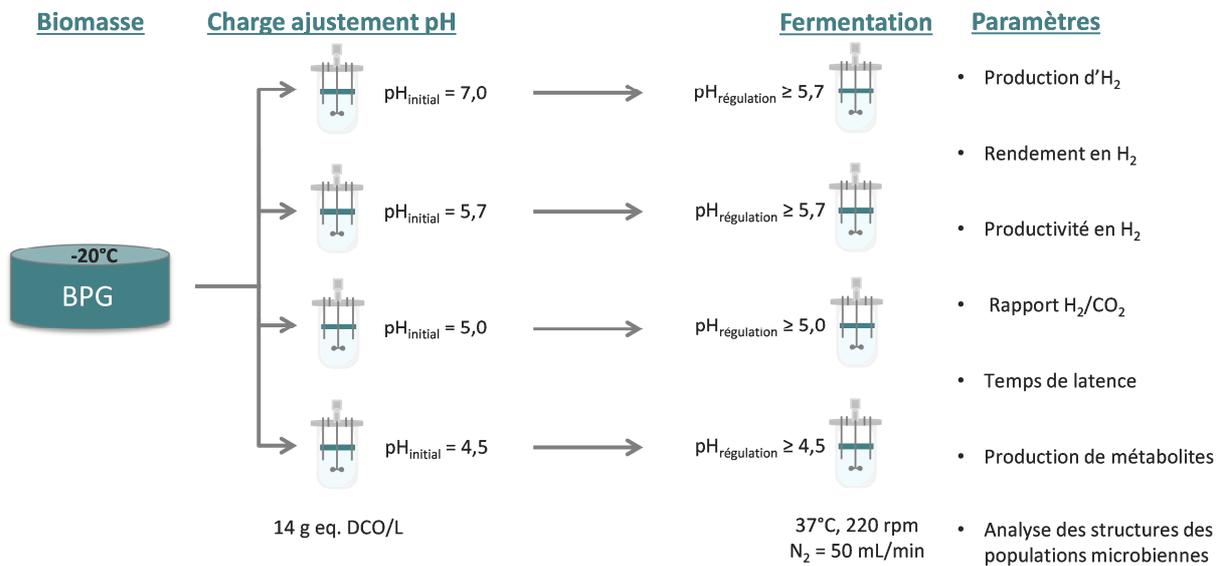


Figure 26 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence du pH sur la production d'hydrogène.

Dans la quatrième partie, la biomasse stockée à -20°C a été diluée à différents ratios afin d'obtenir des concentrations initiales en sucre de 14/28/45/60/95 g équivalent DCO/L. Le pH initial a été ajusté à 7,0 et régulé à une valeur égale ou supérieure à 5,7. L'azote a été utilisé comme gaz de balayage. La figure 27 résume les fermentations réalisées pour l'étude de l'influence de la charge sur la production d'hydrogène.

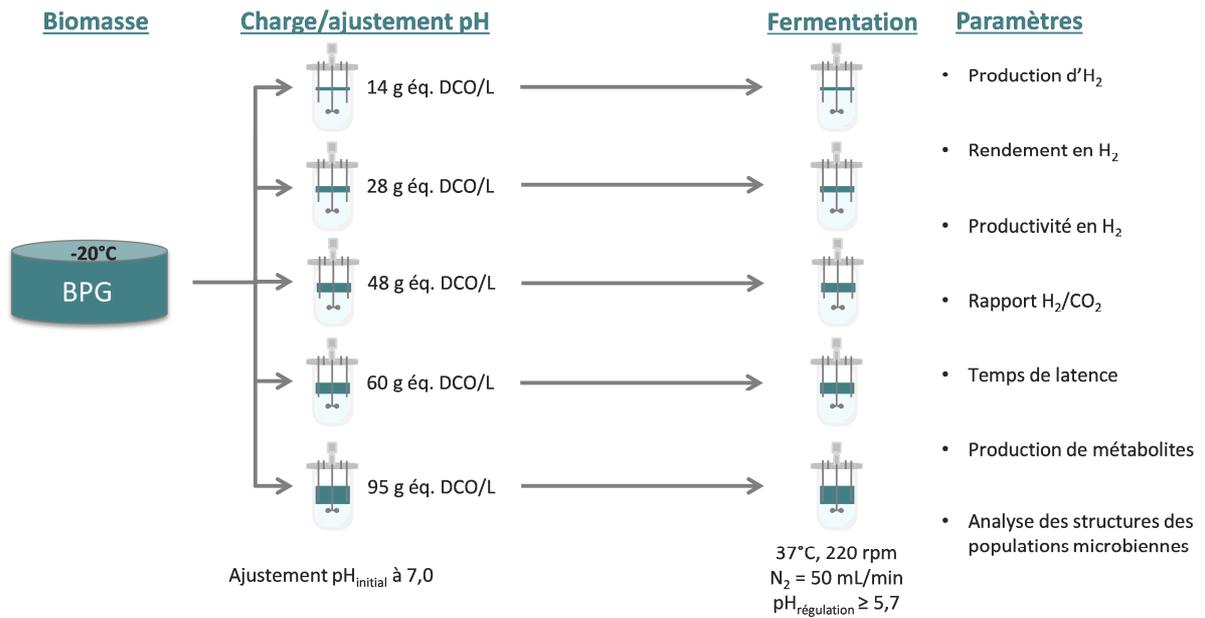


Figure 27 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence de la charge sur la production d'hydrogène.

2. Influence de la durée de stockage de la biomasse à -20°C

La biomasse viticole 'bourbes' de cépage Pinot Gris issue du domaine Pfister à Dalhenheim en Alsace a été stockée à -20°C dans le but de limiter sa fermentation intrinsèque. Dans cette partie, on s'intéresse à étudier l'influence de la durée de ce stockage sur les performances de production d'hydrogène, ainsi que sur le métabolisme global et les populations microbiennes.

2.1. Evolution de la production d'hydrogène

Les figures 28a et 28b représentent le volume cumulé et le débit d'hydrogène produit au cours du temps en fonction de la durée de stockage de la biomasse à -20 °C.

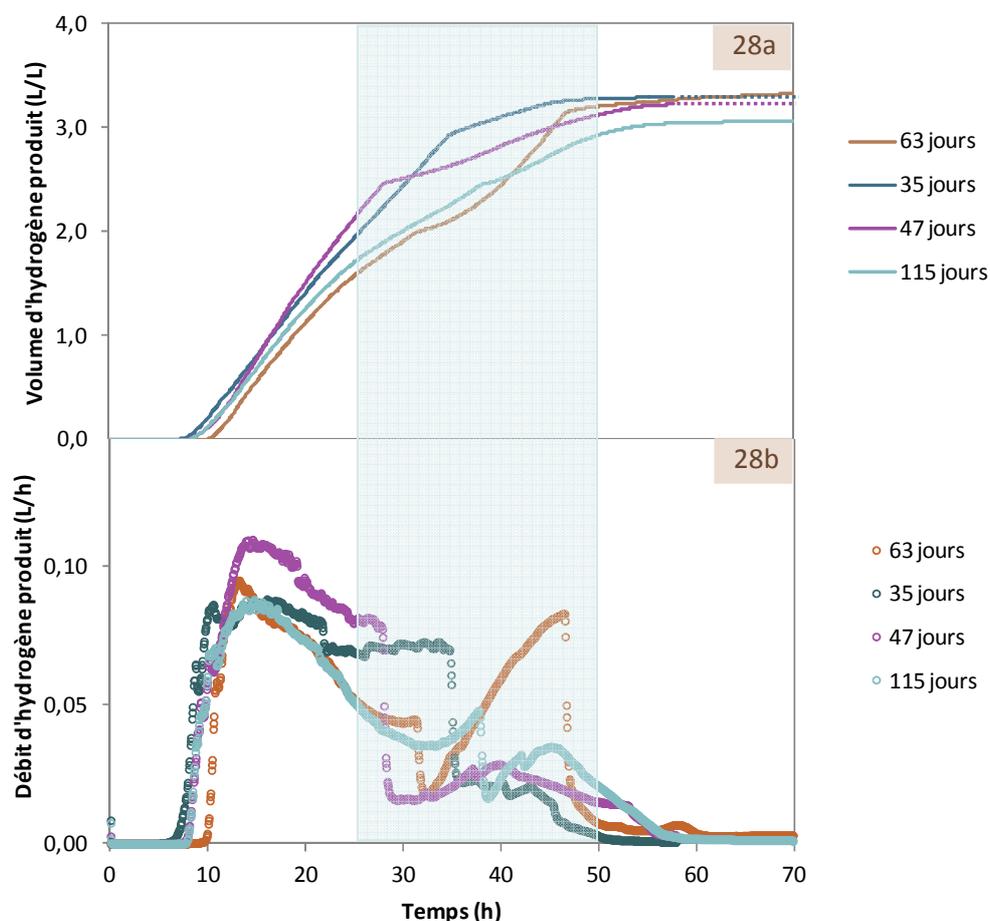


Figure 28 : Influence de la durée de stockage (35, 47, 63 et 115 jours) de la biomasse à -20°C sur le volume d'hydrogène (a) et le débit d'hydrogène (b) produit au cours du temps

La figure 28a montre l'allure globale des courbes de production d'hydrogène cumulé par litre de milieu réactionnel, similaire quelle que soit la durée de stockage. Après des temps de latence d'environ 9 h hormis pour le test '63 jours' (10 h), les consortia microbiens produisent de l'hydrogène avec des productivités maximales similaires pendant plusieurs dizaines d'heures, puis, entre 25 et 50 h de fermentation, les productions d'hydrogène sont ralenties plus ou moins fortement selon les tests. A partir de la figure 28b, on remarque que le débit d'hydrogène produit entre 25 h et 50 h de fermentation, diffère en fonction de la durée de congélation. En effet, les profils de production

d'hydrogène sont composés de deux phases dont la fin de la première marque le début des divergences entre les différents tests. L'accumulation de ses disparités se traduit par des phases de ralentissement de la production d'hydrogène plus ou forte selon les tests. Stenberg *et al.* (1998) suggèrent que les dommages causés par la congélation sur la biomasse sont notamment dus à l'augmentation de la concentration en sels pendant la phase de formation des cristaux, ces derniers pouvant également être formés dans le milieu intracellulaire de la cellule. Par conséquent, le stockage de la biomasse à -20°C peut induire un stress osmotique pour la microflore présente et former des cristaux intracellulaires qui deviennent létaux pour les micro-organismes sensibles. Si l'on considère que les micro-organismes majoritaires responsables des deux phases de production d'hydrogène (figure 28b) sont différents, il semble que la congélation conduise à une modification de la diversité microbienne endogène de la biomasse responsable de la deuxième phase de production d'hydrogène. Ceci entraîne ainsi une modification de profil au niveau de la phase de ralentissement de la production d'hydrogène.

Enfin, à partir de 50 h, les productions d'hydrogène se stabilisent à des valeurs statistiquement proches ($p > 0,05$; t-test), dont la valeur moyenne est de $3,2 \pm 0,1 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$.

Ainsi, la durée de stockage de la biomasse à -20°C influence uniquement la deuxième phase de production d'hydrogène (plus minoritaire) correspondant au ralentissement de la phase exponentielle (entre 25 h et 50 h), sans affecter pour autant le volume d'hydrogène produit. Cette différence minoritaire aura-t-elle une répercussion sur la productivité et rendement en hydrogène ?

2.2. Performances de production d'hydrogène

Les valeurs de performances de production d'hydrogène obtenues en fonction de la durée de stockage de la biomasse à -20°C sont représentées sur la figure 29.

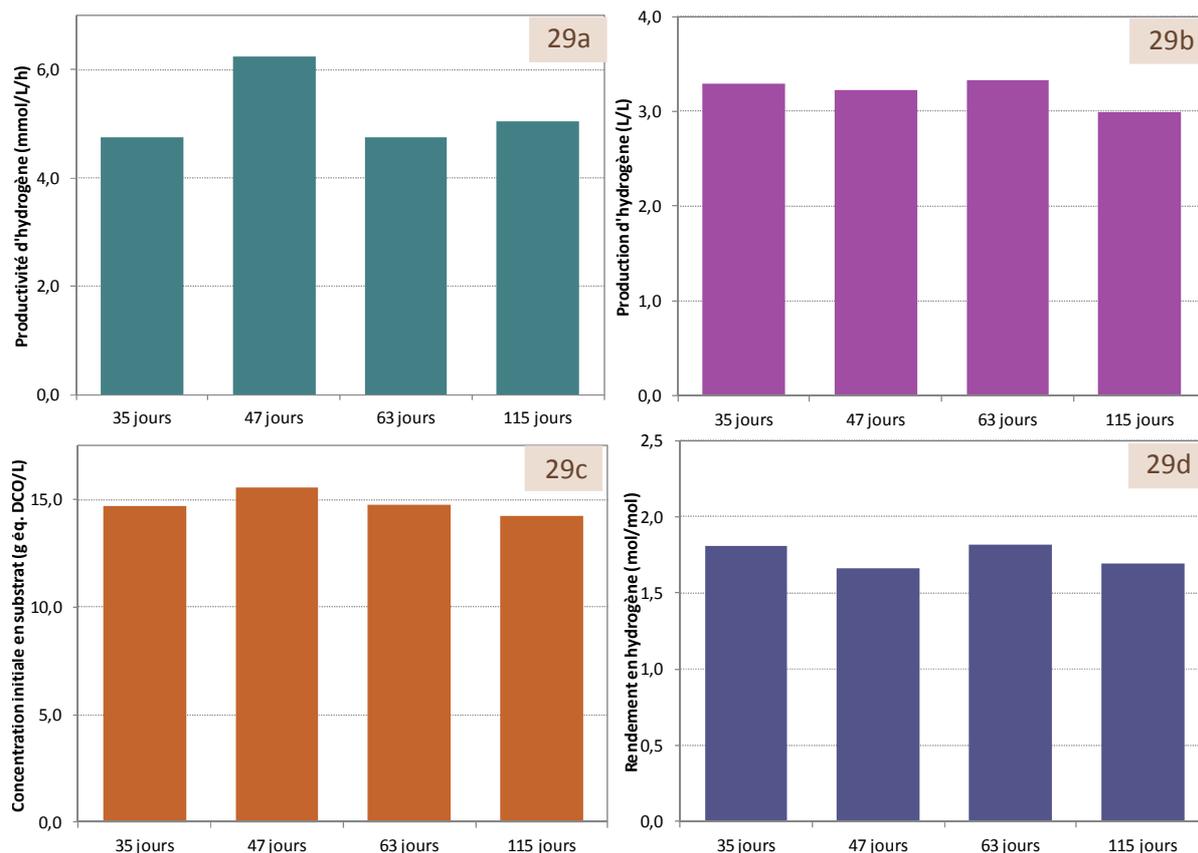


Figure 29 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction de la durée de stockage de la biomasse à -20°C pendant 35, 47, 63 et 115 jours : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration initiale en substrat (c).

Les résultats de la figure 29a indiquent que la productivité la plus élevée obtenue lors du test '47 jours' (6,24 mmol/L/h) est statistiquement différente des autres valeurs ($p < 0,05$; t-test). Les concentrations initiales en sucres (figure 29c) étant similaires (en moyenne $14,8 \pm 0,6$ g éq. DCO/L), la seule explication possible est une modification de la microflore en faveur des bactéries productrices d'hydrogène certainement liée à une hétérogénéité de la biomasse, malgré toutes les précautions prises pour homogénéiser la biomasse au mieux lors du fractionnement. La productivité en hydrogène obtenue par le test '47 jours' étant une valeur isolée, on peut en conclure que le temps de stockage de la biomasse à -20°C n'impacte pas la productivité en hydrogène.

Les résultats de la figure 29b et 29d indiquent que le temps de stockage de la biomasse à -20°C n'impacte pas significativement ($p > 0,05$; t-test) le volume d'hydrogène produit, en moyenne de $3,2 \pm 0,1$ L/L, ni le rendement en hydrogène, en moyenne $1,74 \pm 0,08$ mol/mol.

Ces données prouvent qu'un stockage à froid de la biomasse jusqu'à près de quatre mois, est possible avec le maintien des performances d'hydrogène. Les légères différences observées pendant la deuxième phase de production d'hydrogène (2.1.) des biomasses stockées à -20°C pendant différentes durées, n'ont pas d'impact significatif sur les performances de production d'hydrogène. On peut alors se demander si le métabolisme microbien est responsable de ces différences.

2.3. Métabolisme

Lors de cette série de tests de fermentation, la quantification des métabolites a été réalisée par GC-FID pour les alcools (éthanol et butanol) et par HPLC-UV pour les acides organiques et les acides gras volatils. La figure 30 représente les bilans de matière calculés sur la DCO soluble initiale et finale. Les quantités initiales de métabolites et d'hexoses ont été converties en équivalent DCO et leurs sommes représentent la DCO initiale. L'équivalent DCO finale est calculé à partir de l'hydrogène et des métabolites produits.

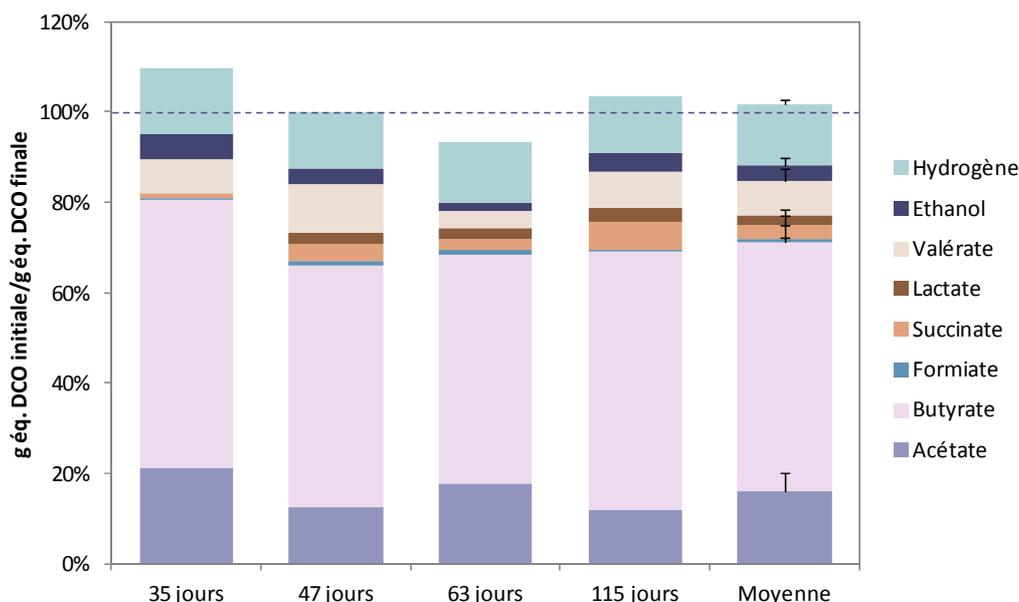


Figure 30 : Bilans de matière calculés pour les différents tests de fermentation à partir d'une biomasse stockée à -20°C pendant 35 jours, 47 jours, 63 jours et 115 jours.

Les valeurs de bilans de matière calculés sont comprises entre 93 % et 110 %, respectivement pour les tests '63 jours' et '35 jours'. Cela signifie que l'équivalent DCO finale a été complètement identifié pour tous les tests de fermentation grâce aux analyses GC-FID et HPLC-UV. Par ailleurs, les sucres initiaux ont été totalement consommés entre un maximum de 99,5 % et un minimum de 99,1%, respectivement pour les biomasses stockées pendant 47 jours et 35 jours.

La figure 31 représente la distribution des métabolites et des gaz produits, et les quantités initiales de sucres, pour les quatre tests de fermentation ainsi que la moyenne calculée à partir de ces derniers. Les quantités obtenues sont calculées en soustrayant les quantités initiales aux quantités finales présentes dans le milieu fermentaire. Une consommation de métabolites est représentée par une barre d'histogramme négative, alors qu'une production est représentée par une barre d'histogramme positive.

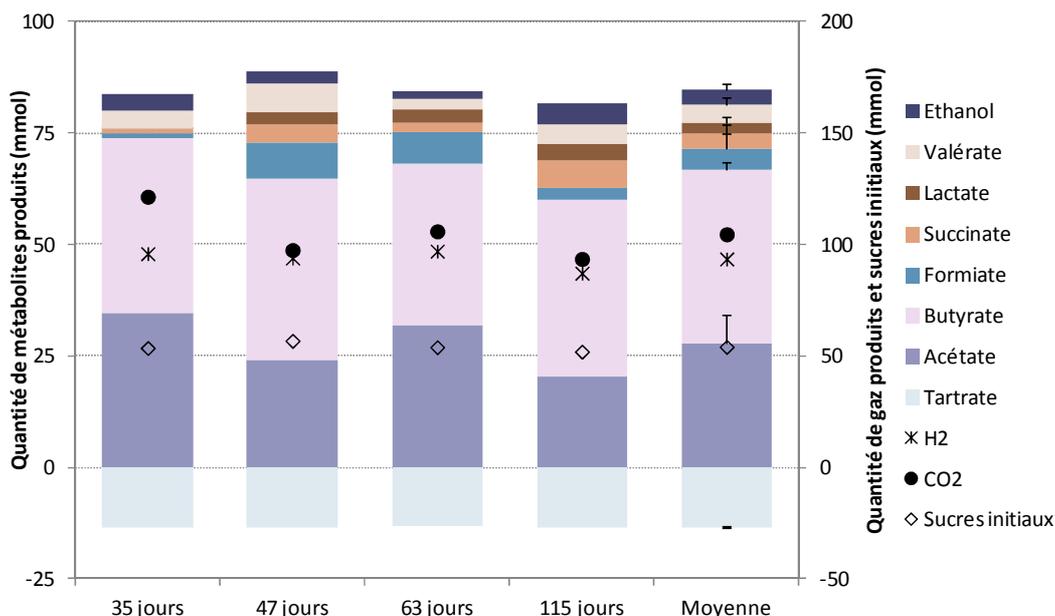
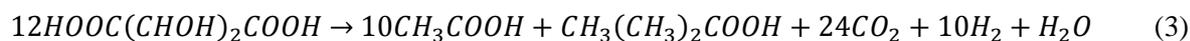
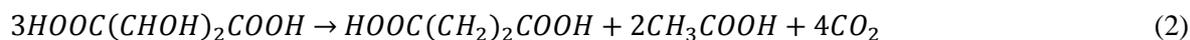


Figure 31 : Distribution des métabolites et des gaz produits, et des quantités initiales de sucres en fonction de la durée de stockage (35, 47, 63 et 115 jours) de la biomasse à -20°C .

Quels que soient les tests de fermentation, l'acétate et le butyrate sont les métabolites majoritairement produits (moyennes respectives de 28 ± 7 mmol et 39 ± 2 mmol), alors que l'éthanol, le valérate, le lactate, le succinate et le formiate sont les métabolites minoritairement produits ; quant au tartrate, il est le seul métabolite à être présent initialement en quantité élevée ($13,4 \pm 0,1$ mmol en moyenne) et à être entièrement consommé pendant la fermentation (quantité finale nulle pour tous les tests). L'acide tartrique est spécifique du raisin et très peu de bactéries sont capables de le métaboliser. Celles ayant cette capacité sont le plus souvent des lactobacilles (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012). Très peu d'études se sont intéressées aux voies métaboliques impliquées dans la dégradation du tartrate, cependant Radler *et al.* (1972), ont montré deux voies possibles de dégradation du tartrate : la première convertit deux moles de tartrate en une mole de lactate et une mole d'acétate par *Lactobacillus plantarum* (équation 1) ; la deuxième convertit trois moles de tartrate en une mole de succinate et deux moles d'acétate (équation 2) par *Lactobacillus brevis*. Une étude antérieure à celle de Radler *et al.* (1972) a mis en évidence que le tartrate pouvait être consommé par des bactéries appartenant au genre *Clostridium* (Tabachnick & Vaughn, 1948), telles que *Clostridium butyricum*, en le convertissant préférentiellement en acétate, en hydrogène et dioxyde de carbone et en butyrate (équation 3) (rapport molaire butyrate/acétate de 0,1). Que ce soit dans l'étude de Radler *et al.* (1972) ou de Tabachnick & Vaughn (1948), le tartrate est donc principalement converti en acétate.



Le test de fermentation effectué lorsque la biomasse a été stockée pendant 35 jours à -20°C présente la plus faible quantité sommée (11,6 mmol) de métabolites minoritaires (éthanol, valérate, lactate,

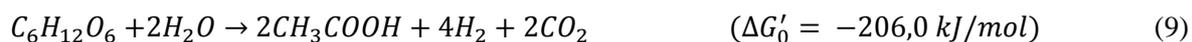
succinate et formiate) avec principalement l'éthanol et le valérate (respectivement, 3,8 et 3,9 mmol). Lorsque la durée de stockage à -20°C augmente, la quantité sommée de métabolites minoritaires est plus élevée (jusqu'à 23,9 mmol pour 47 jours) sans qu'il y ait pour autant de corrélation entre le nombre de jours de stockage et la quantité de métabolites minoritaires. L'augmentation de la quantité totale de métabolites minoritaires est principalement due à des quantités plus élevées de formiate (équation 4), succinate (équation 5) et lactate (équation 6) (entre 2,5 à 19,5 fois plus élevées selon les métabolites). Par ailleurs, on remarque que lorsque les quantités sommées de métabolites minoritaires sont les plus élevées, les quantités d'acétate produit sont légèrement plus faibles.



La durée de stockage de la biomasse à -20°C a donc un léger impact sur la quantité de métabolites minoritaires en favorisant les voies formiate, succinate et lactate homo-fermentaire en défaveur de la voie acétate, sans toutefois établir une corrélation entre la durée de stockage et la somme des métabolites minoritairement produits. Cette légère augmentation peut s'expliquer par l'augmentation de la diversité microbienne. Malgré ces légères différences, très peu de changements (mise à part la légère diminution d'acétate produit) sont notables au niveau des métabolites majoritaires. Ceci explique pourquoi les productions d'hydrogène obtenues lors des différents tests (cf. 2.1.) étaient proches avec seulement 5 % de variation.

Les rapports molaires $\text{H}_2/[2*(\text{butyrate} + \text{acétate})]$ calculés pour les différents tests sont compris entre 0,65 et 0,74. Ces valeurs étant inférieures à 1 et les bilans de matière étant complets, plusieurs hypothèses peuvent être émises. La première est qu'une partie de l'hydrogène produit a été consommée pour la production de métabolites tels que le propionate (équation 7), le succinate (équation 5) ou le valérate (équation 8). Une deuxième hypothèse suggère que l'acétate a été produit par une autre voie que celle habituellement produite à partir du sucre et menant à la production d'hydrogène (équation 9), telle que la voie acétate homo-fermentaire (équation 10) et/ou les voies consommatrices de tartrate et productrices d'acétate (équations 1, 2 et 3). Chacun de ces tests a produit au moins l'un de ces métabolites consommateurs d'hydrogène, ce qui permet de valider la première hypothèse. De plus, la biomasse contient initialement du tartrate (13 mmol), ce qui laisse trois voies possibles de conversion du tartrate en acétate. Enfin, la valeur du rapport théorique du test '35 jours' étant la plus faible (0,65) laisse à penser, qu'en plus des voies consommatrices de tartrate et d'hydrogène, et, productrices d'acétate et de valérate, la voie acétate homo-fermentaire (équation 10) a été utilisée.





Par ailleurs, les rapports molaires H_2/CO_2 indiquent que la plus faible valeur est obtenue pour le test '35 jours' (0,79) en comparaison avec les autres tests (respectivement 0,96, 0,93 et 0,92 pour les tests '47 jours', '63 jours' et '115 jours'). Or, les métabolites produits (différence entre la quantité finale et initiale) susceptibles d'expliquer ce faible rapport, tels que l'éthanol et le valérate restent minoritaires et du même ordre de grandeur que pour les autres tests. Ainsi, les seules mesures initiales et finales de métabolites ne suffisent pas à expliquer la valeur du rapport H_2/CO_2 différente obtenue pour le test '35 jours'.

Les valeurs de rapport molaire butyrate/acétate calculées pour les différents tests sont respectivement de 1,13 ('35 jours'), 1,69 ('47 jours'), 1,14 ('63 jours') et 1,94 ('115 jours'). Les différences observées entre les tests mettent en évidence soit (i) une consommation partielle du butyrate pour produire d'autres métabolites ; soit (ii) une production d'acétate par différentes voies métaboliques. Deux auteurs montrent qu'il existe d'autres voies métaboliques de production de butyrate (i) : Thauer *et al.* (1977) montrent que *Clostridium kluyveri* est capable de convertir l'acétate et l'éthanol en butyrate ; Wang *et al.*, (1999) montrent la possibilité de convertir l'acétate et l'hydrogène en butyrate. Enfin, Belenguer *et al.*, (2007) montrent la possibilité que possèdent certaines bactéries à convertir le lactate en acétate, butyrate et/ou propionate, telles que *Eubacterium* spp. L'utilisation différente des voies de consommation du tartrate (équations 1 à 3) et/ou de la voie de production d'acétate homo-fermentaire (équation 11) peuvent également expliquer les différences de rapports molaires butyrate/acétate.

La figure 32 représente la consommation et la production des métabolites, des gaz et des sucres au cours du temps, pour les tests de fermentation '35 jours', '47 jours' et '63 jours'.

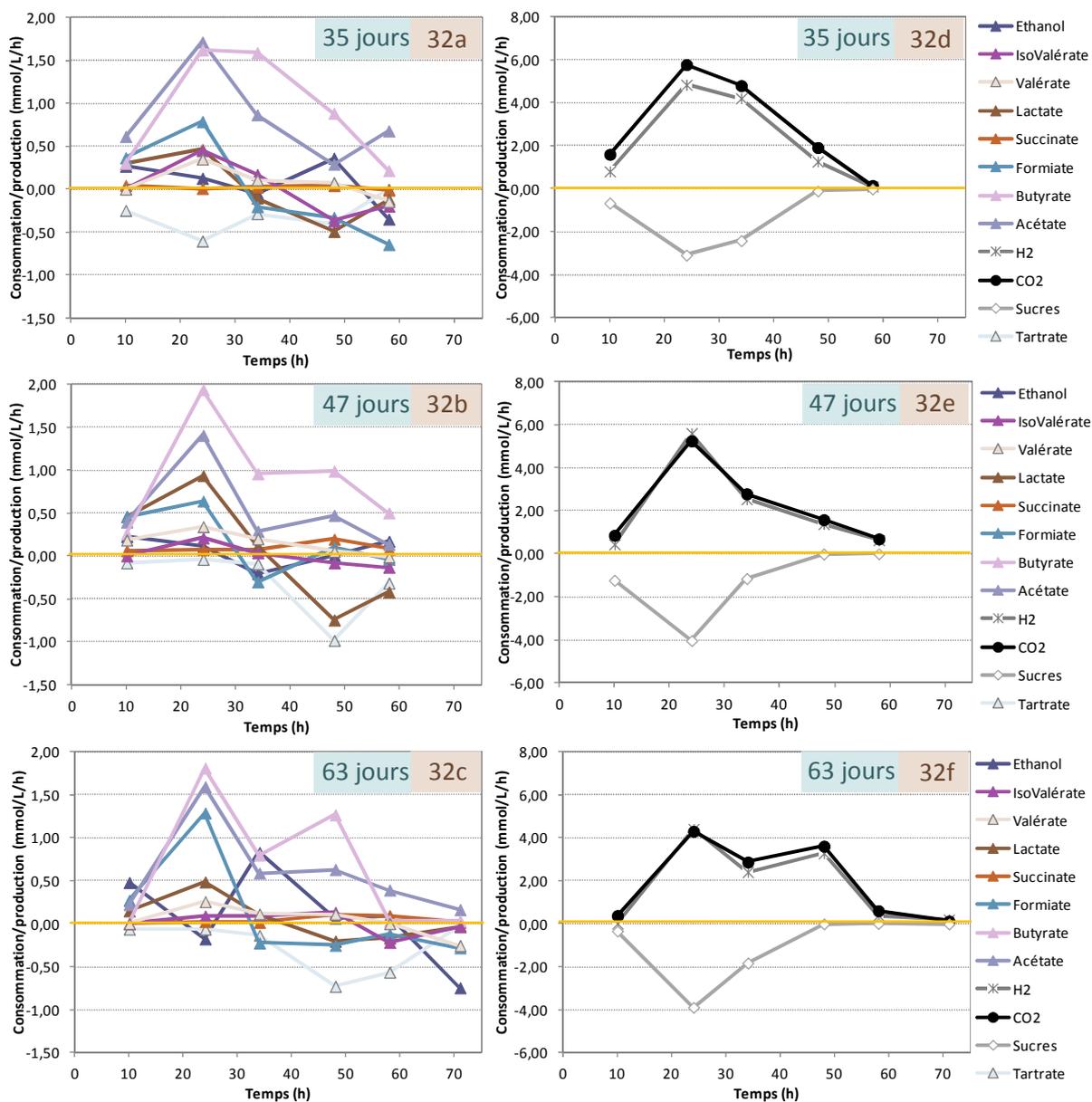


Figure 32 : Consommation/production des métabolites (a, b, c), et, des gaz et des sucres (d, e, f) au cours du temps de fermentation des biomasses stockées à -20°C pendant 35 jours, 47 jours et 63 jours.

La figure 32d indique que l'excès de dioxyde de carbone produit par rapport à l'hydrogène observé au niveau du biogaz total produit pour le test '35 jours' (rapport molaire H₂/CO₂ de 0,79) est également présent dès 10 h de fermentation. Or, pour ce test, on observe une consommation du tartrate à partir de 10 h : 0,25 mmol/L/h à 10 h, puis 0,60 mmol/L/h à 24 h et 0,29 mmol/L/h à 34 h (figure 32a) ; contrairement aux tests '47 jours' et '63 jours' pour lesquels le tartrate n'est consommé qu'à partir de 34 h, lorsque tous les sucres ont été consommés (figures 32b et 32c). Les allures de courbes de production de butyrate et d'acétate suivent celles de production d'hydrogène (figures 32d, 32e, 32f), avec une production de butyrate toujours plus élevée que celle de l'acétate à partir de 24 h de fermentation, excepté pour le test '35 jours'. En effet, lors de ce dernier test, la concentration en acétate est légèrement plus élevée que celle du butyrate jusqu'à 24 h de fermentation, puis elle devient inférieure à la concentration en butyrate jusqu'à 48 h.

La consommation prématurée du tartrate selon l'équation 3 permet d'expliquer le faible rapport molaire H_2/CO_2 global obtenu et la production d'acétate supérieure à celle de butyrate à 10 h lors du test '35 jours', alors que dans les autres tests, le tartrate semble être consommé par une voie non productrice d'hydrogène ou de dioxyde de carbone.

Par ailleurs, on remarque que pour le test '35 jours' la production d'acétate réaugmente en fin de fermentation (figure 32a) alors que pour le test '47 jours', l'acétate diminue en suivant l'allure de courbe du butyrate (figure 32b). Or à ces temps de fermentation, il n'y a plus de sucres disponibles ni de métabolites dont la consommation aurait la tendance inversée de la production d'acétate. Ainsi, il n'est pas à exclure que les quantités d'acétate en excès (par rapport au butyrate) soient produites via la voie homo-acétogénèse (équation 11). Certains micro-organismes homo-acétogènes ont la capacité de sporuler ce qui les rend capables de résister à des conditions de congélation. L'homo-acétogénèse expliquerait ainsi les faibles rapports molaires butyrate/acétate obtenus par les tests '35 jours' et '63 jours'.



Les cinétiques de production de métabolites obtenues à partir des triplicats montrent quelques différences minoritaires en fonction des tests, sans pour autant avoir de corrélation avec la durée de stockage de la biomasse, ni d'impact sur les performances globales des productions d'hydrogène (cf. 2.1.). Afin de connaître l'origine microbienne de l'évolution de la production de métabolites d'une part, et des différences perçues au niveau des métabolites minoritaires d'autre part, les échantillons à différents temps de fermentation prélevés lors du test '47 jours', ainsi que l'ADN extrait des échantillons prélevés à 24 h pour les tests '35 jours' et '63 jours', a été séquencé.

2.4. Structure des populations microbiennes

Le séquençage a été réalisé par l'INRA Transfert Environnement en ciblant les régions variables V4-V5 des séquences de l'ARN ribosomique 16S des procaryotes. Les séquences partageant au minimum 97 % de similarité ont été groupées en OTU (unités taxonomiques opérationnelles) à l'aide du logiciel Mothur. Ce pourcentage correspond à un pourcentage intermédiaire entre les genres (96 %) et les espèces (98 % pour la plupart des genres bactériens sauf le genre *Bacillus* > 98 %).

Avant d'étudier la structure des populations microbiennes en fonction de la durée de stockage de la biomasse à -20°C, il fût nécessaire d'étudier les structures des communautés microbiennes au cours de la fermentation. Pour cela, des échantillons prélevés initialement et au cours de la fermentation (10 h, 24 h, 34 h et 58 h) du test '47 jours' ont été séquencés. La taxonomie aux niveaux du phylum et de la famille de ces échantillons est représentée sur la figure 33.

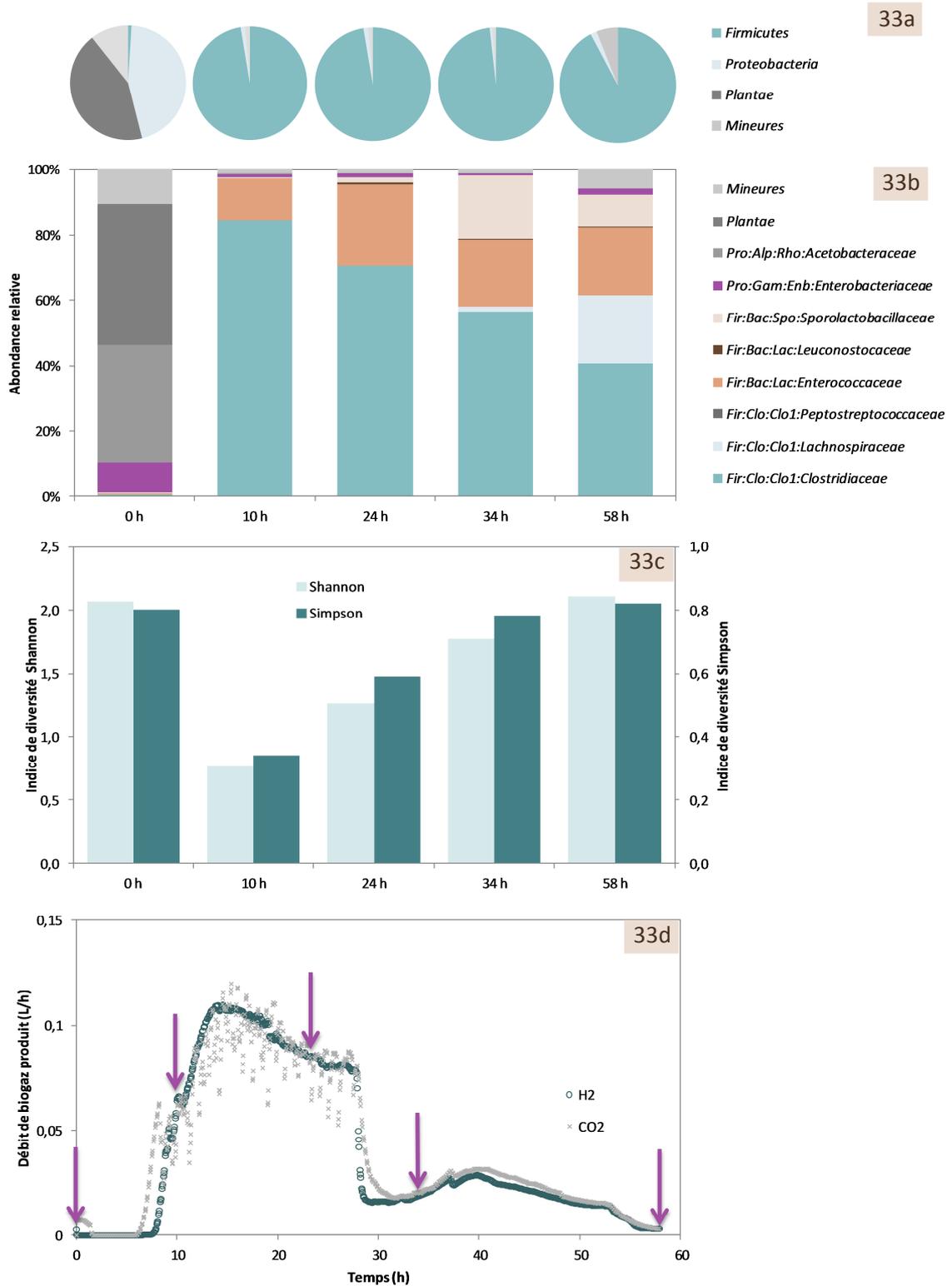


Figure 33 : Classification taxonomique aux niveaux du phylum et de la famille (a et b) et indices de diversité des échantillons prélevés (représentés par des flèches) au cours de la fermentation des bourbes Pinot Gris lors du test '47 jours' (d). Fir = Firmicutes ; Pro = Proteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Gam = Gammaproterobacteria ; Alp = Alphaproteobacteria ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Rho = Rhodospirillales.

La classification taxonomique de la biomasse initiale diluée dans le bioréacteur (0 h) montre que *Proteobacteria* est le phylum bactérien le plus abondant (60,6 %), suivi du phylum *Cyanobacteria* (27,8 %), le phylum *Firmicutes* ne représentant que 1,0 % d'abondance relative.

Les séquences représentatives des trois OTU majoritaires ont été identifiées grâce à la comparaison aux séquences issues de la base de données environnementale (nr_nt) de NCBI via le logiciel en ligne BLAST. Les séquences représentatives des deux OTU majoritaires (28,7 % et 15,5 %) appartenant au phylum *Proteobacteria* ont été respectivement affiliées à *Gluconobacteroxydans* et à des mitochondries avec respectivement 99,5 % et 100,0 % de similarité. La séquence représentative de l'OTU majoritaire (27,8 %) appartenant au phylum *Cyanobacteria* a été affiliée à des chloroplastes avec 100,0 % de similarité. Les mitochondries et les chloroplastes étaient originellement des procaryotes vivant en symbiose avec les eucaryotes (les plantes en font partie), qui au cours du temps ont perdu leurs capacités à vivre sans leur hôte et ont évolué organelles (Bapteste, 2013). Parmi la liste de séquences affiliées les plus proches, on retrouve des mitochondries et des chloroplastes issus de la plante *Vitis vinifera*. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'en effet, la biomasse 'bourbes' utilisée pour la fermentation obscure est issue de la viticulture. *Gluconobacter oxydans* est une bactérie acétique prédominante dans les baies de raisin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

Ainsi, la biomasse 'bourbes' est constituée principalement de bactéries appartenant au phylum *Proteobacteria*. En revanche, au cours de la fermentation, le phylum *Firmicutes* devient le plus abondant au détriment du phylum *Proteobacteria*. En effet, les valeurs d'abondances relatives du phylum *Firmicutes* passent de 1,0 % initialement à des valeurs comprises entre 97,4 % (10 h) et 92,3 % (58 h) ; et celles du phylum *Proteobacteria* passent de 45,1 % (0 h) à des valeurs comprises entre 0,6 % (34 h) et 1,8 % (58 h). Les conditions dans lesquelles la fermentation obscure est pratiquée permettent de « favoriser » les bactéries appartenant au phylum *Firmicutes*.

Même si le phylum *Firmicutes* reste le plus abondant, la classification taxonomique des séquences au niveau du taxon évolue au cours de la fermentation (figure 33b). En effet, initialement, la famille *Acetobacteriaceae* (phylum *Proteobacteria*) est la plus abondante après *Vitis vinifera* (35,5 %), puis à 10 h de fermentation, la famille *Clostridiaceae* devient la plus abondante (84,3 %) et l'abondance relative de la famille *Enterococcaceae* augmente en passant de 0,3 % à 12,9 %. Ces deux familles restent les principales jusqu'à la fin de fermentation (58 h) mais avec des abondances relatives différentes. Au cours du temps, l'abondance relative des *Clostridiaceae* diminue de moitié en passant de 84,3 % (10 h) à 40,5 % (58 h) alors que celle des *Enterococcaceae* augmente en passant de 12,9 % (10 h) à 20,7 % (58 h). A 34 h, une autre famille devient également importante avec 19,3 % d'abondance relative, les *Sporolactobacillaceae*. Toutefois, l'abondance de cette famille diminue de moitié en fin de fermentation (9,7 %) en faveur de la famille *Lachnospiraceae* qui passe de 1,4 % (34 h) à une abondance relative de 21,0 % (58 h).

Les indices de diversité Shannon (*H*) et Simpson (*S*) des communautés microbiennes ont été calculés pour les échantillons en début de fermentation et en cours de fermentation, basés sur les abondances relatives obtenues pour chaque OTU (figure 33c). L'indice de diversité de Shannon estime la diversité

des taxons contenus dans un échantillon environnemental, en tenant compte du nombre de séquences obtenues pour chaque taxon (Mouillot et al., 1999). L'indice de diversité de Simpson (S) tient compte non seulement du nombre de taxons observés mais aussi, de la part de chaque taxon dans la population totale. Cet indice donne plus de poids aux taxons dominants. Il existe plusieurs indices déclinés à partir de cette définition. Celui utilisé dans cette étude ($1-S$) rend compte de la probabilité de sélectionner aléatoirement deux séquences appartenant à deux OTUs différents, autrement dit, plus les valeurs des indices de diversité augmentent, et plus la population observée, possède une diversité élevée.

De manière générale, les indices de Shannon et de Simpson évoluent de manière similaire au cours de la fermentation du test '47 jours'. On remarque qu'en début de fermentation, les indices de diversité (Shannon et Simpson) sont élevés, ce qui traduit une grande diversité microbienne, puis à 10 h de fermentation, les valeurs des indices sont 2,3 à 2,6 fois plus faibles que les valeurs initiales, ce qui traduit une faible diversité microbienne. Puis, au cours de la fermentation, la diversité microbienne évolue, ce qui se traduit par l'augmentation des valeurs des indices de diversité, jusqu'à devenir similaires en fin de fermentation (58 h) à leurs valeurs initiales en début de fermentation (respectivement 2,1 et 0,8 pour Shannon et Simpson).

En somme, la mise en fermentation de la biomasse 'bourbes' dans le bioréacteur a permis l'émergence de bactéries appartenant majoritairement à la famille *Clostridiaceae* au détriment de celles initialement présentes (*Acetobacteriaceae*, *Cyanobacteria*, *Mitochondria*, *Enterobacteriaceae*).

A 10 h de fermentation, la distribution microbienne obtenue, semble être la plus représentative de la productivité en hydrogène maximale pour le test '47 jours' et est associée à la famille des *Clostridiaceae*. Puis, à partir de la phase de ralentissement de la production d'hydrogène (24 h), on observe une diminution de l'abondance des *Clostridiaceae* et une augmentation de la diversification des populations microbiennes, liées à un appauvrissement en substrat et à l'accumulation des métabolites dans le milieu réactionnel.

La productivité en hydrogène maximale n'étant pas toujours atteinte à 10 h de fermentation pour tous les tests de fermentation ('63 jours'), les classifications taxonomiques suivantes ont été par conséquent réalisées sur des échantillons prélevés à 24 h de fermentation.

Les figures 34a et 34b représentent les classifications taxonomiques et les indices de diversité microbienne des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lorsque la biomasse a été stockée pendant 35, 47 et 63 jours.

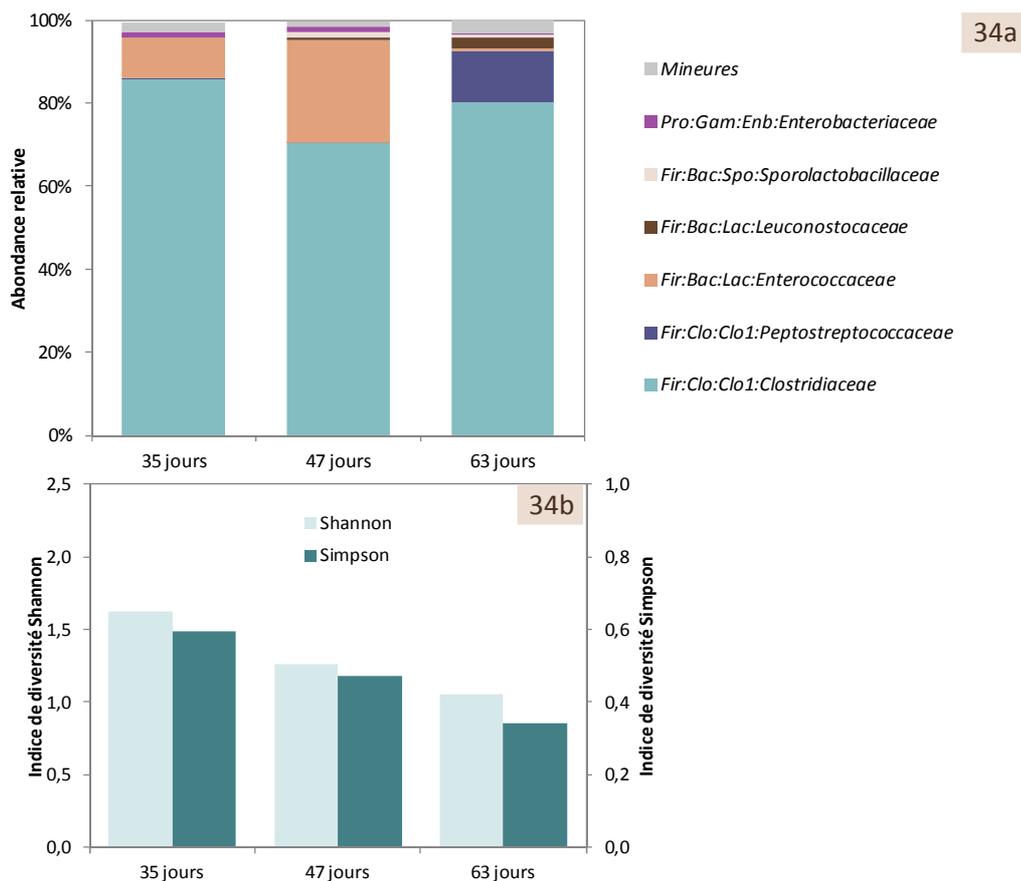


Figure 34 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours'. Fir = Firmicutes ; Pro = Proteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Gam = Gammaproterobacteria ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales.

Comme remarqué précédemment, le phylum *Firmicutes* est le plus abondant avec des valeurs d'abondances relatives proches variant entre 96,1 % et 97,4 % respectivement pour '35 jours' et '47 jours' (figure non représentée). La classification taxonomique au niveau des familles (figure 34a) indique que *Clostridiaceae* est la famille majoritaire quelle que soit la durée du stockage de la biomasse à -20°C , avec respectivement, 85,8 %, 70,4 % et 80,1 % d'abondance relative pour les tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours'. En revanche, on remarque que la principale famille minoritaire est différente pour le test '63 jours' : *Peptostreptococcaceae* (12,9 %), que pour les deux autres tests : *Enterococcaceae* (respectivement 9,7 % et 12,9 % pour '35 jours' et '47 jours').

Sur la figure 10b, on remarque que plus la durée du stockage de la biomasse à -20°C est longue, et plus les indices de diversités microbiennes sont faibles (diminution respective de 35 % et 43 % pour les indices de Shannon et de Simpson, entre les tests '35 jours' et '63 jours'). Ceci peut s'expliquer par le fait que seules les bactéries les plus résistantes à des conditions de congélation de longue durée sont conservées ; les autres moins résistantes, peuvent s'acclimater à ces conditions sur une courte durée mais plus la durée est longue et moins elles résistent.

L'affiliation des séquences à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 5 pour les tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours'.

Tableau 5 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours'.

	Similarité	'35 jours'	'47 jours'	'63 jours'
<i>Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)</i>	99,5%	35,9%	58,2%	74,4%
<i>Clostridium sp.</i>	98,7%	23,0%	8,9%	0,4%
<i>Clostridium spp. (sartagoforme, tertium)</i>	100,0%	1,7%	2,5%	2,3%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7%	25,2%	0,8%	3,0%
<i>[Clostridium] bifermentans</i>	100,0%	0,2%	0,1%	12,4%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	9,7%	24,8%	0,8%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0%	<0,1%	0,5%	2,7%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	0,1%	1,5%	0,7%
<i>Enterobacter/Klebsiella/Proteus</i>	99,7%	1,2%	1,3%	0,1%

Le tableau 5 indique que le genre affilié à la séquence représentative de l'OTU dominant et commun aux trois tests de fermentation '35 jours', '47 jours' et '63 jours', est *Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)* avec les abondances relatives respectives de 35,9 %, 58,2 % et 74,4 %. Seul le test '35 jours' contient deux taxons sous-dominants appartenant également à la famille *Clostridiaceae* et affiliés respectivement à *Clostridium intestinale* et *Clostridium sp.* avec respectivement 25,2 % et 23,0 % d'abondance relative. Ces deux taxons sont plus minoritaires dans les tests '47 jours' et '63 jours' (abondances relatives inférieures à 8,9 %). Les espèces intermédiaires affiliées aux autres séquences sont : *Enterococcus villorum* avec des abondances relatives de 9,7 % et 24,8 % respectivement pour le test '35 jours' et '47 jours' ; *[Clostridium] bifermentans* avec une abondance relative de 12,4 % pour le test '63 jours'. Les phylotypes bactériens minoritaires présents dans tous les tests sont principalement *Clostridium spp. (sartagoforme, tertium)*, *Leuconostoc mesenteroides* et les phylotypes bactériens entériques (*Enterobacter/Klebsiella/Proteus*) appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* avec des abondances relatives inférieures à 2,7 %.

2.5. Discussion

Dans les paragraphes 2.1. et 2.2., nous avons vu que les performances de production d'hydrogène étaient similaires quelle que soit la durée de stockage de la biomasse à -20°C. L'étude des métabolites produits lors des différents tests de fermentations a révélé une similarité au niveau de la production d'acétate et de butyrate, métabolites majoritairement produits, avec quelques différences au niveau des métabolites minoritairement produits tels que l'éthanol, le valérate, le lactate, le succinate et le formiate. En revanche, l'étude des structures de communautés microbiennes a permis de voir une diversité microbienne décroissante avec l'augmentation de la durée de congélation.

Cette discussion est fondée d'une part sur la tentative de relier les métabolites produits aux structures

de communautés microbiennes présentes, et d'autre part, sur la compréhension de l'influence de la durée de stockage de la biomasse à -20°C sur les structures de communautés microbiennes.

Le genre bactérien affilié à la séquence représentative de l'OTU majoritaire est *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) a une abondance relative respective pour chacun des tests '35 jours', '47 jours' et '63 jours', de 35,9 %, 58,2 % et 74,4 %. Ainsi, plus la durée de stockage est longue et plus *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est majoritaire, ce qui signifie que les bactéries appartenant à ce genre sont résistantes à la congélation même après 63 jours. *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium diolis*, *Clostridium roseum* sont connues dans la littérature pour produire de l'hydrogène (Koskinen *et al.*, 2007 ; Nandi, 1998 ; Davila-Vazquez *et al.*, 2007). Le paragraphe 2.1. a montré que la production d'hydrogène n'était pas affectée par la durée de stockage, or, on remarque que les abondances relatives de cette espèce sont différentes. Ceci suggère soit (i) que *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) ne sont pas les seuls types de bactéries responsables de la production d'hydrogène et qu'une ou plusieurs autres bactéries sont également capables d'y participer ; (ii) soit qu'elles sont suffisamment nombreuses dans le milieu réactionnel de chaque test pour convertir le substrat en hydrogène et dans ce cas, la condition limitante n'est plus l'abondance relative des bactéries productrices d'hydrogène mais la quantité de substrat disponible.

Le test '35 jours' montre deux autres OTU supplémentaires majoritaires : *Clostridium intestinale* (25,2 %) et *Clostridium* sp. (23,0 %). Le test '47 jours' ayant la meilleure productivité en hydrogène (6,24 mmol/L/h) ne montre la présence de ces deux OTU qu'en moindre proportion et surtout pour le premier : 0,8 % et 8,9 % respectivement. Les résultats obtenus pour deux OTU sont respectivement de 3,0 % et 0,8 % pour le test '63 jours'. Comme indiqué dans le chapitre III, *Clostridium intestinale* est potentiellement capable de produire de l'hydrogène d'après Gößner *et al.* (2006). Par ailleurs, l'abondance relative de *Clostridium* sp. diminue avec l'augmentation de la durée de stockage de la biomasse à -20°C passant de 23,0 % à 0,4 % respectivement pour les durées 35 jours et 63 jours, ce qui suggère que ces souches qui n'ont pas été formellement caractérisées taxonomiquement sont impactées par la durée de congélation. En outre, ces trois phylotypes bactériens fermentent majoritairement les hexoses en butyrate et acétate (De Vos *et al.*, 2009), ce qui permet de confirmer la production majoritaire de butyrate et acétate, avec potentiellement la capacité à produire de l'hydrogène. De même, [*Clostridium*] *bifermentans* présente dans le test '63 jours' (12,4 %) est connue pour fermenter à la fois les sucres et les acides aminés et a la particularité de produire majoritairement de l'hydrogène via les voies acétate et formiate (De Vos *et al.*, 2009). On observe en effet la consommation de formiate (figure 32c) sur la 2^{ème} phase de fermentation (après 34 h) sur ce test. Ainsi l'hypothèse (i) selon laquelle plusieurs espèces bactériennes sont responsables de la

production d'hydrogène et pas seulement *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est recevable.

L'hypothèse (ii) selon laquelle le volume d'hydrogène produit est similaire quelle que soit la durée de stockage de la biomasse à -20°C en raison non pas du nombre de bactéries productrices d'hydrogène mais de la quantité limitée du substrat disponible est également valable. En effet, non seulement, l'analyse des sucres solubles initiaux présents dans la biomasse a montré des concentrations en substrat identiques (en moyenne $14,8 \pm 0,6$ g éq. DCO/L) ; mais aussi les rendements en hydrogène calculés sont semblables ($1,74 \pm 0,08$ mol/mol).

En ce qui concerne les métabolites minoritairement produits, on s'intéresse aux bactéries ayant des abondances relatives minoritaires. Parmi celles-ci, on retrouve *Enterococcus villorum* et *Leuconostoc mesenteroides* qui sont des bactéries lactiques aéro-anaérobies facultatives, homo-fermentaire pour l'une, et hétéro-fermentaire pour l'autre. La première produit de l'acide L-lactique (équation 6) à partir du glucose et est retrouvée dans la flore intestinale des oiseaux, alors que la seconde produit de l'acide D-lactique, de l'éthanol et du CO₂ (équation 12) et est souvent présente dans le moût de raisin et le vin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012). *Enterococcus villorum* est l'espèce minoritaire principale présente dans le test '47 jours' (24,8 % d'abondance relative), ce qui est en accord avec le pic de production de l'acétate mesuré entre 10 h et 24 h de fermentation (figure 32). En revanche, les quantités de lactate mesurées au cours de la fermentation du test '63 jours' sont du même ordre de grandeur que le test '47 jours' et '35 jours' malgré de très faibles abondances en bactéries lactiques (respectivement, 0,8 % et 2,7 % pour *Enterococcus villorum* et *Leuconostoc mesenteroides*). Ceci permet de mettre en évidence deux phénomènes : la capacité des bactéries, autres que les bactéries lactiques, de produire du lactate ; la capacité de certaines bactéries de consommer le lactate. C'est le cas des *Clostridium* (Bhat & Barker, 1947).



En somme, les phylotypes majoritaires *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) responsables de la production majoritaire d'acétate et de butyrate sont capables de produire de l'hydrogène ; alors que l'identification des phylotypes minoritaires entériques, lactiques, *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*), *Sporolactobacillus laevolacticus* et [*Clostridium*] *bifermentans* ne suffit pas à expliquer clairement les productions de métabolites minoritaires.

2.6. Conclusion

Cette étude a montré que le stockage de la biomasse à -20°C n'avait pas d'impact jusqu'à une durée de 115 jours sur la production d'hydrogène (en moyenne $3,2 \pm 0,1$ L/L de milieu réactionnel), ni sur ses performances en termes de rendement en hydrogène ($1,74 \pm 0,08$ mol/mol d'hexoses consommés) ou en terme de productivité (en moyenne $5,2 \pm 0,7$ mmol/L/h). Ceci nous permet d'une part, d'utiliser la

biomasse congelée sans diminution effective des performances de production d'hydrogène, et ainsi de pouvoir étudier l'influence des paramètres opératoires (prétraitement de la biomasse, gaz de balayage, pH, charge) sur les performances de production d'hydrogène sans se soucier du temps séjourné par la biomasse à -20°C. D'autre part, ce paragraphe montre la possibilité de stocker la biomasse viticole à l'extérieur pendant la période automnale et hivernale, qui peut atteindre des températures négatives en Alsace.

Par ailleurs, le séquençage des échantillons prélevés avant et au cours de la fermentation a permis de mettre en évidence l'émergence des bactéries productrices d'hydrogène appartenant à la famille *Clostridiaceae* grâce à mise en fermentation de la biomasse 'bourbes' dans le bioréacteur. A 24 h de fermentation, les phylotypes microbiens dominants identifiés sont *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijreinekii*, *butyricum*) quelle que soit la durée de stockage de la biomasse, avec tout de même une augmentation de leur abondance relative avec l'augmentation de la durée de stockage. Cette augmentation n'est pas corrélée au volume d'hydrogène produit, ce qui laisse suggérer que soit *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijreinekii*, *butyricum*) ne sont pas les seules bactéries productrices d'hydrogène soit que la condition limitante pour produire l'hydrogène n'est pas le nombre de ces bactéries productrices d'hydrogène mais la quantité de substrat disponible. Les deux hypothèses sont valables car d'autres bactéries potentiellement productrices d'hydrogène ont également été identifiées (*Clostridium intestinale*, [*Clostridium*] *bifermentans*); les concentrations initiales en substrat, les quantités de métabolites majoritaires (acétate et butyrate) ainsi que les rendements en hydrogène obtenus sont similaires quelle que soit la durée de stockage de la biomasse à -20°C.

En outre, le séquençage a également permis de mettre en évidence la modification de la diversité microbienne qui diminue avec la durée de stockage de la biomasse à -20°C, notamment due à un réarrangement des bactéries minoritaires en faveur de *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijreinekii*, *butyricum*). Au travers de l'analyse des métabolites, on a également montré des quantités différentes de métabolites minoritaires sans toutefois pouvoir les relier aux variations de phylotypes microbiens minoritaires observées.

Par conséquent, dans les études suivantes, la moyenne obtenue à partir des tests '35 jours', '47 jours', '63 jours' et '115 jours' a été utilisée comme test de référence au niveau des performances de production d'hydrogène et des métabolites produits; alors que le test ayant la durée de stockage la plus proche du test à comparer sera choisi comme élément de comparaison au niveau des structures microbiennes.

3. Influence du prétraitement et du gaz de balayage

Dans cette partie, on s'intéresse à mettre en évidence d'une part, l'influence des prétraitements thermiques à froid et à chaud réalisés sur la biomasse 'bourbes' provenant d'Alsace sur la production d'hydrogène ; et d'autre part, l'influence de l'utilisation du dioxyde de carbone comme gaz de balayage sur la production d'hydrogène, dans l'objectif de recycler le CO₂ produit lors de la fermentation.

3.1. Evolution de la production d'hydrogène

La figure 35 représente le volume cumulé d'hydrogène produit au cours du temps, en fonction des prétraitements effectués et du gaz de balayage utilisé.

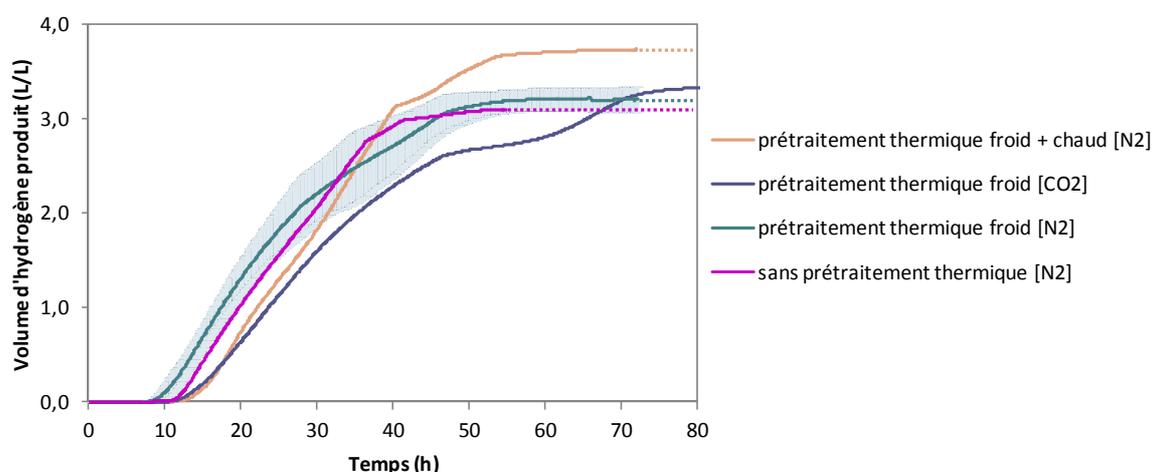


Figure 35 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps en fonction de prétraitement effectué et du gaz de balayage utilisé entre crochets.

La figure 35 montre des volumes cumulés en hydrogène produit au cours du temps similaires pour la biomasse non prétraitée conservée à 4°C ('sans pt') et celle prétraitée à -20°C ('ptf moyenne'). Le test pour lequel la biomasse stockée à -20°C a subi un prétraitement thermique à 70°C ('ptf + ptc') pendant une heure a produit le volume d'hydrogène le plus élevé (3,7 L/L). Lorsque le CO₂ a été utilisé comme gaz de balayage ('ptf + CO₂'), la production totale d'hydrogène n'a pas été impactée (3,3 L/L). Par ailleurs, on remarque que les temps de latence obtenus lors de ces deux derniers tests sont légèrement plus élevés que ceux obtenus par les tests 'sans pt' et 'ptf moyenne'. On ne peut toutefois pas clairement attribuer ce décalage à l'utilisation du prétraitement thermique à chaud ou du CO₂ comme gaz de balayage plutôt qu'à la durée de stockage de la biomasse à -20°C qui est beaucoup plus élevée que dans le test 'ptf moyenne', respectivement de 154 et 162 jours contre une moyenne effectuée entre 35 et 115 jours.

Ainsi, seul le prétraitement thermique à chaud semble impacter positivement la production d'hydrogène lorsqu'il est réalisée sur une biomasse congelée. L'utilisation du CO₂ en tant que gaz de balayage n'a pas d'impact sur la production d'hydrogène permettant de conserver le volume d'hydrogène produit.

3.2. Performances de production d'hydrogène

Les performances de production d'hydrogène obtenues à partir des tests de fermentation sur l'étude de l'influence du prétraitement de la biomasse et du gaz de balayage utilisé ont été regroupées sur la figure 36.

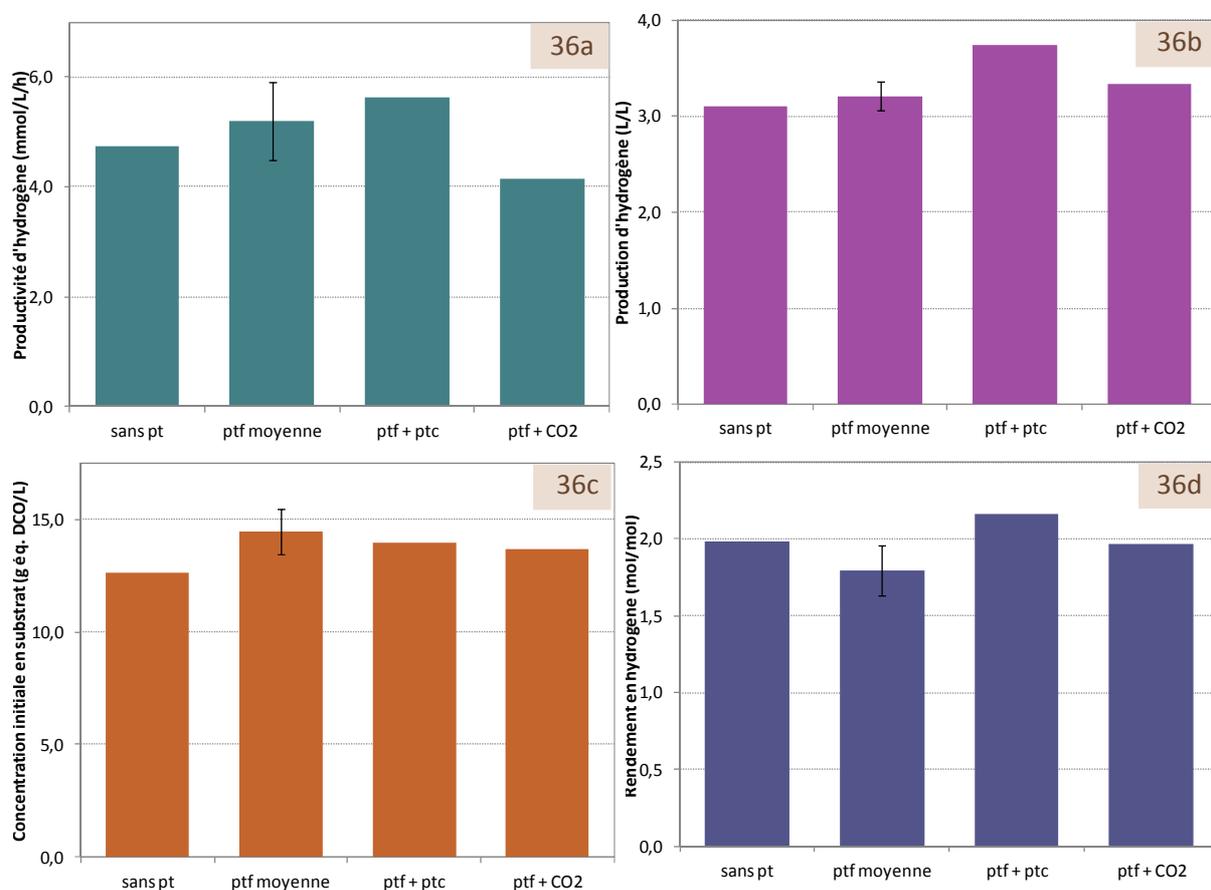


Figure 36 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction du prétraitement et du gaz de balayage : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

Les résultats de la figure 36a indiquent que l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage impacte négativement la productivité en hydrogène. En effet, la productivité obtenue par ce test (4,16 mmol/L/h) est 20 % plus faible que celles obtenues par les autres tests dont le N₂ a été utilisé comme gaz de balayage. De plus, les résultats de la figure 36a indiquent que le(s) prétraitement(s) effectués sur la biomasse n'ont visiblement que peu d'influence sur la vitesse de production d'hydrogène, les productivités étant toutes dans l'écart-type du test de référence ('ptf moyenne'). En effet, les valeurs de productivités obtenues par les tests de fermentation dans lesquels soit la biomasse n'a pas été prétraitée thermiquement ('sans pt'), soit la biomasse a subi un double prétraitement thermique, stockage à -20°C et 1 h à 70°C ('ptf + ptc') sont respectivement, de 4,75 mmol/L/h et 5,64 mmol/L/h et sont comprises dans l'écart-type de la productivité moyenne (5,20 ± 0,71 mmol/L/h) obtenue par le test de référence où la biomasse a été stockée à -20°C.

Les résultats de la figure 36b indiquent que le prétraitement thermique d'une heure à 70°C effectué sur la biomasse a un effet positif sur le volume d'hydrogène produit. En effet, le volume d'hydrogène produit obtenu pour ce test (3,7 L/L) est 16 % plus élevé que ceux obtenus pour les autres tests de fermentation pour lesquels les biomasses n'ont pas été prétraitées à 70°C, en sachant que la concentration initiale en sucres (figure 36c) est identique à celle du test 'ptf moyenne' (respectivement, 13,7 g éq. DCO/L et $14,4 \pm 1,0$ g éq. DCO/L). Les résultats mettent également en évidence la possibilité d'utiliser le CO₂ comme gaz de balayage et la possibilité d'utiliser une biomasse réfrigérée pour la production d'hydrogène en maintenant le volume d'hydrogène produit cumulé à une valeur comprise dans l'écart-type de la valeur moyenne ($3,2 \pm 0,2$ L/L) obtenue par le test de référence pour lequel la biomasse a été stockée à -20°C ('ptf moyenne') avec N₂ comme gaz de balayage.

Les résultats de la figure 36c indiquent qu'une biomasse stockée à 4°C ('sans pt') ne permet pas de limiter la consommation des sucres par les micro-organismes endogènes lors du stockage. Ceci est en accord avec le chapitre III. En revanche, la congélation de la biomasse permet de la limiter.

Enfin, les résultats de la figure 36d indiquent que le prétraitement thermique de 1 h à 70°C effectué sur la biomasse permet de produire de l'hydrogène de manière plus efficace. En effet, le rendement en hydrogène (2,16 mol/mol) obtenu pour ce test est 20 % plus élevé que celui obtenu pour le test de référence ($1,80 \pm 0,16$ mol/mol). De plus, les résultats de la figure 36d montrent que ni l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage, ni l'utilisation d'une biomasse non prétraitée thermiquement n'influencent le rendement en hydrogène, à condition que la biomasse non prétraitée ait une courte durée de stockage à 4°C (cf. Chapitre III). Ainsi, les rendements obtenus dans ces tests sont similaires à celui obtenu par le test 'ptf moyenne' ($1,80 \pm 0,16$ mol/mol).

Malgré la similarité des performances de production d'hydrogène obtenue entre les différents tests, le prétraitement thermique d'une heure à 70°C effectué sur la biomasse stockée à -20°C permet d'obtenir des valeurs de production et de rendement en hydrogène, respectivement 16 % et 20 % plus élevées que dans le test de référence. Par ailleurs, l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage n'impacte pas le rendement en hydrogène malgré une productivité en hydrogène légèrement plus faible.

3.3. Métabolisme

La figure 37 représente la distribution des métabolites et des gaz produits, et les quantités initiales de sucres, pour les quatre tests de fermentation. Les bilans de matière calculés et représentés sur l'annexe 1 étant complets, les métabolites principalement produits ont été identifiés.

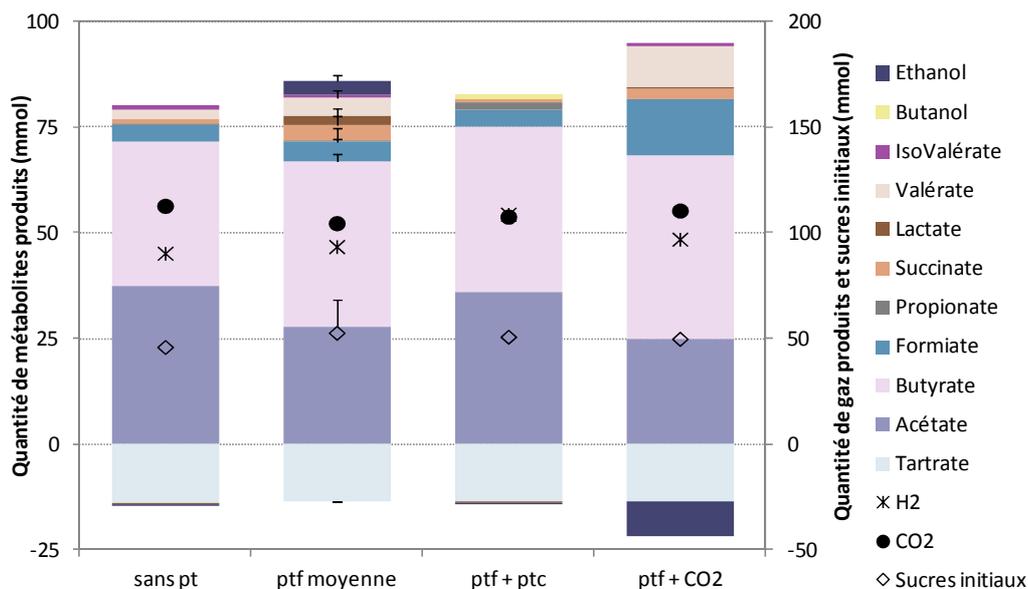


Figure 37 : Distribution des métabolites et des gaz produits, et quantités initiales de sucres en fonction des prétraitements et du gaz de balayage.

Quels que soient les tests de fermentation, l'acétate (en moyenne, 31 ± 6 mmol) et le butyrate (en moyenne, 39 ± 4 mmol) sont les métabolites majoritairement produits et le tartrate initial (en moyenne, $13,6 \pm 0,2$ mmol) est totalement consommé. Seuls les métabolites minoritaires produits diffèrent en fonction des tests.

La figure 37 indique que les métabolites minoritaires produits sont principalement : le formiate (4,0 mmol) et le valérate (2,0 mmol) lorsque la biomasse n'est pas prétraitée thermiquement ; le formiate (3,8 mmol) et le propionate (2,1 mmol) lorsqu'un prétraitement thermique de 70°C pendant 1 h a été effectué sur une biomasse congelée ; le formiate (13,1 mmol) et le valérate (10,0 mmol) lorsque le CO₂ a été utilisé comme gaz de balayage.

Par ailleurs, on remarque que la quantité totale des métabolites minoritairement produits par le test 'ptf + CO₂' (26,6 mmol) est 1,67 fois plus élevée que celle obtenue avec l'utilisation du N₂. De plus, on observe que l'éthanol présent initialement en quantité non négligeable (13,5 mmol) dans ce test est reconsumé en partie (8,3 mmol).

Les rapports molaires butyrate/acétate, les rapports molaires théoriques H₂/[2*(butyrate + acétate)] et les rapports molaires H₂/CO₂ obtenus lors des différents tests de fermentation, et associés aux métabolismes microbiens, sont représentés sur la figure 38.

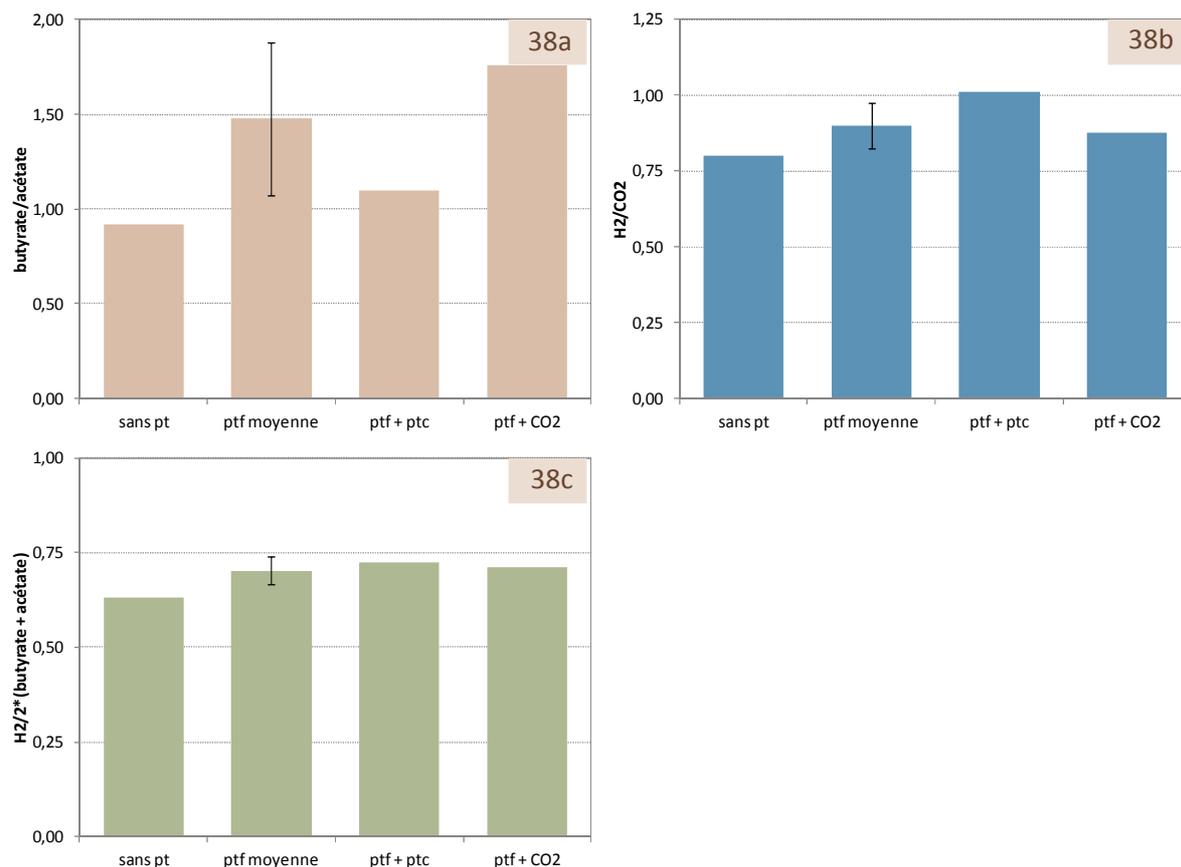
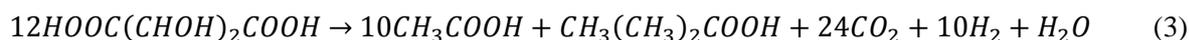


Figure 38 : Rapports molaires butyrate/acétate (a), théorique (b) et H₂/CO₂ (c) obtenus pour les différents tests de fermentation.

Les résultats de la figure 38 indiquent que le test 'sans pt' a obtenu les valeurs les plus faibles de rapports molaires : butyrate/acétate avec une diminution de 38 % par rapport au test de référence (1,48 ± 0,48) ; H₂/CO₂ avec une diminution de 11 % par rapport au test 'ptf moyenne' (0,90 ± 0,08) ; H₂/2*(butyrate + acétate) avec une baisse de 10 % par rapport au test de référence (0,70 ± 0,04). Le volume d'hydrogène produit et la quantité de butyrate produit étant similaires à ceux obtenus dans le test 'ptf moyenne', cela signifie que le rapport butyrate/acétate plus faible est lié à un excès d'acétate produit, ce qui a été confirmé lors de l'analyse des métabolites (figure 13). En revanche, celle-ci n'a pas mis en évidence la production d'un métabolite particulièrement co-produit de CO₂. Ainsi, la seule voie métabolique justifiant les faibles valeurs des trois rapports molaires et l'excès d'acétate est la voie de dégradation 'prématurée' du tartrate (équation 3) mise en évidence dans ce chapitre au paragraphe 2.3.



En ce qui concerne le test 'ptf + ptc', les résultats de la figure 38 indiquent que seul le rapport molaire H₂/CO₂ est amélioré de 12 % par rapport au test de référence (0,90 ± 0,08), les autres rapports molaires étant compris dans l'écart-type du test 'ptf moyenne'.

Enfin, l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage n'impacte pas les rapports molaires

butyrate/acétate, H_2/CO_2 et $H_2/2*(butyrate + acétate)$ pour lesquels les valeurs sont comprises dans l'écart-type du test de référence 'ptf moyenne'.

3.4. Structure des communautés microbiennes

Le séquençage a été réalisé sur des échantillons prélevés à 24 h de fermentation. Seul le test 'ptf + CO_2 ' n'a pas pu être séquençé. L'étude réalisée sur l'influence de la durée de stockage a permis de mettre en évidence une évolution de la flore microbienne en fonction de la durée de stockage. C'est pourquoi, le test 'ptf 63 jours' sera utilisé comme élément de comparaison au test 'ptf + ptc' car la durée de stockage est la plus proche (154 jours). En revanche, le test 'sans pt' dont la biomasse a été stockée à 4°C pendant 12 jours sera comparé au test 'ptf 35 jours'. La figure 39 représente la diversité microbienne associée aux échantillons prélevés à 24 h de fermentation pour l'étude du prétraitement thermique.

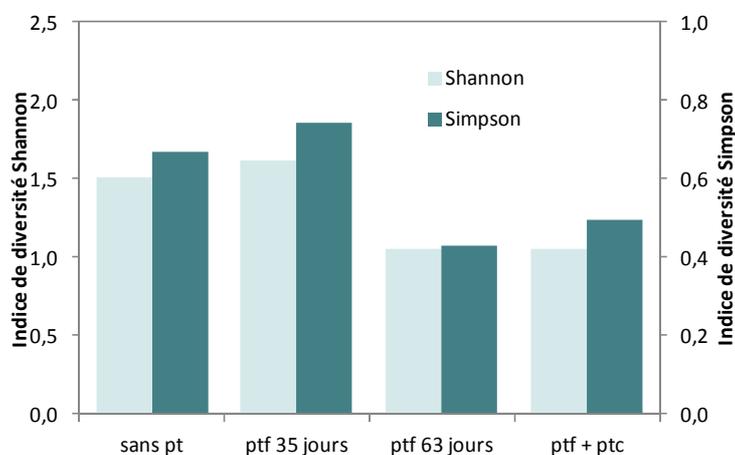


Figure 39 : Diversité microbienne obtenue pour les tests sans prétraitement et avec prétraitements thermiques froid et chaud.

La figure 39 indique qu'une biomasse non prétraitée a une diversité 7 à 10 % plus faible pour les indices de Shannon et Simpson que celle de la biomasse congelée pendant 35 jours. En revanche, le prétraitement thermique à 70°C effectué sur la biomasse congelée n'impacte pas sa diversité microbienne par rapport au test 'ptf 63 jours'. De plus, cette diversité est plus faible que celle de la biomasse non prétraitée ou congelée pendant 35 jours. Ceci confirme ce qui a été conclu dans l'étude précédente : plus la durée de stockage de la biomasse à -20°C est élevée et plus la diversité microbienne est faible.

La figure 40 représente la classification taxonomique au niveau de la famille obtenue pour les échantillons prétraités ou non.

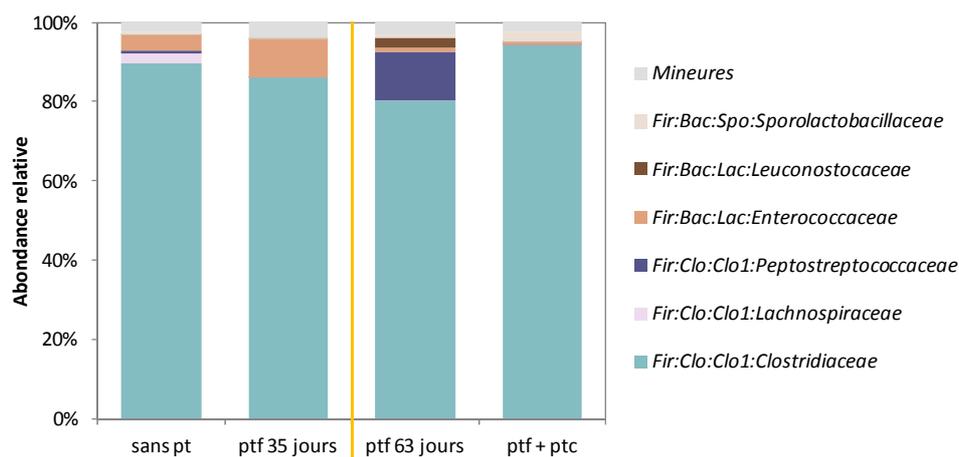


Figure 40 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests sans prétraitement et avec prétraitements thermiques froid et chaud. Fir = Firmicutes ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

Comme remarqué précédemment, le phylum *Firmicutes* est le plus abondant avec des valeurs d'abondances relatives variant entre 96,0 % et 97,6 % respectivement pour '35 jours' et 'ptf + ptc' (figure non représentée). *Clostridiaceae* est la famille majoritaire quel que soit le test avec des abondances relatives variant de 80,3 % à 94,5 %. Contrairement aux tests 'ptf 35 jours' et 'ptf 63 jours', les tests 'sans pt' et 'ptf + ptc' sont composés de familles minoritaires ayant des abondances relatives plus faibles et inférieures à 3,8 %.

L'affiliation des séquences à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 6 pour les tests 'sans pt' et 'ptf + ptc'.

Tableau 6 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests 'sans pt' et 'ptf + ptc'.

	Similarité	sans pt	ptf 35 jours	ptf 63 jours	ptf + ptc
<i>Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)</i>	99,5%	34,4%	35,9%	74,5%	67,8%
<i>Clostridium sp.</i>	98,7%	3,8%	23,0%	0,4%	1,8%
<i>Clostridium spp. (sartagoforme, tertium)</i>	100,0%	1,3%	1,7%	2,3%	20,7%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7%	45,6%	25,2%	3,0%	4,1%
<i>Clostridium perfringens</i>	100,0%	4,6%	0,2%	0,2%	<0,1%
<i>[Clostridium] bif fermentans</i>	100,0%	0,6%	0,2%	12,4%	<0,1%
<i>Anaerospobacter mobilis</i>	99,5%	2,8%	<0,1%	<0,1%	<0,1%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	3,8%	9,7%	0,8%	0,6%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0%	0,1%	<0,1%	2,7%	<0,1%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	0,8%	0,1%	0,7%	2,5%

Comme pour la partie 2, *Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)* est le genre majoritaire présent dans tous les tests à l'exception du test 'sans pt' pour lequel l'espèce *Clostridium intestinale* prime (45,6 %). En effet, l'abondance relative de *Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)* est d'environ 35 % pour les tests 'sans pt' et 'ptf 35 jours' et d'environ 70 % pour les tests 'ptf 63 jours' et 'ptf + ptc'.

Le stockage de la biomasse à -20°C affecte l'espèce *Clostridium intestinale* dont l'abondance relative a presque diminué de moitié passant de 45,6 % à 25,2 %, en faveur de *Clostridium* sp. dont l'abondance relative passe de 3,8 % à 23,0 %. *Clostridium perfringens* et *Anaerospobacter mobilis* sont aussi affectées par la congélation, leurs abondances relatives respectives passent de 4,6 % à 0,2 %, et de 2,8 % à < 0,1 %. En revanche, *Enterococcus villorum* n'est pas impactée par le prétraitement à froid car elle est présente dans les deux tests (respectivement de 3,8 % et 9,7 %). Quant au prétraitement de 70°C, il affecte négativement [*Clostridium*] *bifermentans* et *Leuconostoc mesenteroides*, pour lesquelles les abondances relatives passent respectivement de 12,4 % à < 0,1 %, et de 2,7 % à < 0,1 %. En revanche, en plus de résister à la congélation, *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*) dont l'abondance relative passe de 2,3 % à 20,7 % est favorisée par le traitement thermique chaud.

3.5. Discussion

Le paragraphe 3.2. a montré que la microflore endogène préconsommait une partie des sucres lorsque la biomasse était stockée à 4°C. Cette consommation en sucres de 5 % a été sans conséquence pour les performances de production d'hydrogène obtenues (3,1 L/L, 4,78 mmol/L/h et 1,98 mol/mol contre $3,2 \pm 0,2$ L/L, $5,20 \pm 0,71$ mmol/L/h et $1,80 \pm 0,16$ mol/mol pour la biomasse congelée). En revanche, la réfrigération de la biomasse à 4°C ('sans pt') a favorisé l'émergence de *Clostridium intestinale* (45,6 %), mais également plus minoritairement, *Clostridium perfringens* (4,6 %) et *Anaerospobacter mobilis* (2,8 %). Ces trois espèces ont pu participer à la production en excès d'acétate (34 %). Toutefois, le faible rapport molaire butyrate/acétate associé au faible rapport molaire H_2/CO_2 a mis en évidence la consommation « prématurée » du tartrate selon l'équation 3, de la même manière que pour le test 'ptf 35 jours' alors que les teneurs en hexose dans le milieu réactionnel sont encore importantes. D'après Tabachnick & Vaughn (1948), les bactéries appartenant au genre *Clostridium* ont cette capacité de dégrader le tartrate. Ceci ne nous permet donc pas de savoir avec certitude quelle espèce est responsable de la consommation du tartrate via l'équation 3.

Le paragraphe 3.2. a également montré qu'un prétraitement thermique de 70°C effectué sur la biomasse congelée permettait d'améliorer de 16 % le volume d'hydrogène produit, de 20 % le rendement en hydrogène et de 12 % le rapport molaire H_2/CO_2 comparativement au test utilisant une biomasse congelée, et sans impacter la productivité et les métabolites majoritaires produits (acétate et butyrate). Quant à la productivité, elle n'a pas été significativement impactée par le traitement thermique réalisé. Ce résultat positif montre que l'adaptabilité du consortium microbien à la production d'hydrogène existe déjà sans aucune action thermique sur le milieu réactionnel. Alors que dans la littérature, Kim *et al.* (2009) n'ont pu améliorer le rendement en hydrogène (celui-ci étant nul sans prétraitement) qu'en effectuant un prétraitement thermique à 90°C, pendant 20 min effectué sur la biomasse (déchets alimentaires) utilisée à la fois comme substrat et comme consortium bactérien

(fermentation endogène) permettant d'obtenir un rendement de $2,05 \pm 0,35$ mol/mol ; Wang *et al.* (2011) ont augmenté leur rendement de 53,2 % en prétraitant leur inoculum à 80°C pendant 30 min ; Baghchehsaraee *et al.* (2008) ont également augmenté leur rendement de 35 à 47 % en prétraitant des boues aérées ou anaérobies à 65°C pendant 30 min, le maximum obtenu étant de 2,3 mol/mol. Le prétraitement thermique effectué sur la biomasse a permis de limiter la production de lactate en faveur de la production de butyrate en fermentation endogène (Kim *et al.*, 2009). En revanche, le prétraitement thermique effectué sur l'inoculum externe a permis d'inhiber la voie propionate pour Wang *et al.* (2011), alors que Baghchehsaraee *et al.* (2008) a obtenu une inhibition de la voie lactate et éthanolique en faveur de la voie acétate/butyrate. En ce qui concerne notre étude, le prétraitement thermique effectué sur la biomasse stockée à -20°C, a permis de limiter la production des métabolites minoritaires suivants : valérate, succinate, lactate et formiate et à la place d'orienter le métabolisme vers d'autres métabolites minoritaires : propionate et butanol. L'orientation, même dans une moindre mesure, du propionate est surprenante suite au précédent chapitre (III) dans lequel la production de propionate était inhibée par le traitement thermique. Ceci peut être lié au fait que la biomasse ait été stockée à -20°C avant le traitement thermique, ce qui a favorisé l'émergence de bactéries productrices de propionate. Le séquençage ne révèle cependant pas de bactéries propioniques, ce qui peut être attribué au fait que certaines bactéries (non propioniques) peuvent produire du propionate en faible quantité, c'est notamment le cas de *Clostridium beijerinckii* De Vos *et al.*, 2009. La production légèrement plus élevée d'acétate est attribuée au fait que les bactéries productrices d'hydrogène nécessitent un apport en ATP plus important pour leur croissance après avoir subi un stress induit par le prétraitement thermique. Les inhibitions totales de la production de valérate et partielle de la production de formiate peuvent être attribuées à une inhibition de *Clostridium bif fermentans*, bactérie connue (De Vos *et al.*, 2009) pour dégrader à la fois les sucres et les acides aminés produisant notamment ces deux acides organiques. L'utilisation du prétraitement thermique pour optimiser la production d'hydrogène n'est pas clairement établie. Cela conduit certes, à une augmentation de la production d'hydrogène, de son rendement et du rapport H_2/CO_2 , mais sans pour autant être expliquée par le biais des métabolites produits. On peut cependant noter que *Clostridium spp. (sartagoforme, tertium)* est favorisée par le traitement à 70°C. Il serait donc nécessaire d'effectuer des tests complémentaires tels que l'analyse des enzymes impliquées dans la production d'hydrogène.

L'utilisation du CO_2 comme gaz de balayage a uniquement impacter la productivité en hydrogène (baisse de 20 % par rapport à la valeur obtenue par le test 'ptf moyenne' ($5,20 \pm 0,71$ mmol/L/h). La légère augmentation du temps de latence observée peut s'expliquer par l'augmentation de la pression partielle en CO_2 a induit un stress chez les cellules bactériennes qui se manifeste de plusieurs façons. L'une d'elles est l'augmentation de la pression osmotique engendrée par l'ajout plus important d'hydroxyde de sodium utilisé pour réguler l'abaissement de pH induit en plus de la production d'acides organiques, au flux continu de CO_2 . Or, la consommation de NaOH dans le test 'ptf + CO_2 '

était similaire à celles des tests sous flux d'azote. Le pH initialement ajusté à 7,0 a très rapidement diminué au pH opératoire (5,7), valeur pour laquelle la forme CO₂ prédomine (88 % contre 12 % sous la forme bicarbonate). De plus, Jones *et al.* (1982) ont étudié l'effet inhibiteur du CO₂ sur la croissance de différents micro-organismes : ils en ont conclu que le seuil de tolérance du micro-organisme au CO₂ lui était propre. Par exemple, 1 atm de CO₂ stimule la germination de *Clostridium sporogenes* alors qu'à 4 atm, 40 % de la germination est inhibée. Cette observation expliquerait la durée légèrement plus élevée du temps de latence, ce qui contribue également à diminuer la productivité en hydrogène. Le séquençage n'a pas été réalisé sur ce test, mais il sera intéressant de voir l'influence du bullage de CO₂ dans le milieu sur la structure des populations microbiennes. Willquist *et al.* (2009) ont étudié l'utilisation du CO₂ sur une culture pure de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* et ont conclu à l'inhibition de la croissance bactérienne par le CO₂ de 60 %. A partir de notre test, on peut conclure que l'utilisation de CO₂ comme gaz de balayage est possible et permettrait de substituer l'azote à celui-ci à moindre coût. D'autres études complémentaires seront toutefois, nécessaires afin de conclure quant à l'effet du CO₂ sur l'expression enzymatique des bactéries et plus particulièrement des hydrogénases.

Malgré les différences observées entre les différents tests de ce chapitre, il est important de souligner que *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est le genre majoritaire (ou co-majoritaire) dans chacun de ces tests avec une abondance relative qui diffère mais qui est sans conséquence majeure sur les volumes d'hydrogène produit. Ceci signifie que l'abondance relative de l'espèce productrice d'hydrogène n'a pas d'impact direct sur la production d'hydrogène pour des valeurs supérieures à 34 %.

4. Influence du pH d'ajustement/de régulation

Dans cette partie, l'influence du pH initial et du pH de régulation sur la production d'hydrogène a été étudiée dans le but d'optimiser la production d'hydrogène par fermentation endogène.

4.1. Evolution de la production d'hydrogène

Le volume d'hydrogène produit au cours du temps a été mesuré individuellement pour les tests '5,7/5,7', '5,0/5,0' et '4,5/4,5', seuls les résultats obtenus pour le test '7,0/5,7' résulte d'une moyenne de triplicats. Les fermentations ont été réalisées à partir des biomasses congelées 'bourbes' provenant d'Alsace. La figure 41 représente l'évolution de la production d'hydrogène, au cours du temps, en fonction du pH initialement ajusté et du pH de régulation ($pH_{initial}/pH_{régulé}$). Les courbes obtenues lors de ces tests présentent toutes une allure typique d'une croissance microbienne et de production de métabolites en mode non continu, qui peut être déclinée en trois phases (latence, exponentielle et stationnaire).

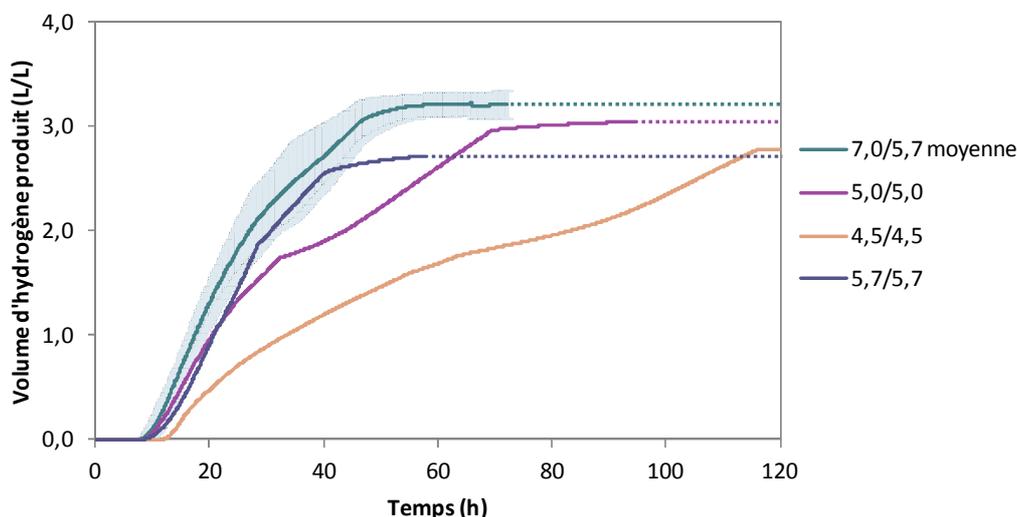


Figure 41 : Evolution de la production d'hydrogène au cours du temps en fonction des $pH_{initial}/pH_{régulé}$.

La période de latence est d'environ 9 h pour trois tests sur quatre. Seul le test pour lesquelles $pH_{initial}/pH_{régulé}$ sont de 4,5/4,5 présente un temps de latence plus long (13 h). Puis, selon les pH, on observe que l'hydrogène est produit avec une productivité maximale différente. On remarque que plus le pH de régulation est faible, et plus la productivité maximale est faible et dure un temps plus court. En effet, à un pH de régulation de 5,7, la productivité maximale dure environ vingt heures, alors qu'à un pH de 4,5, elle ne dure seulement que trois heures. On observe également deux phases de productivités distinctes à un pH de 5,0 et de 4,5. Malgré ces différences, les valeurs de production finale d'hydrogène sont du même ordre de grandeur et comprises entre 2,7 et 3,2 L/L de milieu réactionnel.

4.2. Performances de production d'hydrogène

Les performances de production d'hydrogène obtenues lors des tests de fermentation en fonction du pH ont été regroupées sur la figure 42.

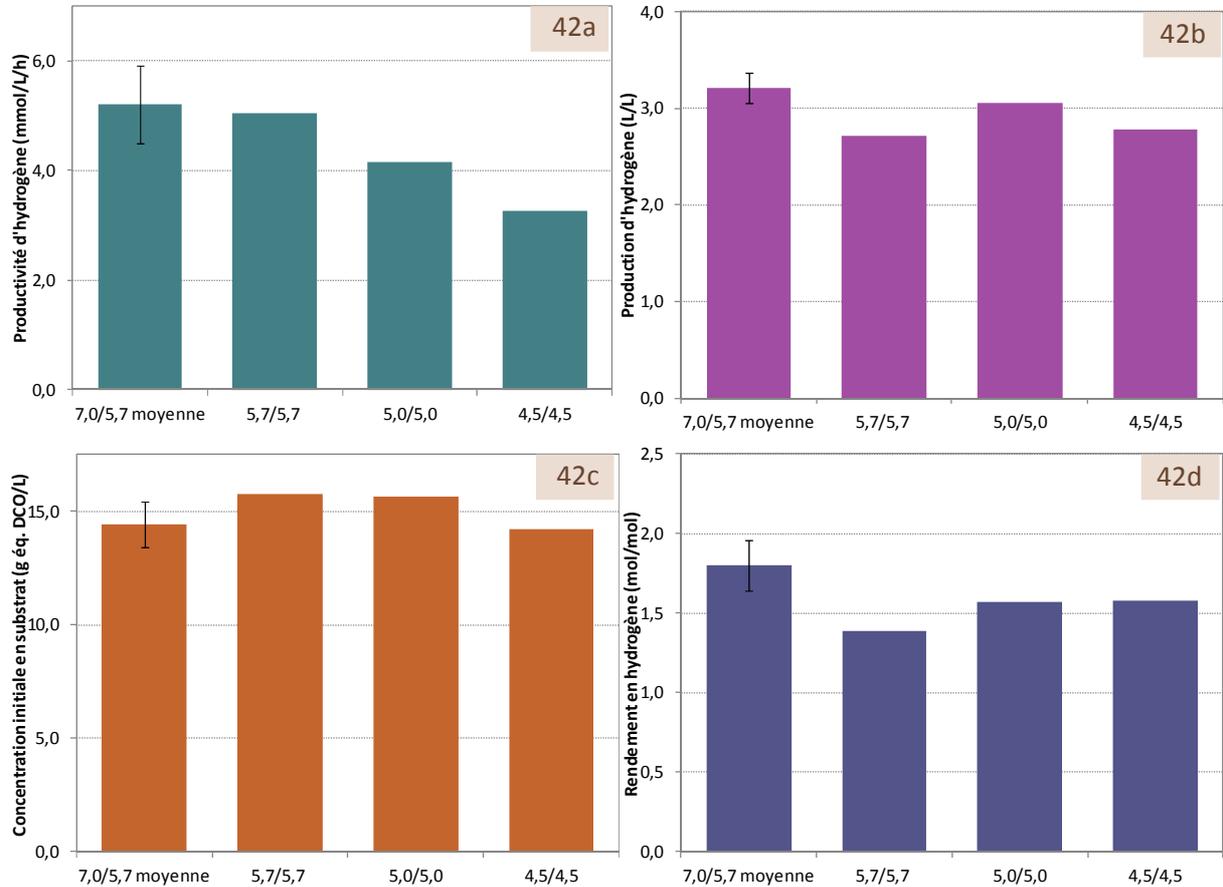


Figure 42 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction du pH : productivité (a), production (b), rendement en hydrogène (d) et teneur initiale en sucres (c).

Les résultats de la figure 42a confirment que plus le pH de régulation est élevé et plus la productivité en hydrogène augmente. Le test de Pearson a permis d'établir une corrélation positive linéaire, entre les valeurs de pH régulé comprises entre 4,5 et 5,7, ($r = 0,996$ sur quatre observations) significative au seuil de 1 % entre les pH de régulation et les productivités maximales en hydrogène (figure 43). Le pH initial ne semble pas avoir d'impact sur la productivité maximale en hydrogène.

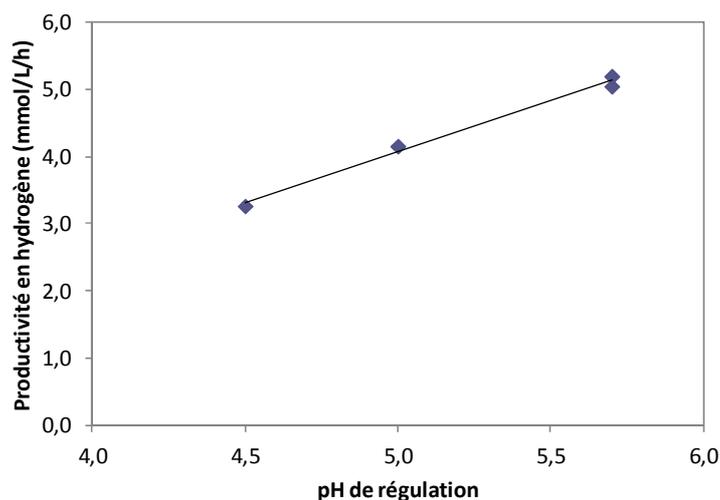


Figure 43 : Corrélation entre la valeur de régulation du pH et la productivité maximale en hydrogène obtenue.

Les résultats de la figure 42b indiquent que la mise du milieu réactionnel à un pH initial plus élevé a une incidence sur le volume d'hydrogène produit. En effet, un pH initial ajusté à 7,0 augmente de 15 % la production d'hydrogène par rapport à un pH initial de 5,7, et ce malgré la concentration initiale en sucres (figure 42c) légèrement plus faible pour ce test (respectivement $14,4 \pm 1,0$ g éq. DCO/L contre 15,8 g éq. DCO/L). En revanche, le pH de régulation n'a pas d'impact significatif ($p > 0,05$; t-test) sur le volume d'hydrogène produit. Par ailleurs, on observe que le volume d'hydrogène le plus élevé est obtenu pour le test '7,0/5,7'.

Les résultats de la figure 42d indiquent que le pH initial a également un impact sur le rendement en hydrogène. Un pH initial de 5,7 diminue de 23 % le rendement en hydrogène par rapport à un pH initial de 7,0. En revanche, le pH de régulation n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$; t-test) sur le rendement en hydrogène. La valeur de rendement en hydrogène la plus élevée est obtenue par le test '7,0/5,7'.

4.3. Métabolisme

La figure 44 représente la distribution des métabolites et des gaz produits, et les quantités initiales de sucres, pour les quatre tests de fermentation. Les bilans de matière calculés pour les différents tests sont complets (entre 92 et 103 %) et représentés sur l'annexe 2, ce qui signifie que tous les métabolites principalement produits ont été quantifiés.

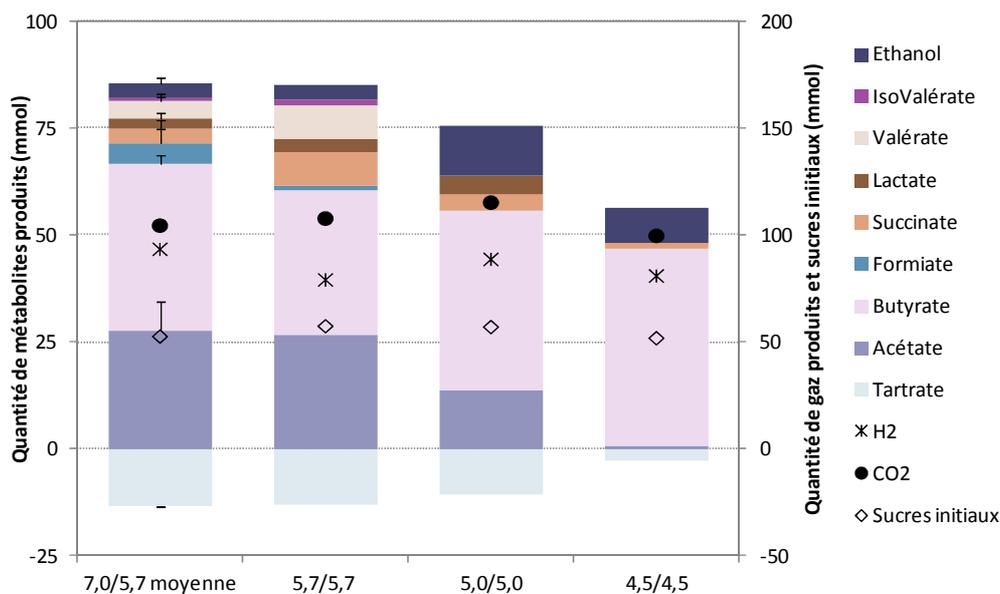


Figure 44 : Distribution des métabolites et des gaz produits et quantités initiales de sucres en fonction du pH.

L'acétate et le butyrate sont les métabolites majoritairement produits pour les tests dont le pH a été réglé à 5,7, alors qu'à un pH réglé à 5,0 ou à 4,5, seul le butyrate est majoritairement produit. De plus, on remarque que, plus le pH de régulation diminue, et moins l'acétate est produit ($25,4 \pm 1,8$ mmol d'acétate produit à un pH de régulation de 5,7 contre 13,6 mmol et 0,5 mmol pour les valeurs de régulation de pH respectives de 5,0 et 4,5), et moins le tartrate dont la concentration initiale est identique dans chacun des tests (en moyenne $19,1 \pm 0,3$ mmol/L) est consommé (100 % pour un pH réglé à 5,7, 82 % pour un pH réglé de 5,0 et 21 % pour un pH réglé de 4,5). A un pH de 4,5, la quantité de butyrate produit est la plus élevée (46,3 mmol). Par ailleurs, la diversité des métabolites minoritairement produits est plus faible lorsque le pH est faible. En effet, pour les tests '7,0/5,7' et '5,7/5,7', les métabolites minoritairement produits sont : l'éthanol, l'isovalérate, le valérate, le lactate, le succinate et le formiate, alors qu'à un pH de 5,0 se sont seulement l'éthanol, le lactate et le succinate et à un pH de 4,5, uniquement l'éthanol et le succinate.

La figure 45 représente les rendements métaboliques obtenus (par mole de sucres consommés) pour les différents tests.

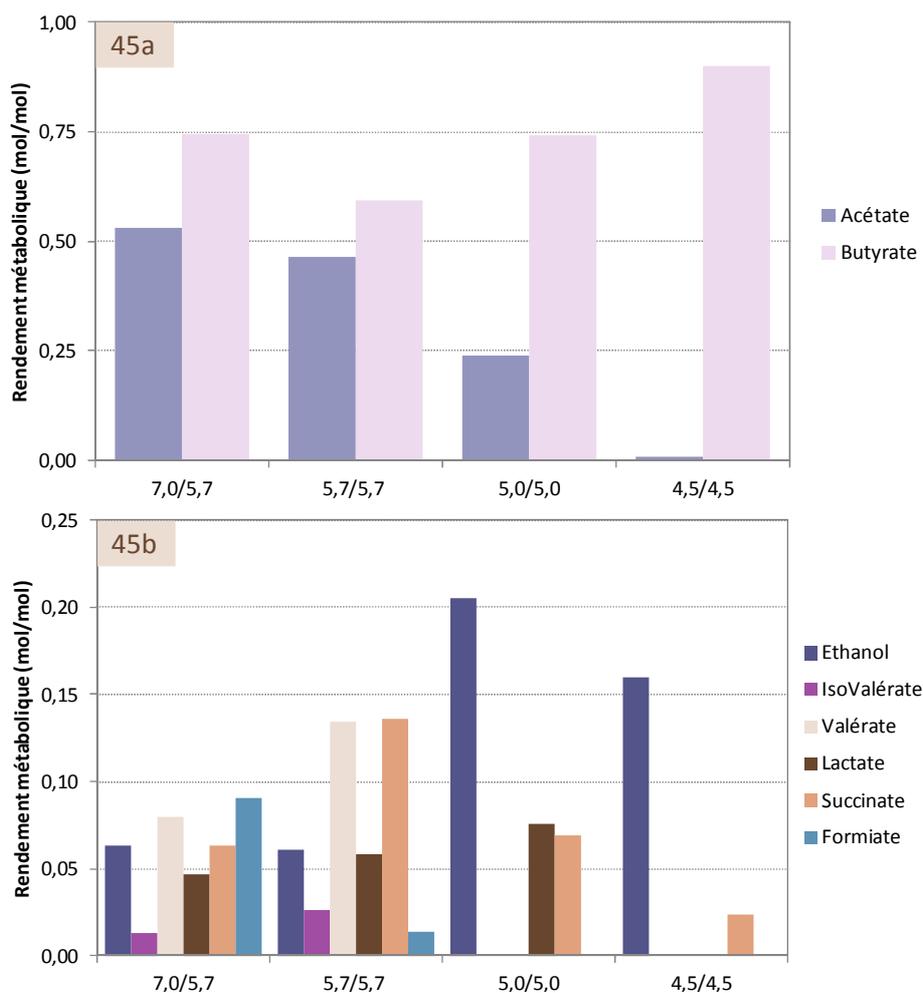


Figure 45 : Rendements métaboliques en fonction du $pH_{initial}/pH_{régulé}$.

La figure 45a indique que le pH initial et le pH de régulation impactent la distribution des métabolites produits lors de la fermentation endogène. Une diminution du pH initial de 7,0 à 5,7, induit une diminution du rendement en butyrate de 20 %, sans impacter l'acétate qui est co-majoritairement produit. Lorsque le pH de régulation diminue de 5,7 à 4,5, le rendement en butyrate augmente de 25 % (pH = 5,0) et de 52 % (pH = 4,5) par rapport au pH = 5,7 ; alors que le rendement en acétate diminue de 49 % (pH = 5,0) et 98 % (pH = 4,5).

Au niveau des rendements molaires des métabolites minoritaires (figure 45b), le formiate, le valérate et l'isovalérate sont uniquement produits à un pH de régulation de 5,7. Le pH initial passant de 7,0 à 5,7, diminue de 85 % le rendement en formiate mais augmente de 68 % celui du valérate et de 102 % celui de l'isovalérate. Le lactate est uniquement produit à un pH de régulation $\geq 5,0$. Le pH initial passant de 7,0 à 5,7 augmente de 15 % le rendement en lactate, alors que le pH de régulation passant de 5,7 à 5,0, l'augmente de 30 % et de 5,0 à 4,5, le rend nul. Le succinate et l'éthanol sont produits à tous les pH testés. L'éthanol produit n'est pas modifié par le changement de pH initial de 7,0 à 5,7 alors que le succinate augmente d'un facteur 2. En revanche, lorsque le pH de régulation passe de 5,7 à 5,0, puis à 4,5, le rendement en éthanol est 3,4 fois et 2,6 fois plus élevé qu'à 5,7, alors que le

rendement en succinate diminue de 49 % et de 83 %.

Les rapports molaires butyrate/acétate, les rapports théoriques $H_2/[2*(butyrate + acétate)]$ et les rapports molaires H_2/CO_2 obtenus lors des différents tests de fermentation, et associés aux métabolismes microbiens, sont représentés sur la figure 46.

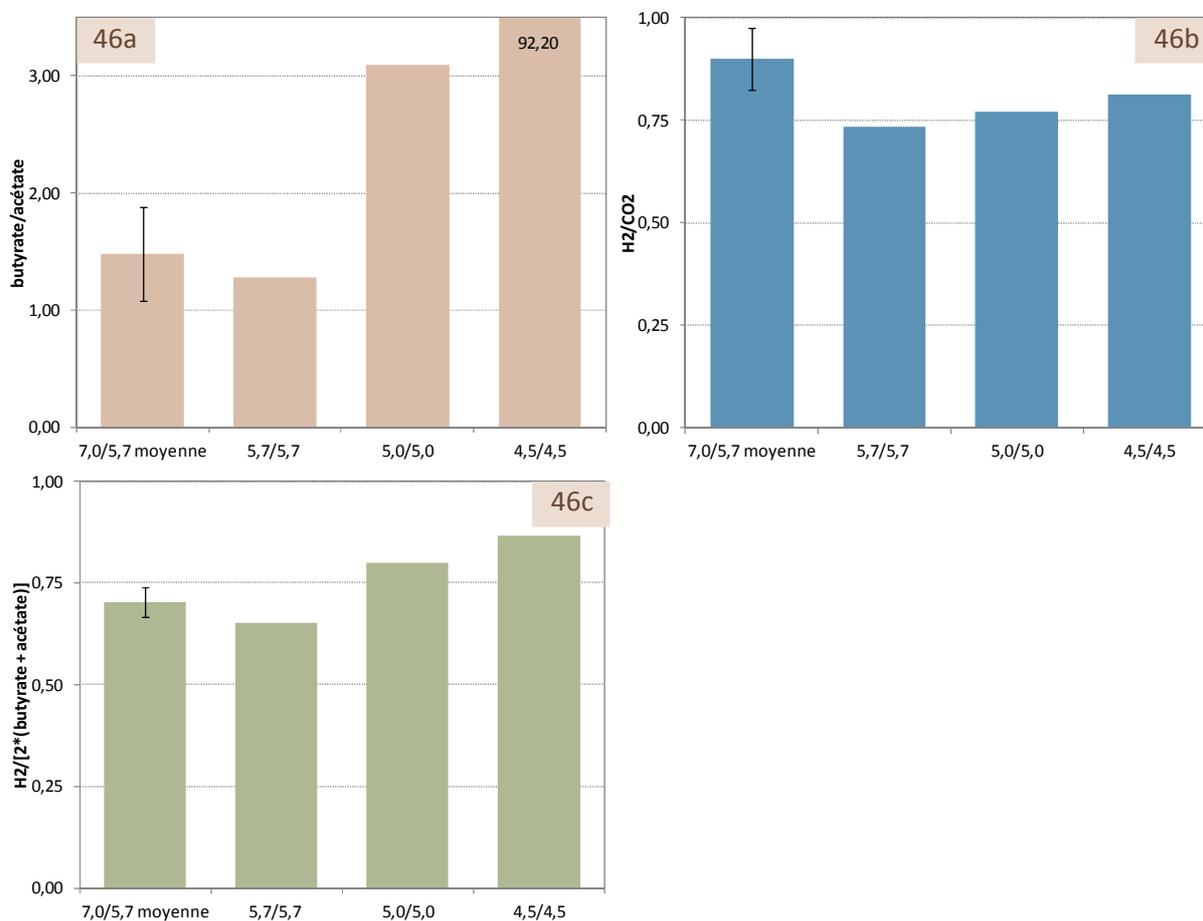


Figure 46 : Rapports molaires butyrate/acétate (a), théorique (b) et H_2/CO_2 (c) obtenus pour les différents tests de fermentation.

Les résultats de la figure 46a indiquent que plus le pH est régulé à une valeur faible, plus la quantité de butyrate produit est élevée et celle d'acétate faible, et donc, plus le rapport molaire butyrate/acétate augmente significativement ($p < 0,05$; t-test). Ainsi, le rapport molaire butyrate/acétate obtenu par le test '4,5/4,5' atteint une valeur de 92,20 alors que celui obtenu lors du test '5,7/5,7' n'est que de 1,28.

Les résultats de la figure 46b indiquent que le pH initial a une influence sur le rapport molaire H_2/CO_2 . En effet, un pH initial de 5,7 diminue de 19 % le rapport molaire H_2/CO_2 par rapport à un pH initial de 7,0 dont la valeur obtenue est la plus élevée ($0,90 \pm 0,08$). En revanche, le rapport molaire H_2/CO_2 n'est pas significativement ($p > 0,05$; t-test) modifié avec la diminution du pH de régulation. Les résultats de la figure 46c montrent que la quantité molaire théorique d'hydrogène calculée à partir des quantités molaires d'acétate et de butyrate diminue significativement ($p < 0,05$; t-test) avec l'augmentation du pH de régulation. En d'autres termes, plus le pH de régulation diminue, et plus la

quantité molaire d'hydrogène calculée à partir des quantités molaires de butyrate et d'acétate est proche de la quantité molaire d'hydrogène mesurée. A un pH de 4,5, le rapport molaire H_2 expérimental/ H_2 théorique est de 0,87.

Les différences observées étant les plus notables pour le test '4,5/4,5', la structure des populations microbiennes a été étudiée sur ce test et a été comparé au test '7,0/5,7'. Le profil de production d'hydrogène présentant deux phases de production d'hydrogène, des échantillons prélevés lors de ces deux phases ont été séquencés et comparés au test '7,0/5,7', afin de voir les effets engendrés par le pH sur la flore microbienne.

4.4. Structure des communautés microbiennes

La figure 47 représente les indices de diversité microbienne obtenus pour les tests '7,0/5,7' et '4,5/4,5' à deux temps de fermentation différents correspondants aux deux « phases » de production d'hydrogène observées lors du paragraphe 4.1.

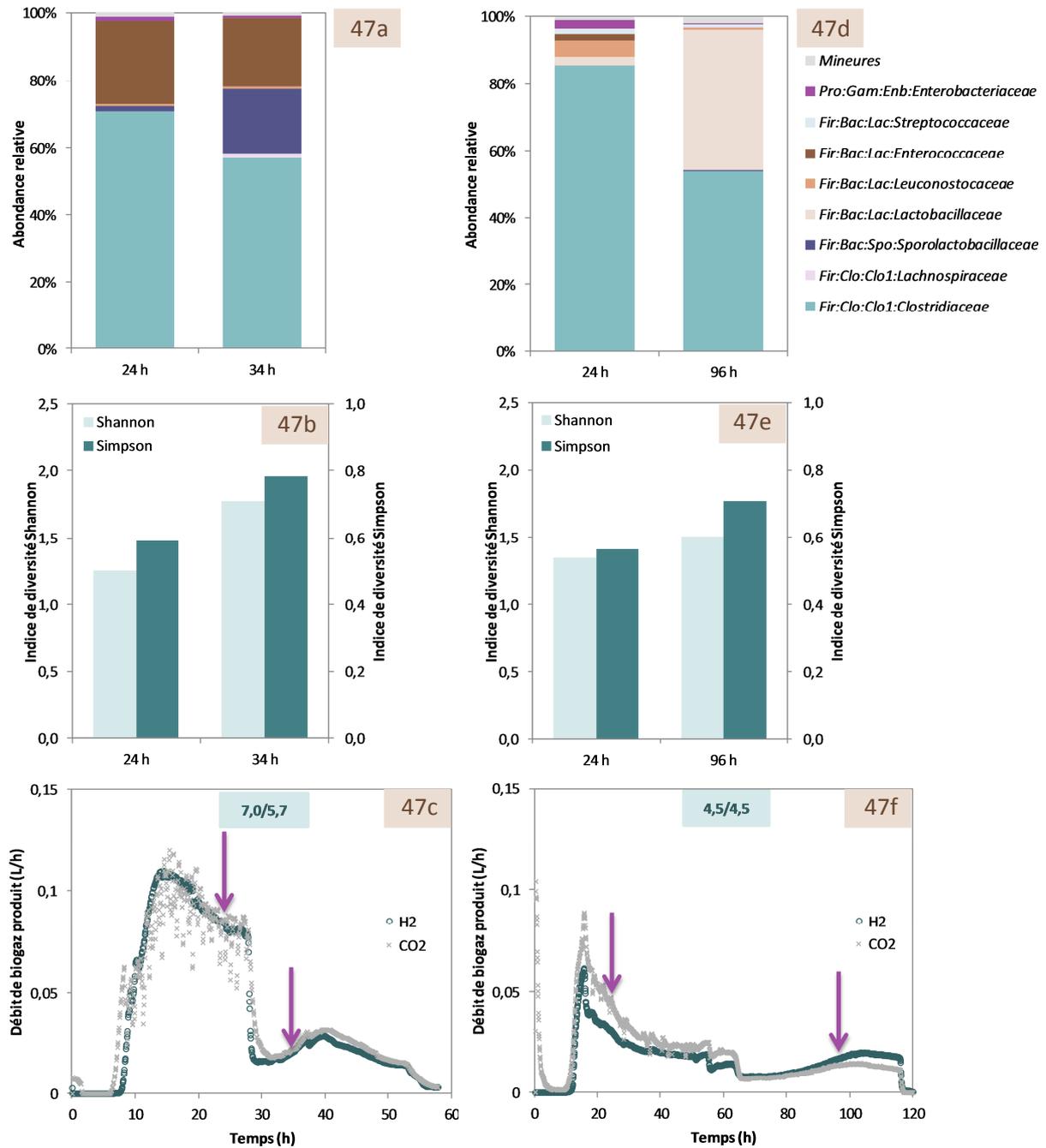


Figure 47 : Classification taxonomique au niveau de la famille (a, d) et indices de diversité (b, e) des échantillons prélevés (représentés par des flèches) au cours de la fermentation lors du test '7,0/5,7' (c) et '4,5/4,5' (f). Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

Parmi les familles appartenant au phylum *Firmicutes* (abondance relative entre 96,6 et 98,6 %), *Clostridiaceae* est la plus abondante à 24 h de fermentation que les pHs soient de '7,0/5,7' ou de '4,5/4,5' avec des valeurs d'abondances relatives respectives de 70,7 % et 85,4 %. A 24 h de fermentation, la famille *Enterococcaceae* est la deuxième famille majoritaire pour le test '7,0/5,7' (24,8 %) alors qu'elle n'est que faiblement représentée dans le test '4,5/4,5' (2,0 %). Le test '4,5/4,5' présente plusieurs familles minoritaires dont les abondances relatives sont inférieures à 4,8 % et correspondent à *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae* et *Lactobacillaceae*.

Lors de la deuxième phase de production d'hydrogène, la composition des familles majoritaires change. En effet, à 34 h de fermentation du test '7,0/5,7', l'abondance relative des *Clostridiaceae* est plus faible (57,2 % à 34 h contre 70,7 % à 24 h) en faveur de la famille émergente *Sporolactobacillaceae* (19,3 % à 34 h contre 1,5 % à 24 h). Quant à l'abondance de la famille des *Enterococcaceae*, elle reste similaire lors de la deuxième phase de production d'hydrogène (respectivement de 20,6 % contre 24,8 %). On observe la même évolution pour la famille des *Clostridiaceae* lors du test '4,5/4,5' : diminution de l'abondance relative (85,4 % à 24 h contre 53,4 % à 96 h) en faveur de l'émergence cette fois d'une autre famille, *Lactobacillaceae* (passant de 2,4 % à 42,1 %).

Les indices de diversité microbienne (figures 47b et 47c) traduisent l'augmentation de diversité observée pour les deux tests entre les populations microbiennes obtenues lors de la 1^{ère} phase et celles obtenues lors de la 2^{ème} phase.

L'affiliation des séquences à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 7 pour les tests '7,0/5,7' et '4,5/4,5' à deux temps de fermentation différents.

Tableau 7 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés lors des tests '7,0/5,7' et '4,5/4,5'.

	Similarité	'7,0/5,7' 24 h	'7,0/5,7' 34 h	'4,5/4,5' 24 h	'4,5/4,5' 96 h
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5%	58,2%	34,6%	64,1%	15,8%
<i>Clostridium</i> sp.	98,7%	8,9%	10,2%	10,7%	0,6%
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0%	2,5%	7,1%	0,3%	< 0,1%
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	100,0%	< 0,1%	0,1%	10,0%	28,7%
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	100,0%	< 0,1%	0,1%	0,1%	8,2%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7%	0,8%	4,7%	0,1%	< 0,1%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	1,5%	19,3%	0,1%	0,1%
<i>Lactobacillus</i> spp. (<i>mali</i> , <i>hordei</i>)	100,0%	0,1%	<0,1%	2,4%	42,1%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0%	0,5%	0,4%	4,8%	0,4%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	24,8%	20,6%	2,0%	0,2%
<i>Lactococcus lactis</i>	100,0%	< 0,1%	< 0,1%	1,8%	0,7%
<i>Enterobacter/Klebsiella/Proteus</i>	99,7%	1,3%	0,6%	2,3%	0,5%

A 24 h de fermentation, le genre dominant affilié à l'OTU majoritaire est *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) avec des abondances relatives respectives de 58,2 % et 64,1 % pour les tests '7,0/5,7' et '4,5/4,5'. Les souches non formellement caractérisées taxonomiquement *Clostridium* sp. sont également présentes dans les deux échantillons avec des abondances relatives similaires (8,9 % et 10,7 %). En revanche, l'espèce *Enterococcus villorum* est sous-dominante (24,8 %) dans le test '7,0/5,7', alors qu'elle n'est que très minoritaire dans le test '4,5/4,5' (2,0 %). Inversement, *Clostridium acetobutylicum* est présente avec une abondance de 10,0 % lorsque le pH est régulé à 4,5 alors qu'elle est quasiment absente dans le test '7,0/5,7' (< 0,1 %). Par ailleurs, comme remarqué précédemment, le test '4,5/4,5' montre la présence de divers phylotypes bactériens minoritaires

ayant des abondances comprises entre 4,8 % et 1,8 %, tels que *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* spp. (*mali*, *hordei*), les phylotypes bactériens entériques appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus villorum* et *Lactococcus lactis*.

Lors du test '7,0/5,7', à 34 h de fermentation, le phylotype *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est moins présent (34,6 %) qu'à 24 h (58,2 %), en faveur de trois autres phylotypes : *Sporolactobacillus laevolacticus* (19,3 % contre 1,5 %), *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*) (7,1 % contre 2,5 %) et *Clostridium intestinale* (4,7 % contre 0,8 %). L'espèce *Enterococcus villorum* est présente avec une abondance similaire aux deux temps de fermentation (20,6 % et 24,8 %).

Pour le test '4,5/4,5', le genre *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est quatre fois moins abondant (15,8 %) à 96 h de fermentation qu'à 24 h (64,1 %), en faveur de trois espèces différentes de celles observées pour le test '7,0/5,7' : *Lactobacillus* spp. (*mali*, *hordei*) (42,1 % contre 2,4 %), *Clostridium acetobutylicum* (28,7 % contre 10,0 %) et *Clostridium tyrobutyricum* (8,2 % contre 0,1 %).

4.5. Discussion

Le pH est un des paramètres le plus important car il agit non seulement sur la croissance des cellules et l'expression de leurs enzymes, mais également par le fait qu'il oriente le métabolisme microbien. L'étude des performances de production d'hydrogène dans la gamme de pH testée a permis de mettre en évidence que plus le pH de régulation est acide et plus la productivité en hydrogène est faible sans toutefois impacter de manière significative la production totale en hydrogène. Des observations similaires quant au ralentissement de la production d'hydrogène et à sa durée totale avec un faible pH ont été faites par Khanal *et al.* (2004). Par ailleurs, le pH de 4,5 impacte la croissance microbienne car le temps de latence est augmenté de 4 h par rapport aux autres pH. Dabrock *et al.* (1992) ont observé dans leur étude qu'à un pH inférieur à 5,0, les taux de croissance de *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium pasteurianum* ont été réduits à des valeurs respectives de 0,05 h⁻¹ et 0,03 h⁻¹ contre 1,5 h⁻¹ lorsque le pH était supérieur à 5,0. Le paragraphe 4.2.a mis en évidence qu'un pH initial de 5,7 diminue de manière significative le volume d'hydrogène produit et le rendement en hydrogène par rapport à un pH initial de 7,0. En revanche, le rendement en hydrogène n'a pas été affecté significativement par le pH de régulation.

Le métabolisme des bactéries est modifié en fonction des pH d'ajustement et de régulation. Le paragraphe 4.3. a permis de mettre en évidence que : (i) la production d'acétate diminue avec le pH de régulation alors que celle du butyrate augmente ; (ii) le valérate, l'isovalérate et le formiate ne sont produits qu'à un pH de régulation de 5,7, en-deçà, ils ne sont pas détectés ; (iii) le lactate est produit à un pH de régulation $\geq 5,0$; (iv) l'éthanol et le succinate sont produits à tous les pH testés, avec une

quantité d'éthanol supérieure à celle du succinate à $\text{pH} \leq 5,0$ alors que l'inverse est observé à un pH de régulation de 5,7.

Contrairement à la littérature, ni le passage à la solvantogénèse (Van Ginkel & Logan, 2005), ni l'orientation du métabolisme vers la production d'acétate et d'éthanol (Temudo *et al.*, 2007) ou bien vers l'acétate et le lactate (Infantes *et al.*, 2011), n'ont été observés avec la diminution du pH. A partir des équations de formation des différents métabolites produits, on remarque que celle étant la plus favorable (exergonique) est l'équation productrice de butyrate (équation 13). Ceci explique donc pourquoi la production de butyrate prédomine à faible pH. De plus, la production de butyrate permet non seulement la régénération du NADH produit lors de la conversion du glucose en pyruvate mais elle permet également la production d'une mole supplémentaire d'ATP (en plus des 2 moles produites par la glycolyse).



Selon Van Ginkel & Logan, (2005), l'acidité devient toxique pour les cellules microbiennes, ce qui favorise la solvantogénèse (productions d'acétone, d'éthanol et de butanol), mécanismes de détoxification de la cellule pour éviter les effets inhibiteurs (Jones & Woods, 1986). Or, dans cette étude, seul l'éthanol a été quantifié à un pH de 4,5, le butanol et l'acétone n'ont pas été détectés (bilans de matière complets). Cette hypothèse est donc infirmée, et ce même en présence de *Clostridium acetobutylicum* (10,0 %) connue pour produire ces solvants.

Temudo *et al.* (2007) ont observé que le butyrate n'était produit qu'à des pH compris entre 4,0 et 5,5 (rendements entre 0,4 mol/mol et 0,6 mol/mol glucose consommé) alors que l'acétate était produit à tous les pH. Les quantités les plus faibles d'acétate produit étaient obtenues à des valeurs de pH comprises entre 4,0 et 5,5 (rendements de 0,4 mol/mol) alors qu'au-delà pH 5,5, les valeurs étaient plus élevées (entre 0,6-0,7 mol/mol) accompagnées d'éthanol du même ordre de grandeur. Khanal *et al.* (2004) ont observé que le rapport butyrate/acétate diminuait lorsque le pH opérationnel diminuait. De plus, le propionate accompagnait l'acétate et le butyrate sans passage à la solvantogénèse. Ainsi, en fonction des études, le métabolisme des cultures mixtes est orienté différemment. Par ailleurs, la fermentation endogène à partir de bourbes de raisin utilise un consortium microbien déjà adapté à de faibles pH puisque les pH des bourbes se situent entre 3,0 et 4,0, ce qui expliquerait une orientation métabolique différente de celles observées dans la littérature.

L'analyse des métabolites produits a montré que, dans notre étude, le formiate est produit (entre 0,01 et 0,09 mol/mol de sucres consommés) à un pH de régulation de 5,7, et qu'en-deçà, le formiate n'est pas quantifiable. Temudo *et al.* (2007) ont également observé que le formiate n'était pas produit à un pH de 4,0 ; alors qu'il était produit en faible quantité (entre 0,01 et 0,05 mol/mol) associé à une forte production d'hydrogène à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 4,75, et enfin, qu'il était fortement produit (0,2 à 1,45 mol/mol de glucose consommé) à des pH opérationnels de 6,25 à 8,0, associé à une

faible production d'hydrogène. Dans cette étude, la production de formiate est donc en accord avec Temudo *et al.* (2007). Ce qui confirme qu'à faible pH, le formiate est scindé en hydrogène et dioxyde de carbone sans toutefois, savoir par quel micro-organisme.

D'autre part, il est assez surprenant d'observer la présence de nombreuses bactéries lactiques à un pH de 4,5 : *Lactobacillus spp. (mali, hordei)* (2,4 %), *Leuconostoc mesenteroides* (4,8 %), *Enterococcus villorum* (2,0 %) et *Lactococcus lactis* (1,8 %) ; alors que lors du test '7,0/5,7' une seule espèce de bactérie lactique était recensée : *Enterococcus villorum* (24,8 %). En accord avec cette observation, Hutkins *et al.* (1993), ont notamment mis en évidence une résistance plus prononcée des bactéries lactiques lors de grande variation de pH intra/extracellulaire. Malgré les abondances relatives sommées élevées représentant les bactéries lactiques (11,0 % pour le test '4,5/4,5' contre 24,8 % en ne considérant que l'espèce majoritaire *Enterococcus villorum* pour le test '7,0/5,7'), les quantités de lactate produites respectives sont nulles et faibles (0,05 mol/mol de sucres consommés). Cependant, l'analyse des métabolites a montré que la concentration en lactate diminuait au cours du temps de fermentation. Ceci suggère donc une reconsommation du lactate, associé dans le cas du test '7,0/5,7' à une consommation de formiate et d'isovalérate, et, dans le cas du test '4,5/4,5', à une consommation d'acétate, de valérate et de l'isovalérate (métabolites également présents en cours de fermentation mais absents en fin de fermentation).

Enfin, le fait que le butyrate soit le principal métabolite produit à un pH de 4,5 soulève la question suivante : l'hydrogène est-il produit via la régénération du NADH non consommé et grâce à l'oxydation de la ferrédoxine réduite ? Pour tenter de répondre à cette question, il est nécessaire d'effectuer les rappels suivants. Lors de la glycolyse, le glucose est converti en pyruvate, en énergie (ATP) et en équivalents réducteurs (NADH). Une partie du substrat organique sera oxydée (catabolisme) tandis qu'une autre, sera réduite (anabolisme). De plus, les cofacteurs NAD^+/NADH existent en quantités limitées dans la cellule, ce qui nécessite à la cellule de régénérer le NADH produit au cours de la glycolyse. Cette régénération en NAD^+ passe entre autres, par la conversion du pyruvate en différents métabolites, tels que le butyrate, le lactate, l'éthanol, le succinate, le valérate... Dans cette étude, les métabolites produits à un pH de 4,5 sont : le butyrate (46,3 mmol), l'éthanol (8,2 mmol), le succinate (1,2 mmol) et l'acétate (0,5 mmol). Le tableau 8 indique le nombre de mole de métabolites produits par nombre de mol de sucres, et le nombre de moles de cofacteurs produits/consommés via la production de ces métabolites.

Tableau 8 : Métabolites produits, co-facteurs et énergie associés lors de la fermentation.

Métabolites	Rendement métabolite/glucose	Rendement NADH/glucose	Rendement ATP/glucose
Pyruvate	+2	+2	+2
Butyrate	+1	0	+3
Ethanol	+2	-2	+2
Succinate	+2	-2	+2
Acétate	+2	+2	+4
Lactate	+2	0	+2

La quantité molaire de sucres consommés nous a permis de calculer la quantité de NADH produit lors de la conversion des sucres en pyruvate. Les quantités molaires de métabolites produits et le tableau 8 nous ont permis de calculer la quantité de NADH régénéré en NAD^+ . La figure 48 représente les quantités molaires de NADH produit et consommé via la production des métabolites pour tous les tests de fermentation de cette étude. Le valérate et l'isovalérate ont été exclus du calcul car les équations de formation de ces métabolites ne sont pas clairement définies dans la littérature. Cependant, ces deux métabolites ne sont que faiblement produits dans cette étude.

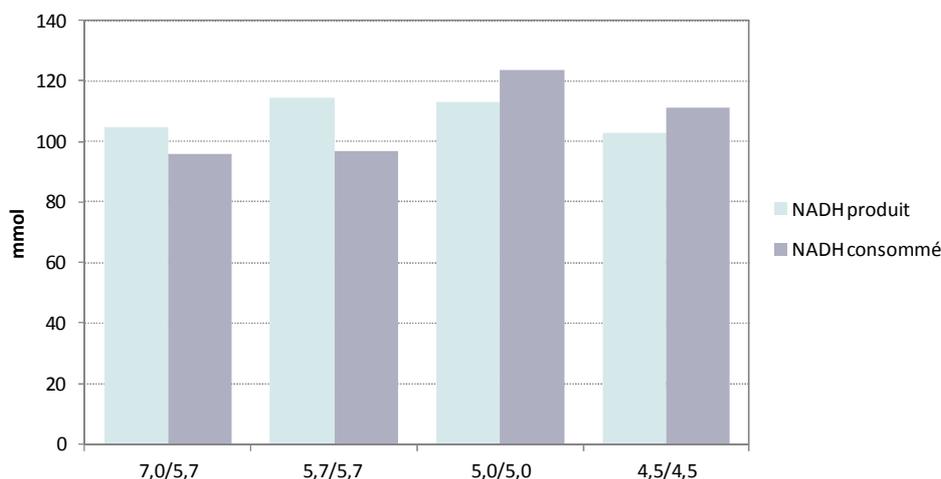
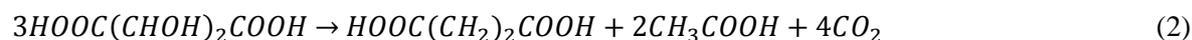


Figure 48 : Equilibre entre NADH produit par la conversion des sucres en pyruvate et NADH consommé par la production des métabolites.

La figure 48 indique un équilibre entre la quantité molaire de NADH produit lors de la conversion des sucres en pyruvate et la quantité molaire de NADH consommé via les voies métaboliques. Les quantités ne sont pas exactement identiques entre NADH produit et consommé, ce qui s'explique d'une part, par le fait que le valérate et l'isovalérate n'ait pas été pris en considération dans le calcul, ni la quantité de NADH utilisé pour la production de biomasse microbienne, et d'autre part, l'incertitude de mesure des différents métabolites et sucres. Malgré cela, la régénération du NADH en NAD^+ est quasiment complète grâce à la production des métabolites. Ceci suggère que l'hydrogène n'a pas été produit via le NADH grâce à l'oxydation de la ferrédoxine mais plutôt par l'oxydation de la ferrédoxine réduite lors de l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA, c'est-à-dire lors de la production de butyrate. Ceci est en accord avec González-Cabaleiro *et al.* (2015) qui déclarent que non seulement, les calculs thermodynamiques sont défavorables pour la production d'hydrogène via le NADH mais en

plus ceci est en accord avec Angenent *et al.* (2004), qui précisent que la production d'hydrogène par les ferrédoxines s'effectue par la voie butyrate à une pression partielle en hydrogène ≥ 60 Pa, en-dessous de cette pression partielle, la production d'hydrogène s'effectue par les ferrédoxines couplées à la réduction du NADH via la voie acétate. Dans nos tests, 99,8 % de l'hydrogène produit est mesuré à des pressions partielles en hydrogène largement supérieures à 60 Pa (ou 0,6 mbar), atteignant des valeurs maximales comprises entre 19 et 34 mbar selon les tests. Ainsi, ceci participe à démontrer que la quantité molaire théorique en hydrogène calculée à partir de deux fois les quantités molaires d'acétate et de butyrate sommées n'est que peu adaptée. De plus, cela signifie que l'acétate mesuré à un pH $\geq 5,0$ est produit par des bactéries non productrices d'hydrogène qui peuvent être des homo-acétogènes (i) ou bien l'acétate est produit via une des voies de dégradation du tartrate (ii). Bien qu'un faible pH permettrait en effet, d'inhiber temporairement les homo-acétogènes (Saady, 2013), l'hypothèse (i) est peu probable puisque le séquençage n'a pas permis de mettre en évidence des bactéries homo-acétogènes. En ce qui concerne l'hypothèse (ii), l'analyse des métabolites a permis de montrer que non seulement le tartrate était consommé de manière partielle lorsque le pH de régulation était acide (82 % pour le test '5,0/5,0' et 21 % pour le test '4,5/4,5'), mais aussi l'analyse a mis en évidence une production de succinate plus faible avec l'acidité du pH de régulation. Selon Radler *et al.* (1972), une des voies de dégradation du tartrate co-produit à la fois de l'acétate et du succinate (équation 2).



Même si l'identification bactérienne réalisée via le séquençage ne nous a pas permis de mettre en évidence *Lactobacillus brevis* responsable d'après Radler *et al.* (1972), de la dégradation du tartrate, nous avons observé que l'abondance relative d'une autre bactérie lactique, *Enterococcus villorum* (dont la similarité est de 98,7 %), diminuait fortement entre le test '7,0/5,6' et '4,5/4,5' (respectivement 24,8 % et 2,0 % à 24 h de fermentation). Ainsi, *Enterococcus villorum* pourrait être l'espèce bactérienne responsable de la dégradation du tartrate en acétate et succinate. Pour confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire d'effectuer d'autres tests en réalisant par exemple des tests de fermentation avec un pH régulé de 5,7 lors duquel du tartrate est ajouté au milieu réactionnel en concentrations différentes afin d'observer d'éventuelles productions d'acétate et de succinate proportionnelles à l'ajout de tartrate ainsi que des abondances relatives de l'espèce *Enterococcus villorum* corrélables.

5. Influence de la charge

Il est important de rappeler que la biomasse ‘bourbes’ brute (non diluée) est très concentrée en sucres fermentescibles : de l’ordre de 200 g/L (hexoses). Notre choix s’est porté sur une dilution au 1/14^{ème} pour des raisons pratiques de durée du test de fermentation (environ 72 h) et de comparaison avec la littérature. Le postulat à partir duquel plus la quantité de substrat apporté au consortium microbien est élevée et plus la production d’hydrogène est importante, participe à la volonté de tester une charge initiale en substrat plus élevée, non seulement dans le but d’une optimisation du bioprocédé en termes de volume d’hydrogène produit et de vitesse de production, mais également en termes de diminution des coûts d’ajout d’eau à la biomasse et de son traitement postérieur.

5.1. Evolution de la production d’hydrogène

La figure 49 représente l’évolution de la production d’hydrogène, au cours du temps, en fonction de la charge de biomasse introduite dans le bioréacteur.

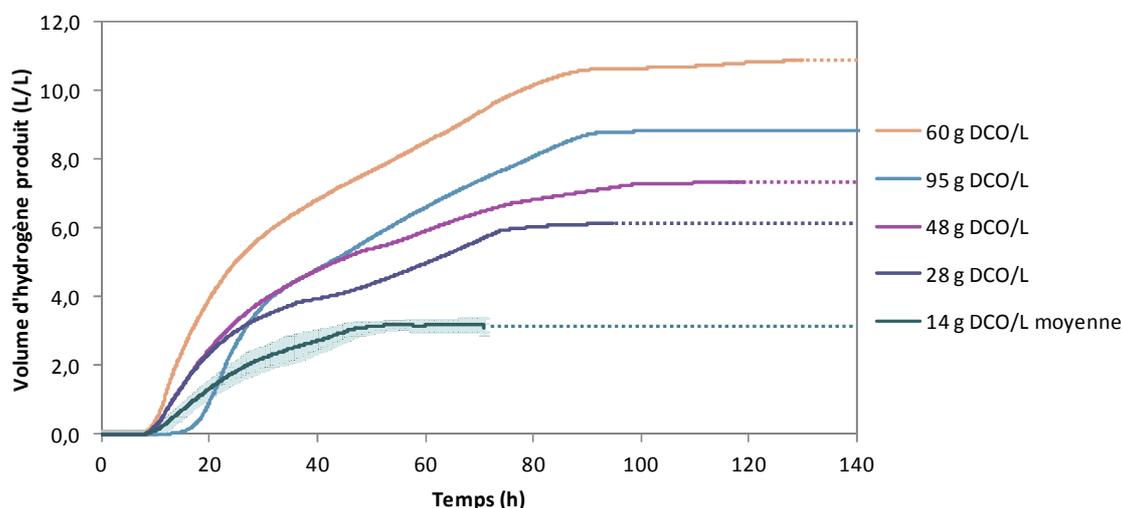


Figure 49 : Evolution de la production d’hydrogène au cours du temps en fonction de la charge de biomasse appliquée.

La figure 49 montre qu’une charge élevée (95 g DCO/L) a une influence sur le temps de latence qui est 1,7 fois plus élevé que pour des charges inférieures. De plus, la figure indique une corrélation entre la charge et la productivité en hydrogène : plus la charge est élevée et plus la productivité en hydrogène est grande. Enfin, le volume d’hydrogène produit est également corrélé à la charge : plus la charge est élevée et plus le volume d’hydrogène produit est important. Ceci est vrai jusqu’à une valeur seuil située entre une charge de 60 g DCO/L et une charge de 95 g DCO/L. En effet, à 95 g DCO/L, le volume total d’hydrogène produit est inférieur (8,9 L/L) à celui obtenu par le test ‘60 g DCO/L’ (10,9 L/L).

5.2. Performances de production d'hydrogène

Les performances de production d'hydrogène obtenues en fonction de la charge, sont représentées sur la figure 50.

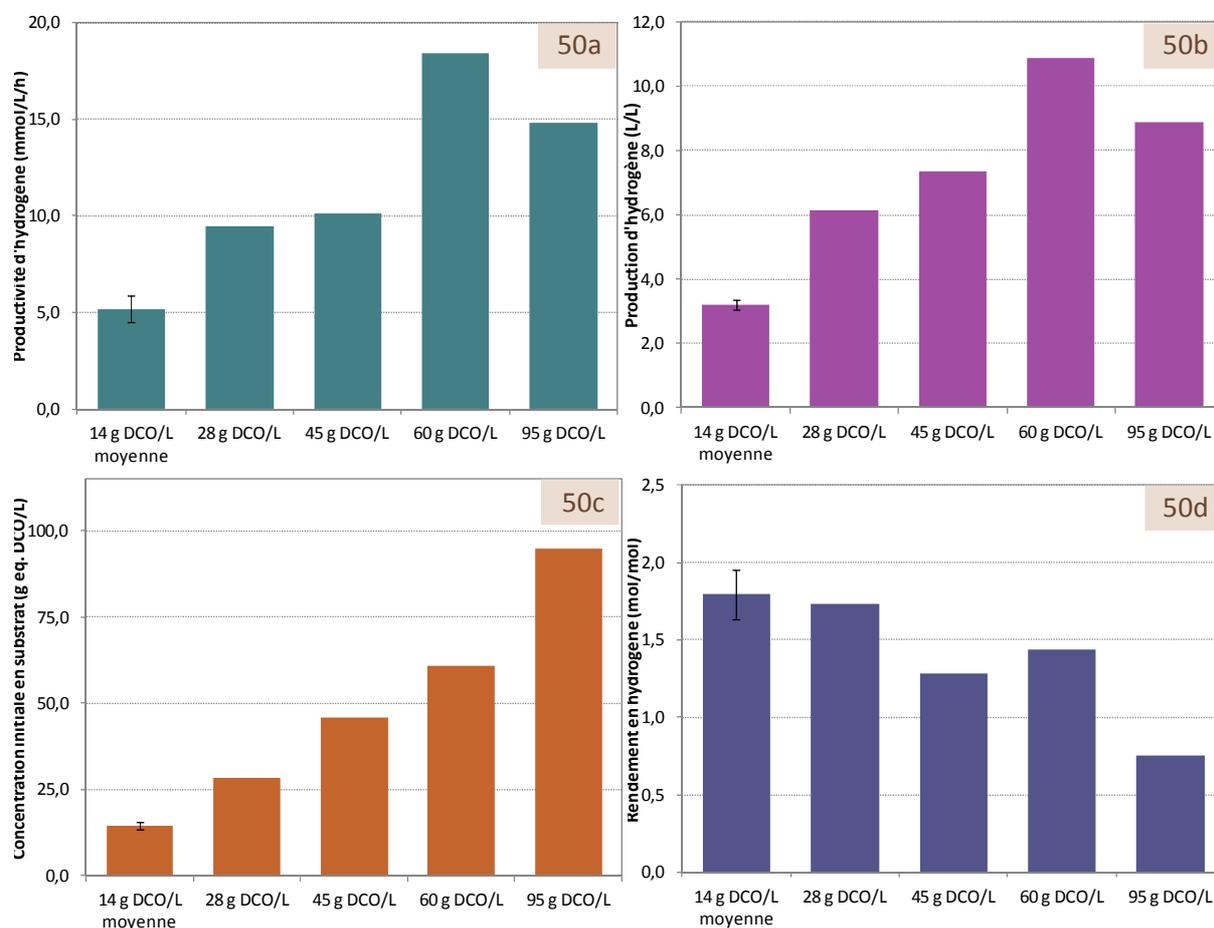


Figure 50 : Performances de production d'hydrogène obtenues en fonction de la charge de biomasse.

Les résultats de la figure 50a confirment que plus la charge initiale en substrat est élevée et plus la vitesse de production d'hydrogène est grande jusqu'à 60 g DCO/L (5,20 ± 0,71 mmol/L/h obtenue pour le test '14 g DCO/L' et 18,41 mmol/L/h obtenu pour le test '60 g DCO/L'). Au-delà de 60 g DCO/L, la charge a un impact négatif sur la productivité en hydrogène. En effet, à 95 g DCO/L, la productivité a diminué de 19 % (14,85 mmol/L/h) par rapport à celle obtenue au test '60 g DCO/L'.

Les résultats de la figure 50b montrent de la même façon que pour la productivité que plus la charge est élevée et plus le volume d'hydrogène produit est élevé jusqu'à '60 g DCO/L' (3,2 ± 0,2 L/L obtenu pour le test '14 g DCO/L' et 10,9 L/L obtenu pour le test '60 g DCO/L'). Au-delà, le volume d'hydrogène produit diminue de 19 % (8,9 L/L) par rapport à celle obtenue au test '60 g DCO/L'.

Les résultats figure 50d indiquent que la charge n'a pas d'influence sur le rendement en hydrogène jusqu'à une charge de 28 g DCO/L (1,73 mol/mol obtenu pour '28 g DCO/L' contre 1,80 ± 0,16 mol/mol pour le test '14 g DCO/L'). Au-delà de 28 g DCO/L, le rendement en hydrogène est impacté

négativement diminuant les valeurs de 17 % (1,44 mol/mol pour le test '60 g DCO/L') jusqu'à 57 % (0,75 mol/mol pour le test '95 g DCO/L').

A partir de ces résultats, le test de Pearson a permis d'établir une corrélation positive linéaire ($r = 0,978$ sur quatre observations) significative au seuil de 1% entre la production d'hydrogène et la charge initiale en sucres appliquée jusqu'à 60 g DCO/L (figure 51a) et une corrélation positive linéaire ($r = 0,931$ sur quatre observations) significative au seuil de 1 % entre la productivité d'hydrogène et la charge appliquée jusqu'à 60 g DCO/L (figure 51b).

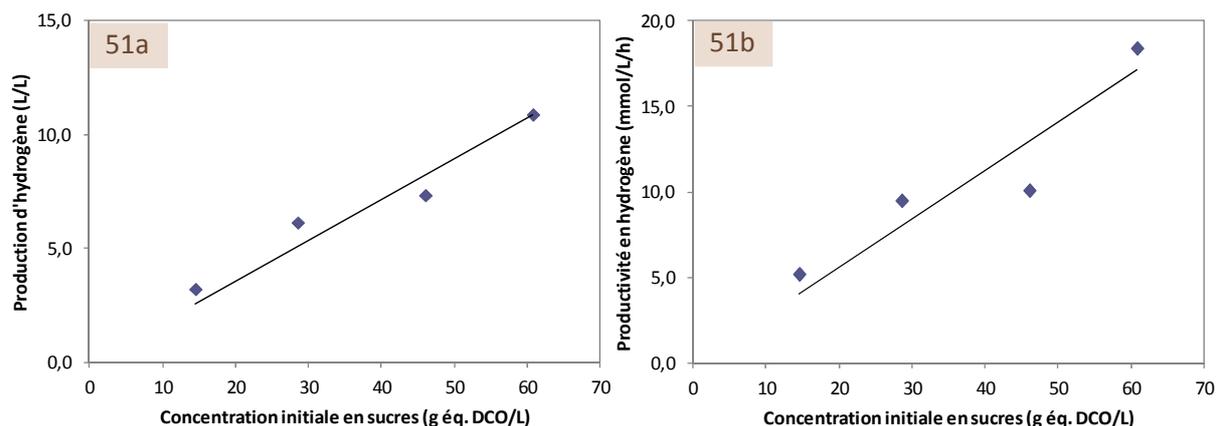


Figure 51 : Corrélations établies entre la charge initiale de substrat et la production d'hydrogène (a), et la vitesse de production d'hydrogène (b).

5.3. Métabolisme

La figure 52 représente la distribution des métabolites et des gaz produits, et les quantités initiales de sucres, pour les cinq tests de fermentation. Seul le bilan de matière (annexe 3) obtenu pour le test '95 g DCO/L' est incomplet (75 %). En revanche, les sucres initiaux ont été consommés en quasi-totalité quelle que soit la charge initiale en substrat (entre 99,3 % et 99,5 %).

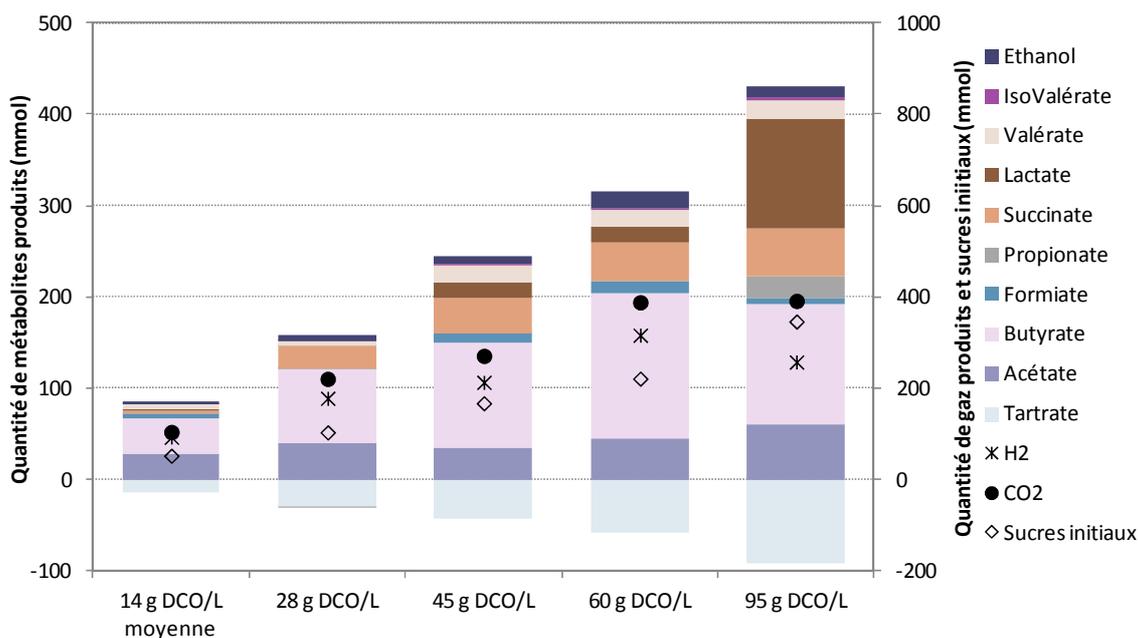


Figure 52 : Distribution des métabolites et des gaz produits et quantités initiales de sucres en fonction de la charge de biomasse.

Alors que l'acétate et le butyrate sont les deux métabolites majoritairement produits lors du test '14 g DCO/L', le butyrate est le seul métabolite majoritaire produit lorsque la charge initiale en substrat varie de 28 à 60 g éq. DCO/L. Au-delà, les productions de lactate et de butyrate sont co-majoritaires. Le test de Pearson a permis d'établir une corrélation positive linéaire ($r = 0,997$ sur quatre observations) significative au seuil de 1 % entre les quantités de butyrate produit et la charge appliquée jusqu'à 60 g DCO/L (figure 53). Au-delà (95 g DCO/L), cette corrélation n'est plus vraie.

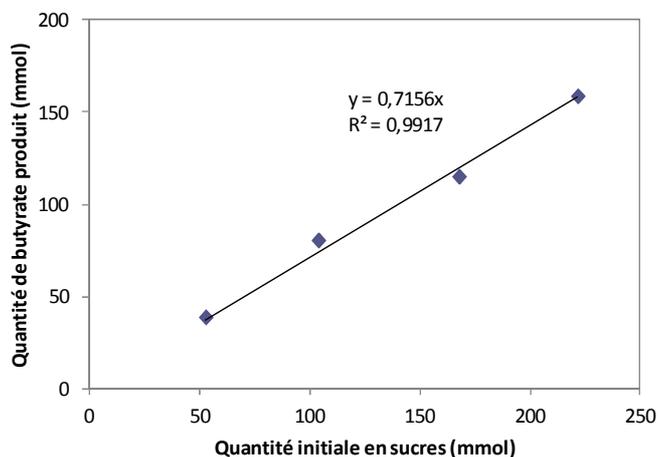


Figure 53: Corrélation entre la quantité de butyrate produit et la charge initiale en sucres.

La figure 53 montre un coefficient directeur de 0,72 de la droite de régression linéaire. Cette valeur est inférieure à celle théoriquement obtenue via l'équation (13), ce qui s'explique par le fait qu'une partie du sucre initial soit consommé par d'autres voies métaboliques majoritaires (voies acétate) ou minoritaires.



Les métabolites minoritairement produits dans tous les tests de fermentation à l'exception du test '95 g DCO/L' sont le succinate, l'éthanol, le valérate, l'isovalérate, le formiate et le lactate. Pour le test '95 g DCO/L', seul le lactate n'est pas considéré comme métabolite minoritaire alors que l'on observe une quantité de propionate significative. Il est à noter que la quantité initiale de tartrate a été consommée entièrement dans tous les tests de fermentation.

Les métabolites produits au cours des différentes fermentations ont été normalisés par la quantité de sucres consommés (figure 54).

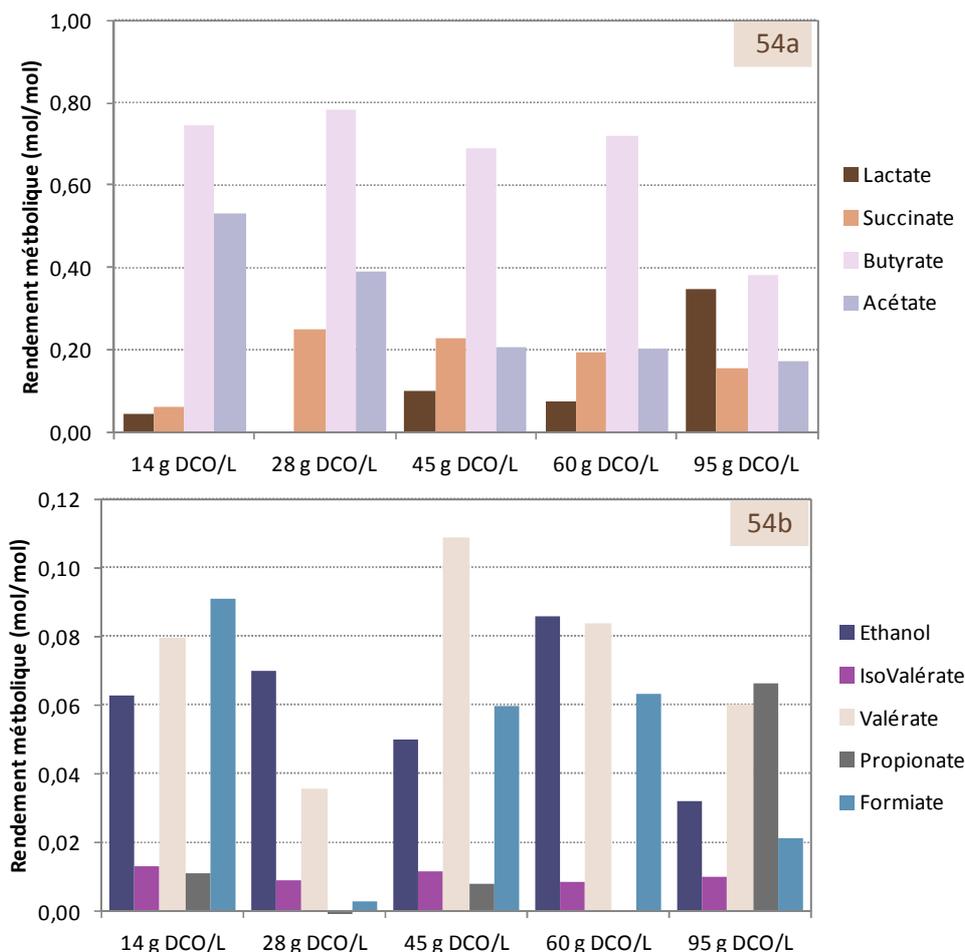


Figure 54: Rendements métaboliques en fonction de la charge appliquée.

La figure 54 indique que la charge impacte la production d'acétate qui diminue quand la charge augmente (respectivement, 0,53 mol/mol à 0,17 mol/mol pour les tests '14 g DCO/L' et '95 g DCO/L'), alors que la production de butyrate n'est pas affectée (en moyenne $0,73 \pm 0,04$ mol/mol), à l'exception du test '95 g DCO/L'. On observe également, qu'une charge élevée (95 g DCO/L) diminue la production de butyrate de moitié (0,38 mol/mol) en orientant le métabolisme vers la production de lactate (0,35 mol/mol), qui devient co-majoritaire avec le butyrate, et vers la production de propionate (0,07 mol/mol) qui était jusqu'à présent inférieur à 0,01 mol/mol. L'éthanol, le formiate, le valérate et l'isovalérate sont produits de manière indépendante de la charge appliquée. En revanche, le succinate est faiblement produit à 14 g DCO/L (0,06 mol/mol) et plus fortement produit au-delà (0,15 à 0,25 mol/mol). Enfin, on note de manière étonnante, l'absence de production de lactate lors du test '28 g DCO/L'.

Les rapports molaires butyrate/acétate et les rapports molaires H_2/CO_2 obtenus lors des différents tests de fermentation, et associés aux métabolismes microbiens, sont représentés sur la figure 55.

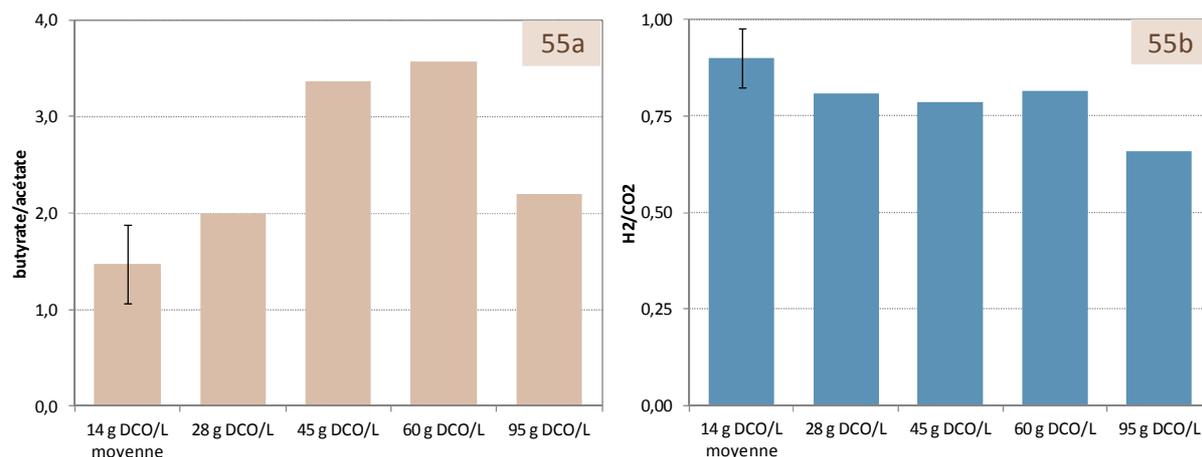


Figure 55 : Rapports molaires butyrate/acétate (a) et H₂/CO₂ (b) obtenus pour les différents tests de fermentation.

Les résultats de la figure 55a indiquent que plus la quantité initiale de sucres est élevée et plus le rapport molaire butyrate/acétate est grand, jusqu'à 60 g DCO/L, confirmant bien les observations précédentes. Au-delà, la valeur du rapport molaire diminue de 39 % (2,19) par rapport au test '60 g DCO/L'.

Les résultats de la figure 55b indiquent qu'une charge élevée en substrat (95 g DCO/L) impacte le rapport molaire H₂/CO₂ (diminution de 27 %), alors qu'à des valeurs comprises entre 28 g DCO/L à 60 g DCO/L, le rapport H₂/CO₂ est similaire à celui du test '14 g DCO/L' (0,90 ± 0,08). La valeur faible H₂/CO₂ obtenue lors du test '95 g DCO/L' (0,66) est sans doute liée à la présence de propionate produit par la voie acrylate.

5.4. Structure des communautés microbiennes

Le séquençage a été réalisé à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation pour les tests '14 g DCO/L', '28 g DCO/L', '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L'. La diversité microbienne obtenue pour ces échantillons est représentée sur la figure 56.

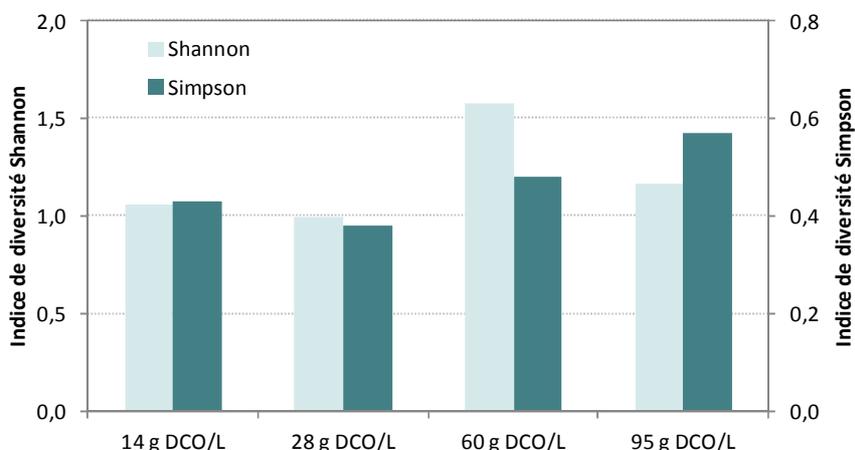


Figure 56 : Indices de diversité microbienne de Shannon et Simpson obtenus en fonction de la charge appliquée.

A partir de la figure 56, on remarque que les indices de diversité Shannon ou Simpson obtenus pour les tests '14 g DCO/L' et '28 g DCO/L' sont similaires et inférieurs aux tests '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L'. L'indice de Shannon le plus élevé est obtenu pour le test '60 g DCO/L' (1,58), tandis que celui de Simpson le plus élevé est obtenu pour le test '95 g DCO/L' (0,57). Ceci signifie que ce dernier échantillon a une diversité microbienne des taxons dominants plus élevée.

La figure 57 représente la classification taxonomique au niveau des familles des séquences obtenues pour chaque échantillon.

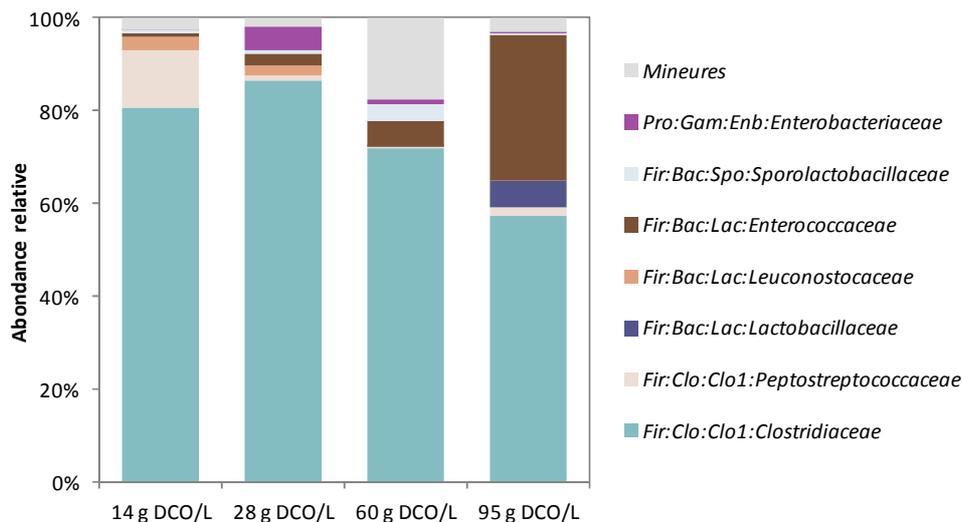


Figure 57 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests '14 g DCO/L', '28 g DCO/L', '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L'. Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

Parmi les différentes familles appartenant au phylum *Firmicutes* (majoritaire), *Clostridiaceae* est la plus abondante à 24 h de fermentation quelle que soit la charge avec des valeurs d'abondances relatives comprises entre 57,4 % ('95 g DCO/L') et 86,4 % ('28 g DCO/L'). On remarque, que plus la charge est élevée et plus l'abondance relative de cette famille est faible. Les autres familles présentes plus minoritairement sont principalement : *Peptostreptococcaceae* (12,4 %) pour le test '14 g DCO/L' ; *Enterobacteriaceae* (5,2 %) pour le test '28 g DCO/L' ; *Enterococcaceae* pour les tests '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L' avec respectivement 5,2 % et 31,2 % d'abondances relatives. Par ailleurs, qu'une partie non négligeable des abondances relatives (17,4 %) est attribuée à des OTU très minoritaires pour le test '60 g DCO/L'.

L'affiliation des séquences à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 9.

Tableau 9 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation lors des tests '14 g DCO/L', '28 g DCO/L', '60 g DCO/L' et '95 g DCO/L'.

	Similarité	'14 g _{DCO/L} '	'28 g _{DCO/L} '	'60 g _{DCO/L} '	'95 g _{DCO/L} '
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5%	74,4%	78,1%	71,6%	57,4%
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0%	2,3%	0,1%	< 0,1%	< 0,1%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7%	3,0%	6,3%	0,3%	< 0,1%
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	100,0%	1,2%	1,9%	0,1%	< 0,1%
[<i>Clostridium</i>] <i>bifermentans</i>	100,0%	12,4%	1,1%	0,1%	1,9%
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	100,0%	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%	5,6%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0%	2,7%	2,1%	0,2%	< 0,1%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	0,8%	2,8%	5,2%	31,2%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	0,7%	0,7%	3,7%	0,5%
<i>Enterobacter/Klebsiella/Proteus</i>	99,7%	0,1%	5,2%	1,2%	0,5%

Le genre dominant affilié à la séquence représentative de l'OTU majoritaire est *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) quelle que soit la charge avec des abondances relatives similaires les plus élevées pour une charge jusqu'à 60 g DCO/L (74,4 %, 78,1 % et 71,6 % pour les tests 14/28/60 g DCO/L) et une abondance un peu plus faible pour le test '95 g DCO/L' (57,4 %). Par ailleurs, la remarque faite au niveau de la famille, est toujours vraie au niveau de l'espèce : plus la charge est élevée et plus l'abondance relative de l'espèce *Enterococcus villorum* est élevée (0,8 % à 14 g DCO/L contre 31,2 % à 95 g DCO/L). Les phylotypes bactériens minoritaires affiliés à chaque test sont : [*Clostridium*] *bifermentans* (12,4 %) pour le test '14 g DCO/L', *Clostridium intestinale* (6,3 %) et les phylotypes bactériens entériques appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (5,2 %) pour le test '28 g DCO/L', *Enterococcus villorum* pour le test '60 g DCO/L' (5,2 %) et *Lactobacillus johnsonii* (31,2 %) pour le test '95 g DCO/L'. Trois phylotypes bactériens minoritaires (< 3,7 %) à très minoritaires (< 0,1 %) sont présents dans tous les tests : *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*), *Clostridium acetobutylicum*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Sporolactobacillus laevolacticus*.

5.5. Discussion

Les paragraphes 5.1. et 5.2. ont montré que plus la charge était élevée et plus la productivité et le volume d'hydrogène produit étaient élevés, jusqu'à une valeur seuil comprise entre 60 g DCO/L et 95 g DCO/L ; qu'une charge trop élevée (95 g DCO/L) augmentait le temps de latence (de 10 h à 17 h) en plus d'impacter négativement les performances de production d'hydrogène ; enfin, que la charge n'avait pas d'influence sur le rendement en hydrogène en-dessous de 28 g DCO/L, mais qu'au-delà, le rendement était plus faible.

Pour rappel, la fermentation endogène à partir d'une biomasse implique une utilisation de la biomasse à la fois comme substrat mais également en tant que consortium microbien. Ainsi, lorsque que la charge en biomasse est augmentée, c'est à la fois la concentration en substrat qui est plus élevée mais également le consortium microbien qui est plus grand. Un temps de latence plus long engendré par une charge élevée (95 g DCO/L) peut être expliqué par les hypothèses suivantes : (i) une concurrence plus

rude entre les bactéries productrices d'hydrogène et les micro-organismes compétiteurs vis-à-vis du substrat car la taille du consortium est plus grande ; (ii) bien que la microflore endogène soit adaptée au substrat, l'émergence des bactéries productrices d'hydrogène est réalisée grâce aux conditions de mise en œuvre dans le bioréacteur, ce qui signifie qu'un choc osmotique engendré par une concentration élevée en substrat, est une explication valable pour justifier un temps de latence plus long. A 95 g DCO/L, le volume d'hydrogène produit est de 8,9 L/L de milieu réactionnel, ce qui est deux fois plus faible que celui calculé (17,0 L/L) à partir de la corrélation déterminée entre la concentration initiale en sucres et le volume d'hydrogène produit. De même, la productivité en hydrogène est inhibée par la charge initiale en substrat dont la valeur (14,9 mmol/L/h) est largement inférieure à celle calculée (26,8 mmol/L/h) à partir de la deuxième corrélation établie au paragraphe 5.2. de ce chapitre. On note tout de même que le butyrate est le métabolite majoritairement produit comme dans tous les tests de fermentation mais en quantité deux fois plus faible (0,38 mol/mol hexoses contre en moyenne $0,73 \pm 0,04$ mol/mol). D'ailleurs, ceci est justifié par la présence du taxon majoritaire qui est affilié à *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) même phylotype majoritaire que dans les études précédentes, avec une abondance décroissante en fonction de la teneur initiale en sucres (environ 75 % pour les tests '14 g DCO/L' à '60 g DCO/L' et 57,4 % pour le test '95 g DCO/L'). Malgré la présence majoritaire du butyrate, le lactate est co-produit majoritairement (0,35 mol/mol). Ce dernier permet d'expliquer le faible rendement en hydrogène obtenu (0,75 mol/mol), puisque la voie lactate est concurrente de la voie productrice d'hydrogène en consommant les sucres présents (équations 14 et 15).



De façon cohérente, le séquençage a en effet mis en évidence une diversité microbienne plus élevée des taxons dominants dans l'échantillon de test '95 g DCO/L' que les autres tests, avec notamment la diminution de l'abondance relative de l'espèce productrice d'hydrogène en faveur de *Enterococcus villorum* (31,2 %). Cette bactérie lactique semble donc être responsable de l'augmentation de la production de lactate et par conséquent la baisse du rendement en hydrogène. De plus, *Enterococcus villorum* est connu pour sécréter des bactériocines notamment contre *Clostridium* (Fisher & Phillips, 2009), ce qui a inhibé en partie la croissance des bactéries productrices d'hydrogène (temps de latence de 17 h au lieu de 10 h) d'où une diminution de la production d'hydrogène par l'oxydation de la ferrédoxine réduite via la voie butyrate. L'analyse des métabolites produits a également révélée une production de propionate (0,07 mol/mol) associée à une teneur initiale en sucres élevée. Ce métabolite produit selon l'équation 16 permet d'expliquer la baisse du rapport molaire H_2/CO_2 observée par rapport au test '14 g DCO/L' (respectivement 0,66 contre $0,90 \pm 0,08$).



Comme cela a été expliqué dans le chapitre I, le propionate peut être produit soit à partir du succinate par *Propionibacterium* (Suwannakham & Yang, 2005), ou bien par la réduction du L-lactate par *Clostridium propionicum* (Luo *et al.*, 2012), *Megasphaera elsdenii* (Kim & Miura, 2004) et *Prevotella ruminicola*, ou encore par la réduction du L-lactate en 1,2-propanediol par *Lactobacillus buchneri* (Elferink *et al.*, 2001) suivie de sa réduction en propionate ; c'est le cas de *Listeria innocua* et des espèces appartenant au genre *Salmonella* (Xue *et al.*, 2008). Les analyses biomoléculaires réalisées n'ont pas permis d'identifier l'une de ces bactéries. On remarque toutefois que *Lactobacillus johnsonii* a une abondance relative qui a augmenté lorsque la teneur initiale en sucres est de 95 g DCO/L (contre < 0,1 % dans les autres cas). Cette bactérie lactique est-elle capable de réaliser cette conversion comme *Lactobacillus buchneri* en présence des *Enterobacteriaceae* ? L'analyse métabolique a également montré que le bilan de matière calculé était incomplet, ce qui signifie que des métabolites non quantifiables par nos techniques d'analyses ont été produits. Parmi eux, le glycérol qui permet le stockage d'un excès d'énergie produite lorsque la concentration en sucres est élevée. En effet, le glycérol peut être produit par *Saccharomyces* (Pagliardini *et al.*, 2013), *Bacillus* (Skraly *et al.*, 1998) et *Lactobacillus* ; puis peut être converti en 1,3-propanediol (Saxena *et al.*, 2009) par *Clostridium*, *Citrobacter*, *Lactobacillus* et *Enterobacter*. Certaines de ces espèces ont été identifiées lors du séquençage : *Lactobacillus johnsonii*, *Clostridium*, *Enterobacter*.

Par ailleurs, il est à noter que la quantité initiale de tartrate a été entièrement consommée quelle que soit la charge initiale en substrat. Dans le chapitre IV.4., nous avons émis l'hypothèse selon laquelle *Enterococcus villorum* était la bactérie responsable de la dégradation du tartrate. Dans cette partie, les résultats de séquençage permettent de valider partiellement cette hypothèse avec une abondance relative de cette bactérie quoique faible (0,8 % à 5,2 %), mais croissante avec la charge initiale en sucres pour les tests '14 g DCO/L' à '60 g DCO/L' et co-majoritaire pour le test '95 g DCO/L' est de 31,2 %.

Enfin, en ce qui concerne les tests de fermentation '14 g DCO/L' à '60 g DCO/L', on a observé que les métabolites sont de même composition et de quantité relative similaire. Ceci est en adéquation avec les performances de production d'hydrogène et les résultats de séquençage qui sont globalement proches.

Jusqu'à aujourd'hui peu d'études se sont intéressées à tester l'influence de concentration élevée en substrat sur la production d'hydrogène. Lay *et al.* (2010) ont testé une biomasse ayant une concentration de 40 g DCO/L utilisée comme substrat en présence de boues anaérobies prétraitées thermiquement dans un réacteur continu et ont obtenu une productivité maximale élevée de 16,33 mmol/L/h et un rendement de 0,9 mol/mol. Dans notre étude, la concentration de 60 g DCO/L a permis d'obtenir de meilleures performances de production avec un rendement 1,6 fois plus élevé (1,44 mol/mol) et une productivité augmentée de 13 % (18,41 mmol/L/h). Il faut bien évidemment

tenir compte du fait que notre étude a été réalisée dans un bioréacteur semi-batch d'un litre par fermentation endogène d'une biomasse non prétraitée thermiquement, ce qui montre une fois encore, le fort potentiel de production de la biomasse vinicole 'bourbes'.

6. Conclusion

Dans ce chapitre, l'influence des paramètres opératoires tels que la durée de stockage de la biomasse à -20°C, le prétraitement de la biomasse et l'utilisation du gaz de balayage, les pH initial et de régulation et la charge initiale en substrat, sur d'une part, les performances de production d'hydrogène, et d'autre part, sur la structure des populations microbiennes a été étudiée.

La première partie a montré qu'il était possible d'utiliser une biomasse congelée pendant différentes durées (jusqu'à 115 jours) sans modification d'une part de la concentration initiale en substrat (sucres) et d'autre part des performances de production d'hydrogène que ce soit au niveau du volume d'hydrogène produit ($3,2 \pm 0,2$ L/L de milieu réactionnel) ou de la productivité en hydrogène ($5,2 \pm 0,7$ mmol/L/h) ou encore du rendement en hydrogène ($1,80 \pm 0,16$ mol/mol d'hexoses consommés) ou enfin de la proportion d'hydrogène produit par rapport au dioxyde de carbone ($0,90 \pm 0,08$). Le séquençage a mis en évidence l'émergence du genre *Clostridium* lors du fonctionnement du bioréacteur dans les conditions anaérobies, puis une reprise de la diversité microbienne en fin de fermentation de la biomasse 'bourbes'. *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est le genre bactérien majoritaire identifié et associé à la production majoritaire du butyrate et de l'acétate représentant respectivement 45 ± 2 % et 32 ± 8 % de la quantité totale des métabolites produits. Par ailleurs, des similitudes entre les compositions bactériennes des échantillons prélevés à 24 h de chaque test ont été remarquées sans pour autant être identiques au niveau des abondances relatives des phylotypes identifiés, liées à la « sélection naturelle » de certaines bactéries par le stress engendré par la congélation.

La deuxième partie a confirmé que la congélation permettait de limiter la consommation des sucres par les micro-organismes intrinsèques à la biomasse lors de son stockage ; qu'un stockage de la biomasse à 4°C pendant un court terme ne modifie pas les performances de production d'hydrogène ; qu'un prétraitement thermique à chaud permettait d'améliorer de 16 % la production d'hydrogène ($3,7$ L/L de milieu réactionnel), de 20 % le rendement en hydrogène ($2,16$ mol/mol d'hexoses consommés) et d'atteindre des quantités équivalentes d'hydrogène et de dioxyde de carbone produit (rapport molaire de 1,01) ; que l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage était possible afin de recycler le CO₂ produit au cours de la fermentation avec un maintien de la production d'hydrogène ($3,3$ L/L de milieu réactionnel) et de son rendement ($1,96$ mol/mol d'hexoses consommés) sans impact significatif sur la productivité ($4,16$ mmol/L/h). Notons que le butyrate (43 % à 50 % des métabolites produits) et l'acétate (29 % à 47 % des métabolites produits) restent les métabolites majoritaires produits lors de

ces tests. Le séquençage a également, comme dans l'étude précédente, permis d'identifier *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) comme étant le genre bactérien majoritaire lorsque le prétraitement thermique de 70°C a été effectué et co-majoritaire avec *Clostridium intestinale* lorsque la biomasse a été stockée à 4°C. Cette dernière bactérie n'a *a priori* pas d'impact sur la production d'hydrogène.

La troisième partie a montré l'importance des pH initial et de régulation sur la production d'hydrogène : le pH initial a eu un impact sur le temps de latence qui est allongé à pH acide, sur la production d'hydrogène, le rendement et le rapport H₂/CO₂ pour lesquels les valeurs les plus élevées ont été obtenues à un pH initial de 7,0 ; le pH de régulation a quant à lui eu un impact direct sur la productivité en hydrogène (diminution avec l'acidité) sans conséquence sur le volume final d'hydrogène produit mais ce qui a eu pour effet d'allonger le temps de production d'hydrogène. De plus, l'analyse des métabolites a mis en évidence que le pH de régulation avait impacté la production d'acétate, jusqu'alors co-majoritaire avec le butyrate, à faible pH mais sans affecter la production de ce dernier (l'acétate ne représente plus que 1 % des métabolites produits à un pH de 4,5). De plus, la dégradation du tartrate initial présent, qui était jusqu'alors consommé totalement, a diminué et n'est plus que partielle (21 %) à un pH régulé à 4,5. Une fois encore, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est le genre bactérien majoritaire identifié aussi bien dans le test où le pH a été régulé à 4,5 que celui de référence. Le calcul théorique effectué des quantités de NADH consommé et produit à partir des métabolites et des sucres, ainsi que les résultats du séquençage, ont permis de déduire que cette bactérie était responsable de la production d'hydrogène via l'oxydation de la ferrédoxine réduite lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA à son tour converti en butyrate, les pressions partielles élevées en hydrogène (>> 60 Pa) au cours de la fermentation le confirmant.

Enfin, la dernière partie a montré qu'une charge initiale de 60 g DCO/L pouvait être appliquée afin d'obtenir une production d'hydrogène (10,9 L/L de milieu réactionnel) et une productivité (18,41 mmol/L/h soit 443 mL/L/h) les plus élevées en ayant un rendement en hydrogène correct (1,44 mol/mol) et un rapport H₂/CO₂ maintenu (0,81). A 95 g DCO/L, les performances sont impactées plus faibles qu'attendues, en ce qui concerne le volume d'hydrogène produit ou la productivité, calculées à partir des corrélations linéaires obtenues avec la concentration initiale en sucres (respectivement, r² = 0,925 et r² = 0,855). La présence majoritaire du butyrate, corrélable avec la quantité initiale de sucres (r² = 0,992), produit par *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) majoritaire quels que soient les tests confirme que c'est par cette voie que l'hydrogène est produit, l'acétate ne représentant que 14 % des métabolites totaux à partir de 45 g DCO/L. C'est la production de lactate par *Enterococcus villorum* qui est responsable de la baisse de rendement (0,75 mol/mol) et du rapport H₂/CO₂ (0,66). En conclusion, une concentration initiale en substrat trop élevée inhibe partiellement les performances de production d'hydrogène en favorisant les bactéries concurrentes consommatrices

du substrat ; la dilution de la biomasse brute 'bourbes' est donc préférable.

A travers ces études paramétriques, des questions restent en suspens quant : à la bactérie responsable de la dégradation du tartrate, aux métabolites produits à concentration initiale en sucres élevée et non quantifiables par nos techniques d'analyse, aux bactéries responsables des métabolites minoritaires produits et celles responsables de la production d'acétate ; les phénomènes à l'origine de ces questionnements ne peuvent pas être expliqués par la seule influence des paramètres opérationnels car ils peuvent également être liés aux caractéristiques endogènes de la biomasse.

**Chapitre V. INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES
ENDOGENES DES BIOMASSES SUR LES PERFORMAN-
CES DE PRODUCTION D'HYDROGENE ET SUR LES
STRUCTURES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES**

1. Introduction

1.1. Objectifs

Après avoir montré l'existence d'une microflore endogène productrice d'hydrogène dans la biomasse viticole (Chapitre III) et après avoir étudié l'influence des paramètres opératoires sur les performances de production d'hydrogène (Chapitre IV), il est nécessaire d'étudier l'impact des caractéristiques endogènes liées aux différentes biomasses viticoles sur les performances de production d'hydrogène.

En effet, la biomasse en tant que substrat est en premier lieu la source de composés fermentescibles, c'est-à-dire, composés métabolisables par les micro-organismes. En fermentation obscure, il a été montré que les sucres sont les composants majoritairement utilisés par les micro-organismes pour la conversion en hydrogène (Guo *et al.*, 2014). Des études ont montré que la présence de macro et micro-nutriments étaient nécessaires aux métabolismes microbiens (Karadag & Puhakka, 2010 ; Lee *et al.*, 2010 ; Wang & Wan, 2009 ; Zhang & Shen, 2006) pour la production d'hydrogène, et que d'autres inhibaient la production d'hydrogène (Fang *et al.*, 2002a).

Ainsi, il est important de caractériser la matière organique de la biomasse viticole de référence ; puis, de la comparer à d'autres biomasses viticoles de différents cépages ou différents types et d'étudier leur production d'hydrogène, ce qui permettra de relier le potentiel de production d'hydrogène à un ou plusieurs « constituants ».

Les biomasses viticoles étant utilisées à la fois comme substrat et consortium microbien producteur d'hydrogène, il est également intéressant d'étudier l'influence du cépage, du type de biomasse (bourbes, marcs de raisin, gâteau de filtration et lies de vin), du mode de culture des vignes (durable, éco-phytosanitaire ou biologique) non seulement sur la composition biochimique mais aussi microbiologique, se répercutant ainsi sur les performances de production d'hydrogène.

Il a été montré que les co-cultures bactériennes améliorent les performances d'hydrogène tout en diminuant le facteur économique (Elsharnouby *et al.*, 2013). En effet, l'association d'une bactérie aéro-anaérobie facultative (AAF) telles que les bactéries entériques, à une bactérie anaérobie stricte productrice d'hydrogène de genre *Clostridium*, permet de s'affranchir d'un agent réducteur d'oxygène. Les bactéries AAF consomment le dioxygène présent dans le milieu ce qui évite l'inhibition par le dioxygène des bactéries anaérobies strictes. Ainsi, a été étudiée l'influence de la perturbation biotique liée à l'ajout des eaux de rinçage de pressoirs aux biomasses 'bourbes' et 'marcs'.

1.2. Mise en œuvre dans le bioréacteur

Cette étude s'appuie sur le fonctionnement optimisé du bioréacteur semi-batch (Clion *et al.*, 2015). Les paramètres opératoires considérés comme optimaux sont : une température de fermentation de 37°C, une agitation de 220 tours par minute (tr/min), un débit de 50 mL/min d'azote utilisé comme gaz de balayage pour extraire les gaz produits par bullage dans le milieu fermentaire pour un volume réactionnel total de 0,7 L. Les paramètres étudiés dans le chapitre IV et utilisés pour cette étude sont : un pH initial de 7,0, un pH de régulation de 5,7 et une charge initiale de 50 mL pour les biomasses liquides ou 50 g pour les biomasses solides.

Dans les différentes parties composant ce chapitre, les biomasses viticoles proviennent d'Alsace et de Bourgogne, sont issues des vendanges 2012, 2013 et 2014 et sont stockées soit à 4°C, soit à -20°C.

Ce chapitre est composé des trois sous-chapitres suivants : (I) l'étude de l'influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses 'bourbes' ; (II) l'étude de l'influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses 'marcs' ; (III) l'étude de l'influence de l'introduction de perturbations biotiques et de l'influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses 'gâteau' et 'lies'.

Les deux premiers sous-chapitres sont divisés en plusieurs parties relatives aux études sur l'influence du cépage, du mode de culture, de la variabilité annuelle et l'impact des rafles (uniquement pour les marcs). La figure 58 résume les fermentations réalisées dans les deux premiers sous-chapitres.

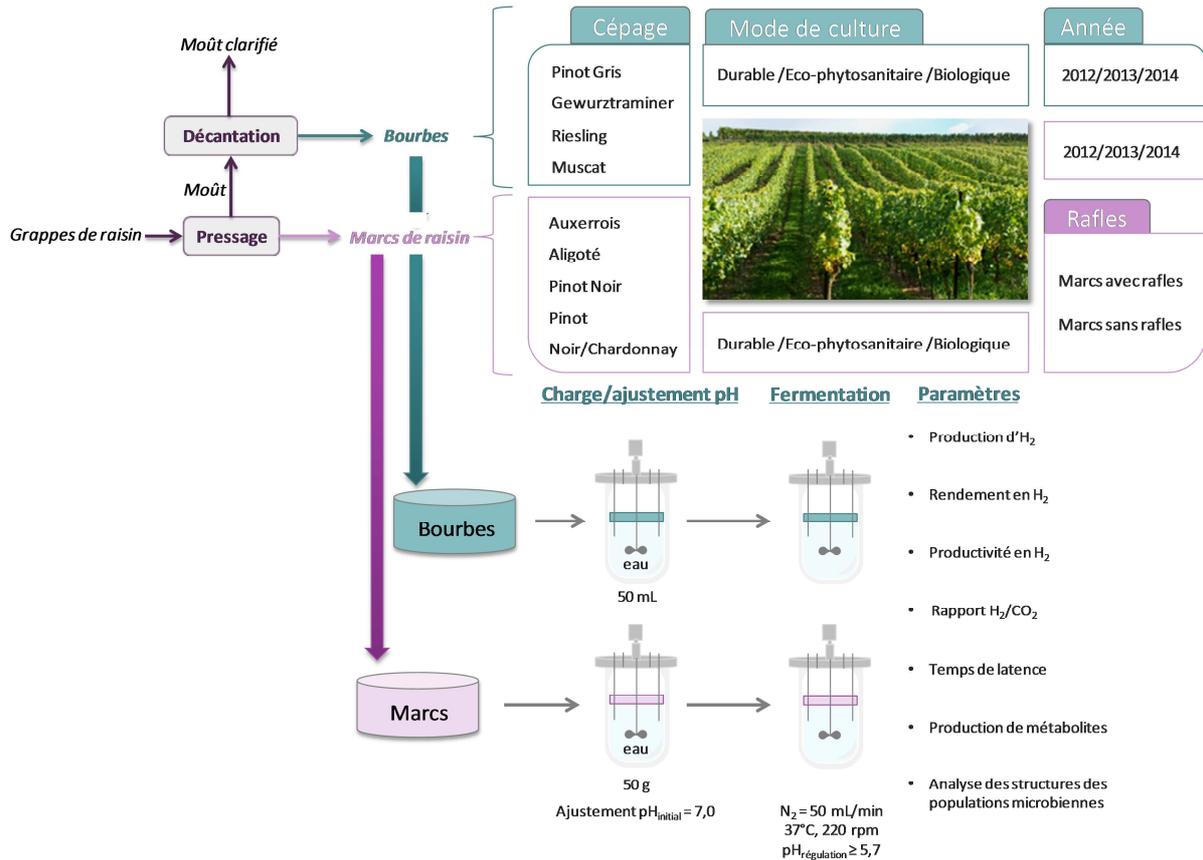


Figure 58 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour tester l'influence des caractéristiques endogènes des 'bourbes' et des 'marcs' sur la production d'hydrogène.

Le troisième sous-chapitre est divisé en deux parties relatives à l'influence de la perturbation biotique liée à l'ajout des eaux de rinçage aux biomasses 'bourbes' et 'marcs' et à l'influence des biomasses 'gâteau de filtration' et 'lies de vin' sur la production d'hydrogène. La figure 59 est une représentation schématique de la production viti-vinicole des différentes biomasses utilisées.

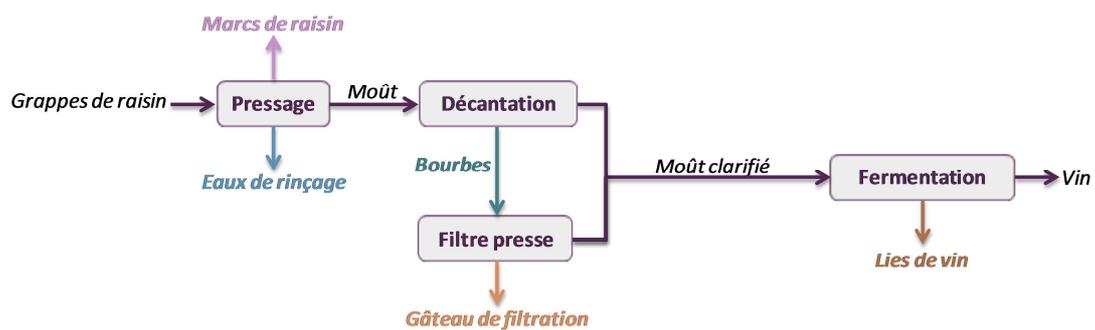


Figure 59 : Représentation schématique de la production viti-vinicole des différentes biomasses utilisées.

2. Influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘bourbes’ sur la production d’hydrogène

2.1. Influence du cépage des bourbes sur la production d’hydrogène

2.1.1 Caractérisation des matières des bourbes

La production d’hydrogène par fermentation obscure est l’un des processus impliqués dans la digestion anaérobie ; la matière organique constituant une partie du substrat potentiellement dégradable. Une caractérisation des matières permet de mieux déterminer le potentiel de production d’hydrogène des bourbes. La figure 60 représente la distribution des matières sèches (MS), matières volatiles (MV), matières minérales (Mi) et des matières en suspension (MES) des différentes bourbes fraîchement récupérées issues des vendanges 2013. La MS inclut à la fois les MES et les sels dissous et représente donc l’ensemble des sels, matières organiques et matières minérales. La MV est assimilée à la matière organique. Les MES représentent la fraction solide organique et minérale. Afin de comparer la composition en MV, Mi et MES des différentes bourbes, ces valeurs ont été normalisées par rapport à la MS.

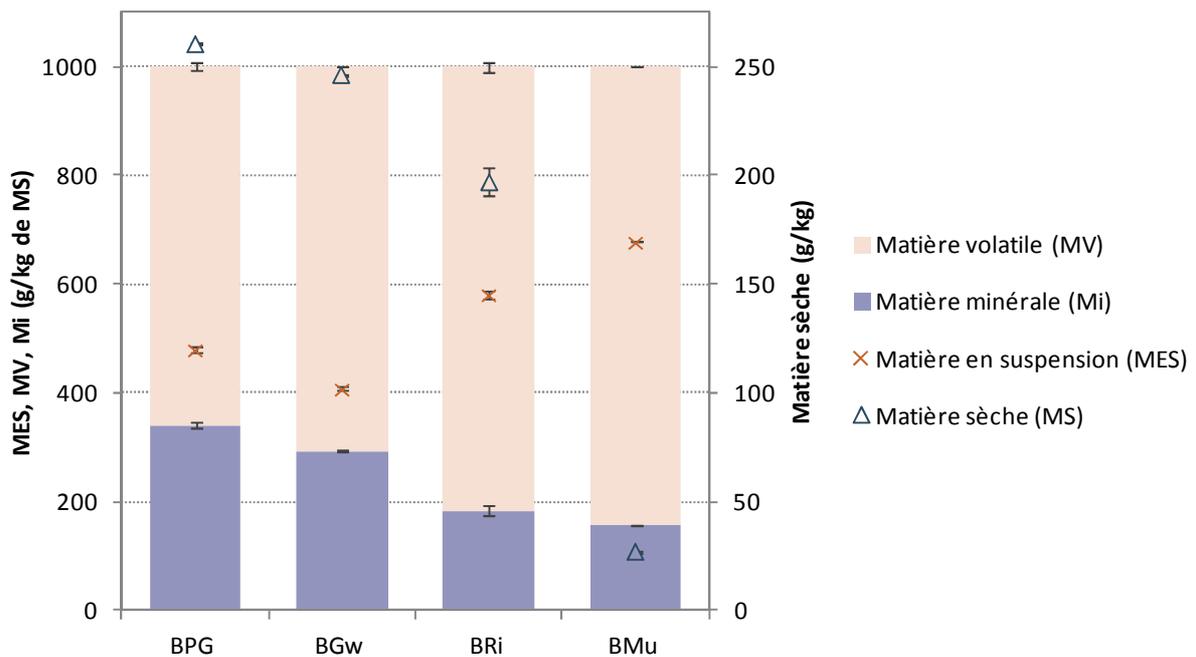


Figure 60 : Caractérisation des matières sèches, volatiles, minérales et en suspension des différentes bourbes Pinot Gris (BPG), Gewurztraminer (BGw), Riesling (BRi) et Muscat (BMu).

Les valeurs de matières sèches (MS) les plus élevées sont obtenues par les bourbes Pinot Gris et Gewurztraminer et sont significativement identiques ($p > 0,02$; t-test) avec une valeur moyenne de 253 ± 10 g/kg d’échantillon. En revanche, la valeur de MS la plus faible est obtenue par les bourbes Muscat avec une valeur de $27,0 \pm 0,2$ g/kg. En ce qui concerne la répartition des matières en suspension (MES), des matières volatiles (MV) et des matières minérales (Mi), les cépages Pinot Gris et Gewurztraminer se distinguent statistiquement ($p > 0,05$; t-test) des cépages Riesling et Muscat. En effet, la MS des deux premiers cépages est constituée en moyenne de 684 ± 34 g de MV/kg de MS et

de 443 ± 51 g de MES/kg de MS, alors que celle des deux derniers cépages est composée de 830 ± 18 g de MV/kg de MS et de 629 ± 68 g de MES/kg de MS.

A partir de la caractérisation physique des bourbes, on s'attend à obtenir des productions en hydrogène beaucoup plus élevées pour les bourbes de cépage Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling que pour les bourbes Muscat, en raison de leurs teneurs plus élevées en matières volatiles et donc en matières organiques.

2.1.2 Caractérisation de la DCO des bourbes

La demande chimique en oxygène (DCO) représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la totalité des substances organiques de la biomasse. La figure 61 représente la répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble ainsi que la composition de la DCO soluble en sucres, en alcools, en acides organiques et en protéines. La DCO de la fraction non soluble des bourbes congelées a été calculée en retranchant la DCO de la fraction soluble à celle de la fraction totale. Les sucres, les alcools, les acides organiques et les protéines de la fraction soluble ont été convertis en DCO grâce aux facteurs de conversion issus de la littérature (Angelidaki *et al.*, 2007 ; Miron *et al.*, 2000).

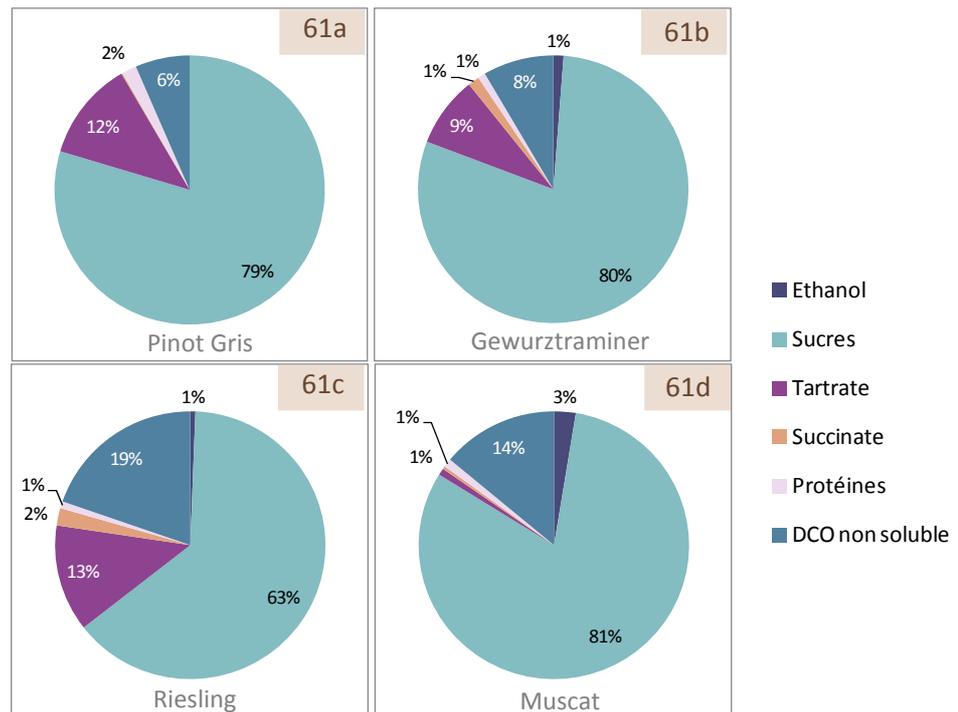


Figure 61 : Répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble des bourbes pour les différents cépages : Pinot Gris (a), Gewurztraminer (b), Riesling (c) et Muscat (d) ; et composition biochimique de la DCO soluble.

Les résultats obtenus indiquent que les cépages Pinot Gris et Gewurztraminer ont un fractionnement de la matière organique similaire. Notons que les cépages Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling ont une DCO totale égale en moyenne à 257 ± 13 g/L, ce qui est significativement différent ($p < 0,05$; t-test) de celle obtenue par le Muscat (209 ± 17 g/L) pour laquelle la valeur est cohérente avec la plus

faible valeur de MV obtenue pour ce cépage. Les valeurs de DCO solubles représentent $94 \pm 6 \%$ à $81 \pm 9 \%$ de la DCO totale pour les cépages Pinot Gris et Riesling. La DCO soluble se compose majoritairement des sucres ($76 \pm 8 \%$ moyenne calculée à partir des différents cépages). Le tartrate est le deuxième composé majoritaire de la fraction soluble après les sucres et représente en moyenne $11 \pm 2 \%$ sur les cépages Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling, seule la valeur obtenue pour le Muscat est faible (1 %). On remarque l'absence de malate et de citrate, deux autres métabolites en plus du tartrate retrouvés majoritairement dans la pulpe de raisin mûrs (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012). Cette absence peut se justifier par les hypothèses suivantes : (i) en fonction des cépages, la constitution en tartrate, citrate et malate n'est pas la même ; (ii) les micro-organismes endogènes ont dégradé rapidement le citrate et le malate via le cycle de Krebs, métabolisme utilisé en aérobiose, ce qui explique la présence de succinate pour les cépages Gewurztraminer et Riesling. La DCO non soluble représente des valeurs comprises entre 6 % et 19 %, respectivement pour les bourbes Pinot Gris et Riesling. Enfin, l'éthanol est le dernier composé organique représentant 1 % à 3 % de la DCO totale, respectivement pour le Gewurztraminer et le Riesling, et le Muscat. Seul le cépage Pinot Gris ne contient pas d'éthanol initialement.

A partir de ce fractionnement de la matière organique, on peut dire que : les cépages Pinot Gris et Gewurztraminer sont similaires ; le Muscat se distingue des autres cépages par une valeur de DCO totale plus faible et par une quasi-absence de tartrate dans la DCO soluble ; les bourbes Riesling se distinguent des autres cépages par une valeur élevée en DCO non soluble. On s'attend alors à obtenir de meilleures productions d'hydrogène à partir des cépages Pinot Gris et Gewurztraminer qu'à partir des cépages Riesling et Muscat, conformément également à la teneur en sucres solubles dans les échantillons initiaux.

2.1.3 Caractérisation de la teneur en protéines des bourbes

Les teneurs en protéines des fractions totales et solubles nous permettent non seulement, de calculer les teneurs en azote organique présent dans les bourbes congelées mais également d'estimer en première approche que les quantités de micro-organismes. La teneur en azote organique de la fraction totale peut être calculée en divisant la teneur en protéines de la fraction totale par le facteur de conversion 6,25 (Miron *et al.*, 2000). La figure 62 représente les teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes de différents cépages. Les incertitudes élevées obtenues sur la fraction totale sont notamment dues à la difficulté de prélèvement de l'échantillon à la pipette.

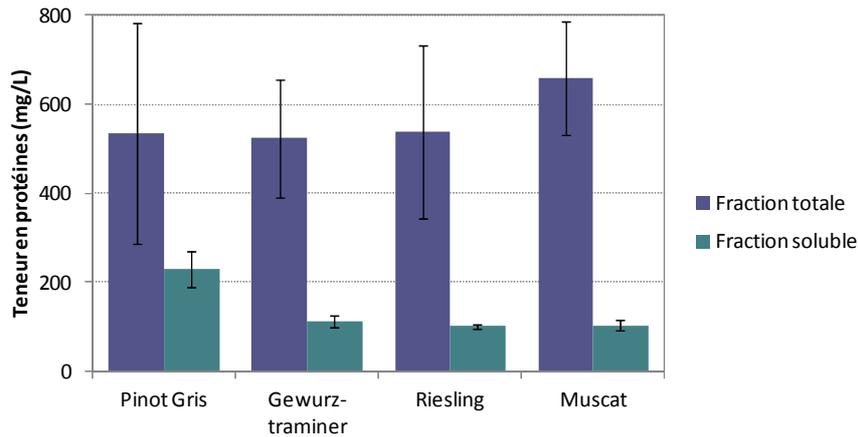


Figure 62 : Teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes pour les différents cépages : Pinot Gris (BPG), Gewurztraminer (BGw), Riesling (BRi) et Muscat (BMu).

La figure 62 montre que les protéines issues de la fraction soluble des bourbes Gewurztraminer, Riesling et Muscat représentent en moyenne $19 \pm 3 \%$ des protéines issues de la fraction totale alors qu'elles représentent plus du double pour le cépage Pinot Gris ($43 \pm 7 \%$). Cela signifie que le Muscat est le cépage qui a la teneur en azote organique la plus élevée 105 g/L contre une moyenne de $85 \pm 1 \text{ g/L}$ pour les autres cépages. La différence entre les teneurs en protéines de la fraction totale avec celles de la fraction soluble permet d'estimer les teneurs en protéines de la fraction particulière représentative notamment des micro-organismes. Ainsi, la teneur en protéines des fractions particulières est la plus élevée pour les bourbes Muscat ($554 \pm 138 \text{ mg/L}$ contre $305 \pm 287 \text{ mg/L}$ pour le Pinot Gris, $411 \pm 146 \text{ mg/L}$ pour le Gewurztraminer et $436 \pm 198 \text{ mg/L}$ pour le Riesling). On peut alors estimer en première approche que les micro-organismes sont les plus nombreux dans les bourbes Muscat et les moins nombreux dans les bourbes Pinot Gris.

A partir de l'analyse des protéines, on s'attend à ce que les bourbes Pinot Gris produisent de l'hydrogène avec un temps de latence plus élevé que les autres cépages. Au contraire, les bourbes Muscat produiront de l'hydrogène soit avec un temps de latence plus court, soit le substrat sera rapidement consommé par les bactéries présentes en grand nombre, et non productrices d'hydrogène.

2.1.4 Caractérisation élémentaires des bourbes

La composition élémentaire réalisée sur les bourbes permet d'une part, de connaître l'influence du cépage sur sa composition et d'autre part, de connaître la composition des biomasses en macro- et micro-nutriments nécessaires aux micro-organismes pour produire de l'hydrogène. La figure 63 représente la répartition élémentaire moyenne calculée à partir des différentes bourbes congelées sur la fraction totale (figure 63a) et soluble (figure 63b), le Muscat ayant été exclu (figures 63c et 63d) en raison de sa répartition différente par rapport aux autres cépages. Quel que soit le cépage, les éléments principaux des fractions totales et solubles sont le soufre (S), le phosphore (P), le calcium (Ca), le magnésium (Mg) et le potassium (K).

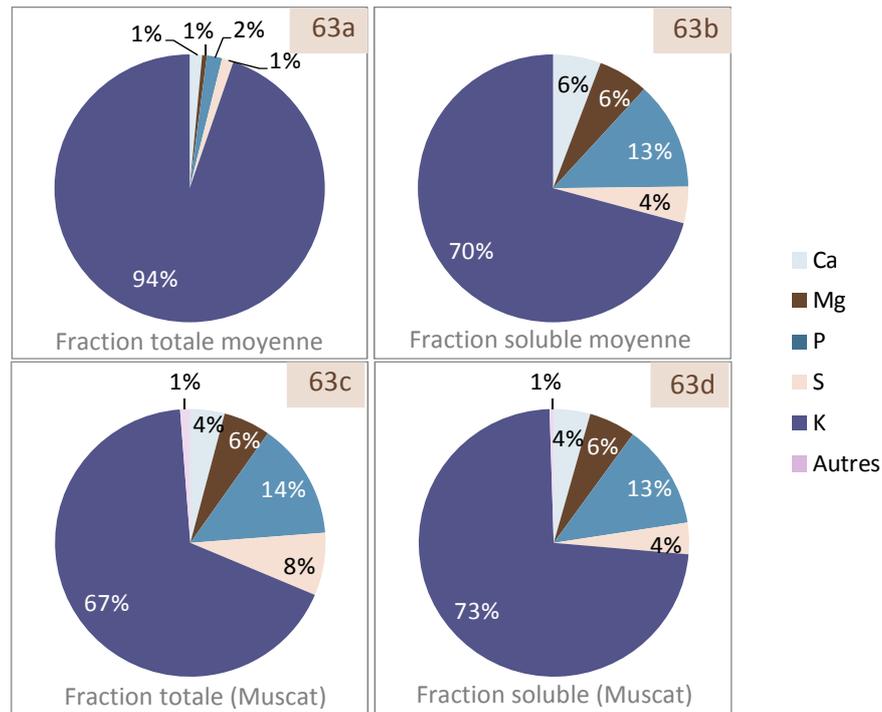


Figure 63 : Répartition élémentaire moyenne de la fraction totale (a) et soluble (b) des bourbes Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling et celles des bourbes Muscat seules (c) et (d).

La fraction totale moyenne des bourbes Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling est composée majoritairement de K (94 ± 1 %) et d'éléments plus minoritaires tels que P, Ca, S et Mg ($2,1 \pm 0,2$ %, $1,7 \pm 0,9$ %, $1,3 \pm 0,1$ % et $0,7 \pm 0,2$ %). Même si la fraction soluble moyenne est composée des mêmes éléments que la fraction totale, leurs répartitions diffèrent légèrement : 70 ± 4 % pour le K, $13,0 \pm 0,6$ % pour le P, 6 ± 2 % pour Ca, 6 ± 1 % pour Mg et $4,4 \pm 0,8$ % pour S. Quant aux bourbes Muscat, la répartition élémentaire des fractions totale ou soluble sont similaires entre elles (hormis pour S) et également très proches de celle de la fraction soluble moyenne obtenue pour les autres cépages.

La répartition élémentaire ne permettant pas de voir de différences entre les cépages Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling, l'analyse des teneurs en macro- et micro-nutriments est nécessaire. La figure 64 représente les concentrations en macro- et micro-nutriments des fractions totales et solubles des bourbes en fonction de leur cépage. Les nutriments contenus dans la fraction soluble sont les plus facilement assimilables par les bactéries. Toutefois, il est rare que les métaux traces soient sous forme dissoute, mais sont plutôt sous forme liée par interactions physico-chimiques avec les composés organiques et inorganiques ou bien par interactions microbiennes. La technique d'analyse ICP-AES, utilisée dans cette étude, ne permet pas cependant de déterminer la biodisponibilité de ces métaux.

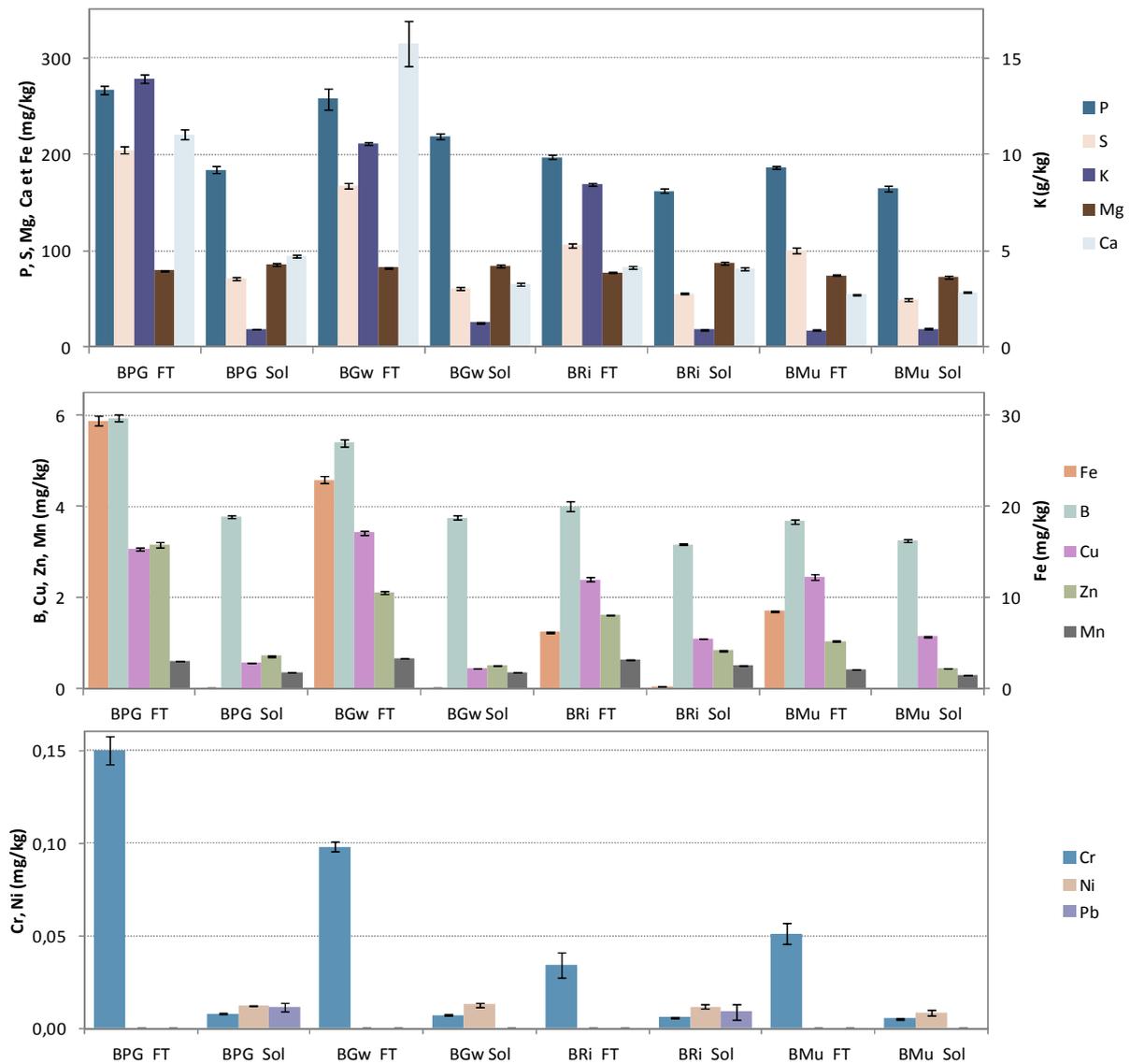


Figure 64 : Teneurs des macro- et micro-nutriments présents dans les fractions totales (FT) et solubles (Sol) des bourbes Pinot Gris (BPG), Gewurztraminer (BGw), Riesling (BRi) et Muscat (BMu).

Alors que les teneurs en macro- et micro- éléments diffèrent selon les fractions totales des bourbes de différents cépages, celles des fractions solubles sont similaires quel que soit le cépage et sont composées en moyenne de : 182 ± 26 mg/kg de P, 60 ± 9 mg/kg de S, $1,0 \pm 0,2$ g/kg de K, 83 ± 7 mg/kg de Mg, de 74 ± 16 mg/kg de Ca, de $0,11 \pm 0,09$ mg/kg de Fe, de $3,5 \pm 0,3$ mg/kg de B, de $0,8 \pm 0,4$ mg/kg de Cu, de $0,6 \pm 0,2$ mg/kg de Zn, de $0,39 \pm 0,09$ mg/kg de Mn, de $0,007 \pm 0,001$ mg/kg de Cr, de $0,012 \pm 0,002$ mg/kg de Ni et de $0,005 \pm 0,006$ mg/kg de Pb. Les métaux lourds tels que le cuivre, le chrome, le zinc, le nickel et le plomb ont été reportés comme éléments toxiques pour la production d'hydrogène à partir de teneurs élevées (Wang *et al.*, 2009). Les teneurs en nutriments dans les fractions solubles sont inférieures à celles des fractions totales pour tous les éléments sauf le magnésium qui a des teneurs similaires, et le nickel et le plomb pour lesquels les teneurs sont plus élevées.

La différenciation des cépages se fait par les teneurs en nutriments des fractions totales. Comme

expliqué précédemment au chapitre I, le phosphore est un élément clé pour la biosynthèse des acides nucléiques et des phospholipides. Les bourbes Pinot Gris et Gewurztraminer sont les cépages les plus riches en P (respectivement, 267 ± 4 mg/kg et 257 ± 11 mg/kg). Le soufre, présent dans certains acides aminés essentiels et dans certaines vitamines est deux fois plus élevé dans les bourbes Pinot Gris à 205 ± 3 mg/kg que dans le Muscat (106 ± 1 mg/kg) ou le Riesling (101 ± 1 mg/kg). Le potassium, nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes, est l'élément dont la teneur est la plus élevée de tous les autres nutriments et est également 16 fois plus élevée dans les bourbes Pinot Gris ($13,9 \pm 0,3$ g/kg) que dans le Muscat ($0,90 \pm 0,01$ g/kg). Le magnésium est requis pour stabiliser les ribosomes, membranes et acides nucléiques et également nécessaire à l'activité d'enzymes, a été quantifié à des valeurs moyennes de 79 ± 3 mg/kg. Quant au calcium, les teneurs obtenues sont 6 fois plus élevées dans les bourbes Gewurztraminer (314 ± 23 mg/kg) que dans les bourbes Muscat ($54,5 \pm 0,4$ mg/kg). Les bourbes Pinot Gris ont une teneur en fer, le principal micro-nutriment, 5 fois plus élevée ($29,4 \pm 0,5$ mg/kg) que celle des bourbes Riesling ($6,3 \pm 0,1$ mg/kg). Le fer est un métal trace très important car il joue un rôle de cofacteur enzymatique notamment celui des hydrogénases, productrices d'hydrogène.

La composition élémentaire montre que les bourbes Pinot Gris sont les plus riches en macro-nutriments K, P et S, et en micro-nutriment Fe ; que les bourbes Gewurztraminer sont les plus riches en macro-nutriments Ca et P ; que les bourbes Riesling sont les plus pauvres en macro-nutriment S et en micro-nutriment Fe ; et enfin, que les bourbes Muscat sont les plus pauvres en tous macro-nutriments (K, S, P, Ca). A partir de la caractérisation élémentaire des bourbes, on émet l'hypothèse selon laquelle les bourbes Pinot Gris pourront avoir une productivité en hydrogène plus élevée non seulement parce qu'elles contiennent les teneurs les plus élevées en macro-nutriments essentiels à la croissance microbienne, mais également, parce que la teneur en fer, micro-nutriment constitutif des hydrogénases, de la fraction totale est la plus élevée.

Grâce à la caractérisation des bourbes des cépages Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling et Muscat, nous avons pu mettre en évidence que les bourbes Pinot Gris et Gewurztraminer étaient les cépages composés de plus de matières organiques (MV et DCO) et dont les DCO totales se composaient à 80 % de sucres. De plus, le Pinot Gris est le plus riche des cépages en macro-nutriments K, P et S, et en micro-nutriment Fe. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse selon laquelle les bourbes Pinot Gris produiront potentiellement le plus d'hydrogène avec une productivité élevée car elles sont les plus chargées en matières fermentescibles et présentent les nutriments nécessaires au développement des bactéries et de leurs enzymes. Toutefois, elles auront le temps de latence le plus élevé car la quantité de protéines de la fraction particulière représentative de la biomasse microbienne est la plus faible de tous les cépages. Les bourbes Muscat contiennent le moins de matière organique et fermentescible et sont les plus pauvres en macro- et micro-nutriments, on s'attend donc à ce qu'elles produisent le moins d'hydrogène, avec une microflore microbienne qui consommera le substrat présent. Enfin, les

bourbes Gewurztraminer et Riesling sont les cépages intermédiaires, pour lesquels on peut toutefois, émettre l'hypothèse que le Gewurztraminer produira plus d'hydrogène que le Riesling car sa composition en substrat et en nutriments est plus riche.

2.1.5 Influence du cépage sur les performances de production d'hydrogène

Le volume d'hydrogène produit au cours du temps a été mesuré individuellement pour chaque biomasse de cépages différents et issue de la région Alsace : Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling et Muscat. Une partie des biomasses a été stockée à 4°C avant fermentation (dont la durée de stockage est notée entre parenthèses) alors qu'une autre partie a été congelée dès réception des échantillons au laboratoire. Les courbes obtenues à partir de ces biomasses présentent toutes une allure typique d'une croissance microbienne et de production de métabolites en mode non continu (figure 65).

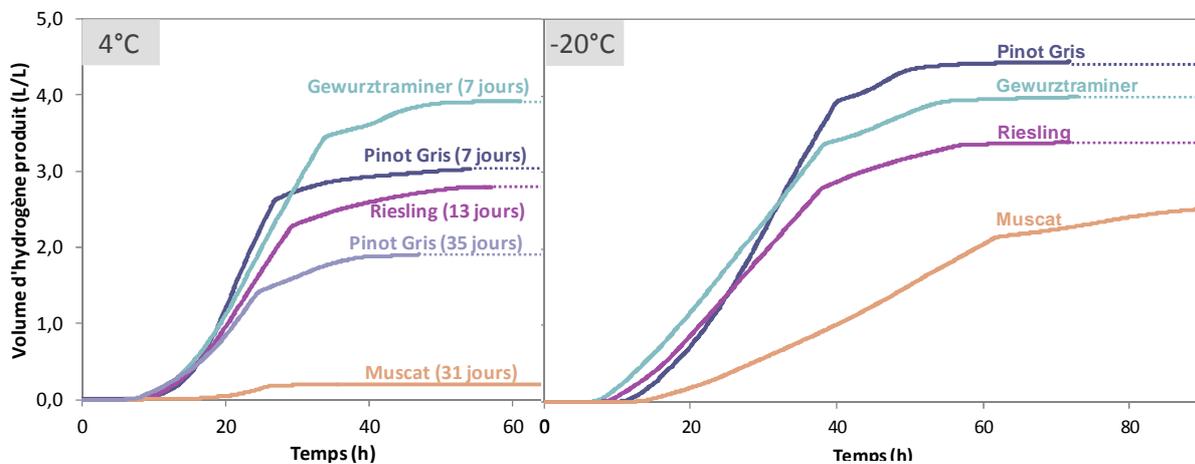


Figure 65 : Volume d'hydrogène produit au cours du temps à partir des bourbes stockées à 4°C et à -20°C pour les différents cépages : Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling et Muscat.

Lorsque les bourbes sont stockées à 4°C, le temps de latence est compris entre 7 et 8 h pour les cépages Gewurztraminer, Pinot Gris et Riesling alors qu'il est de 12 h pour le Muscat. Ainsi, la fraction particulière plus élevée décelée pour les bourbes de Muscat ne donne pas lieu à une réduction du temps de latence et peut répondre de prime abord à l'hypothèse de micro-organismes non producteurs d'hydrogène présents en plus grand nombre. Lorsque les bourbes sont congelées, les valeurs de temps de latence obtenues pour chaque cépage sont similaires à celles des bourbes stockées à 4°C sauf pour le Pinot Gris. En effet, la congélation des bourbes Pinot Gris nécessite un temps d'adaptation plus long (11 h) que lorsqu'elles sont uniquement stockées à 4°C. Est-ce un indicateur que la microflore endogène des bourbes Pinot Gris est plus sensible à la congélation ? La deuxième phase, dite exponentielle, correspond à l'augmentation rapide du volume d'hydrogène produit et dont la productivité en hydrogène est maximale. Enfin, la dernière phase, dite stationnaire, correspond au ralentissement de la production d'hydrogène jusqu'à l'obtention d'un plateau. Ceci signifie que la fermentation est terminée soit en raison de l'épuisement du substrat, soit à cause d'une inhibition due aux produits de fermentation.

Les productivités et les productions d'hydrogène obtenues à partir des biomasses ainsi que les

rendements en hydrogène et concentrations en sucres solubles sont représentés dans la figure 66.

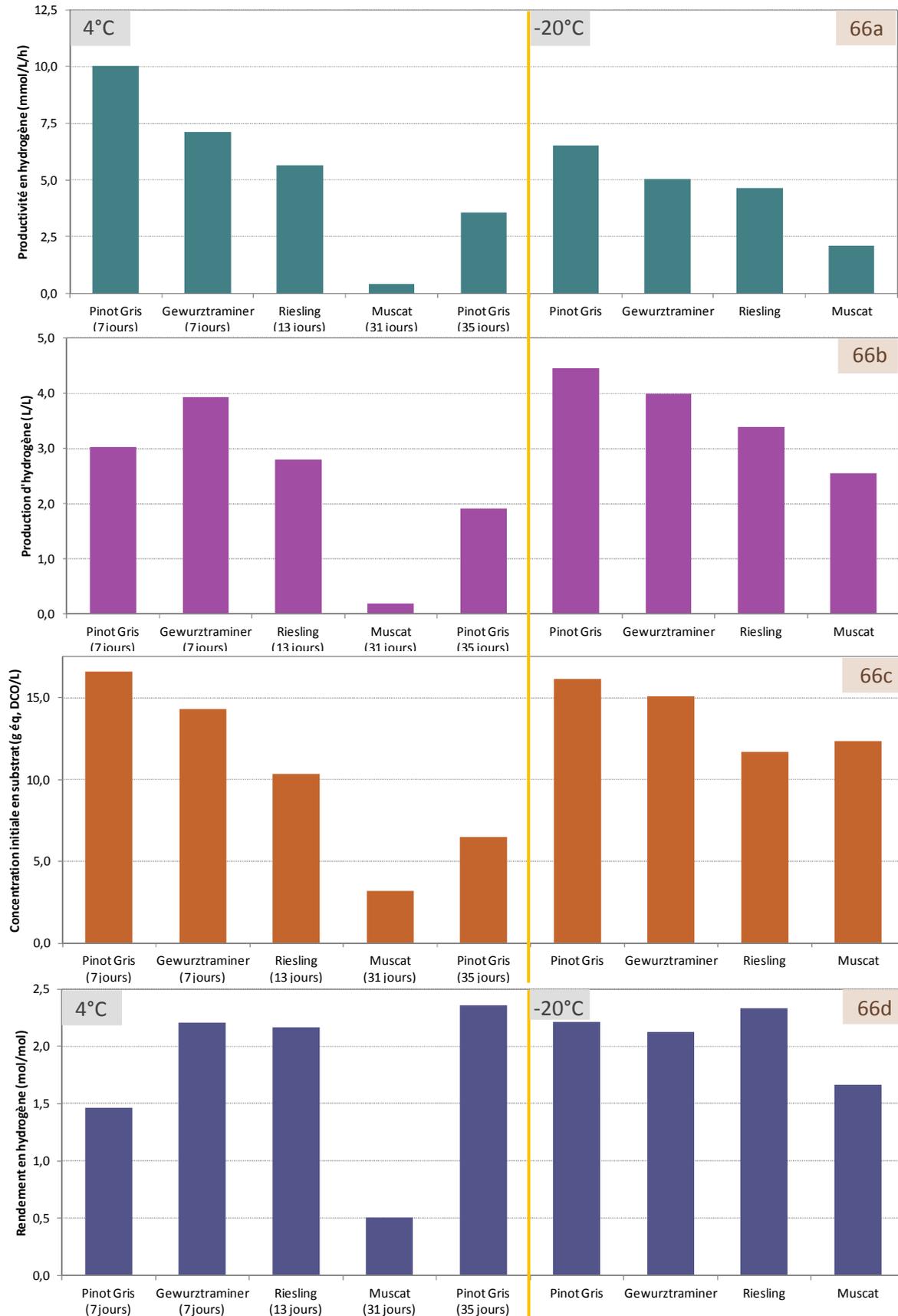


Figure 66 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses 'bourbes' de différents cépages : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration initiale en substrat (c).

Pour rappel, les valeurs des concentrations initiales en substrat (en eq. DCO/L) (figure 66c) correspondent à celles du milieu réactionnel au début du test et non pas à celles des bourbes brutes (cf. V-2.1.2).

Les résultats de la figure 66a indiquent que le Pinot Gris est le cépage qui a obtenu les meilleures productivités en hydrogène, que les bourbes soient stockées à 4°C ou à -20°C : respectivement 10,04 et 6,53 mmol/L de milieu réactionnel/h (mmol/L/h). En revanche, le Muscat est le cépage qui a obtenu les plus faibles productivités, quel que soit le stockage des bourbes: respectivement 0,42 et 2,08 mmol/L/h pour les bourbes stockées à 4°C et à -20°C. On remarque également, que les productivités en hydrogène sont affectées négativement et de manière significative ($p < 0,02$; t-test) par la congélation des bourbes : les vitesses de production d'hydrogène sont 1,2 à 1,5 fois plus faibles lorsque les bourbes sont congelées que lorsqu'elles ne sont que réfrigérées. Les résultats indiquent également qu'une durée de stockage d'un mois à 4°C impacte négativement et de manière significative les productivités en hydrogène ($p < 0,02$; t-test) : 3,56 mmol/L/h contre 10,04 mmol/L/h pour les bourbes Pinot Gris (35 jours) et (7 jours).

Les résultats de la figure 66b indiquent que le Gewurztraminer est le cépage qui a obtenu la plus forte production en hydrogène parmi les bourbes stockées à 4°C (3,9 L/L_{réacteur} soit 55,0 L/L_{bourbes}), alors que c'est le Pinot Gris parmi les bourbes congelées (4,4 L/L_{réacteur} soit 62,3 L/L_{bourbes}). La congélation des biomasses impacte positivement et de manière significative ($p < 0,02$; t-test) la production en hydrogène, à une exception près : le volume de production d'hydrogène des bourbes Gewurztraminer est significativement similaire ($p > 0,02$; t-test) que les bourbes soient congelées ou non (4,0 contre 3,9 L/L). Le Muscat a obtenu les plus faibles volumes de production d'hydrogène : 2,6 L/L et 0,2 L/L pour les biomasses congelées et réfrigérées. Les résultats indiquent également que la durée de stockage à 4°C impacte négativement et de manière significative les productions d'hydrogène ($p < 0,02$; t-test).

Les résultats de la figure 66c permettent d'expliquer, en partie, la différence de production et de productivité en hydrogène obtenues pour les différents cépages. En effet, plus la biomasse a une concentration initiale en substrat (sucres composés de 50 % de glucose et de 50 % de fructose) élevée et plus la vitesse et le volume d'hydrogène produit sont élevés, et inversement, hormis le cépage Muscat. Cela confirme les corrélations directes établies au chapitre IV, entre la vitesse de production et la teneur initiale en sucres, ainsi que la production d'hydrogène et la teneur initiale en sucres.

Une durée de stockage prolongée de la biomasse à 4°C ne permet pas de stopper complètement les métabolismes microbiens, ce qui implique une consommation du substrat (sucres composés de 19 % de glucose et de 81 % de fructose pour les bourbes Muscat 31 jours et, de 32 % de glucose et de 68 % de fructose pour les bourbes Pinot Gris 35 jours) et un développement microbien « parasite » concurrent à la production d'hydrogène. Ceci permet d'expliquer les faibles volumes et vitesses

d'hydrogène produit par les bourbes Pinot Gris (35 jours) et partiellement par les bourbes Muscat (31 jours). En effet, la concentration initiale en sucres des bourbes Pinot Gris (35 jours) est deux fois plus élevée que celle des bourbes Muscat (31 jours), or la productivité et le volume d'hydrogène produit obtenus par les bourbes Pinot Gris (35 jours) sont respectivement, 8,6 et 9,6 fois plus élevés que ceux obtenus par les bourbes Muscat (31 jours). Un autre paramètre (non encore identifié) est donc impliqué dans les contre-performances de production d'hydrogène des bourbes Muscat (31 jours).

Les résultats de la figure 66d indiquent des rendements en hydrogène significativement comparables ($p > 0,02$; t-test) pour les bourbes réfrigérées Gewurztraminer (7 jours), Riesling (13 jours) et Pinot Gris (35 jours), et les bourbes congelées Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling (en moyenne $2,23 \pm 0,09$ mol/mol). Ceci est notable et montre que pour ces échantillons le type de cépage et le mode de stockage de la biomasse sont sans effet significatif sur le rendement en hydrogène. Les trois biomasses : Pinot Gris (7 jours), Muscat (31 jours) et Muscat, se distinguent en revanche, significativement des autres avec des valeurs plus faibles de rendement (respectivement, 1,46 ; 0,50 ; 1,66). Ceci signifie donc que le substrat présent dans la biomasse a été consommé par des bactéries non productrices d'hydrogène et concurrentes pour le substrat aux bactéries productrices d'hydrogène.

2.1.6 Influence du cépage sur le métabolisme

La distribution des métabolites produits en fin de fermentation de chaque biomasse ainsi que les quantités de gaz produits et de sucres initiaux sont représentées sur la figure 67.

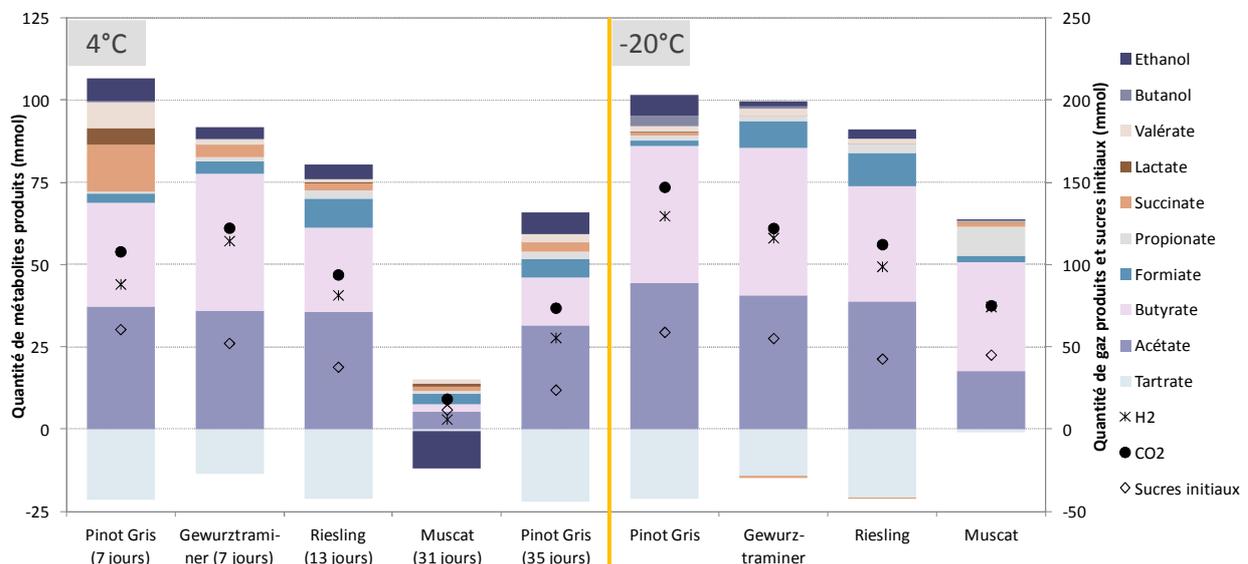


Figure 67 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des biomasses de différents cépages.

L'acétate et le butyrate sont les deux métabolites majoritairement produits par toutes les biomasses, à l'exception des bourbes Muscat (31 jours) pour lesquelles le rendement observé en hydrogène est le plus faible. C'est d'ailleurs les seules bourbes pour lesquelles le bilan DCO calculé (annexe 4) est incomplet (65 %). Ceci signifie que tous les métabolites ne sont pas mesurés par nos techniques d'analyses au laboratoire et/ou que la biomasse microbienne, non prise en compte dans le bilan de

matière, représente une part beaucoup plus importante que celle des autres cépages. Les quantités d'acétate et de butyrate produites sont significativement ($p < 0,02$; t-test) plus élevées lorsque les biomasses sont congelées que lorsqu'elles sont réfrigérées. Par ailleurs, toutes les bourbes contiennent initialement du tartrate qui est consommé totalement au cours de la fermentation, à l'exception du cépage Muscat (en moyenne $19,2 \pm 3,7$ mmol contre $0,9 \pm 0,3$ mmol pour le Muscat).

Ce qui distingue les cépages les uns des autres, sont les métabolites secondaires produits. Le Pinot Gris (7 jours) produit principalement du **succinate** (14,1 mmol), mais également de l'**éthanol** (7,0 mmol) et du **valérate** (7,7 mmol). Les métabolismes secondaires caractérisant le Gewurztraminer (7 jours) et le Riesling (13 jours) sont le **formiate** (3,6 mmol et 8,8 mmol), l'**éthanol** (3,6 mmol et 4,5 mmol) et le **succinate** (3,8 et 2,3 mmol). Stockées pendant 31 jours à 4°C, les bourbes Muscat ont entamé leur maturation ou pré-fermentation, ce qui a eu pour conséquence de diminuer largement la teneur en sucres (11,7 mmol) et de pré-produire de l'éthanol (35,7 mmol initialement) dont une partie a été consommée au cours de la fermentation (11,4 mmol). Une longue durée de stockage influe négativement sur la quantité de butyrate produit (31,6 contre 14,5 mmol, respectivement pour le Pinot Gris stocké 7 jours contre 35 jours) en raison de sa plus faible quantité initiale en sucres (23,7 contre 60,5 mmol) mais redirige les métabolites secondaires (succinate, valérate et lactate) vers les voies formiate et propionate.

On note également, une distribution différente des métabolites secondaires produits à partir des biomasses congelées. Les métabolites secondaires principalement produits sont : l'éthanol (6,2 mmol) pour les bourbes Pinot Gris, le formiate (8,1 mmol et 10,3 mmol) pour le Gewurztraminer et le Riesling, et le propionate (9,0 mmol) pour le Muscat. La production de succinate et de lactate a diminué de manière significative avec la congélation de la biomasse. La voie acétate est sous-exprimée lorsque la biomasse Muscat est utilisée (17,8 mmol contre 38,8 et 44,4 mmol pour le Riesling et le Pinot Gris).

2.1.7 Structure des communautés microbiennes par T-RFLP

La structure des communautés microbiennes par T-RFLP obtenue à partir des bourbes 'Pinot gris (7 jours)', 'Gewurztraminer (7 jours)', 'Riesling (13 jours)' et 'Muscat (31 jours)' est représentée sur la figure 11. Les analyses ont été réalisées sur des échantillons obtenus en cours de fermentation et qui correspondent aux maxima ou sont proches des maxima de production d'hydrogène. Il est important de noter que les incertitudes liées au temps de migration qui correspond ici à la taille des fragments de restriction, sont de 2 pb jusqu'à une taille de 200 pb ; 3 pb jusqu'à 300 pb ; 5 jusqu'à 600 pb et 7 jusqu'à 800 pb.

Globalement, sur les quatre structures des communautés microbiennes présentées dans la figure 68, trois structures sur quatre sont proches : ce sont celles des bourbes Pinot Gris (7 jours), Gewurztraminer (7 jours) et Riesling (13 jours). Les électrophorogrammes de ces trois cépages

montrent des pics communs correspondant à des populations bactériennes. On remarque particulièrement la similitude des structures et l'abondance des communautés microbiennes obtenues lors des fermentations des bourbes Gewurztraminer et Riesling, mais également de leurs profils de production d'hydrogène. Le couple de fragments de restriction 67/702 pb respectivement avec les enzymes aluI et hhaI correspond à la population majoritaire ayant une abondance relative de 51/48 % pour le cépage Gewurztraminer contre 61/59 % pour le cépage Riesling. Cette population majoritaire a été identifiée lors du chapitre III comme étant *Clostridium butyricum*. En ce qui concerne le Pinot Gris, plusieurs populations microbiennes sont co-dominantes lors de la fermentation et correspondent aux fragments : 67 pb (32 %) et 74 pb (33%) avec aluI, et, 373 pb (31 %), 231 pb (21 %) et 703 pb (21 %) avec hhaI. Il est toutefois impossible, avec comme seule analyse la T-RFLP, de déterminer les couples de fragments de restriction et les espèces bactériennes associées.

Enfin, les bourbes Muscat montrent un profil de production d'hydrogène et une structure des communautés bactériennes différents des autres cépages avec une population microbienne majoritaire représentée par le couple 236/229 pb avec les abondances relatives respectives de 56 % et 67 %. La structure des communautés microbiennes est plus simple car moins de pics sont présents que pour les autres cépages. Le chapitre III avait seulement permis d'identifier le phylum *Firmicutes* comprenant des bactéries appartenant au(x) genre(s) *Anaerobacter*, *Anaeroplasma*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* ou *Pasteuria* comme représentatif de ce couple. Par ailleurs, on remarque l'absence du pic représentatif de l'espèce *Clostridium butyricum* (67/702 pb).

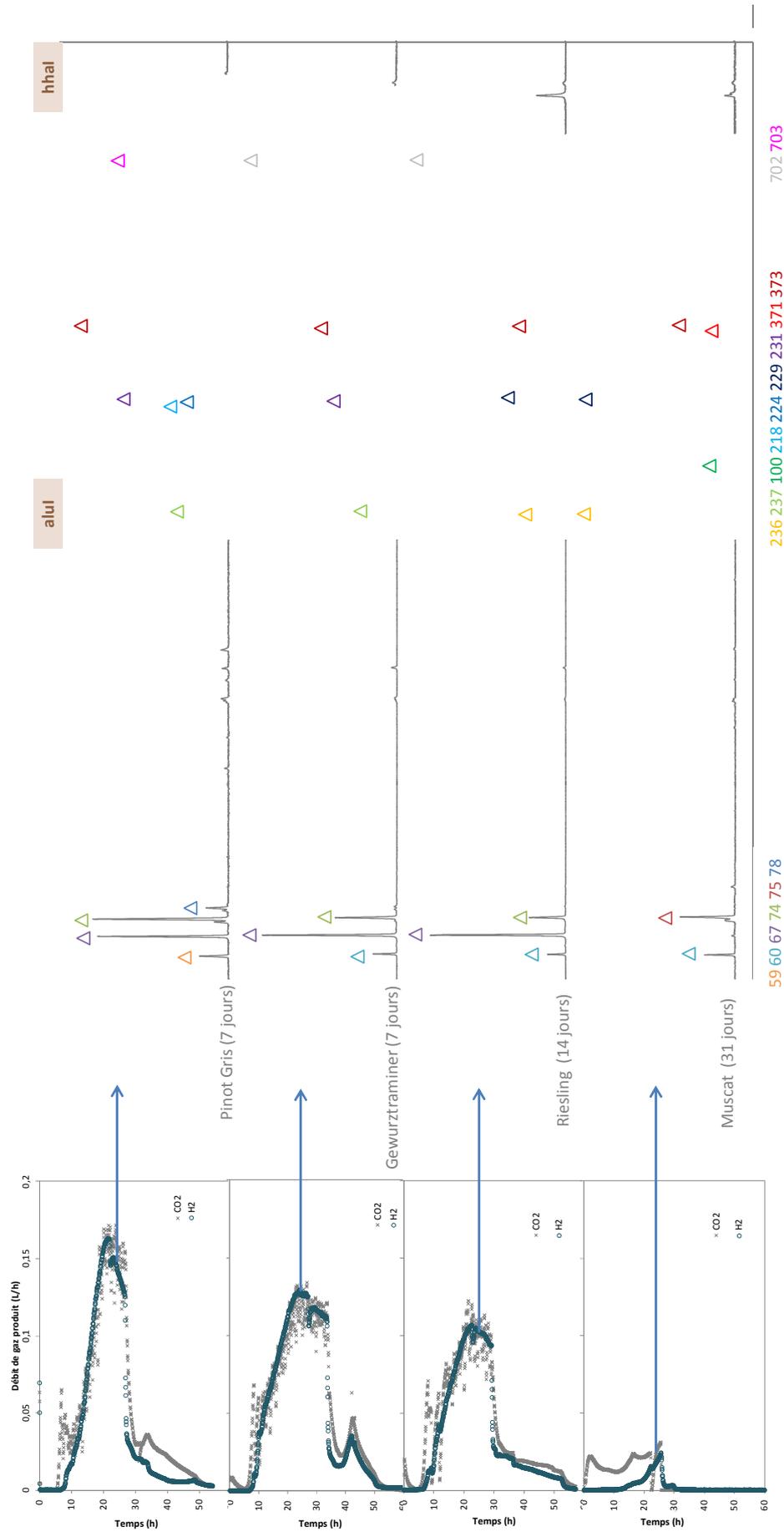


Figure 68 : Profil de production d'hydrogène et structure des populations microbiennes obtenues avec deux enzymes de restriction *alul* et *hhaI*.

2.1.8 Influence du cépage sur les structures des communautés microbiennes par séquençage

Des analyses moléculaires de séquençage ont été réalisées sur les biomasses réfrigérées et congelées de cépages Pinot Gris et Muscat présentées dans ce chapitre. Ces analyses complètent les analyses T-RFLP réalisées sur les biomasses réfrigérées. La figure 69 représente les indices de diversité obtenus pour ces biomasses.

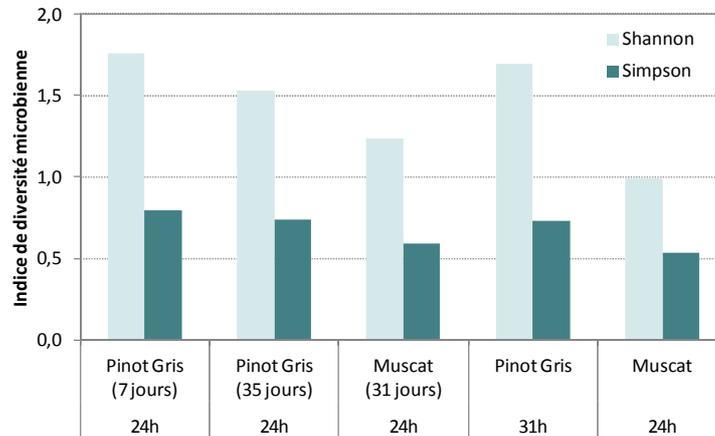


Figure 69 : Indices de diversité microbienne de Shannon et Simpson obtenus en fonction des cépages et du stockage des biomasses.

Le cépage Pinot Gris montre une diversité microbienne plus élevée que le cépage Muscat et ce, quelle que soit la température de stockage de la biomasse, ce qui avait déjà été remarqué avec les électrophorogrammes du paragraphe précédent. De plus, la diversité microbienne est impactée négativement lorsque la biomasse Muscat est congelée, ce qui n'est pas le cas avec le Pinot Gris. L'hypothèse selon laquelle la biomasse 'bourbes Muscat' serait constituée de bactéries sensibles à la congélation permettrait d'expliquer cette diminution.

La classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir du séquençage des échantillons est représentée sur la figure 70.

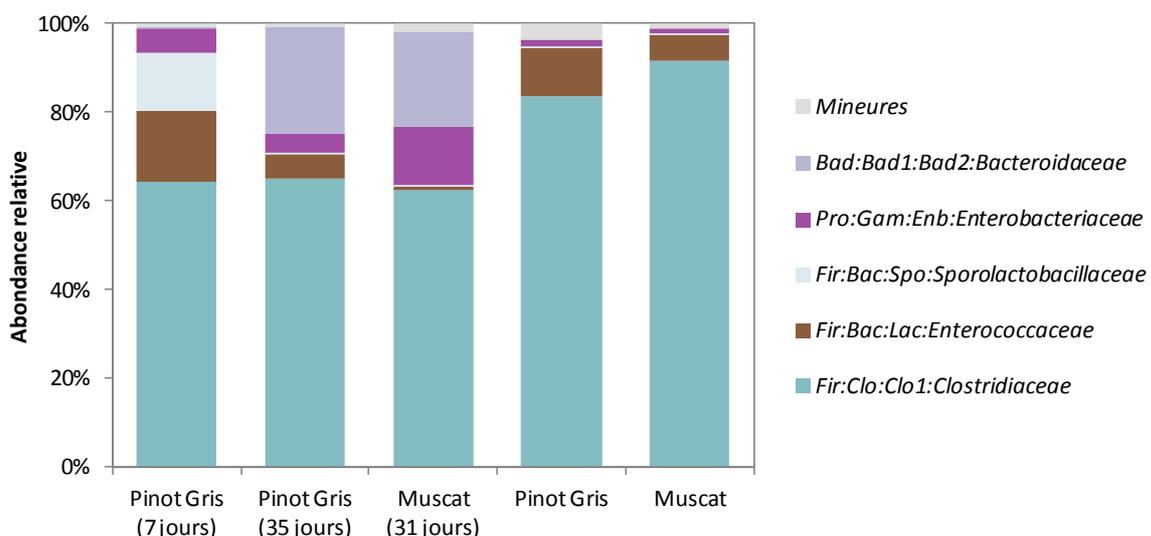


Figure 70 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation excepté pour les 'bourbes Pinot Gris' congelées dont l'échantillon a été prélevé à 31 h. Bad = Bacteroidetes ; Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Bad1 = Bacteroidia ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Bad2 = Bacteroidiales ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

Les résultats montrent que *Clostridiaceae* est la famille majoritaire représentée dans toutes les biomasses avec des abondances relatives de 64 ± 1 % pour les biomasses réfrigérées et 88 ± 6 % pour les biomasses congelées. La classification taxonomique au niveau de la famille montre l'influence de la durée de stockage sur la microflore endogène (Pinot Gris) : plus la durée de stockage à 4°C est longue et plus la famille *Bacteroidaceae* est favorisée au détriment des familles *Sporolactobacillaceae* et *Enterococcaceae*, ce qui explique la diminution de l'indice de diversité. La figure 13 montre également l'influence de la température de stockage sur la microflore endogène (Pinot Gris) : la congélation favorise les familles *Clostridiaceae* et *Enterococcaceae* au détriment des familles *Bacteroidaceae* et *Enterobacteriaceae* qui sont certainement plus sensibles. Enfin, le cépage des bourbes congelées n'impacte que très peu la classification taxonomique au niveau des familles.

L'affiliation des séquences représentatives des OTUs majoritaires à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 10.

Tableau 10 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes de différents cépages.

	Similarité	BPG (7 jours)	BPG (35 jours)	BMu (31 jours)	BPG	BMu
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7%	1,5%	37,2%	58,5%	16,8%	60,6%
<i>Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)</i>	99,5%	33,7%	24,9%	1,8%	44,8%	30,6%
<i>Clostridium spp. (sartagoforme, tertium)</i>	100,0%	<0,1%	-	-	1,5%	-
<i>Clostridium sp.</i>	98,7%	19,9%	2,2%	0,0%	15,6%	0,1%
<i>Clostridium pasteurianum</i>	100,0%	9,2%	0,7%	2,1%	4,8%	0,5%
<i>Bacteroides graminisolvens</i>	99,5%	<0,1%	24,2%	21,4%	<0,1%	-
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	15,8%	5,6%	0,6%	11,0%	5,8%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	13,2%	0,1%	0,4%	0,1%	0,2%
<i>Klebsiella/Enterobacter/Proteus</i>	99,7%	5,6%	4,4%	13,2%	1,6%	1,3%

Le séquençage révèle qu'une durée prolongée de stockage de la biomasse à 4°C ou bien qu'une congélation induit des changements au niveau de la structure des populations microbiennes. La prolongation du stockage de la biomasse à 4°C favorise *Clostridium intestinale* et *Bacteroides graminisolvens* au détriment des bactéries lactiques (*Enterococcus villorum* et *Sporolactobacillus laevolacticus*) et de *Clostridium pasteurianum*. La congélation de la biomasse favorise *Clostridium intestinale* et *Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)* au détriment de *Sporolactobacillus laevolacticus*. De légères diminutions des abondances relatives des espèces *Enterococcus villorum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium sp.* et de la famille *Enterobacteriaceae* sont également notées.

Alors que la classification taxonomique n'avait montré qu'une légère différence au niveau de la famille des *Enterobacteriaceae* entre les bourbes réfrigérées Pinot Gris (35 jours) et Muscat (31 jours), l'affiliation des séquences à l'espèce la plus proche permet de mieux les distinguer. En effet, le Pinot Gris (35 jours) est constitué de deux espèces co-dominantes *Clostridium spp. (roseum, diolis,*

beijerinckii, *butyricum*) (24,9 %) et *Clostridium intestinale* (37,2 %) appartenant à la famille des *Clostridiaceae* alors que le Muscat (31 jours) n'en est constitué que d'une seule, *Clostridium intestinale* (58,5 %). La comparaison de l'électrophorégramme (paragraphe précédent) obtenu à partir des bourbes Muscat (31 jours) est remarquable : les abondances des fragments de restrictions obtenus avec *aluI* (56/23/13 % pour 236/75/60 pb) correspondent à celles des espèces obtenues par séquençage *Clostridium intestinale* (58,5 %), *Bacteroides graminisolvens* (21,4 %) et *Enterobacteriaceae* (13,2 %). Une analyse de digestion de l'ADN (obtenu à partir des séquences FASTA des OTU correspondants à ces espèces) *in silico* par des enzymes de restriction réalisée à partir du logiciel en ligne <http://insilico.ehu.eus> (2015) a permis de confirmer uniquement les longueurs des fragments de restrictions de l'espèce *Clostridium intestinale* à 237/231 pb avec les enzymes *aluI/hhaI*.

La durée de stockage de la biomasse (Pinot Gris) influence non seulement les familles minoritaires (*Sporolactobacillaceae*, *Enterococcaceae* et *Bacteroidaceae*) mais également les espèces appartenant à la famille majoritaire *Clostridiaceae*. En effet, plus la durée de stockage à 4°C est longue, et plus *Clostridium intestinale* est favorisée (37,2 % à 35 jours contre 1,5 % à 7 jours) au détriment de *Clostridium sp.* (2,2 % à 35 jours contre 19,9 % à 7 jours). En revanche, la durée de stockage n'a pas d'influence sur l'espèce *Clostridium spp.* (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) (24,9 % à 35 jours contre 33,7 % à 7 jours).

De la même manière que pour les biomasses stockées à 4°C, les bourbes congelées Pinot Gris et Muscat se distinguent au niveau des espèces appartenant à la famille des *Clostridiaceae*. Le cépage Pinot Gris est constitué majoritairement de *Clostridium spp.* (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) avec une abondance relative de 44,8 % et de deux autres populations bactériennes plus minoritaires : *Clostridium intestinale* (16,8 %) et *Clostridium sp.* (15,6 %). Quant au cépage Muscat, *Clostridium intestinale* (60,6 %) est l'espèce dominante et *Clostridium spp.* (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) (30,6 %) est l'espèce sous dominante.

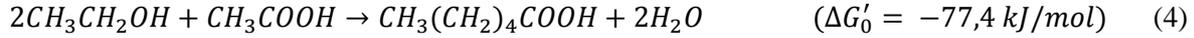
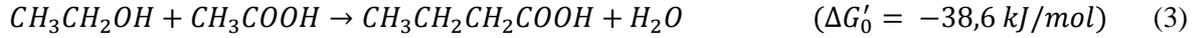
La congélation de la biomasse (Pinot Gris) favorise les espèces *Clostridium intestinale* (16,8 % contre 1,5 % à 4°C) et *Clostridium spp.* (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) (44,8 % contre 33,7 % à 4°C) en défaveur des espèces bactériennes *Sporolactobacillus laevolacticus* (0,1 % contre 13,2 % à 4°C).

2.1.9 Discussion

❖ Le cépage Muscat, potentiel de production d'hydrogène le plus faible

Entre tous les cépages testés, le cépage Muscat s'est distingué des autres cépages, non seulement par sa caractérisation physico-biochimique, que par ses performances de production d'hydrogène. En effet, dès la caractérisation, le cépage Muscat a accumulé les superlatifs d'infériorité en ce qui concerne : les matières sèches et volatiles ($27,0 \pm 0,2$ g/kg et 843 ± 1 g/kg de MS), la DCO totale (209 g/L), la teneur en potassium (10 fois plus faible que celle des autres cépages) ; mais un superlatif de supériorité en ce qui concerne l'estimation de la quantité de micro-organismes présents dans la biomasse à partir des teneurs en protéines. Puis, lors de la fermentation, les biomasses bourbes Muscat, aussi bien réfrigérées que congelées, ont continué de se distinguer des autres cépages par des performances de production d'hydrogène inférieures et un temps de latence supérieur. Il est clair qu'une microflore microbienne endogène non productrice d'hydrogène importante s'est développée au cours des 31 jours de stockage des bourbes Muscat à 4°C, et qui a consommé une grande partie du substrat initial. Le bilan de matière incomplet (65 %) et les teneurs initiales en sucres (3,2 g éq. DCO/L) et en tartrate (1,6 mmol/L) en apportent des éléments de preuves. Ceci a eu pour conséquence des performances de production d'hydrogène les plus extrêmes avec une productivité de 0,42 mmol/L/h et un volume d'hydrogène produit de 0,2 L/L, mais également une concurrence rude vis-à-vis du substrat restant, d'où un rendement en hydrogène faible de 0,50 mol/mol. La comparaison avec les bourbes Pinot Gris (35 jours) indique qu'un autre « paramètre » est impliqué dans le faible potentiel de production d'hydrogène du cépage Muscat puisque les performances de production d'hydrogène obtenues par le cépage Pinot Gris sont jusqu'à 9,6 fois plus élevées que le Muscat alors que la concentration initiale en substrat n'est que le double. Par ailleurs, les bourbes congelées Muscat, dont la teneur initiale en substrat était similaire aux autres bourbes congelées, ont également montrées des performances de production d'hydrogène les plus faibles parmi les autres cépages : une productivité de 2,08 mmol/L/h, un volume d'hydrogène produit de 2,6 L/L et un rendement de 1,66 mol/mol qui indique l'utilisation de voies concurrentes pour la consommation du substrat. L'analyse des métabolites produits et le séquençage permettent de discriminer les différences obtenues entre ces deux biomasses. Tout d'abord, le Muscat contient initialement de l'éthanol (bourbes réfrigérées uniquement) à défaut de tartrate (bourbes congelées et réfrigérées), dont une partie est consommée en cours de fermentation. L'oxydation de l'éthanol est un phénomène majoritairement connu dans la digestion anaérobie qui est réalisée grâce au syntrophisme de deux espèces bactériennes (Schink *et al.*, 2006). C'est le cas par exemple de *Pelobacter acetylenicus* qui oxyde l'éthanol en acétate et hydrogène (équation 1) et de *Methanobacillus omelianskii* qui utilise l'hydrogène et le CO₂ pour produire du méthane (équation 2) (Schink *et al.*, 2006). Barker *et al.* (1945) ont mis en évidence que *Clostridium kluyveri* était capable de convertir l'éthanol en butyrate (équation 3) ou en caproate (équation 4). Une autre possibilité, est la conversion de l'éthanol en acétaldéhyde grâce à l'éthanol

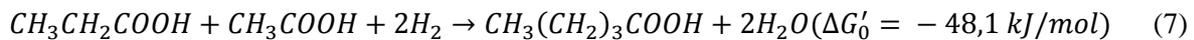
déshydrogénase puis, en acétate grâce à l'aldéhyde déshydrogénase par quelques espèces bactériennes *Lactobacillus* (Nosova *et al.*, 2000).



Toutes ces hypothèses ont été infirmées soit en raison de la non détection de méthane, soit parce que l'analyse de séquençage n'a pas identifiée les espèces citées ci-dessus. Toutefois, il n'est pas impossible que les bactéries identifiées par séquençage aient acquis la capacité à fermenter l'éthanol par adaptation ou grâce à un transfert d'informations génétiques (Baptiste, 2013).

Le séquençage a identifié *Clostridium intestinale* comme étant l'espèce principale retrouvée dans les bourbes de cépage Muscat, aussi bien dans les bourbes réfrigérées (58,5 %) que dans les bourbes congelées (60,6 %). Au niveau du métabolisme, les faibles productions d'acétate (5,3 mmol pour les bourbes réfrigérées et 17,8 mmol pour les bourbes congelées) sont à relier à la quasi-absence de tartrate initial (respectivement 0,6 mmol et 1,1 mmol) alors que la faible production de butyrate (2,2 mmol pour les bourbes réfrigérées) est à relier à la faible teneur initiale en sucres (3,2 g éq. DCO/L).

Les voies hydrogénotrophes observées dans les tests de fermentation des bourbes réfrigérées et congelées Muscat sont les voies succinate (équation 5) et propionate (équation 6). Quant au valérate, sa formation n'est pas clairement établie (Jeon *et al.*, 2010) ; certains auteurs (Thauer *et al.*, 1977) estiment qu'il est produit à partir du propionate et de l'acétate (équation 7).



Il est assez étonnant d'obtenir une quantité élevée de propionate produit par les bourbes congelées sans que le rapport H₂/CO₂ obtenu ne soit affecté (0,99) ; en effet, puisque l'équation de production du propionate (équation 5) consomme deux moles d'hydrogène ce qui tend à diminuer le rapport H₂/CO₂.

La différence d'hydrogène produit entre les bourbes Muscat congelées et réfrigérées et de l'utilisation du réseau métabolique, indiquent que *Clostridium intestinale* n'est pas l'espèce productrice d'hydrogène. Au chapitre IV, tout indiquait que l'espèce *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) était responsable de la production d'hydrogène. Une fois encore, la corrélation entre la quantité d'hydrogène produit et l'abondance relative de cette espèce confirme que *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est directement responsable de la production d'hydrogène (figure 71).

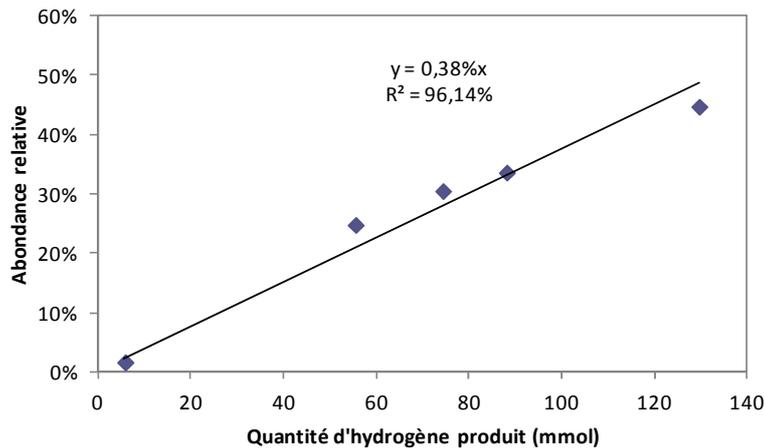


Figure 71 : Relation entre l'abondance relative de *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) et la quantité d'hydrogène produit.

Muscat est le cépage qui a obtenu le potentiel d'hydrogène le plus faible et ce, même en évitant par congélation la préfermentation. Il est difficile de savoir si, l'espèce *Clostridium intestinale* s'est développée dans les bourbes Muscat parce que c'est une bactérie dont les besoins nutritionnels sont faibles ou parce que c'est une bactérie résistante à des températures faibles. De toute évidence, cette espèce consomme une partie du substrat sans produire d'hydrogène, ce qui la rend concurrente au niveau du substrat des bactéries productrices d'hydrogène.

❖ Le cépage Pinot Gris, potentiel de production d'hydrogène le plus élevé

Il est vrai que les bourbes de cépage Pinot Gris étaient proches de celles du cépage Gewurztraminer lors de la caractérisation. Pourtant, elles s'y sont distinguées par le fait d'être plus riches en macro-nutriments K, P et S et, en micro-nutriment Fe. Le cépage Pinot Gris s'est également démarqué par ses performances de production d'hydrogène les plus élevées : avec des productivités de 10,04 mmol/L/h lorsque les bourbes sont réfrigérées et 6,53 mmol/L/h lorsque les bourbes sont congelées ; et des volumes d'hydrogène respectifs de 3,0 L/L de milieu réactionnel (deuxième production la plus élevée après le Gewurztraminer) et de 4,4 L/L. Les rendements en hydrogène obtenus (1,46 mol/mol et 2,21 mol/mol) indiquent l'existence d'une concurrence pour le substrat uniquement pour les bourbes réfrigérées pendant 7 jours. Les voies hydrogénotrophes observées dans les tests de fermentation des bourbes réfrigérées et congelées Pinot Gris sont les voies succinate (équation 5) et potentiellement valérate ; alors que les voies uniquement consommatrices de substrat observées sont les voies formiate, éthanol et lactate, avec en plus la voie butanol pour les bourbes congelées. La quantité totale élevée de métabolites secondaires avec 37,4 mmol pour les bourbes réfrigérées contre 12,2 mmol pour les bourbes congelées, permet d'expliquer pourquoi le rendement en hydrogène obtenu pour les bourbes Pinot Gris (7 jours) est plus faible que celui des bourbes congelées. Le séquençage a permis d'établir que *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) était l'espèce dominante productrice d'hydrogène avec 33,7 % et 44,8 % d'abondance relative respective pour les bourbes réfrigérées (7 jours) et congelées. Les phylotypes *Clostridium* sp. et *Clostridium pasteurianum* sont

également connues dans la littérature pour produire de l'hydrogène (Rafrafi *et al.*, 2013). On pourrait suspecter *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) de produire une bactériocine dirigée vers les autres espèces *Clostridium* comme cela a notamment été mis en évidence dans la littérature (Clarke *et al.*, 1976). *Enterococcus villorum* et *Sporolactobacillus laevolacticus* sont des bactéries lactiques homo-fermentaires identifiées dans les bourbes réfrigérées qui ont produit du lactate. En revanche, seule *Enterococcus villorum* a été identifiée dans les bourbes congelées mais n'a produit que très peu de lactate, ce qui indique que cette bactérie lactique joue un autre rôle dans la production d'hydrogène. Par déduction, il semble que *Sporolactobacillus laevolacticus* soit la seule bactérie responsable de la production de lactate dans les bourbes réfrigérées.

❖ Les cépages Gewurztraminer et Riesling, potentiels de production d'hydrogène intermédiaires

Les cépages Gewurztraminer et Riesling ont montré des performances de production d'hydrogène intermédiaires aux cépages Muscat et Pinot Gris avec de meilleurs résultats pour le Gewurztraminer notamment grâce à sa concentration initiale en substrat plus élevée. La caractérisation des biomasses a également montré que la teneur en fer des bourbes Riesling était la plus faible des quatre cépages. Or, les productivités en hydrogène obtenues pour ce cépage étaient 2 à 3 fois plus élevées que celles obtenues pour le Muscat dont la teneur en fer était du même ordre de grandeur. Sur quatre cépages, il n'est donc pas possible de relier la teneur en fer avec la productivité en hydrogène, ni les teneurs en macro- et micro-nutriments avec les performances de production d'hydrogène.

Les métabolites minoritaires produits par les voies hydrogénotrophes suivantes : succinate (équation 5), propionate (équation 6) et valérate (équation 7) pour les bourbes réfrigérées, et propionate et valérate pour les bourbes congelées ; ainsi que ceux produits par la voie formiate ou par une voie concurrente à la production d'hydrogène (éthanol) n'ont que peu d'impact sur les rendements en hydrogène qui restent élevés. Les structures des communautés bactériennes des bourbes Gewurztraminer et Riesling n'ont pas été analysées par séquençage lors des tests de fermentation mais par T-RFLP. Cette analyse a révélé la prédominance de l'espèce bactérienne identifiée comme *Clostridium butyricum* dont les fragments de restriction obtenus par les enzymes *aluI/hhaI* sont de 67/702 pb. Cette identification bactérienne semble fortement correspondre à l'espèce majoritaire identifiée par séquençage de l'échantillon prélevé lors du test 'Pinot Gris (7 jours)'.

❖ Le stockage longue durée à 4°C diminue le potentiel de production d'hydrogène

La productivité en hydrogène est directement impactée (65 % inférieure) par le stockage des bourbes à 4°C pendant un mois notamment à cause de la concentration initiale en substrat 61 % plus faible. Le volume d'hydrogène produit quant à lui, est également impacté mais de manière plus légère (37 % inférieur). Alors que la voie acétate n'est que légèrement influencée (16 %) par le stockage de la biomasse, la production de butyrate est 54 % plus faible, ce qui est logique compte tenu de l'absence

d'impact sur la teneur initiale en tartrate et à l'inverse, de la plus faible teneur initiale en sucres. Le séquençage a mis en évidence deux espèces bactériennes favorisées par le stockage longue durée à 4°C : *Clostridium intestinale* et *Bacteroides graminisolvens* en défaveur des bactéries lactiques et des bactéries appartenant au genre *Clostridium* (*Clostridium* sp. et *Clostridium pasteurianum*). Une raison pour laquelle les bactéries lactiques sont défavorisées est qu'elles ont des besoins spécifiques notamment en vitamines, dont la concentration diminue avec le temps de stockage car celles-ci sont consommées par d'autres bactéries telles que *Bacteroides graminisolvens* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

Au cours de cette étude, il a été possible de confirmer à nouveau la corrélation linéaire entre la teneur initiale en sucres et la production d'hydrogène et de mettre en évidence une corrélation entre l'abondance de *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) (à 24 h de fermentation) et la quantité d'hydrogène produit. Cependant, il n'a pas été possible de corréler les teneurs en nutriments en fonction des performances de production d'hydrogène à partir de quatre cépages dont globalement les caractérisations étaient proches. Ainsi, les questions suivantes subsistent toujours : (i) les espèces bactériennes sont-elles liées intrinsèquement au cépage de la biomasse ou bien, se développent-elles au cours de la fermentation en fonction des substrats et nutriments disponibles dans la biomasse ? (ii) L'orientation métabolique est-elle influencée par ces teneurs ? Afin de répondre à ces questions, des études supplémentaires sont nécessaires telles que : (a) tester l'influence notamment de l'ajout de sulfate de fer à différentes concentrations au milieu, sur les performances de production d'hydrogène et la structure des populations microbiennes ; (b) tester la microflore endogène après sa récupération au niveau du culot de centrifugation et l'inoculer dans un milieu de culture où les teneurs en nutriments varieront.

2.2. Influence du mode de culture sur la production d'hydrogène

Le mode de culture de la vigne fait référence aux produits phytosanitaires utilisés lors de la culture de la vigne. Dans cette partie, les trois modes de cultures suivants sont étudiés : durable, éco-phytosanitaire et biologique ; leurs performances seront comparées à celles des bourbes d'Alsace. Les échantillons de bourbes de cépage Chardonnay proviennent du Domaine des Poncétys du Lycée Viticole de Mâcon-Davayé (Bourgogne). Le mode « durable » est le mode de culture traditionnellement utilisé et dont les traitements en produits phytosanitaires sont les plus nombreux. Le mode « éco-phytosanitaire » correspond à une utilisation moins intensive de produits phytosanitaires. Enfin, le mode « biologique » ne permet que l'utilisation de soufre et de sulfate de cuivre. Le détail des produits phytosanitaires utilisés en fonction du mode de culture est regroupé dans le tableau 11. Il est important de préciser que les produits phytosanitaires sont utilisés à la fois sur la vigne et sur les baies des raisins.

Tableau 11 : Produits et traitements phytosanitaires utilisés en fonction du mode de culture. Les données entre parenthèses correspondent au nombre de répétitions du traitement appliqué.

Durable	Eco-phytosanitaire	Biologique
<i>Spiroxamine</i> (1)	<i>Soufre</i> (1)	<i>Soufre</i> (7)
<i>Tebuconazole</i> (1)	Mêmes produits que dans le mode « durable » mais avec une demi-dose (0,5)	<i>Sulfate de cuivre</i> (4)
<i>Dithianon + Dimethomorph</i> (1)	<i>Tebuconazole</i> (1)	
<i>Kresoxim-methyl</i> (1)	<i>Kresoxim-methyl</i> (1)	
<i>Fosethyl-Aluminium + Folpel + Cymoxanil</i> (1)	<i>Metrafenone</i> (1)	
<i>Metrafenone</i> (1)	<i>Tetraconazole</i> (1)	
<i>Cymoxanil + Folpel</i> (1)		
<i>Tetraconazole</i> (1)		
<i>Meptyldinocap</i> (1)		

La caractérisation des matières des bourbes Chardonnay n'a pas été réalisée en raison du mode de conditionnement de cette biomasse. En effet, le traitement de congélation, choisi pour des questions pratiques de stockage et afin de limiter l'évolution de la biomasse dans le temps, affecte la répartition des matières.

2.2.1 Caractérisation de la DCO des bourbes

La figure 72 représente la répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble ainsi que la composition de la DCO soluble en sucres, en alcools, en acides organiques et en protéines selon les différents modes de culture.

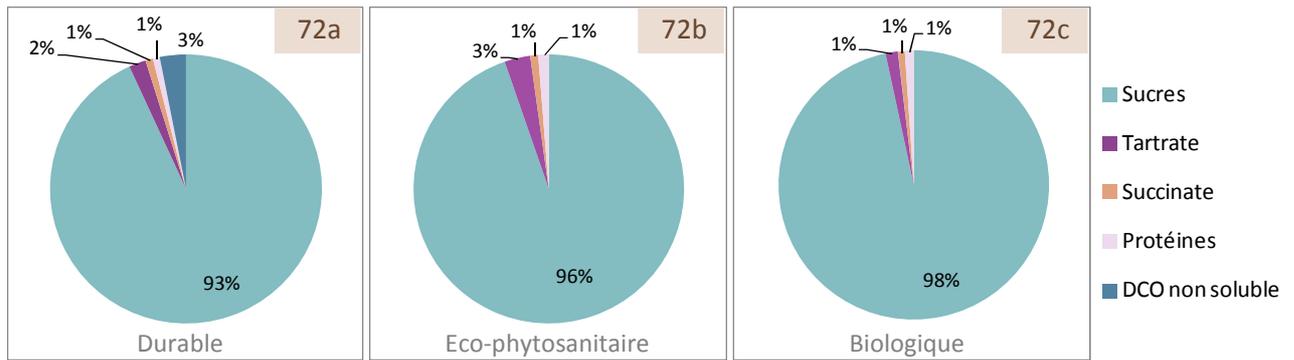


Figure 72 : Répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble des bourbes Chardonnay Durable (a), Eco-phytosanitaire (b) et Biologique (c) ; et composition biochimique de la DCO soluble.

Les valeurs de DCO obtenues sur les fractions totales des bourbes sont significativement identiques ($p > 0,02$; t-test) (en moyenne, 224 ± 4 g/L). Quel que soit le mode de culture, les sucres solubles représentent 93 % à 98 % de la DCO totale respectivement pour les bourbes Chardonnay Durable et Biologique, ce qui est plus élevé que ceux des bourbes d'Alsace (80 ± 2 %). Le tartrate, le succinate et les protéines solubles constituent la DCO minoritaire soluble qui représente entre 3 % et 5 % de la DCO totale. Seules les bourbes Chardonnay Durable se composent de DCO non soluble (3 %), ce qui constitue la seule différence entre les bourbes de différents modes de culture.

2.2.2 Caractérisation de la teneur en protéines des bourbes

La figure 73 représente les teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes de différents modes de culture. Comme noté précédemment, les incertitudes élevées obtenues sur la fraction totale sont notamment dues à la difficulté de prélèvement de l'échantillon à la pipette.

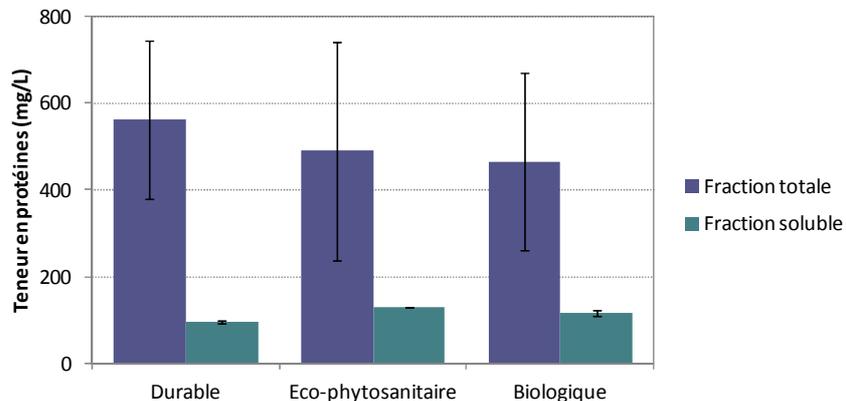


Figure 73 : Influence du mode de culture sur les teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes Chardonnay Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique.

Globalement, la figure montre des répartitions en protéines similaires quel que soit le mode de culture. On remarque toutefois, que les protéines issues de la fraction soluble des bourbes Chardonnay Eco-phytosanitaire et Biologique représentent en moyenne 26 ± 1 % des protéines issues de la fraction totale alors qu'elles ne représentent que 19 ± 1 % pour le cépage Chardonnay Durable. La teneur en azote organique est légèrement plus élevée pour le mode Durable (90 g/L) que les autres modes (76 ± 3 g/L). On peut estimer potentiellement que les micro-organismes sont les plus nombreux dans les

bourbes Chardonnay Durable (465 ± 186 g/L en protéines particulières) et les moins nombreux pour le mode de culture Biologique (349 ± 211 g/L en protéines particulières).

2.2.3 Caractérisation élémentaires des bourbes

La figure 17 représente la répartition élémentaire moyenne calculée à partir des différentes bourbes sur la fraction totale (figure 74a) et soluble (figure 74b), le mode de culture Biologique ayant été exclu (figures 74c et 74d) en raison de la répartition différente de la fraction totale des autres modes. Quel que soit le mode de culture, les éléments principaux des fractions totales et solubles sont : le soufre (S), le phosphore (P), le calcium (Ca), le magnésium (Mg) et le potassium (K).

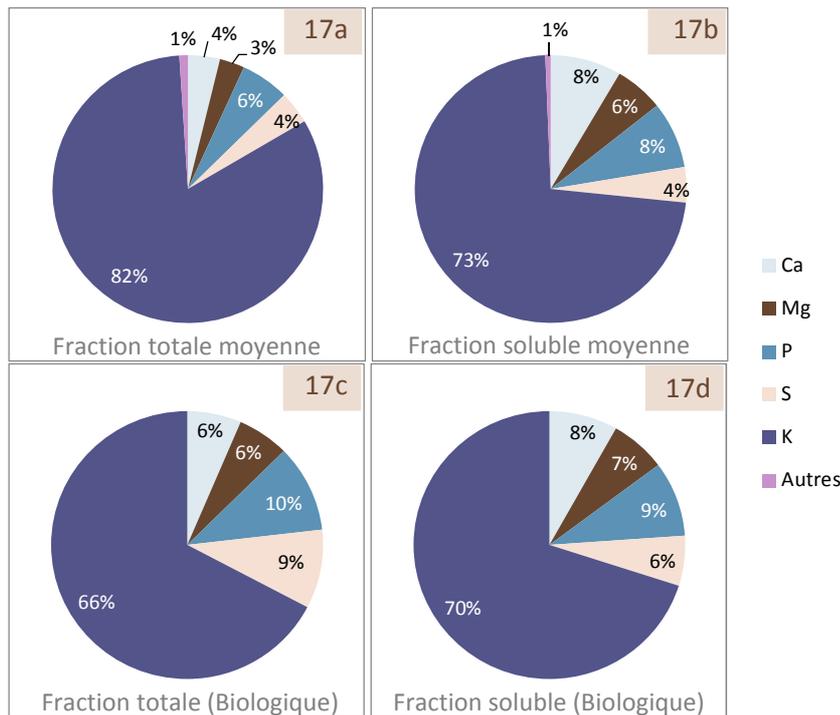


Figure 74 : Répartition élémentaire moyenne des fractions totales (a) et solubles (b) des bourbes Chardonnay Durable et Eco-phytosanitaire (moyenne), et celle des bourbes Chardonnay Biologique (c) et (d).

Les éléments majoritaires des fractions totales et solubles sont identiques quel que soit le mode de culture : le potassium (K) est le principal élément, puis les éléments soufre (S), phosphore (P), magnésium (Mg) et calcium (Ca) sont plus minoritaires. La composition élémentaire moyenne de la fraction totale des bourbes Chardonnay Durable et Eco-phytosanitaire (moyenne) se distingue de celle des bourbes Chardonnay Biologique par le fait que le potassium représente 82 ± 3 % dans le premier cas alors qu'il ne représente seulement que 66 % dans le deuxième cas. Les éléments plus minoritaires représentent entre 3 % (magnésium) et 6 % (phosphore) pour la moyenne de la fraction totale des bourbes Chardonnay Durable et Eco-phytosanitaire contre 6 % (magnésium et calcium) et 10 % (phosphore) pour les bourbes Chardonnay Biologique. La répartition élémentaire de la fraction totale de ces dernières est d'ailleurs très proche de sa fraction soluble (70 % pour le potassium et entre 6 % pour le soufre et 9 % pour le phosphore), ainsi que de celle des fractions solubles des bourbes Chardonnay Durable et Eco-phytosanitaire (73 % pour le potassium et entre 4 % pour le soufre et 8 %

pour le phosphore et calcium).

La figure 75 représente les concentrations en principaux macro- et micro-nutriments des fractions totales et solubles de chacune des bourbes Chardonnay.

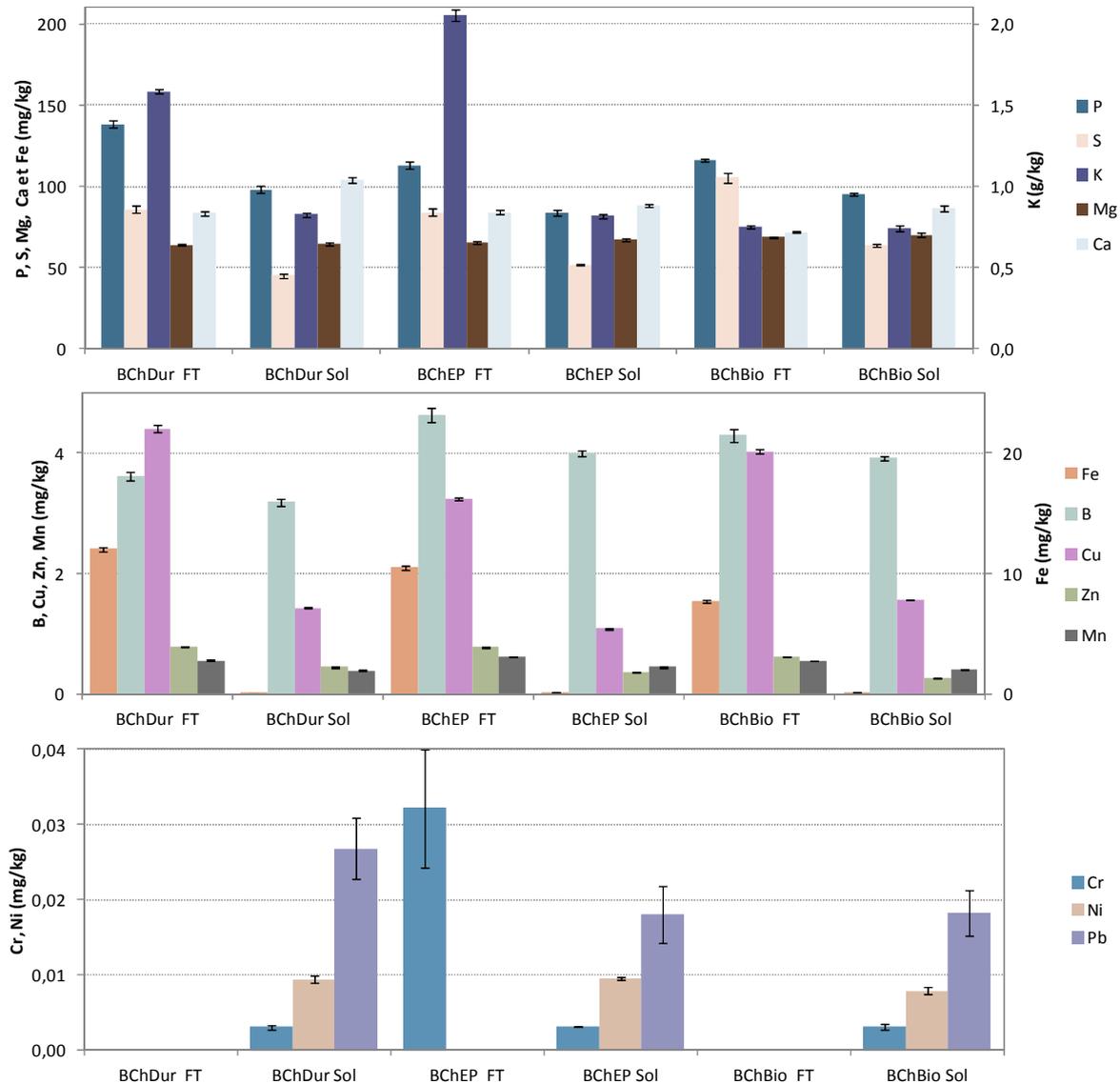


Figure 75 : Teneur des macro- et micro-nutriments des bourbes dans les fractions totales (FT) et solubles (Sol) des bourbes Chardonnay Durable (BChDur), Eco-phytosanitaire (BChEP) et Biologique (BChBio).

Alors que les teneurs en macro- et micro-éléments diffèrent selon les fractions totales des bourbes de différents cépages, celles des fractions solubles sont similaires quel que soit le cépage et sont composées en moyenne de : 92 ± 8 mg/kg de P, 53 ± 9 mg/kg de S, 795 ± 49 mg/kg de K, 67 ± 3 mg/kg de Mg, de 93 ± 10 mg/kg de Ca et d'une teneur très faible en Fe ($0,09 \pm 0,04$ mg/kg). Les teneurs en nutriments dans les fractions solubles sont inférieures à celles des fractions totales pour tous les éléments sauf le magnésium qui a des teneurs similaires et le calcium qui est à des teneurs légèrement supérieures. On note par ailleurs la présence d'une spécificité au niveau des bourbes Chardonnay Eco-phytosanitaires pour lesquelles la teneur en chrome (Cr) n'est pas nulle (32 ± 8 ppb) alors qu'elle l'est pour les autres cépages. La différenciation des modes de culture se fait par les

teneurs en nutriments des fractions totales. Les bourbes Chardonnay Durable sont les plus riches en P et en Fe (respectivement, 138 ± 2 mg/kg et $12,0 \pm 0,2$ mg/kg). Les bourbes Chardonnay Eco-phytosanitaire sont les plus riches en K (205 ± 3 g/kg). Enfin, les bourbes Chardonnay Biologique sont les plus riches en S (105 ± 3 mg/kg) corrélable potentiellement à un traitement avec une teneur élevée en soufre mais les plus pauvres en K et Fe (respectivement, 75 ± 1 mg/kg et $7,7 \pm 0,1$ mg/kg).

2.2.4 Influence du mode de culture sur les performances de production d'hydrogène

Le volume d'hydrogène produit au cours du temps a été mesuré individuellement pour chaque biomasse de modes de culture différents et issue de la région Bourgogne et du cépage Chardonnay : Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique. Les biomasses ont été stockées à -20°C avant fermentation. Les courbes obtenues à partir de ces biomasses présentent toutes une allure typique d'une croissance microbienne et de production de métabolites en mode non continu (figure 76) en trois phases.

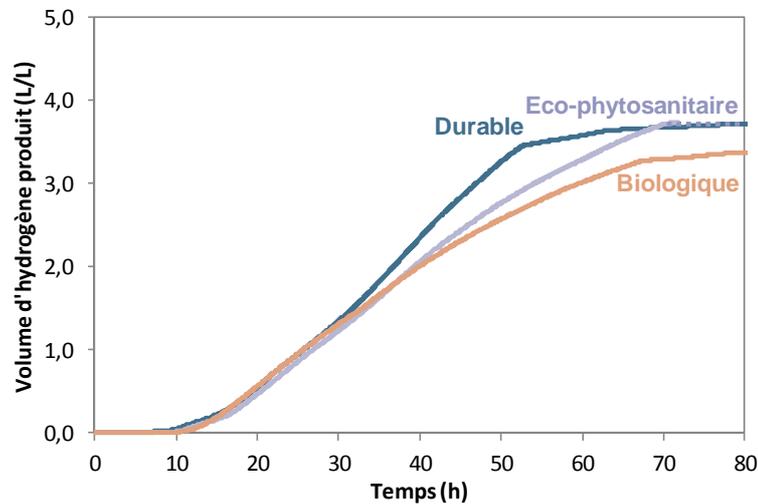


Figure 76 : Volume d'hydrogène produit au cours du temps à partir des bourbes Chardonnay issues de différents modes de culture.

La figure 76 montre une phase de latence de 10 h, puis, des profils de production d'hydrogène identiques jusqu'à 30 h de fermentation, quel que soit le mode de culture utilisé, et ensuite, au-delà, une faible divergence en fonction du mode de culture utilisé. En effet, le mode de culture durable, permet d'obtenir une vitesse de production d'hydrogène plus élevée que les modes Eco-phytosanitaire ou Biologique, en deuxième partie de fermentation. Par ailleurs, on remarque que, même si les bourbes de Chardonnay Eco-phytosanitaire ont une productivité en hydrogène plus faible à partir de 30 h que les bourbes Chardonnay Durable, le volume d'hydrogène final produit est identique (3,7 L/L), ce qui n'est pas le cas des bourbes Chardonnay Biologique dont le volume d'hydrogène final produit est légèrement plus faible (3,4 L/L). Même si des différences mineures existent entre les différents modes de culture, il serait nécessaire de dupliquer les fermentations afin d'infirmier ou de confirmer la tendance observée selon laquelle plus la quantité et la fréquence des produits phytosanitaires sont élevées et meilleure est la productivité en cours de fermentation.

Les productivités et les productions d'hydrogène obtenues à partir des biomasses ainsi que les rendements en hydrogène sont représentés dans la figure 77.

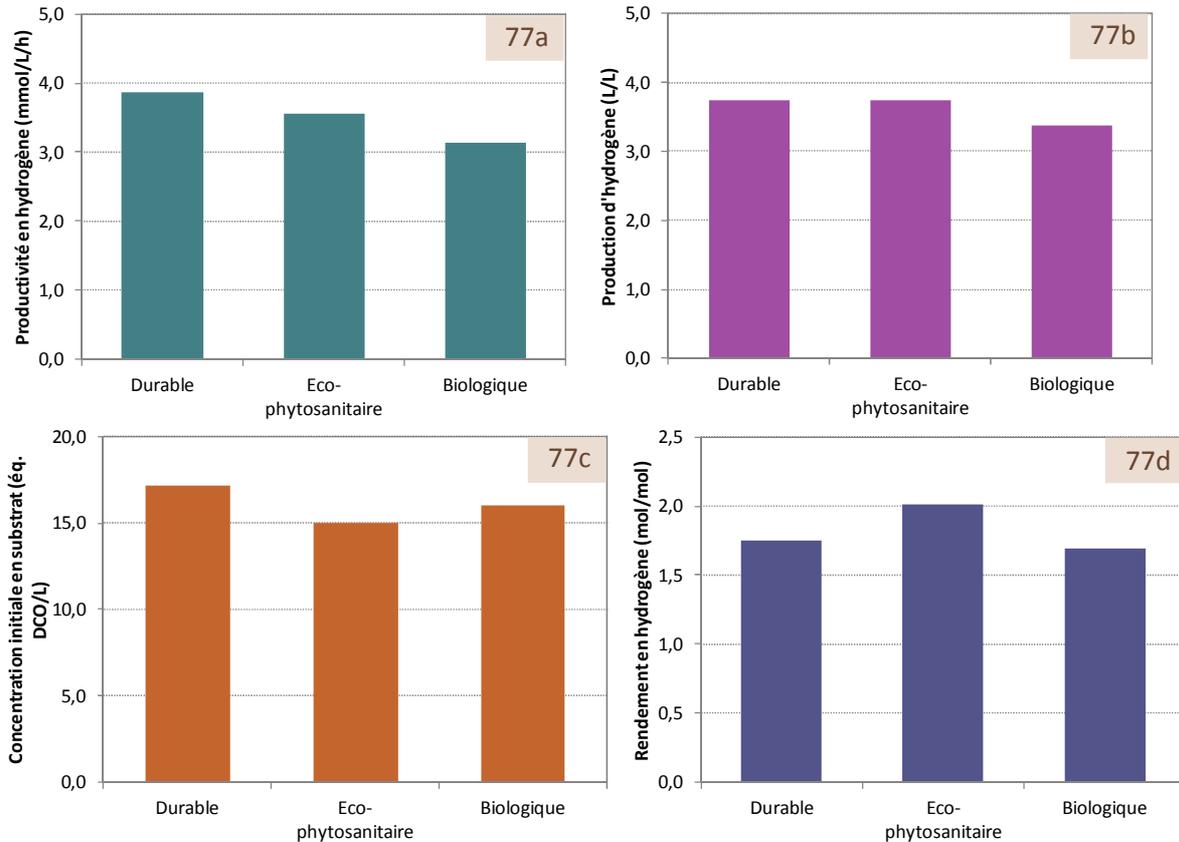


Figure 77 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des bourbes Chardonnay issues de différents modes de culture (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique) : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

Les résultats de la figure 77a, 77b, 77c et 77d indiquent clairement que le mode de culture pour un même cépage n'influence pas significativement ($p > 0,05$; t-test) les performances de production d'hydrogène. Ainsi, la productivité moyenne en hydrogène calculée est de $3,5 \pm 0,4$ mmol/L/h, le volume moyen d'hydrogène produit est de $3,6 \pm 0,2$ L/L et le rendement moyen en hydrogène est de $1,8 \pm 0,2$ mol/mol.

2.2.5 Influence du mode de culture sur le métabolisme

La distribution des métabolites produits en fin de fermentation de chaque biomasse est représentée sur la figure 78. Les bilans de matières DCO calculés sont complets et représentés sur l'annexe 5.

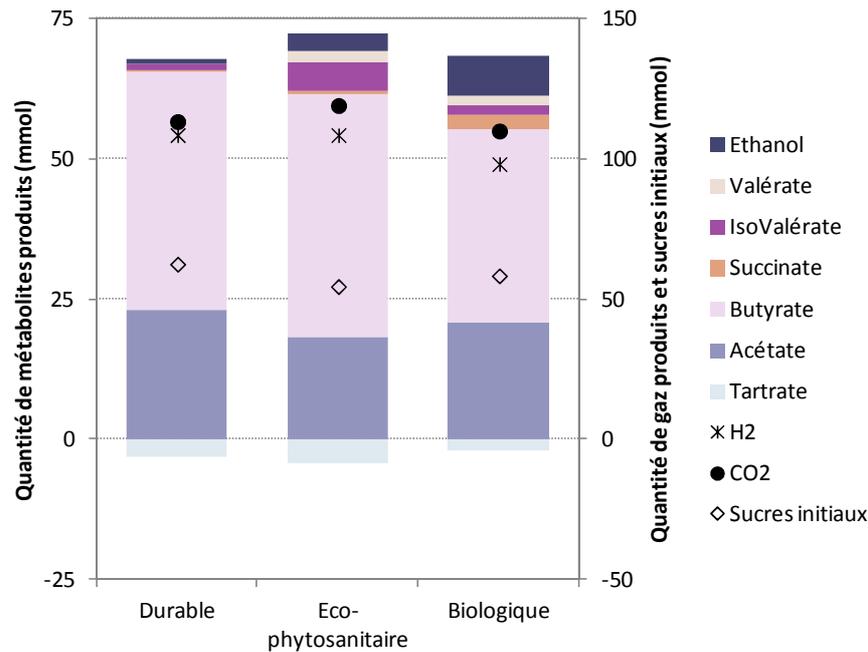


Figure 78 : Métabolites et gaz produits à partir des bourbes Chardonnay issues de différents modes de culture.

Cette figure montre que le butyrate et l'acétate sont les deux métabolites majoritaires produits, quel que soit le mode de culture (entre 34,3 et 42,4 mmol de butyrate produit et 18,1 à 23,0 mmol d'acétate). On remarque par ailleurs, que moins l'utilisation de produits phytosanitaires a été intensive et plus la diversification des métabolites secondaires est prononcée : 2,3 mmol de métabolites secondaires sommés pour le mode Durable contre 11,0 mmol et 13,1 mmol pour les modes Eco-phytosanitaire et Biologique. Plus la quantité de métabolites secondaires produits est élevée et plus le rapport H₂/CO₂ est faible (respectivement, 0,96 ; 0,91 ; 0,89 pour les bourbes Chardonnay Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique). Les métabolites secondaires produits sont principalement l'éthanol (7,0 mmol) et le succinate (2,5 mmol) pour le mode Biologique alors que ce sont l'isovalérate (5,1 mmol) et l'éthanol (3,3 mmol) pour le mode Eco-phytosanitaire. On note également la consommation totale de la quantité initiale de tartrate comprise entre 2,1 mmol et 4,3 mmol pour les bourbes Chardonnay Eco-phytosanitaire et Biologique.

2.2.6 Structure des communautés microbiennes par séquençage

La classification taxonomique au niveau de la famille obtenue pour les différentes biomasses est représentée sur la figure 79.

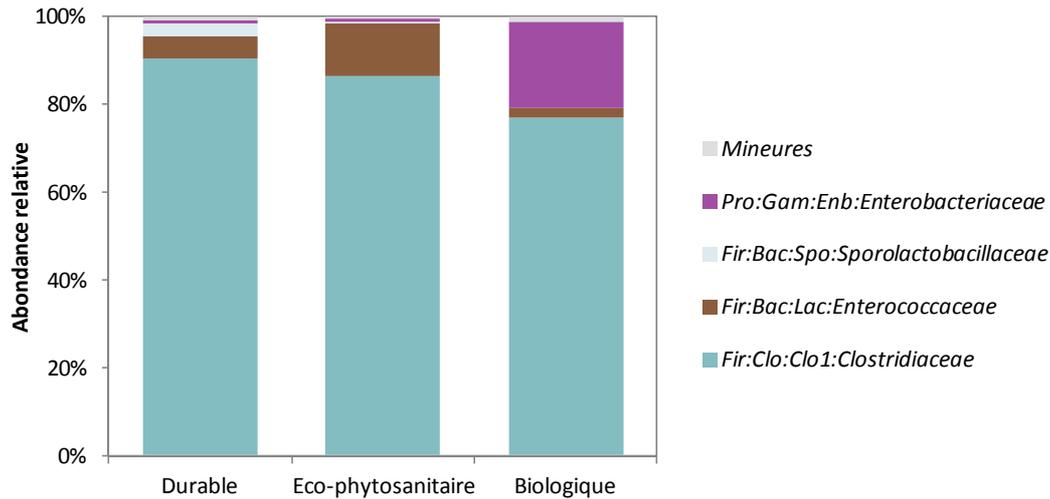


Figure 79 : Classification taxonomique obtenue par séquençage d'échantillons prélevés à 24 h de fermentation en fonction des modes de culture. Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

La classification taxonomique au niveau des familles permet de montrer l'influence du mode de culture sur la microflore endogène des bourbes : plus l'utilisation de produits sanitaires est intensive et plus la famille *Clostridiaceae* est favorisée (90,3 % contre 76,8 % respectivement pour les modes Durable et Biologique). Inversement, plus le mode de culture est limité par le nombre d'intrants, leur nature et leur quantité, plus les familles minoritaires sont favorisées. Pour le mode de culture durable, les familles minoritaires sont *Sporolactobacillaceae* et *Enterococcaceae* avec des abondances relatives respectives de 2,6 % et 5,3 %. Pour le mode de culture Eco-phytosanitaire, la famille minoritaire représentative des bourbes lors de la fermentation obscure est principalement *Enterococcaceae* (12,1 %). Enfin, lors de la fermentation des bourbes issues de la viticulture biologique, la famille minoritaire principale est *Enterobacteriaceae* (19,4%).

L'affiliation des séquences à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 12.

Tableau 12 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24 h de fermentation lors des tests en fonction du mode de culture.

	Similarité	Durable	Eco-phytosanitaire	Biologique
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7%	43,7%	38,2%	28,6%
<i>Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)</i>	99,5%	38,0%	45,5%	45,9%
<i>Clostridium sp.</i>	98,7%	4,3%	1,6%	1,0%
<i>Clostridium pasteurianum</i>	100,0%	4,4%	1,0%	1,3%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	5,3%	12,1%	2,2%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	2,6%	0,2%	0,2%
<i>Klebsiella/Enterobacter/Proteus</i>	99,7%	0,9%	0,9%	19,4%

Les espèces co-dominantes sont *Clostridium intestinale* et *Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)* quel que soit le mode de culture. L'abondance relative de *Clostridium intestinale* augmente avec l'intensification de l'utilisation de produits phytosanitaires et passe de 28,6 % à 43,7 % pour les modes de cultures Biologique et Durable. Ceci montre une certaine résistance de

cette bactérie aux produits phytosanitaires. En revanche, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) n'est pas affecté par le mode de culture (abondances relatives comprises entre 45,9 % et 38,0 % pour les modes Biologique et Durable).

Le mode de culture peut être la source non seulement d'une variation de la composition en bactéries dominantes, mais également celle des bactéries minoritaires ou sous-dominantes. Moins l'utilisation de produits phytosanitaires est intensive et plus on assiste à une diversification de la microflore bactérienne sous-dominante, notamment au niveau des espèces *Enterococcus villorum* et de la famille des *Enterobacteriaceae*. Alors que l'espèce *Enterococcus villorum* est caractéristique du mode Eco-phytosanitaire (abondance relative de 12,1 %) et la famille des *Enterobacteriaceae* est typique du mode Biologique (abondance relative de 19,4 %).

2.2.7 Discussion sur l'impact du mode de culture

Dans cette étude, les paragraphes 2.2.3. et 2.2.4 ont montré que le mode de culture utilisé n'impactait pas les performances de production d'hydrogène avec en moyenne une productivité de $3,5 \pm 0,4$ mmol/L/h, un volume d'hydrogène produit de $3,6 \pm 0,2$ L/L_{réacteur} et un rendement en hydrogène de $1,8 \pm 0,2$ mol/mol ; ceci est cohérent avec l'uniformité des productions majoritaires de butyrate et d'acétate (respectivement, 40 ± 5 mmol et 21 ± 3 mmol) obtenues. *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) a été identifié comme bactérie majoritaire dans les tests 'Eco-phytosanitaire' et 'Biologique' (45,5 % et 45,9 % d'abondances relatives) et co-majoritaire (38,0 %) avec l'espèce *Clostridium intestinale* (43,7 %) dans le test 'Durable'. Cette homogénéité une fois encore de l'abondance relative de la bactérie responsable de la production d'hydrogène explique les quantités de butyrate produit ainsi que les performances de production d'hydrogène similaires obtenues. De plus, les faibles différences observées au niveau des métabolites minoritairement produits, expliquées par des abondances relatives d'espèces ou genres bactériens différents ont uniquement un impact sur le rapport molaire H₂/CO₂ obtenus. En effet, plus le mode de culture est intensif et moins le réseau métabolique secondaire est développé, de même que, plus les abondances relatives des espèces autres que celles appartenant au genre *Clostridium* sont faibles. Les bactéries lactiques *Enterococcus villorum* et *Sporolactobacillus laevolacticus* représentent les espèces minoritaires du mode durable (respectivement 5,3 % et 2,6 %) et sont associées à une très faible production de métabolites secondaires (2,3 mmol) et à un rapport H₂/CO₂ le plus élevé (0,96). *Enterococcus villorum* est également présente dans les bourbes de mode éco-phytosanitaire (12,1 %) et est associée à une quantité de métabolites secondaires produits de 11,0 mmol et à un rapport H₂/CO₂ intermédiaire (0,91). *Enterobacteriaceae* est représentée comme étant caractéristique du mode biologique (19,4 %) et est associée à une quantité de métabolites secondaires produits de 13,1 mmol et à un rapport H₂/CO₂ le plus faible (0,89). La figure 80 représente les concentrations en métabolites et les volumes de biogaz produits au cours de la fermentation.

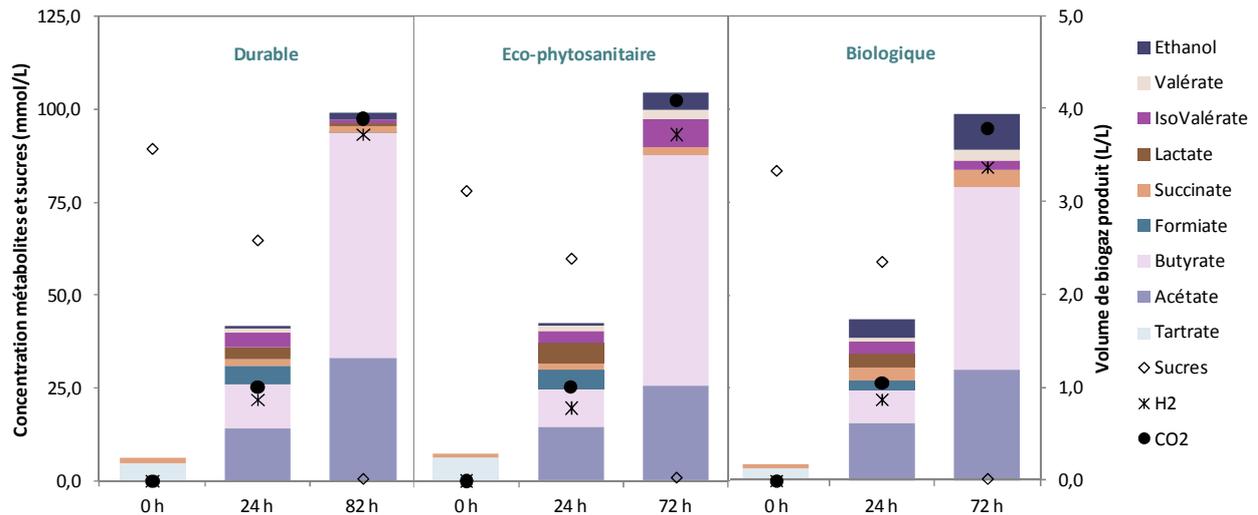


Figure 80 : Métabolites et biogaz produits en cours de fermentation des bourbes Chardonnay pour chaque mode de culture.

Cette figure montre une production de lactate à 24 h de fermentation, quel que soit le mode de culture qui est représentatif du métabolisme des bactéries homo-fermentaires identifiées par le séquençage. Toutefois, les quantités produites ne sont pas corrélables avec la somme des abondances relatives des bactéries lactiques, ce qui s'explique par le fait que soit d'autres bactéries telles que les *Clostridium* sont capables de produire du lactate, soit une partie du lactate produit est converti par d'autres espèces. Pour cette dernière hypothèse, Bhat & Barker (1947) ont en effet mis en évidence que certaines *Clostridium* telles que *Clostridium butyricum* ont la capacité de convertir le lactate en présence d'acétate pour produire du butyrate, on parle de *Clostridium lacto-acetophylum*.

Même si la structure des communautés bactériennes n'est pas identique, le métabolisme global des bactéries productrices d'hydrogène n'est pas impacté ; on peut ainsi dire que le mode de culture n'a pas ou très peu d'influence sur les performances de production d'hydrogène, à l'échelle du laboratoire.

2.2.8 Comparaison des performances entre bourbes de Bourgogne et bourbes d'Alsace

Pour des teneurs initiales en sucres similaires mesurées dans les bourbes de Bourgogne (16 ± 1 g éq. DCO/L) et celles d'Alsace (14 ± 2 g éq. DCO/L), les volumes d'hydrogène moyens et les rendements moyens obtenus par les bourbes des différents terroirs sont similaires (respectivement, $3,6 \pm 0,2$ L/L et $1,8 \pm 0,2$ mol/mol pour le terroir Bourgogne contre $3,6 \pm 0,8$ L/L et $2,1 \pm 0,3$ mol/mol pour le terroir d'Alsace) alors que la productivité d'hydrogène moyenne obtenue par les bourbes de Bourgogne est dans la fourchette basse de celle obtenue par les bourbes d'Alsace ($3,5 \pm 0,4$ contre $4,6 \pm 1,9$ mmol/L/h), de même que le rendement en hydrogène obtenu est légèrement plus faible dans le terroir Bourgogne comparé à celui de l'Alsace. Deux hypothèses peuvent être émises : ces différences observées sont dues à une différence de composition en macro- et micro- nutriments présents dans les bourbes ; ou bien elles sont dues à une composition microbienne différente utilisant des réseaux métaboliques distincts.

L'analyse du réseau métabolique a mis en évidence l'utilisation principale des voies acétate et butyrate, que ce soit pour les bourbes de Bourgogne ou d'Alsace, à la différence près, que les bourbes de Bourgogne produisent majoritairement du butyrate contrairement aux bourbes d'Alsace (à l'exception des bourbes Muscat) : les rapports butyrate/acétate sont compris entre 1,64 et 2,40 pour les bourbes de Bourgogne alors que ceux des bourbes d'Alsace sont compris entre 0,90 et 1,11 (à l'exception du Muscat dont le rapport est de 1,85). De manière intéressante, on remarque que c'est lorsqu'il y a très peu de tartrate (en moyenne sur le cépage Chardonnay 3 ± 1 mmol) que la voie métabolique butyrate est majoritaire (rapport butyrate/acétate compris entre 1,64 et 2,40). Tabachnick & Vaughn (1948) ont montré que le tartrate pouvait être consommé, en milieu anaérobie, par des bactéries appartenant au genre *Clostridium*, telles que *Clostridium butyricum*, en le convertissant préférentiellement en acétate (rapport butyrate/acétate de 0,1) ; de leur côté, Radler *et al.* (1972) ont montré que le tartrate peut être dégradé par des bactéries lactiques en le convertissant en acétate et lactate ou en acétate et succinate. Dans tous les cas, le tartrate est converti majoritairement en acétate qui s'ajoute à la quantité d'acétate produit à partir du sucre, d'où des rapports butyrate/acétate inférieurs à 1 lorsque le tartrate est présent initialement.

Comme pour les bourbes d'Alsace, le séquençage a identifié *Clostridium intestinale* et *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) comme étant les bactéries co-dominantes des bourbes de Bourgogne. Ces deux espèces produisent de l'acétate et du butyrate, mais seule *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est responsable de la production d'hydrogène. L'hypothèse selon laquelle les différences de productivité d'hydrogène observées entre le terroir Alsace et Bourgogne seraient dues à une composition microbienne différente est donc invalidée.

En ce qui concerne les compositions en macro- et micro- nutriments, seules les moyennes obtenues sur le phosphore, le potassium, le zinc et le chrome sont plus élevées pour le terroir Alsace que pour celui Bourgogne à l'exception du cuivre pour lequel la moyenne calculée est plus faible pour le terroir Alsace que pour celui de Bourgogne. Aucune différence significative n'est obtenue entre les teneurs initiales en fer ou en potassium des terroirs Alsace et Bourgogne. Pourtant, des tendances entre les teneurs initiales en fer des bourbes et la productivité en hydrogène d'une part et entre les teneurs initiales en potassium des bourbes et la vitesse de production d'hydrogène sont observées (figure 81a et 81c). Ainsi, plus les teneurs initiales en fer et en potassium de la fraction totale sont élevées et meilleures sont les productivités. Or, la productivité en hydrogène étant également corrélée à la teneur initiale en substrat (corrélation établie au chapitre IV), il convient de supprimer les bourbes Riesling et Muscat pour lesquelles les teneurs sont plus faibles (respectivement 11,7 et 12,3 g éq. DCO/L) que celles obtenues pour les autres cépages (en moyenne 16 ± 1 g éq. DCO/L). Ainsi, la figure 81b tient compte de ce changement.

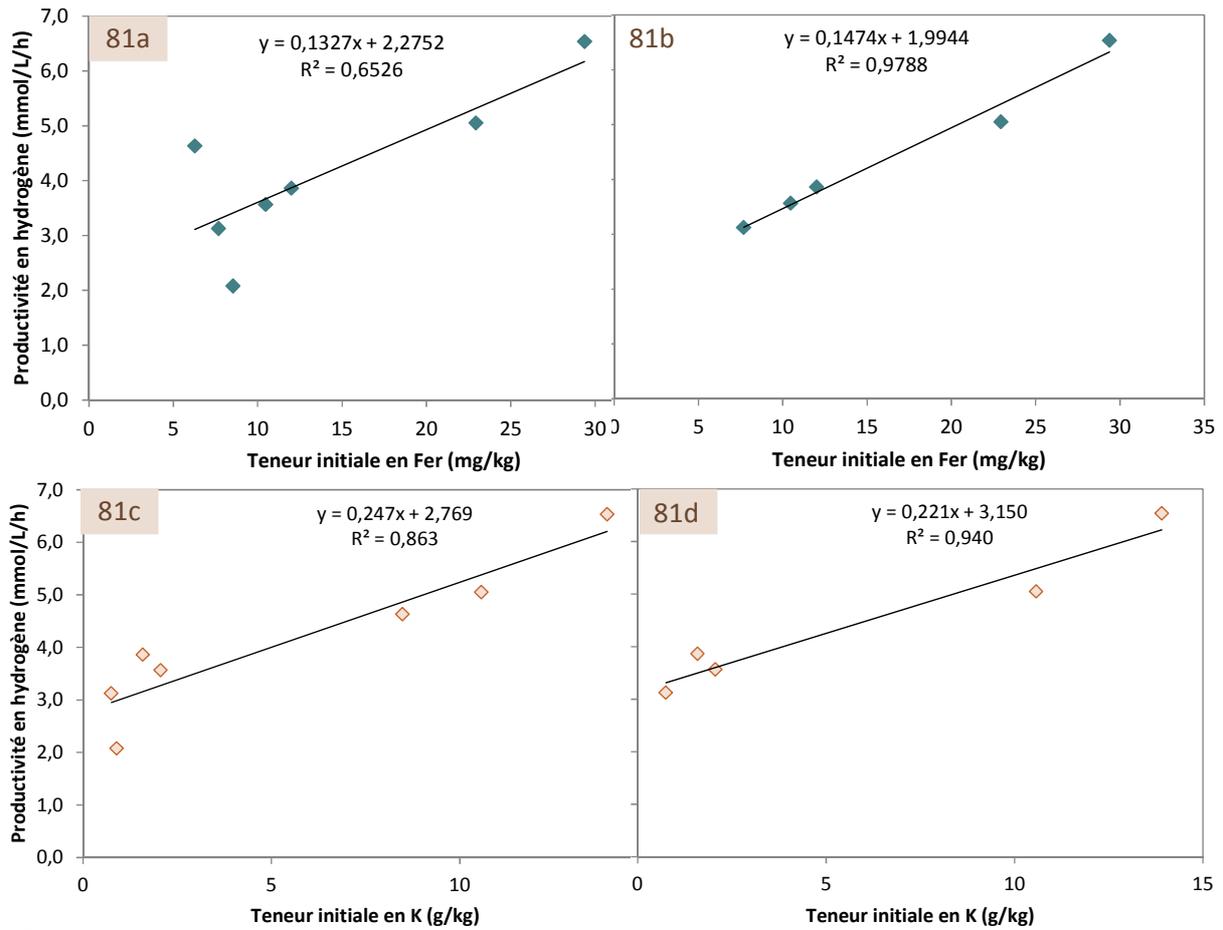


Figure 81 : Corrélation entre la productivité en hydrogène et la teneur initiale en fer et en potassium pour tous les cépages (a et c) et les cépages Muscat et Riesling exclus (b et d).

Le test de Pearson a permis d'établir des corrélations positives linéaires ($r = 0,989$ pour le fer et $r = 0,970$ pour le potassium sur cinq observations) significative au seuil de 1 %. La corrélation entre la teneur en fer et la productivité n'est pas surprenante puisque le fer est constitutif des hydrogénases et des ferredoxines, donc plus la teneur en fer mesurée dans les bourbes est élevée et plus il y a de fer de disponible notamment pour les hydrogénases ce qui tend à maximiser leur activité enzymatique.

Les teneurs initiales en fer et en potassium de la fraction totale peuvent donc expliquer les différences observées entre le terroir Alsace et Bourgogne. Toutefois, des tests complémentaires en faisant varier les teneurs initiales en fer et en potassium par exemple en supplémentant les biomasses de ces nutriments permettront de confirmer cette corrélation.

2.3. Influence de la variabilité annuelle sur la production d'hydrogène

Afin de vérifier que la potentialité des biomasses viticoles de type bourbes pour la production d'hydrogène de manière pérenne dans le temps, les résultats obtenus sur la composition des bourbes d'un même cépage (Pinot Gris) issues des vendanges 2013 et 2014 ont été comparés, ainsi que les performances de production d'hydrogène et les analyses métaboliques et microbiennes sur ce même cépage.

2.3.1 Caractérisation des matières des bourbes

La figure 82 représente la distribution des matières sèches (MS), matières volatiles (MV), matières minérales (Mi) et des matières en suspension (MES).

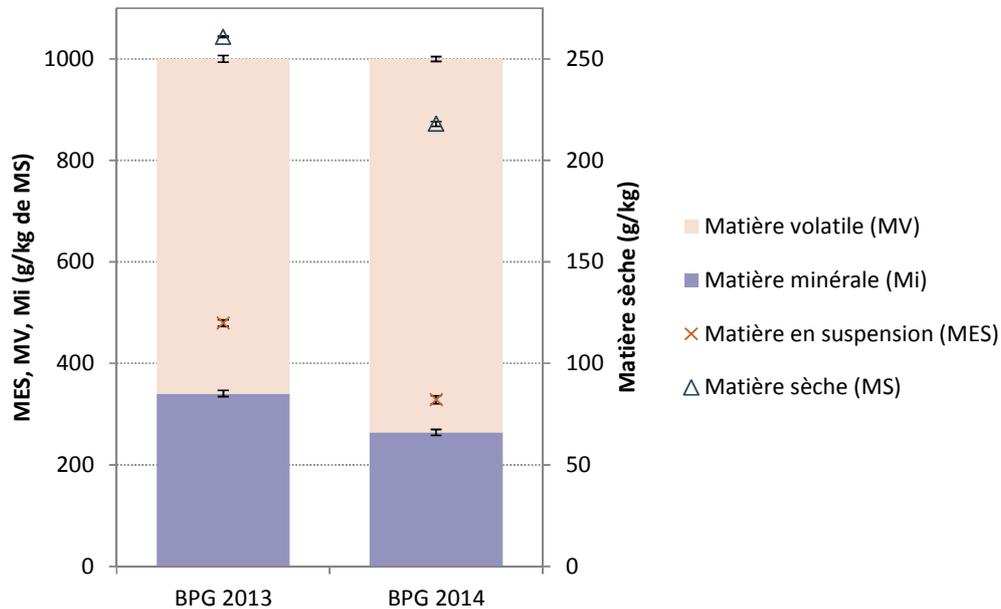


Figure 82 : Caractérisation des matières sèches, volatiles, minérales et en suspension des bourbes Pinot Gris (BPG) issues des vendanges 2013 et 2014.

La valeur de matières sèches des bourbes 2014 est significativement plus faible ($p < 0,05$; t-test) que celle de 2013 (respectivement 218 ± 1 g/kg contre 261 ± 1 g/kg). La répartition des matières en suspension, volatiles et minérales est significativement différente ($p < 0,02$; t-test) entre 2013 et 2014. En effet, la MS est constituée de 659 ± 7 g de MV/kg de MS et de 479 ± 6 g de MES/kg de MS en 2013 alors qu'elle est constituée de 736 ± 5 g de MV/kg de MS et de 328 ± 8 g de MES/kg de MS en 2014.

2.3.2 Caractérisation de la DCO des bourbes

La figure 83 représente la répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble ainsi que la composition de la DCO soluble en sucres, en alcools, en acides organiques et en protéines.

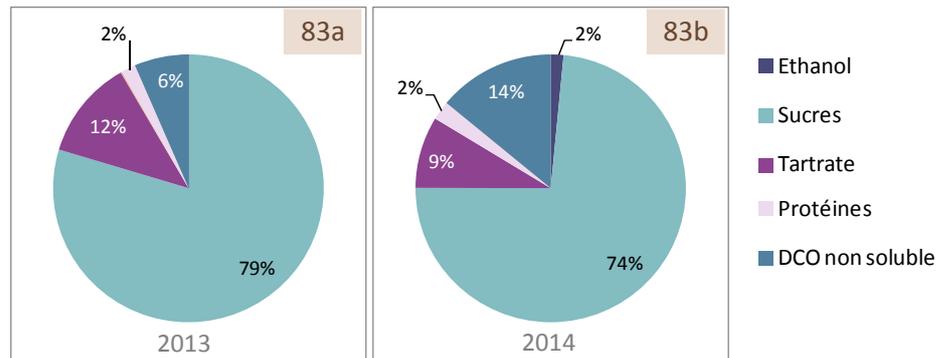


Figure 83 : Répartition de la DCO entre la fraction soluble et non soluble des bourbes Pinot Gris issues des vendanges 2013 (a) et 2014 (b) ; et composition biochimique de la DCO soluble.

La DCO totale des bourbes 2013 et 2014 est similaire ($p > 0,02$; t-test) avec en moyenne 253 ± 3 g/L, ce qui n'est pas tout à fait le cas de la DCO soluble (238 ± 1 g/L pour le lot 2013 contre 216 ± 12 g/L pour le lot 2014). En effet, la DCO soluble des bourbes 2013 et 2014 est composée principalement des sucres (79 % contre 74 %), puis du tartrate (12 % contre 9 %), des protéines à un même pourcentage (2 %) et de l'éthanol uniquement pour le lot 2014 (2 %). En revanche, la DCO non soluble est deux fois plus élevée pour les vendanges 2014 que 2013 (14 % contre 6 %).

2.3.3 Caractérisation de la teneur en protéines des bourbes

La figure 84 représente les teneurs en protéines des fractions solubles et totales des bourbes de différents cépages.

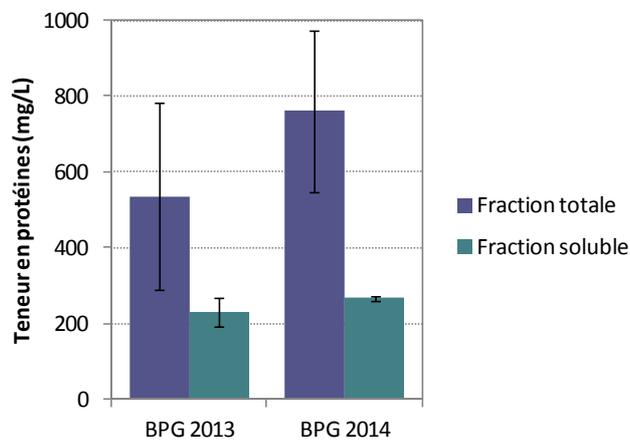


Figure 84 : Influence de l'année de vendange sur la teneur en protéines des fractions solubles et totales des bourbes Pinot Gris (BPG).

Les protéines issues de la fraction soluble des bourbes représentent 573 ± 7 % contre 35 ± 1 % des protéines totales pour respectivement 2013 et 2014. La teneur en azote organique est plus élevée pour les bourbes issues des vendanges 2014 (122 g/L) que celles issues de 2013 (86 g/L). On estime potentiellement que les micro-organismes sont les plus nombreux dans les bourbes 2014 que dans celles de 2013 (494 ± 220 g/L contre 305 ± 287 g/L).

2.3.4 Caractérisation de la composition élémentaire des bourbes

La figure 85 représente la répartition élémentaire des bourbes Pinot Gris 2013 et 2014 sur la fraction totale (figure 85a et 85c) et soluble (figure 85b et 85d). Quelle que soit l'année de vendange, les éléments principaux des fractions totales et solubles sont : le soufre (S), le phosphore (P), le calcium (Ca), le magnésium (Mg) et le potassium (K).

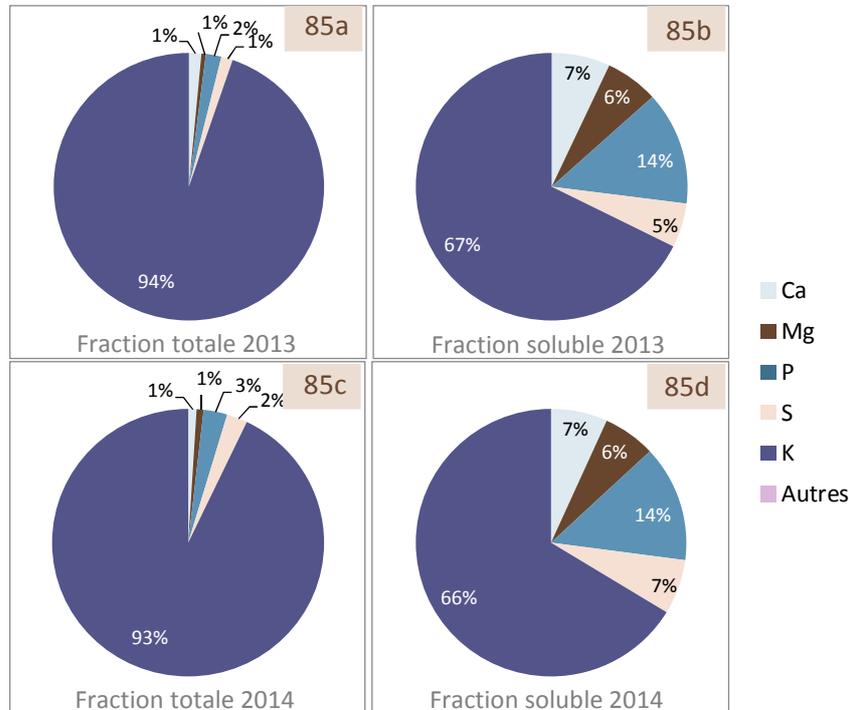


Figure 85 : Répartition élémentaire de la fraction totale (a et c) et soluble (b et d) des bourbes Pinot Gris 2013 (a et b) et 2014 (c et d).

Les bourbes issues des vendanges 2013 et 2014 ont une répartition élémentaire des fractions totale et soluble identiques. Les fractions totales sont composées majoritairement (94 % et 93 %) de potassium et minoritairement de phosphore, soufre, calcium et magnésium. Les fractions solubles sont composées également majoritairement de potassium mais plus faiblement que dans les fractions totales (67 % et 66 %), et minoritairement de phosphore (14 %), de calcium (7 %), de magnésium (6 %) et de soufre (5 % pour 2013 et 7 % pour 2014).

La figure 86 représente les concentrations en principaux macro- et micro-nutriments des fractions totales et solubles de chacune des bourbes Pinot Gris.

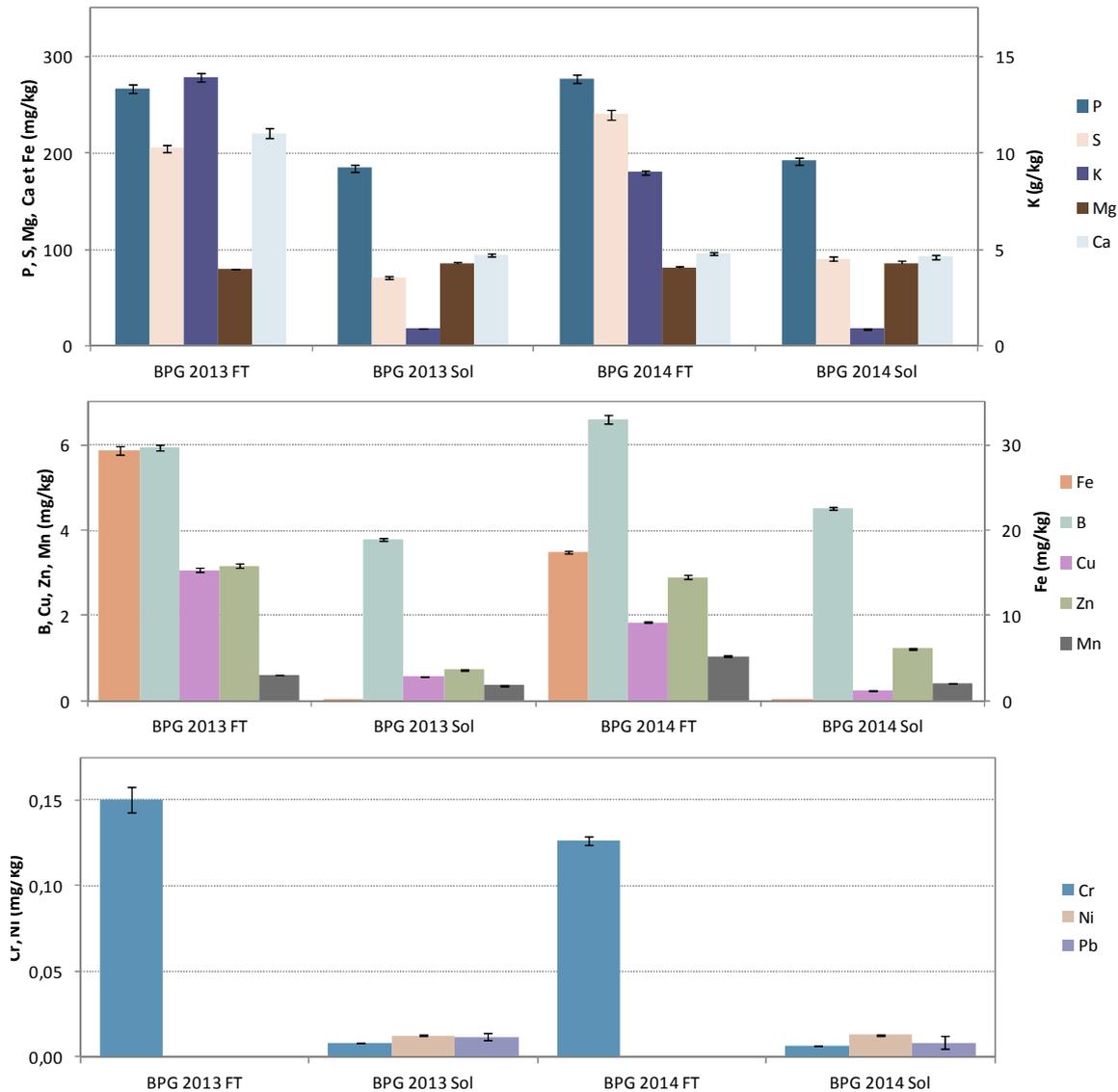


Figure 86 : Teneurs des macro- et micro-nutriments présents dans les fractions totales (FT) et solubles (Sol) des bourbes Pinot Gris (BPG) issues des vendanges 2013 et 2014.

Alors que les teneurs en macro- et micro-éléments diffèrent selon les fractions totales des bourbes de différents cépages, il est à noter que celles des fractions solubles sont similaires quelle que soit l'année de vendange et sont composées en moyenne de : 188 ± 5 mg/kg de P, 81 ± 13 mg/kg de S, 910 ± 4 mg/kg de K, $86,0 \pm 0,4$ mg/kg de Mg, de 93 ± 1 mg/kg de Ca, de $0,10 \pm 0,02$ mg/kg de Fe. Les teneurs en nutriments dans les fractions solubles sont inférieures à celles des fractions totales pour tous les éléments sauf le magnésium qui a des teneurs similaires. Les bourbes 2013 sont les plus riches en K ($13,9 \pm 0,2$ g/kg), en Ca (221 ± 5 mg/kg), en Fe ($29,4 \pm 0,5$ mg/kg), en Cu ($3,07 \pm 0,04$ mg/kg). En revanche, les bourbes 2014 sont les plus riches en S (240 ± 5 mg/kg) et Mn ($1,05 \pm 0,001$ mg/kg).

Les teneurs initiales en fer étant plus élevées lors des vendanges 2013 que 2014, on s'attend à obtenir une productivité en hydrogène plus élevée lors de la fermentation des bourbes Pinot Gris 2013 que celle des bourbes Pinot Gris 2014.

2.3.5 Influence de la variabilité annuelle sur les performances de production d'hydrogène

Le volume d'hydrogène produit au cours du temps a été mesuré individuellement pour chaque biomasse issue des vendanges 2013 et 2014. Une partie des biomasses a été stockée à 4°C avant fermentation dont la durée est notée entre parenthèses alors qu'une autre partie a été congelée. Les courbes obtenues à partir de ces biomasses présentent toutes une allure typique d'une croissance microbienne et de production de métabolites en mode non continu (figure 86).

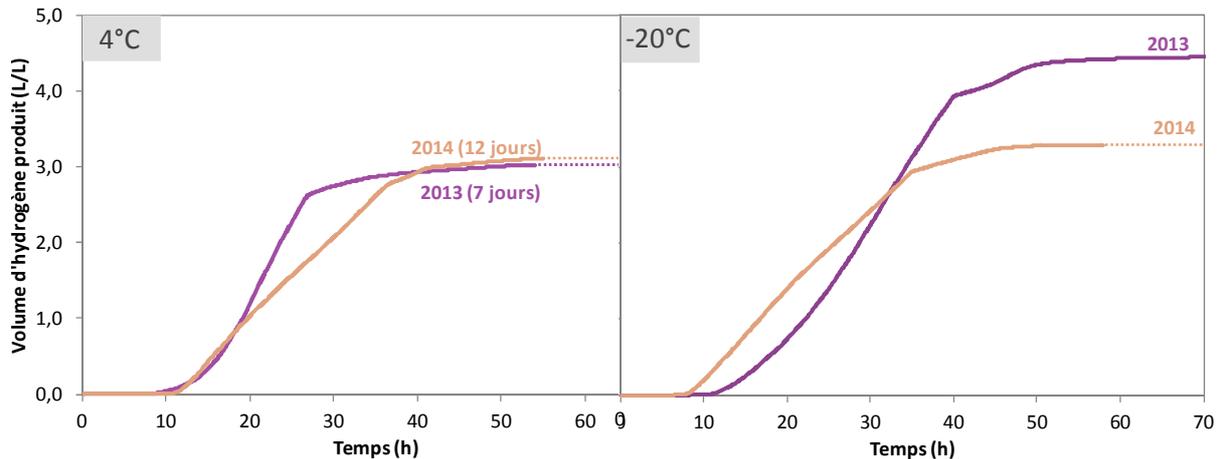


Figure 86 : Volume cumulé d'hydrogène produit au cours du temps à partir des bourbes Pinot Gris issues des vendanges 2013 et 2014 stockées à 4°C ou à -20°C.

Les temps de latence sont compris entre 9 h et 11 h lorsque les biomasses sont réfrigérées alors qu'ils sont variables (entre 7 h et 11 h) lorsque les bourbes sont congelées. Lorsque les bourbes Pinot Gris sont stockées à 4°C (figure 30), le volume final d'hydrogène produit est similaire quelle que soit l'année (en moyenne $3,0 \pm 0,2$ L/L), même si la productivité diffère selon l'année des vendanges (2013 > 2014). En revanche, lorsque les bourbes Pinot Gris sont stockées à -20°C, le volume final d'hydrogène produit varie entre 3,3 L/L pour 2014 et 4,4 L/L pour 2013.

La figure 87 représente les performances de production d'hydrogène des bourbes Pinot Gris stockées à 4°C (à gauche du trait jaune) et à -20°C (à droite), issues des vendanges 2013 et 2014.

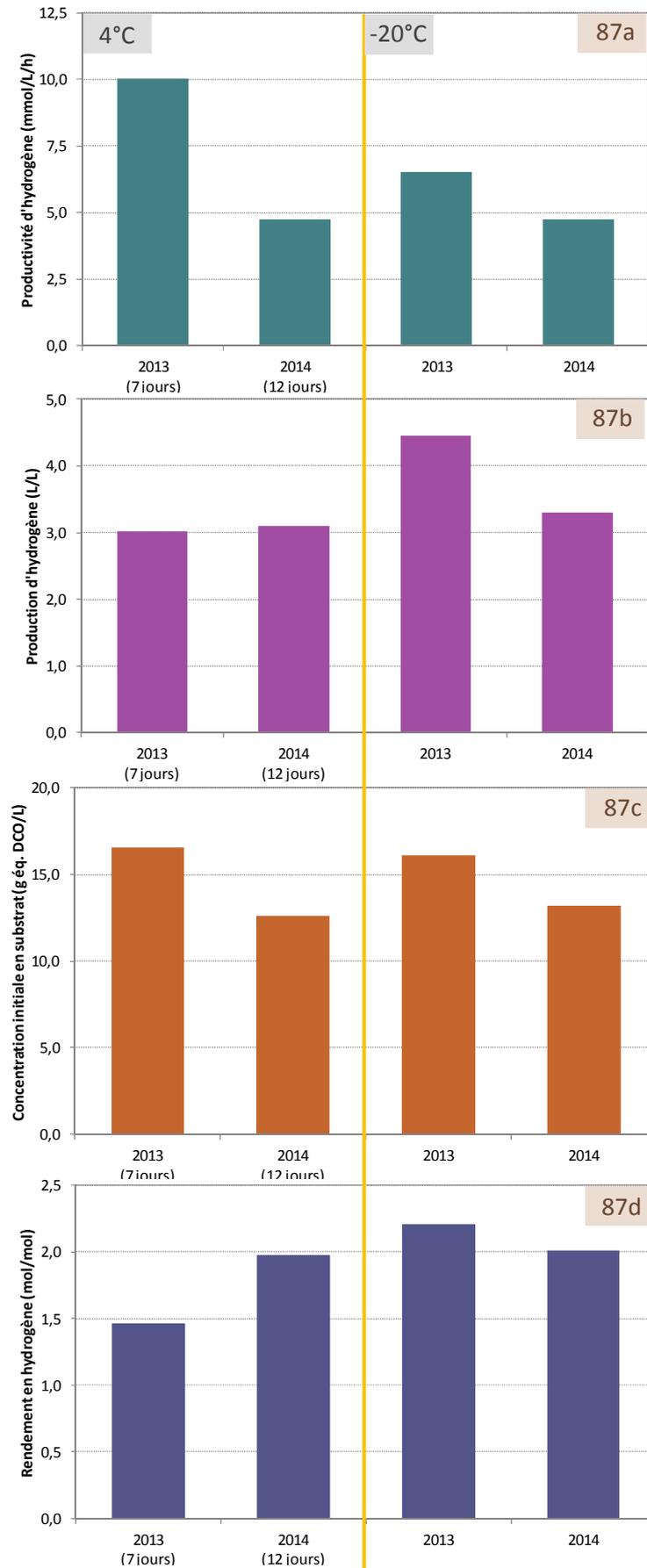


Figure 87 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des biomasses Pinot Gris issues des vendanges 2013 et 2014 : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

Les résultats de la figure 87a indiquent que les bourbes Pinot Gris 2013 ont obtenu les meilleures productivités en hydrogène et de façon significative ($p < 0,05$; t-test), qu'elles aient été congelées ou non : respectivement 10,04 et 6,53 mmol/L/h. Comme cela a été observé dans les paragraphes précédents (V.2.1 et V.2.2), la vitesse de production d'hydrogène obtenue à partir des bourbes congelées est inférieure à celle obtenue à partir des bourbes réfrigérées pour le lot 2013 alors que l'on observe une productivité quasi identique pour le lot 2014. Ceci s'explique non seulement par des teneurs initiales en sucres (figure 87c) et en fer (fraction totale des bourbes brutes) plus faible obtenues lors des vendanges 2014 par rapport à celles 2013.

Les résultats de la figure 87b indiquent des volumes de production d'hydrogène comparables ($p > 0,05$; t-test) entre les bourbes réfrigérées 2013, 2014 et les bourbes congelées 2014 (en moyenne $3,1 \pm 0,1$ L/L), alors que les bourbes 2013 congelées ont obtenu la meilleure production en hydrogène (4,4 L/L). Comme remarqué précédemment, la congélation des biomasses impacte uniquement et de manière significative ($p < 0,05$; t-test) la production en hydrogène pour l'année 2013.

Les résultats de la figure 87c montrent que la concentration initiale en substrat est supérieure pour l'année 2013 comparativement à celle de 2014. En revanche, ces concentrations initiales en substrat ne permettent pas d'expliquer les volumes de production obtenus comme dans les paragraphes précédents.

Les résultats de la figure 87d indiquent une variabilité annuelle non significative ($p > 0,05$; t-test) sur les rendements en hydrogène obtenus par les biomasses congelées (en moyenne $2,11 \pm 0,14$ mol/mol). Le rendement en hydrogène obtenu par la biomasse réfrigérée 2013 diffère de celui obtenu de 2014. Le plus faible rendement en hydrogène obtenu par les bourbes réfrigérées 2013 indique potentiellement la présence de bactéries concurrentes aux bactéries productrices d'hydrogène pour le substrat.

2.3.6 *Influence de la variabilité annuelle sur le métabolisme*

La distribution des métabolites produits en fin de fermentation de chaque biomasse est représentée sur la figure 88. Les bilans de matières DCO calculés sont complets et représentés sur l'annexe 6.

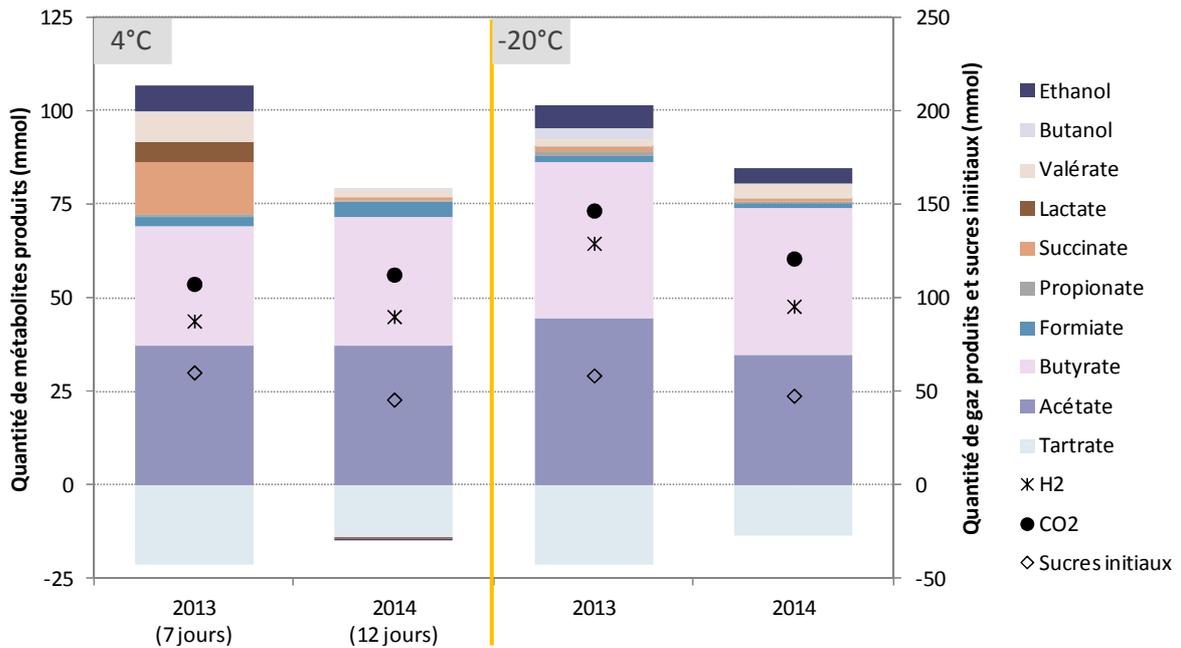


Figure 88 : Quantités de métabolites et de gaz produits à partir des bourbes Pinot Gris stockées à 4°C et -20°C pour les vendanges 2013 et 2014.

L'acétate et le butyrate sont les deux métabolites majoritairement produits quelle que soit l'année de vendange.

Entre 2013 et 2014, seuls les métabolites secondaires produits divergent. En 2013, les bourbes réfrigérées produisent une quantité de métabolites secondaires très élevées comparées à 2014. Cela se traduit par des quantités non négligeables de succinate (14,1 mmol), valérate (7,7 mmol), éthanol (7,0 mmol) et lactate (5,3 mmol), alors que ces métabolites produits par la biomasse 2014 sont très minoritaires (< 2,0 mmol et majoritairement du formiate). Pour ce qui est des biomasses congelées, l'éthanol (6,2 mmol) est le métabolite majoritairement produit du réseau secondaire de 2013 alors que cet alcool (3,8 mmol) est accompagné du valérate (3,9 mmol) en 2014. Enfin, on remarque que la teneur initiale en tartrate est plus faible en 2014 qu'en 2013 (respectivement, 19,4 mmol/L contre 30,3 mmol/L).

2.3.7 Structure des communautés microbiennes par séquençage

Le séquençage Illumina a été réalisé sur les échantillons 2013 et 2014, congelés ou non, à des temps de fermentation correspondant aux maxima ou proches des maxima de production d'hydrogène. La classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes issues des vendanges 2013 et 2014 est représentée sur la figure 89.

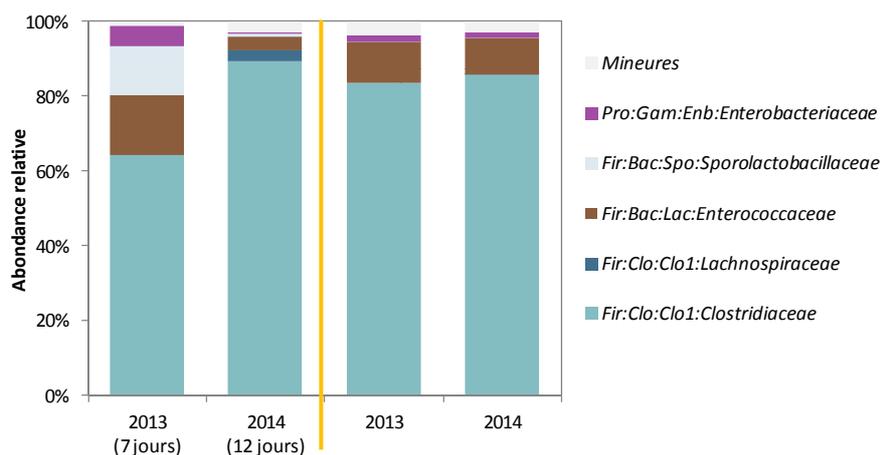


Figure 89 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes Pinot Gris issues des vendanges 2013 et 2014. Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

La classification taxonomique au niveau de la famille permet, d'une part, de montrer que la famille des *Clostridiaceae* est majoritaire quelle que soit l'année de vendange. D'autre part, cette classification montre une plus grande variabilité au niveau des familles microbiennes minoritaires. *Sporolactobacillaceae* (13,2 %) et *Enterococcaceae* (15,8 %) sont les familles minoritaires caractéristiques des bourbes 2013 stockées à 4°C. C'est également pour cette biomasse que l'abondance relative des *Clostridiaceae* est la plus faible (64,4 %) alors que pour les bourbes 2014 stockées à 4°C, elle est la plus élevée (89,5 %). Ainsi, pour cette dernière, les familles minoritaires ne représentent pas plus de 3,8 % d'abondance relative. Enfin, la répartition des populations microbiennes des biomasses congelées 2013 et 2014 est quasiment identique : 11,0 % et 9,7 % d'abondances relatives pour la famille minoritaire *Enterococcaceae*, et, 83,6 % et 85,9 % pour la famille dominante (*Clostridiaceae*).

L'affiliation des séquences représentative des principaux OTUs à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 13.

Tableau 13 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des bourbes issues des vendanges 2013 et 2014.

	Similarité	2013 (7 jours)	2014 (12 jours)	2013	2014
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5%	33,7%	34,4%	44,8%	35,9%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,6%	1,5%	45,5%	16,8%	25,2%
<i>Clostridium</i> sp.	98,7%	19,9%	3,8%	15,6%	23,0%
<i>Clostridium pasteurianum</i>	100,0%	9,2%	< 0,1%	4,8%	< 0,1%
<i>Clostridium perfringens</i>	100,0%	-	4,6%	< 0,1%	0,2%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	15,8%	3,8%	11,0%	9,7%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	13,2%	0,8%	0,1%	0,1%
<i>Klebsiella/Enterobacter/Proteus</i>	99,6%	5,6%	0,1%	1,6%	1,2%
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0%	< 0,1%	1,3%	1,5%	1,7%
<i>Anaerospobacter mobilis</i>	99,5%	-	2,8%	-	< 0,1%

Le séquençage révèle que les bourbes des deux années ont une espèce dominante commune : *Clostridium* spp. (*beijerinckii*, *butyricum*, *diolis*, *roseum*) avec les abondances relatives respectives de 33,7 % pour 2013 (7 jours), 34,4 % pour 2014 (12 jours), 44,8 % pour 2013 et 35,9 % pour 2014. Seules les bourbes 2014 (12 jours) sont co-dominées avec l'espèce *Clostridium intestinale* (45,5 %). Les espèces sous-dominantes appartenant à la famille *Clostridiaceae* sont identifiées différemment en fonction des années : pour les bourbes réfrigérées, *Clostridium* sp. (19,9 %) et *Clostridium pasteurianum* (9,2 %) pour 2013 (7 jours) ; et pour les bourbes congelées, *Clostridium intestinale* (16,8 % et 25,2 %) et *Clostridium* sp. (15,6 % et 23,0 %) pour 2013 et 2014. En ce qui concerne les familles minoritaires *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* et *Sporolactobacillaceae*, elles sont représentées par les espèces : *Streptococcus* spp. (*lutetiensis*, *infantarius*, *equinus*), *Enterococcus villorum* et *Sporolactobacillus laevolacticus*.

2.3.8 Discussion

Notre étude a montré que la concentration initiale en sucres pouvait être différente d'une année à l'autre (la concentration initiale en sucres de 2013 était 23 % plus élevée qu'en 2014). L'étude des performances de production d'hydrogène a montré que la productivité et la production en hydrogène sont corrélables à la teneur en hexose initial donnant lieu à des rendements équivalents, à l'exception de l'échantillon de bourbes 2013 réfrigérées pour lequel, malgré une productivité en hydrogène la plus élevée, le rendement est 25 % plus faible que celui des autres échantillons.

La comparaison des bourbes réfrigérées montre une similitude de l'abondance relative des bactéries productrices d'hydrogène, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) entre 2013 et 2014, respectivement, 33,7 % et 34,4 %, et ce, malgré des concentrations initiales en sucres légèrement plus faibles pour 2014 ($12,9 \pm 0,4$ g éq. DCO/L contre $16,4 \pm 0,3$ g éq. DCO/L pour 2013). La diversité des métabolites produits observée explique les rendements en hydrogène obtenus : plus la quantité de métabolites secondaires est importante et plus le rendement en hydrogène est faible. Cette diversité est à relier aux espèces microbiennes appartenant à d'autres genres bactériens que celui *Clostridium*. Ainsi, les abondances relatives des espèces *Enterococcus villorum*, *Sporolactobacillus laevolacticus* et *Enterobacteriaceae* sont de 15,8 % ; 13,2 % ; 5,6 % en 2013, associées à une quantité totale de métabolites secondaires élevées (37,8 mmol), alors qu'elles sont de 3,8 % ; 0,8 % ; 0,8 % en 2014 et sont associées à une quantité faible de métabolites secondaires (6,8 mmol).

La comparaison des bourbes congelées montre une abondance relative de la bactérie responsable de la production d'hydrogène, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*), plus élevée en 2013 qu'en 2014 (44,8 % contre 35,9 %), ce qui explique les meilleures performances (notamment de rendement) de production obtenues en 2013. Le rapport butyrate/acétate obtenu en 2014 montre un léger excès de butyrate (1,13) alors que c'est l'inverse en 2013 (0,94). La similitude des métabolites secondaires produits en 2013 et 2014 se retrouve à travers les espèces bactériennes minoritaires

Enterococcus villorum, *Sporolactobacillus laevolacticus* et *Enterobacteriaceae*.

La variabilité annuelle se joue majoritairement sur : les teneurs initiales en sucres et en fer ce qui a pour conséquence d'impacter la productivité en hydrogène ; les bactéries minoritaires produisant les métabolites secondaires ce qui a pour conséquence d'impacter le rendement en hydrogène. Toutefois, l'année de vendange n'a pas d'influence sur les bactéries productrices d'hydrogène via la voie butyrate, et donc n'a pas ou peu d'influence sur les volumes d'hydrogène produit. Ces résultats montrent que d'une année sur l'autre, une production d'hydrogène minimale de $3 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$ soit $42 \text{ L/L}_{\text{bourbes}}$ est assurée avec des variations notables sur la productivité fonction des teneurs initiales en sucres et en fer, déterminantes dans la dynamique d'un fonctionnement en continu.

3. Influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘marcs’ sur la production d’hydrogène

Avec la même approche que celle utilisée pour les bourbes, les performances sur la biomasse ‘marcs’ ont été testées en fonction du terroir (Alsace, Bourgogne), des différents cépages, du mode de culture et de la variabilité annuelle avec analyse de la distribution des métabolites et des structures microbiennes endogènes à la biomasse. La spécificité de la biomasse ‘marcs’ en plus du fait qu’elle soit solide est qu’elle est constituée de matières lignocellulosiques (rafles), composés connus dans la littérature (Quéméneur *et al.*, 2008) comme étant inhibiteurs de la production d’hydrogène. Un test de fermentation dans lequel la biomasse ‘marcs’ a été déraflée sera comparé au test réalisé à partir d’une biomasse avec rafles. Enfin, une comparaison entre les marcs/bourbes en termes de production, productivité et de rendement en hydrogène sera effectuée.

3.1. Influence du cépage et du mode de culture sur la production d’hydrogène

3.1.1 Influence du cépage et mode de culture sur les performances de production d’hydrogène

Le volume d’hydrogène produit au cours du temps a été mesuré pour chaque cépage et mode de culture différents. Les biomasses ‘marcs’ issues de la région Alsace (A) sont : Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling, Muscat et Auxerrois ; et celles issues de la région Bourgogne (B) sont: Aligoté, Pinot Noir, Pinot Noir/Chardonnay et Chardonnay (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique). Les biomasses ont été stockées à -20°C avant fermentation. Les courbes obtenues à partir de ces biomasses présentent toutes une allure typique d’une croissance microbienne et de production de métabolites en mode non continu (figure 90).

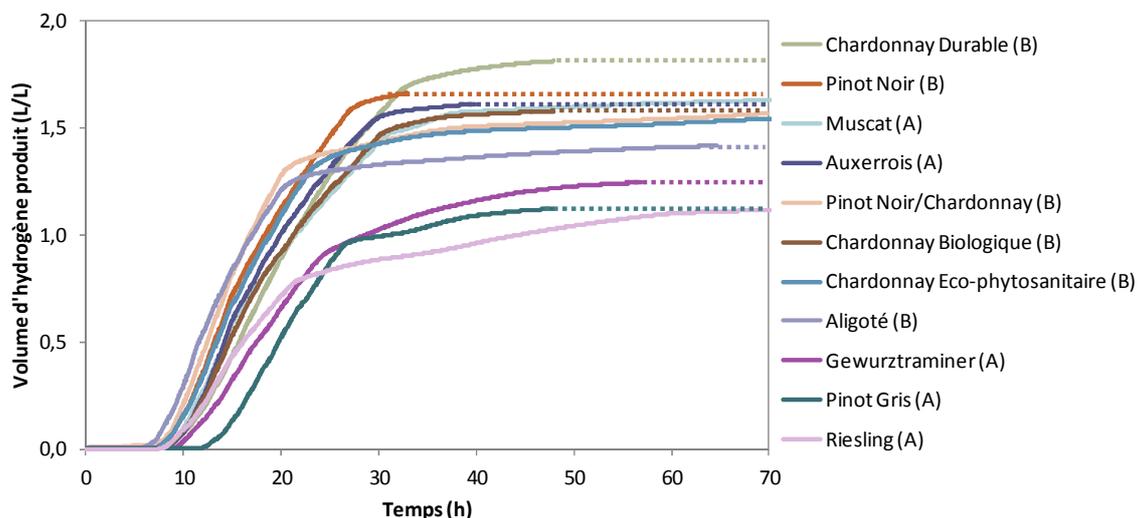
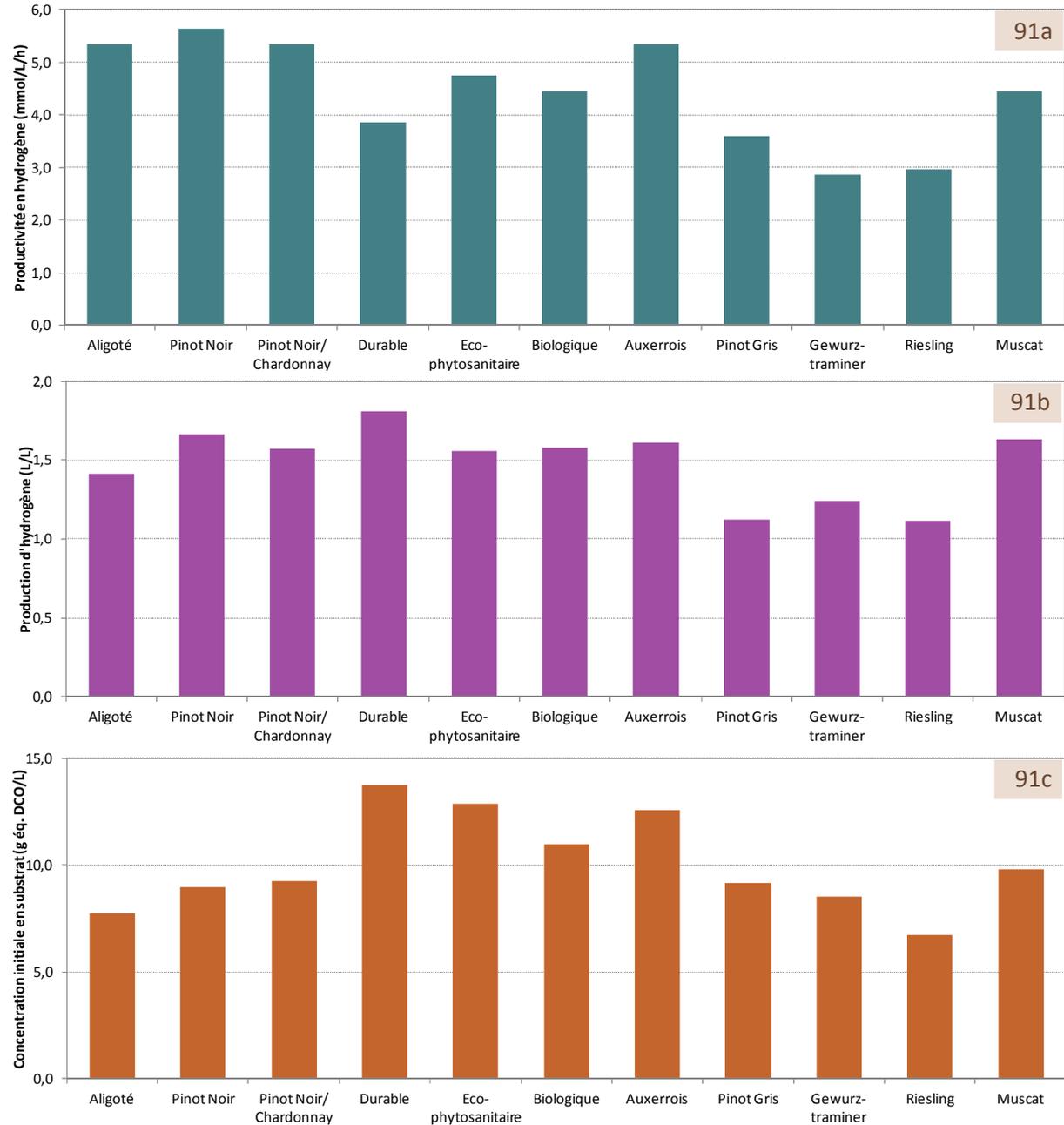


Figure 90 : Volume cumulé d’hydrogène produit au cours du temps à partir des biomasses ‘marcs’ de cépages et de modes de cultures différents, provenant des terroirs d’Alsace (A) et de Bourgogne (B).

De la même manière que pour les bourbes, les courbes de production d’hydrogène à partir des marcs se décomposent en trois phases. Le temps nécessaire à la biomasse microbienne pour s’adapter aux conditions environnementales est compris entre 6,5 h (Aligoté) et 12 h (Pinot Gris). Ce temps d’adaptation est globalement plus long pour trois des cépages alsaciens (Pinot Gris, Gewurztraminer et

Riesling). Puis, lors de la deuxième phase, on observe des productivités en hydrogène différentes en fonction des cépages et en fin de fermentation, différents volumes totaux d'hydrogène produit.

La figure 91 représente les performances de production d'hydrogène obtenues par les marcs de différents cépages et modes de culture.



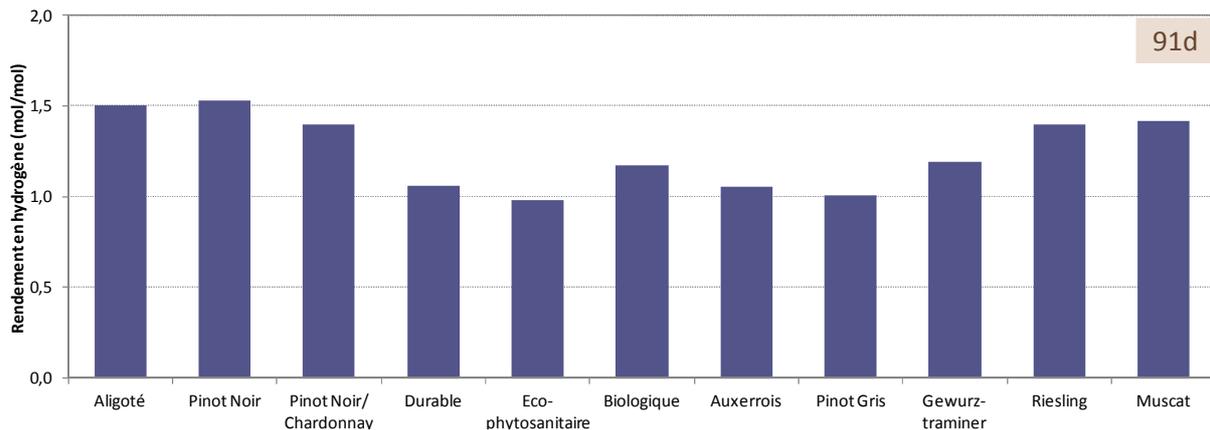


Figure 91 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des marcs pour différents cépages et modes de culture : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

Les résultats de la figure 91a indiquent qu'il y a trois niveaux de productivité en hydrogène : les productivités les plus élevées sont obtenues par les cépages Auxerrois, Aligoté, Pinot Noir, Pinot Noir/Chardonnay (en moyenne $5,4 \pm 0,2$ mmol/L/h) ; les productivités les plus faibles sont obtenues par les cépages Gewurztraminer et Riesling (en moyenne $2,92 \pm 0,07$ mmol/L/h) ; et enfin les productivités intermédiaires sont en moyenne de $4,2 \pm 0,5$ mmol/L/h et sont obtenues par les cépages Pinot Gris, Muscat et Chardonnay (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique).

Les résultats de la figure 91b indiquent qu'il y a deux niveaux de volume d'hydrogène produit : les volumes d'hydrogène produit les plus élevés comprennent les cépages Auxerrois, Aligoté, Pinot Noir, Pinot Noir/Chardonnay, dont les vitesses de production sont les plus élevées, mais aussi, Muscat et les trois Chardonnay (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique) avec une moyenne de $1,6 \pm 0,1$ L/L ; les volumes d'hydrogène produit les plus faibles comprennent les cépages Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling et sont en moyenne de $1,2 \pm 0,1$ L/L dont deux de ces échantillons présentaient une productivité faible.

Les résultats de la figure 91c indiquent que les marcs Auxerrois et Chardonnay (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique) sont les plus chargés en substrat (en moyenne 13 ± 1 g éq. DCO/L après dilution dans le bioréacteur), alors que les autres marcs sont moins chargés (en moyenne 9 ± 1 g éq. DCO/L).

Les résultats de la figure 91d indiquent que les meilleurs rendements en hydrogène sont obtenus par les marcs les moins chargés initialement en sucres et sont les cépages Aligoté, Pinot Noir, Pinot Noir/Chardonnay, Muscat et Riesling (en moyenne $1,45 \pm 0,06$ mol/mol), alors que les plus faibles rendements (en moyenne $1,08 \pm 0,09$ mol/mol) sont obtenus par les marcs les plus chargés initialement en sucres, c'est-à-dire, les cépages Auxerrois et Chardonnay (Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique), mais également les cépages Pinot Gris et Gewurztraminer.

3.1.2 Influence du cépage et du mode de culture sur le métabolisme

La distribution des métabolites produits en fin de fermentation pour les marcs Pinot Gris, Muscat, Gewurztraminer, Riesling et Chardonnay est représentée sur la figure 92. Les métabolites des marcs Auxerrois, Aligoté, Pinot Noir et Pinot/Chardonnay n'ayant pas fait l'objet du même protocole d'analyse (GC-FID (alcools) et HPLC-UV (acides C2 à C5)) ne sont pas représentés sur cette figure. Pour les marcs Pinot Gris, Muscat, Gewurztraminer, Riesling et Chardonnay, les bilans de matière sont compris entre 50 et 74 % (annexe 7).

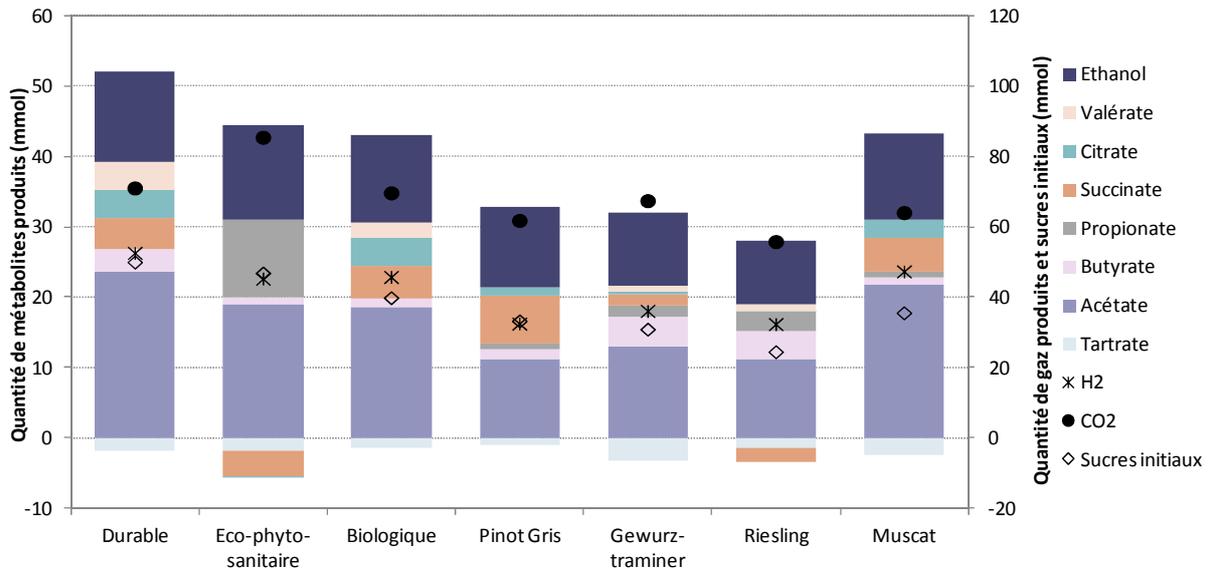


Figure 92 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des biomasses 'marcs' de différents cépages.

L'acétate et l'éthanol sont les deux métabolites majoritairement produits par tous les marcs. Par ailleurs, on remarque que les marcs Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling ont produit les quantités les plus faibles d'acétate (respectivement, 11,2 mmol ; 12,9 mmol ; 11,8 mmol), conjuguées aux plus faibles productions en hydrogène (respectivement 31,7 mmol ; 36,2 mmol ; 32,5 mmol). Le réseau secondaire de métabolites produits est différent selon les cépages et est composé de succinate, de butyrate, de citrate, de propionate de valérate. Trois réseaux métaboliques minoritaires se distinguent : les marcs Pinot Gris et Muscat utilisent un réseau constitué des voies principales succinate (6,8 mmol et 4,8 mmol) et citrate (1,0 mmol et 2,6 mmol) et de la voie plus minoritaire butyrate (1,4 mmol et 1,1 mmol) ; les marcs Chardonnay Durable et Biologique constitués des mêmes métabolites (succinate : 4,4 mmol et 4,6 mmol ; citrate : 4,0 mmol et 4,0 mmol ; butyrate : 3,3 mmol et 1,2 mmol) avec en plus la voie valérate (respectivement 4,0 mmol et 2,2 mmol) ; les marcs Chardonnay Eco-phytosanitaire, Gewurztraminer et Riesling utilisent un réseau constitué des voies minoritaires principales de propionate (11,0 mmol ; 1,7 mmol et 2,8 mmol) et butyrate (1,0 mmol ; 4,2 mmol et 4,0 mmol). Par ailleurs, on note que le tartrate et le succinate présents initialement (respectivement entre 1,0 mmol et 3,3 mmol, et entre 0,3 mmol et 5,2 mmol) sont entièrement consommés.

3.1.3 Structure des communautés microbiennes par séquençage

Les structures des communautés microbiennes des cépages Muscat, Chardonnay Eco-phytosanitaire et Pinot Gris, représentatifs respectivement des deux types de réseaux secondaires succinate/citrate/butyrate et propionate/butyrate, ont été analysées par séquençage. L'affiliation des séquences représentatives des OTUs majoritaires à l'espèce ou au genre microbien le plus proche est présentée dans le tableau 14.

Tableau 14 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation des tests 'marcs Pinot Gris', 'marcs Muscat' et 'marcs Chardonnay Eco-phytosanitaire'.

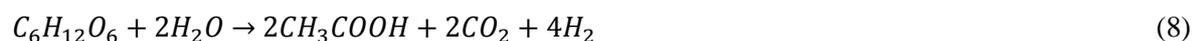
	Similarité	Pinot Gris	Muscat	Chardonnay Eco-phytosanitaire
<i>Klebsiella/Enterobacter/Proteus</i>	99,7 %	98,0 %	99,8 %	98,9 %
<i>Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)</i>	99,5 %	0,33 %	0,06 %	0,37 %

Le séquençage des marcs Muscat, Chardonnay Eco-phytosanitaire et Pinot Gris révèle une structure de communauté microbienne très simple et identique : la séquence représentative de l'OTU dominant est affiliée à la famille *Enterobacteriaceae* et plus précisément aux genres *Klebsiella/Enterobacter/Proteus* avec les abondances relatives respectives de 99,8 %, 98,9 % et 98,0 %. Ces résultats sont assez surprenants. En effet, les réseaux métaboliques secondaires et la quantité d'acétate produit par les marcs Muscat et Chardonnay Eco-phytosanitaire étant différents, on s'attendait à avoir des populations bactériennes plus diverses. Les différences s'expliquent sûrement au niveau des espèces qui ne peuvent malheureusement pas être différenciées ici à partir du séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S.

Parmi les bactéries minoritaires, *Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)* a été identifié comme le genre bactérien principal avec des abondances relatives comprises entre 0,06 % et 0,37 %. Ce genre a été identifié dans le chapitre IV comme étant le phylotype bactérien producteur d'hydrogène dans les biomasses 'bourbes'.

3.1.4 Discussion sur les performances de production d'hydrogène des biomasses 'marcs'

Le réseau métabolique principal obtenu par les marcs (acétate et éthanol) est caractéristique des bactéries entériques hétérofermentaires (Hallenbeck, 2002), ce qui a été confirmé par le séquençage. En effet, 98,0 %, 99,8 % et 98,9 % respectivement pour les marcs Pinot Gris, Muscat et Chardonnay Eco-phytosanitaire, sont les abondances relatives des séquences affiliées à la famille des *Enterobacteriaceae*, et plus précisément aux bactéries : *Klebsiella spp. (oxytoca, michiganensis, pneumoniae)*, *Enterobacter cancerogenus*, *Proteus vulgaris*. Le cépage n'a donc pas d'influence sur la composition microbienne (au niveau de la famille), ni sur le métabolisme global (acétate et éthanol). La production d'hydrogène à partir des marcs est réalisée exclusivement via la voie acétate (équation 8).



La teneur initiale en sucres étant différente pour chacun des marcs (6,8 à 13,8 éq. DCO/L), il est difficile de savoir si le cépage ou le mode de culture a une influence sur la productivité en hydrogène et le volume d'hydrogène produit, ces performances étant corrélées à la concentration initiale en sucres (chapitre IV). Les rendements en hydrogène étant identiques pour les marcs Chardonnay, cela indique que le mode de culture n'a pas d'influence sur la production d'hydrogène, malgré les différences observées au niveau des métabolites minoritairement produits : propionate pour les marcs Eco-phytosanitaire alors que les marcs Biologique et Durable produisent du citrate, succinate et valérate. En revanche, les rendements en hydrogène obtenus par les marcs de différents cépages montrent l'influence du cépage sur le volume d'hydrogène produit associé à la production de différents métabolites minoritaires. Aucune corrélation entre le type de métabolites minoritairement produits et le volume d'hydrogène produit n'a pourtant été établie. Bien que la teneur initiale en succinate (du milieu réactionnel) soit plus élevée (comprise entre 5,3 et 7,5 mmol/L) pour les marcs Chardonnay, Gewurztraminer et Riesling comparée aux marcs Pinot Gris et Muscat (respectivement, 0,5 mmol/L et 1,2 mmol/L), il n'y a pas non plus d'orientation métabolique minoritaire « type ». En effet, à teneurs initiales similaires de 7,3 mmol/L et 7,5 mmol/L pour respectivement les marcs Chardonnay Durable et Riesling, l'orientation métabolique minoritaire diffère vers la production de citrate, succinate, valérate et butyrate pour le premier cépage et vers la production de propionate et de butyrate pour le second. La production de métabolites tels que le citrate et le succinate, en conditions anaérobies, est caractéristique des *Enterobacteriaceae* ayant la capacité de convertir le glucose en oxaloacétate (figure 93) à son tour converti en citrate et/ou succinate (Lengeler *et al.*, 2009). Le succinate peut alors être converti en propionate et en dioxyde de carbone (équation 9). Selon Thauer (1977), le valérate est produit à partir de propionate, d'hydrogène et de dioxyde de carbone (équation 10) ; ce qui est certainement le cas dans les tests de fermentation pour lesquels du valérate a été quantifié.

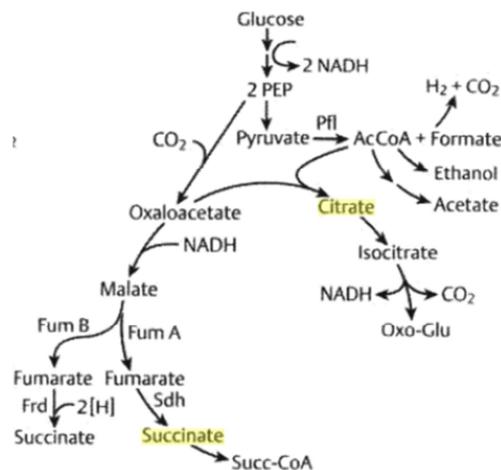
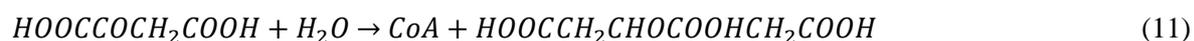


Figure 93 : Production de citrate et de succinate par les *Enterobacteriaceae* en anaérobiose, d'après Lengeler *et al.*, 2009.

Par ailleurs, on remarque que les tests ayant produit du citrate ont un rapport molaire H_2/CO_2 plus élevé que ceux n'en ayant pas produit. Par exemple, les marcs Chardonnay Durable et Muscat ont produit respectivement 4,0 mmol et 2,6 mmol de citrate et ont un rapport molaire H_2/CO_2 de 0,74, alors que les marcs Pinot Gris et Riesling ont produit respectivement 1,24 mmol et 0,16 mmol et ont un rapport molaire H_2/CO_2 de 0,53 et 0,58. Ceci peut s'expliquer grâce à l'équation de production du citrate (équation 11). En effet, la production de citrate ne libère pas de CO_2 contrairement à la conversion du succinate (initialement présent) en propionate.



Alors que les métabolites majoritairement produits (acétate et éthanol) lors de la fermentation des marcs, sont cohérents avec l'identification bactérienne réalisée grâce au séquençage de *Enterobacteriaceae* avec une abondance relative élevée (entre 98,0 et 99,8 %), confirmant la production d'hydrogène via la voie acétate, la production mineure de butyrate est vraisemblablement liée à la présence minoritaire de la famille *Clostridium* (0,08 % à 0,46 %) identifiée au chapitre précédent comme responsable de la production d'hydrogène via la voie butyrate lors de la fermentation de la biomasse 'bourbes'.

Il est assez surprenant de voir que des rendements en hydrogène sont non représentatifs des métabolites produits. L'hypothèse suivante peut expliquer ces observations : les marcs étant solides, les sucres initiaux ont été quantifiés après leur extraction par ultrasons. Cette méthode a le désavantage d'extraire des molécules de sucres solubles supplémentaires qui n'auraient pas été extraites dans le fermenteur par simple agitation. Par conséquent, la concentration initiale en sucres est majorée et donc le rendement en hydrogène est minoré. De plus, l'extraction de ces autres molécules de sucres peut être plus ou moins importante selon la nature des marcs (quantité de rafles, grosseur des grains, quantité des pépins,...), ce qui a pour conséquence une représentativité partielle des concentrations initiales en substrat, et donc du lien avec les performances de production d'hydrogène. Cela peut expliquer pourquoi les rendements en hydrogène obtenus, compris entre 1,0 et 1,5 mol/mol sont dans une fourchette basse comparativement à ceux obtenus pour les bourbes ($1,97 \pm 0,27$ mol/mol obtenu à partir des bourbes de même cépage que les marcs présentés dans ce paragraphe) ; mais cependant largement supérieurs (55 ± 15 mL- H_2 /g_{matière sèche}) à ceux obtenus (1 mL- H_2 /g_{matière sèche}) sur le même type de biomasse (broyats de marcs de raisin) avec l'utilisation d'un consortium microbien exogène prétraité (Guo *et al.*, 2014).

3.2. Influence de la variabilité annuelle et impact des rafles sur la production d'hydrogène

L'influence de la variabilité annuelle a été testée sur trois années de vendanges à partir des marcs Muscat et Pinot Gris issus du domaine Pfister (Alsace). La spécificité de la biomasse 'marcs' en plus du fait qu'elle soit solide, est qu'elle est constituée de matières lignocellulosiques (rafles), composés connus dans la littérature (Quéméneur *et al.*, 2008) comme étant inhibiteurs de la production d'hydrogène. L'influence des matières lignocellulosiques (rafles) a donc été étudiée sur les marcs congelés 'Muscat' issus du domaine Pfister (Alsace) lors des vendanges 2012. Toutes ces biomasses ont été stockées à -20°C après leur récolte.

3.2.1 Influence de la variabilité annuelle et des rafles sur les performances de production d'hydrogène

Le volume d'hydrogène produit au cours du temps a été mesuré pour chaque biomasse issue des vendanges 2012 à 2014. Les courbes obtenues à partir de ces biomasses présentent toutes une allure typique d'une croissance microbienne et de production de métabolites en mode non continu (figure 94).

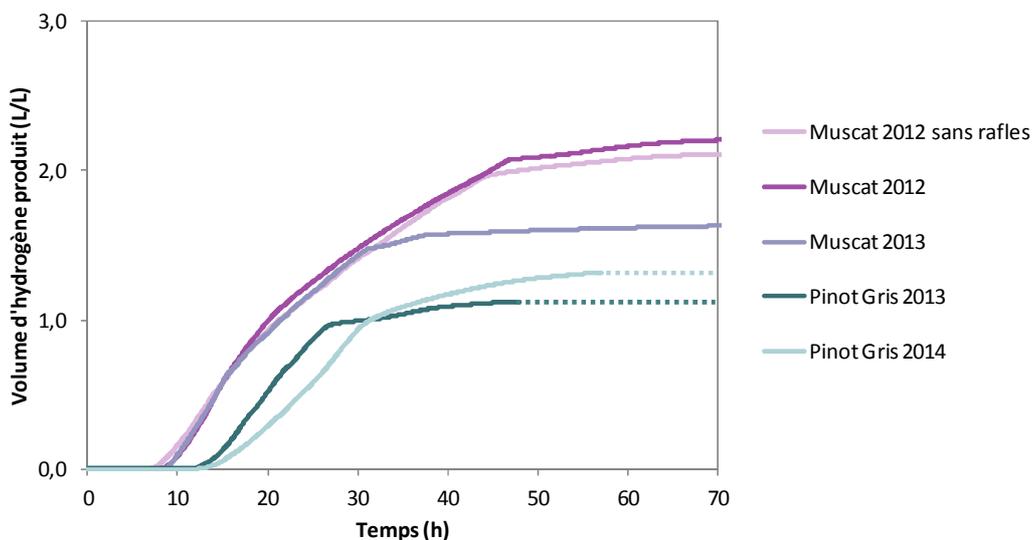


Figure 94 : Volume cumulé d'hydrogène produit au cours du temps à partir des marcs Pinot Gris et Muscat issus des vendanges 2012, 2013 et 2014 stockés à -20°C.

La phase de latence obtenue diffère en fonction du cépage mais est identique pour un même cépage, sur deux années différentes. La phase d'adaptation est de 8 h pour les marcs Muscat alors qu'elle est de 13 h pour les marcs Pinot Gris. L'échantillon sans rafle Muscat 2012 ne présente pas de différence avec son homologue avec rafles sur les phases correspondant à la cinétique et à la production finale d'hydrogène. En revanche, il existe des différences entre les marcs Muscat 2012 et 2013, ainsi que sur les marcs Pinot Gris 2013 et 2014.

La figure 95 représente les performances de production d'hydrogène des marcs avec ou sans rafles, et issus des vendanges 2012, 2013 et 2014.

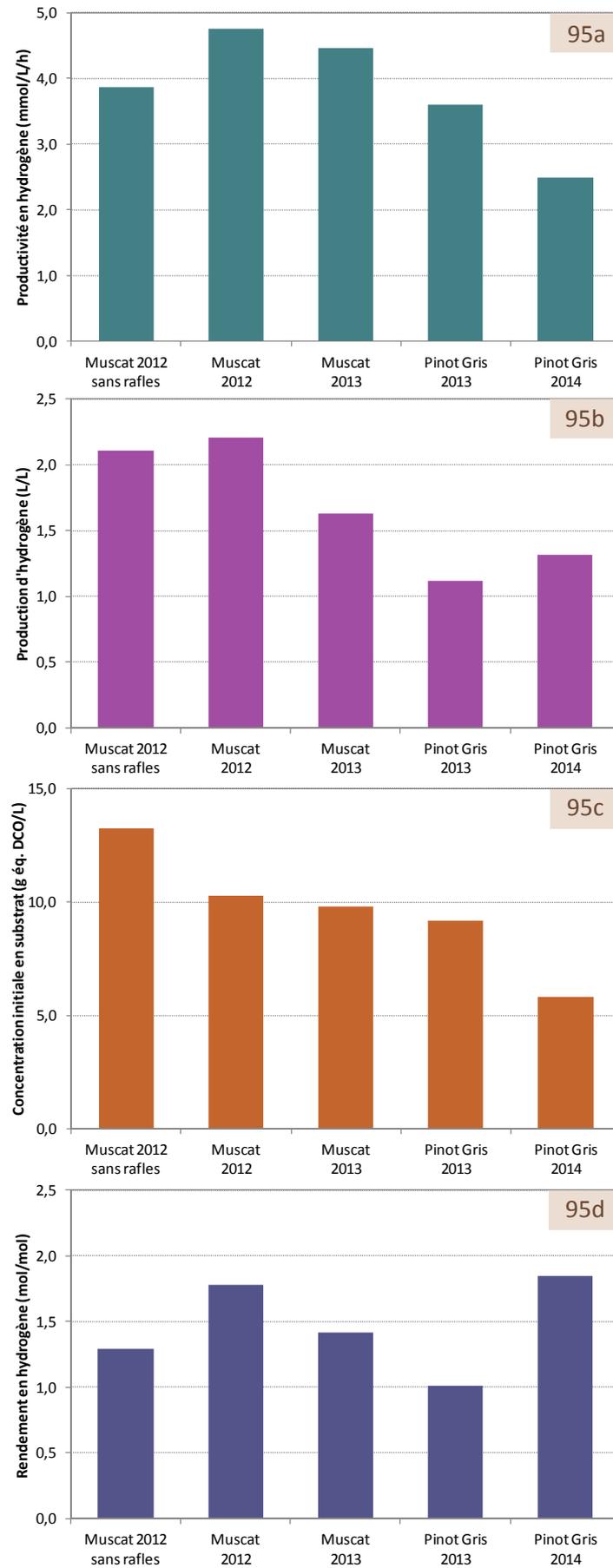


Figure 95 : Influence de la variabilité annuelle et impact des rafles sur les performances de production d'hydrogène : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

A teneur initiale en substrat identique, une inhibition de la production d'hydrogène se traduirait par la baisse des volumes et/ou des productivités en hydrogène obtenus par la biomasse avec inhibiteur (Muscat 2012 avec rafles). La teneur initiale en sucres (figure 95c) de la biomasse marcs Muscat 2012 sans rafles étant supérieure à celle de la biomasse avec rafles (respectivement 13,2 g équ. DCO/L contre 10,3 g équ. DCO/L), une inhibition des matières lignocellulosiques sur la production et/ou la productivité en hydrogène se traduirait alors par de bien plus faibles valeurs de volume d'hydrogène produit et/ou de productivité obtenues avec la biomasse avec rafles. Les résultats de la figure 95a et 95b n'indiquent donc pas d'inhibition des matières lignocellulosiques sur la productivité ou la production d'hydrogène ; les valeurs obtenues (respectivement 3,86 mmol/L/h et 2,1 L/L pour les marcs Muscat sans rafles et 4,75 mmol/L/h et 2,2 L/L pour les marcs Muscat avec rafles) n'étant pas significativement différentes ($p > 0,05$; t-test). Ceci indique en revanche, une consommation du substrat par des bactéries concurrentes à celles productrices d'hydrogène ou bien une consommation partielle de l'hydrogène produit par des bactéries hydrogénéotrophes, le rendement plus faible en hydrogène (figure 95d) dans le cas du test sans rafles le confirmant (1,29 mol/mol contre 1,78 mol/mol pour les marcs avec rafles).

La variabilité annuelle a un impact sur les performances de production d'hydrogène. En effet, les productions en hydrogène (figure 95b) obtenues par les marcs Muscat étaient plus faibles en 2013 qu'en 2012 (respectivement, 1,6 L/L contre 1,2 L/L) alors que les teneurs initiales en sucres (respectivement, 9,8 g équ. DCO/L et 10,3 g équ. DCO/L) ainsi que les productivités en hydrogène (respectivement 4,45 mmol/L/h et 4,75 mmol/L/h) étaient similaires. Cela indique la présence de micro-organismes hydrogénéotrophes dans les marcs Muscat 2013 tout comme le confirme une valeur de rendement en hydrogène plus faible pour cette année que celle obtenue sur l'année 2012 (respectivement, 1,42 mol/mol contre 1,78 mol/mol). En ce qui concerne les marcs de cépage Pinot Gris, les teneurs initiales en sucres (figure 95c) obtenues sont plus faibles sur l'année 2014 que sur l'année 2013 (respectivement, 5,8 g équ. DCO/L contre 9,2 g équ. DCO/L), ce qui explique les plus faibles valeurs de productivité (figure 95a) obtenues (respectivement, 2,48 mmol/L/h et 3,60 mmol/L/h). Les productions en hydrogène (figure 95b) similaires obtenues sur les années 2014 et 2013 (respectivement, 1,3 L/L et 1,1 L/L) indiquent la présence de bactéries concurrentes aux bactéries productrices d'hydrogène. Ceci est confirmé par le rendement en hydrogène (figure 95d) plus faible obtenu sur l'année 2013.

Les rafles constituées notamment de matières lignocellulosiques n'ont pas d'influence sur les performances de production d'hydrogène à l'échelle du laboratoire. La teneur initiale en sucres est en revanche indirectement impactée par l'année de vendange (conditions climatiques différentes,...), de même que la microflore bactérienne, ce qui a pour conséquence d'impacter les performances de production d'hydrogène.

3.2.2 Influence de la variabilité annuelle et des rafles sur le métabolisme

La distribution des métabolites produits en fin de fermentation de chaque biomasse est représentée dans la figure 96. Les métabolites (alcools et acides C2 à C5) des marcs Muscat avec et sans rafles 2012 ont été analysés par GC-FID, alors que les alcools ont été analysés par GC-FID et les autres métabolites par HPLC-UV pour les marcs Muscat 2013, Pinot Gris 2013 et Pinot Gris 2014. Ceci explique que les bilans de matière (annexe 8) soient plus incomplets pour les marcs Muscat avec et sans rafles 2012 (entre 39 et 47 %) que pour les marcs Muscat 2013 et Pinot Gris 2013 (entre 59 et 70 %). En revanche, le bilan de matière obtenu par les marcs Pinot Gris 2014 est de 138 % ; ceci pouvant provenir d'une anomalie d'échantillonnage.

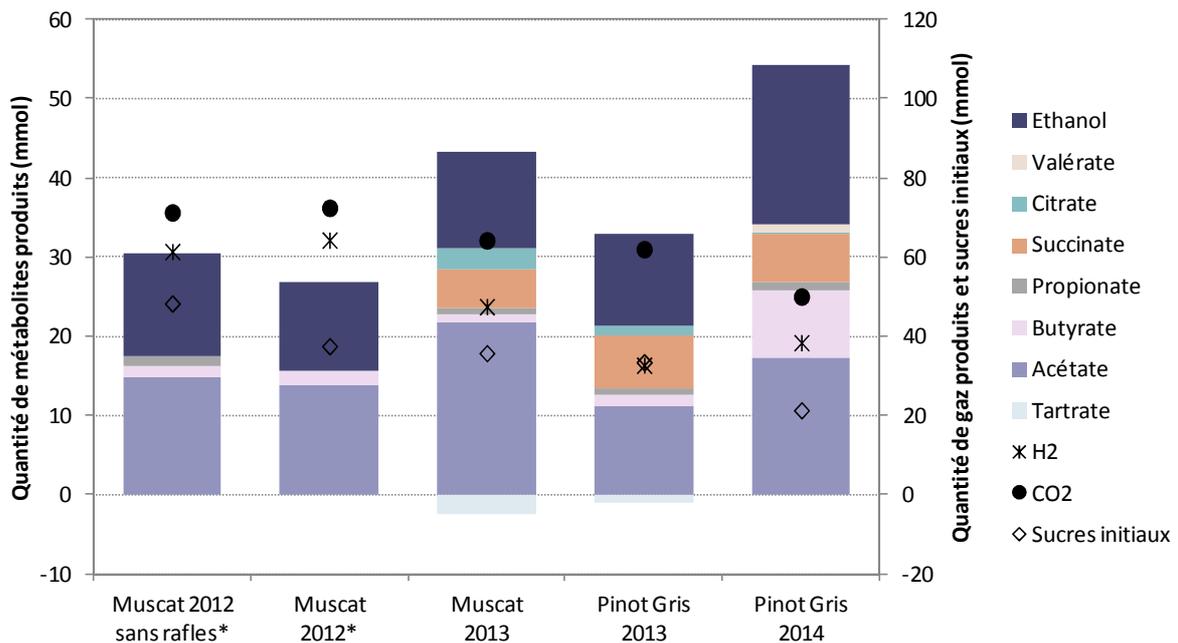


Figure 96 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des marcs avec ou sans rafles et issus des vendanges 2012 à 2014. *analyses réalisées exclusivement par GC-FID.

Comme vu dans le sous-chapitre précédent (V.3.1), l'acétate et l'éthanol sont les deux métabolites majoritairement produits (respectivement, entre 11,2 mmol et 21,8 mmol, et, entre 11,4 mmol et 20,1 mmol) par les marcs avec ou sans rafles, et issus de différentes années de vendanges. Les métabolites secondaires principalement produits sont : le succinate et le butyrate (les marcs Muscat avec ou sans rafles 2012 étant mis à part puisque l'échantillonnage et la technique d'analyse sont différents). Le succinate est majoritaire pour les marcs Muscat 2013 (4,8 mmol) et les marcs Pinot Gris 2013 (6,8 mmol), et co-majoritaire avec le butyrate pour les marcs Pinot Gris 2014 (respectivement 6,2 mmol et 8,4 mmol). Il est à noter que les marcs Pinot Gris 2014 ont produit 1,5 fois plus d'acétate et 6 fois plus de butyrate que les marcs Pinot Gris 2013, d'où un rapport butyrate/acétate 3,9 fois plus élevé pour 2014 que 2013 (0,49 contre 0,13). Pour ce qui est des marcs avec et sans rafles, il n'y a pas d'effet significatif des rafles sur le métabolisme global. Enfin, on observe que les marcs Pinot Gris 2014 sont les seuls à produire les métabolites secondaires minoritaires suivants : valérate (1,12 mmol), formiate (0,62 mmol) et lactate (0,30 mmol).

3.2.3 *Influence des rafles sur la structure des communautés microbiennes par T-RFLP*

La structure des communautés microbiennes des marcs Muscat 2012 avec et sans rafles analysée par T-RFLP est représentée dans la figure 97.

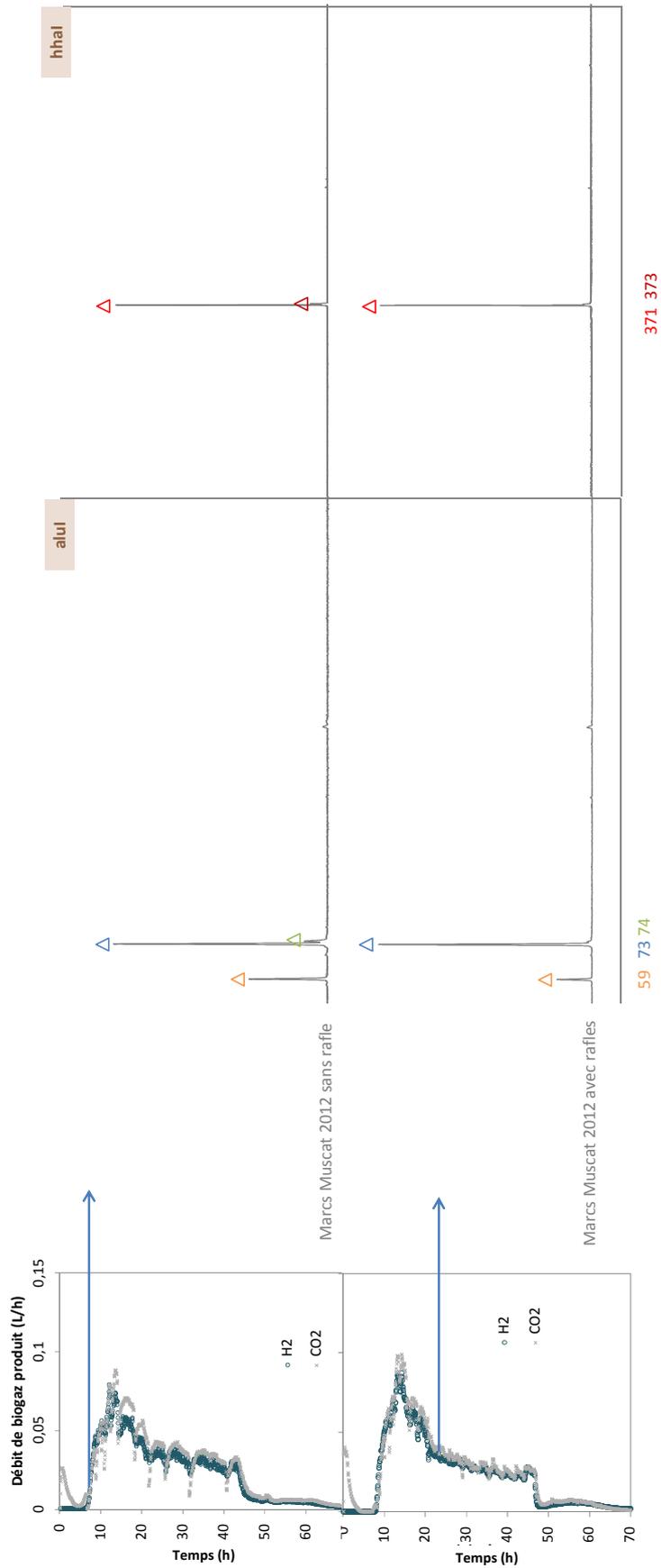


Figure 97. Profil de production d'hydrogène et structure des populations microbiennes obtenues avec deux enzymes de restriction *aluI* et *hhaI*.

Les structures de communautés microbiennes obtenues à partir des marcs avec ou sans rafles sont simples avec une population microbienne majoritaire. Les fragments de restriction obtenus associés sont 73 pb sur *aluI* et 371 pb sur *hhaI*, avec les abondances relatives respectives de 82 % et 95 % pour les marcs avec rafles, et, 67 % et 93 % pour les marcs déraflés. L'analyse T-RFLP montre des pics supplémentaires pour les marcs déraflés : 59 pb (25 %) et 74 pb (7 %) sur *aluI* et 373 pb (7 %) sur *hhaI*. Cette différence, même mineure, peut être attribuée au fait que les échantillons n'aient pas été prélevés au même temps de fermentation : à 23 h pour les marcs avec rafles contre 7 h pour les marcs déraflés, ce choix étant conditionné par un profil de production d'hydrogène remarquablement superposable.

3.2.4 Structure des communautés microbiennes par séquençage et pyroséquençage

La structure des communautés microbiennes des marcs Muscat 2012* et 2013, et des marcs Pinot Gris 2013 et 2014 ont été analysés par pyroséquençage (*) et séquençage. La classification taxonomique obtenue à partir des séquences représentatives des OTUs majoritaires est représentée dans la figure 98.

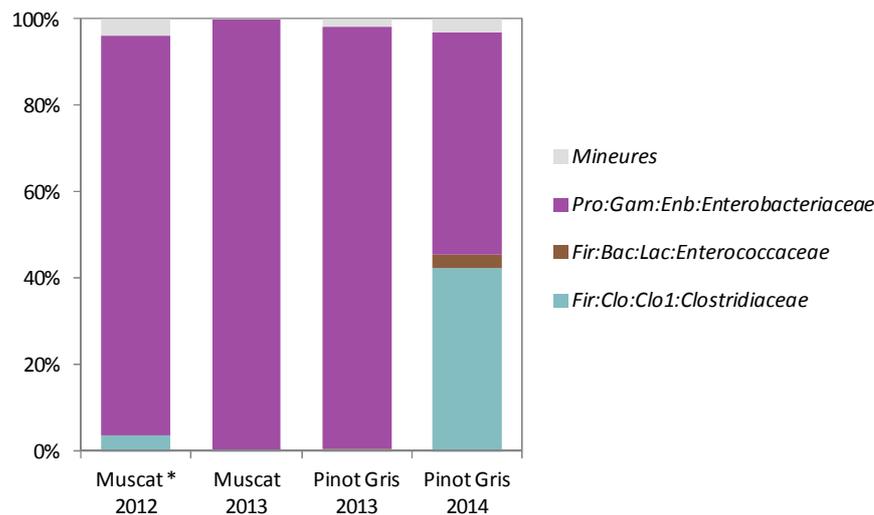
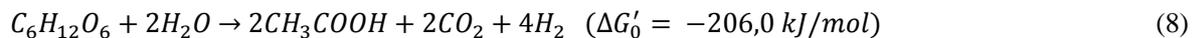


Figure 98 : Classification taxonomique au niveau de la famille réalisée à partir des échantillons prélevés en cours de fermentation des marcs Muscat 2012 et 2013, et des marcs Pinot Gris 2013 et 2014. *analyse effectuée par pyroséquençage. Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

La classification taxonomique au niveau de la famille permet, d'une part, de montrer une structure microbienne similaire pour les marcs Muscat entre les années 2012 et 2013 : la famille *Enterobacteriaceae* est majoritaire avec respectivement, 92,2 % et 99,8 % d'abondance relative. D'autre part, cette classification montre également une structure microbienne différente pour les marcs Pinot Gris entre les années 2013 et 2014. En effet, la famille *Enterobacteriaceae* est largement majoritaire en 2013 avec une abondance relative de 98,0 %, alors qu'en 2014, l'abondance relative de cette famille a diminué d'un facteur 2 (51,3 %) et co-domine avec la famille *Clostridiaceae* (42,4 %). De plus, la famille *Enterococcaceae* qui était présente uniquement dans les bourbes, est également présente mais de façon minoritaire (3,1 %).

3.2.5 Discussion

L'analyse des performances de production d'hydrogène a permis de voir que les rafles n'avaient pas d'influence sur la productivité en hydrogène ni sur le volume d'hydrogène produit, à l'échelle du laboratoire. En effet, les rafles ne représentant qu'entre 3 et 7 % du poids de la grappe mûre (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012), cela n'a pas d'impact sur les performances de production d'hydrogène. Le rendement en hydrogène est cependant différent selon la présence de rafles ou non. Toutefois, la différence significative entre la concentration initiale avec ou sans rafle (respectivement, 10,3 g éq. DCO/L contre 13,2 g éq. DCO/L) va dans le sens de l'hypothèse précédente sur l'extraction supplémentaire de sucres à partir des marcs (et plus particulièrement des grains). Les rafles n'ont pas non plus d'effet sur le réseau métabolique global avec la production majoritaire d'acétate et d'éthanol, le rapport butyrate/acétate étant similaire ($0,10 \pm 0,02$). Les rapports H_2/CO_2 obtenus sont également similaires ($0,87 \pm 0,02$) mais particulièrement élevés par rapport à ceux obtenus dans le paragraphe V.3.1 (en moyenne $0,66 \pm 0,10$). Comme l'analyse par HPLC n'a pas été effectuée sur ces échantillons, il est difficile d'expliquer cette différence significative. On peut tout de même émettre l'hypothèse qu'il y a peu de métabolites secondaires produits, par voies hydrogénotrophes ou par voies productrices de CO_2 . Par conséquent, les voies acétate (équation 8) et éthanol (équation 12) permettent d'équilibrer les quantités d'hydrogène et de dioxyde de carbone produit.



Les structures des communautés microbiennes analysées par T-RFLP n'ont pas non plus montré de différences majeures entre les marcs avec et sans rafles. Tout ceci confirme que les rafles n'influencent pas significativement la production d'hydrogène, à l'échelle du laboratoire.

L'analyse des performances de production d'hydrogène a permis d'établir que l'année de vendange influençait de manière significative la productivité en hydrogène et les volumes d'hydrogène produit. Tout d'abord, la teneur initiale en sucres des marcs n'est pas identique d'une vendange à l'autre notamment à cause des conditions climatiques différentes d'une année à l'autre. De plus, la technique d'extraction des sucres par ultrason donne des résultats de concentrations en sucres biaisées par le fait que les marcs ne sont pas homogènes en rafles, grains et pépins. L'année de vendange a également un impact sur la composition microbienne des marcs, particulièrement sur le Pinot Gris. En effet, en 2013, les marcs Pinot Gris étaient composés à 98,0 % de bactéries productrices d'hydrogène appartenant à la famille *Enterobacteriaceae* utilisant la voie acétate/éthanol, alors qu'en 2014, cette famille ne constituait plus que 51,3 % et est devenue co-dominante avec la famille *Clostridiaceae* (42,4 %). Ce changement au niveau des populations microbiennes a eu un impact direct sur le métabolisme. C'est pourquoi, les quantités d'acétate et de butyrate ont augmenté de facteurs respectifs de 1,5 et 6, entre 2013 et 2014. L'espèce majoritaire appartenant à la famille *Clostridiaceae* est

Clostridium spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) avec une abondance relative de 33,8 %, bactérie identifiée comme étant responsable de la production d'hydrogène à partir des bourbes via la voie butyrate. L'augmentation du volume d'hydrogène produit entre 2013 et 2014, n'est pas uniquement due à la concentration initiale en sucres plus élevée, mais également à la présence de cette bactérie productrice d'hydrogène. Ce qui reste incertain, est l'interaction entre ces deux espèces bactériennes. Est-ce que l'espèce appartenant à la famille *Enterobacteriaceae* est le phylotype dominant et seul responsable de la production d'hydrogène, ou bien à l'inverse est-ce que *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est le seul phylotype responsable de la production d'hydrogène, ou encore, la production d'hydrogène est-elle le produit d'une co-production entre ces deux phylotypes ? Jusqu'à présent, nous avons vu que *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) avait une abondance relative largement majoritaire par rapport à la famille *Enterobacteriaceae* (bourbes). De plus, les métabolites majoritaires produits (acétate et butyrate) indiquaient que l'espèce *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) était dominante et seule responsable de la production d'hydrogène. Mais qu'en est-il pour les marcs Pinot Gris 2014, car les métabolites produits sont à la fois représentatifs des *Enterobacteriaceae* que des *Clostridiaceae*. En effet, la différence de métabolites produits ainsi que les débits de biogaz produits au cours de la fermentation des marcs Pinot Gris 2013 et 2014 (figure 99) montrent clairement une disparité entre ces deux années de vendange.

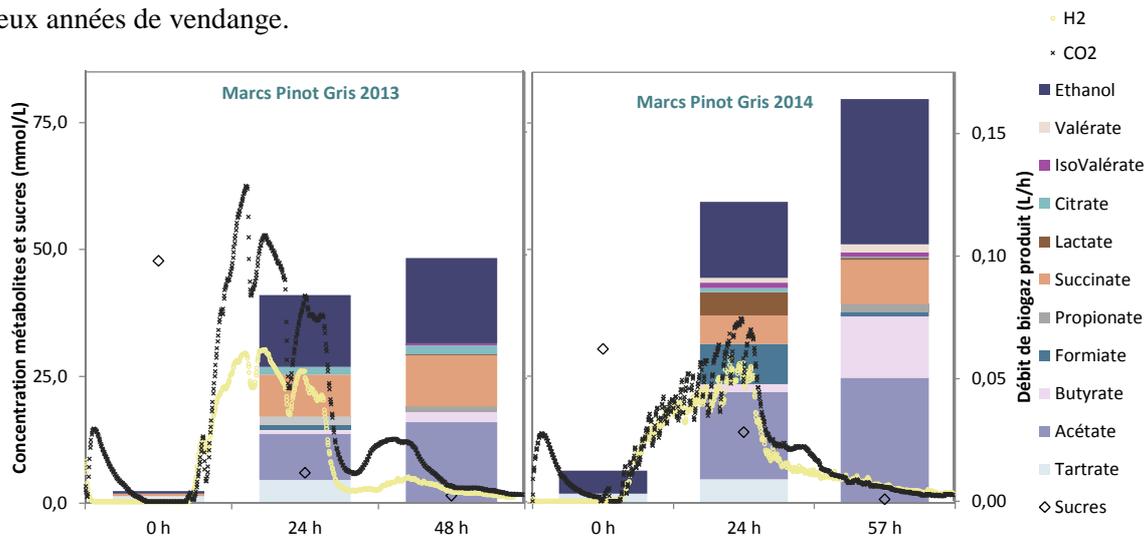


Figure 99 : Métabolites produits et profils de production du biogaz au cours de la fermentation des marcs Pinot Gris 2013 et 2014.

Cette figure met clairement en évidence la différence de profils de production d'hydrogène et de dioxyde de carbone, illustrée notamment par un rapport molaire H_2/CO_2 faible (0,53) dès 10 h de fermentation des marcs Pinot Gris 2013 alors que celui des marcs Pinot Gris 2014 est bien plus élevé (0,72). Dans le chapitre IV, il avait été mis en évidence que la production de butyrate et d'acétate par *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) lors de la fermentation des bourbes étaient quasiment équivalente à 24 h de fermentation. En revanche, la figure 99 met en évidence que la production largement majoritaire d'acétate à 24 h de fermentation des marcs Pinot Gris 2014 de la

même manière que les marcs Pinot Gris 2013 pour lesquels l'hydrogène était produit par le phylotype *Enterobacteriaceae*. Par déduction, il semblerait qu'à 24 h de fermentation, les bactéries entériques soient responsables de la production d'éthanol et d'une partie de la production totale d'acétate, la présence de lactate, formiate, valérate et isovalérate étant représentative des *Clostridium*. Ainsi, l'hydrogène est potentiellement produit par les deux phylotypes *Enterobacteriaceae* et *Clostridiaceae* lors du test marcs Pinot Gris 2014, ce qui explique l'amélioration de 83 % du rendement en hydrogène entre 2013 et 2014. L'avantage réside d'autre part dans l'augmentation du rapport H₂/CO₂ (0,77 contre 0,53) sans toutefois pouvoir l'expliquer.

Quoi qu'il en soit, l'année de vendange influence non seulement la concentration en sucres mais induit également une variation de la structure de communautés microbiennes. La différence de structure microbienne peut ainsi, influencer le métabolisme global des bactéries et donc ses performances de production d'hydrogène plus ou moins fortement en fonction de l'importance du changement de la structure.

3.3. Comparaison des biomasses ‘marcs’ et ‘bourbes’

Dans ce paragraphe, l'ensemble des résultats obtenus sur les biomasses ‘marcs’ et ‘bourbes’ est comparé tant au niveau des performances de production d'hydrogène qu'au niveau des métabolites produits.

La figure 100 représente les moyennes et leurs écart-types des performances de production d'hydrogène obtenues par les biomasses ‘bourbes’ et ‘marcs’.

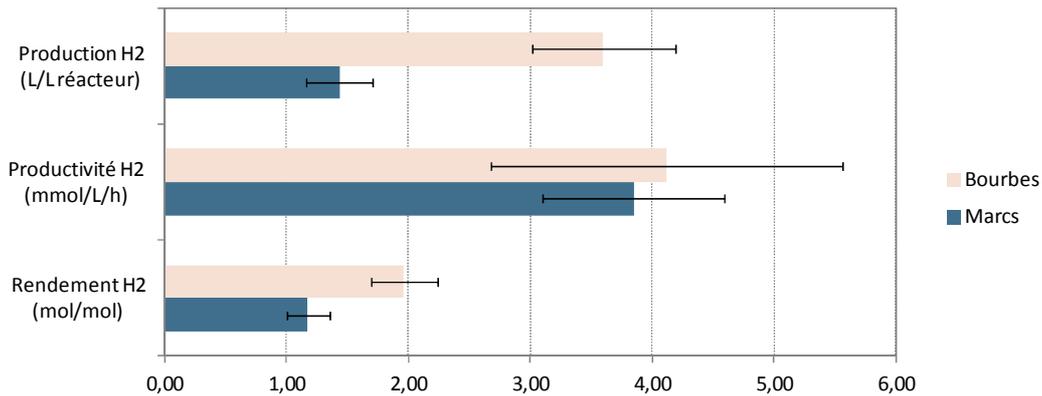


Figure 100 : Comparaison des performances de production d'hydrogène obtenues à partir des marcs et des bourbes (les barres correspondent aux écart-types).

Les volumes d'hydrogène produit sont 2,5 fois plus élevés lorsque la biomasse utilisée est de type bourbes que lorsque la biomasse est de type marcs (en moyenne $3,6 \pm 0,6$ L/L soit 50 ± 8 L/L_{bourbes} contre $1,4 \pm 0,6$ L/L soit 20 ± 4 L/kg_{marcs}) pour une teneur initiale en sucres moyenne de 15 ± 2 g éq. DCO/L et 10 ± 3 g éq. DCO/L pour les biomasses bourbes et marcs. Les productivités en hydrogène, sont très variables que ce soit pour les marcs ou les bourbes, mais restent du même ordre de grandeur pour les deux types de biomasses ($3,9 \pm 0,8$ mmol/L/h pour les marcs contre 4 ± 1 mmol/L/h pour les bourbes). Enfin, les rendements en hydrogène obtenus par les bourbes sont 1,7 fois plus élevés que ceux obtenus par les marcs ($2,0 \pm 0,3$ mol/mol contre $1,2 \pm 0,2$ mol/mol). Toutefois, il est difficile de comparer directement les rendements car ils sont calculés à partir des concentrations initiales en sucres dont le protocole est différent selon le type de biomasses (Chapitre II). Cependant, le faible rendement obtenu pour les marcs peut s'expliquer par la consommation du substrat pour la production d'éthanol, voie non co-productrice d'hydrogène. Comme déterminé au paragraphe 2.1 de ce chapitre, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est la principale responsable de la production d'hydrogène chez les bourbes. Chez les marcs, il n'est pas possible de déterminer l'espèce bactérienne parmi *Klebsiella* spp. (*oxytoca*, *michiganensis*, *pneumoniae*), *Enterobacter cancerogenus* et *Proteus vulgaris* car elles possèdent la même portion de séquence de la région variable V4-V5 du gène codant pour l'ARNr 16S.

Les quantités de métabolites et de gaz produits par quantité de sucres consommés obtenues en fonction

des biomasses ‘bourbes’ et ‘marcs’ sont représentées sur la figure 101.

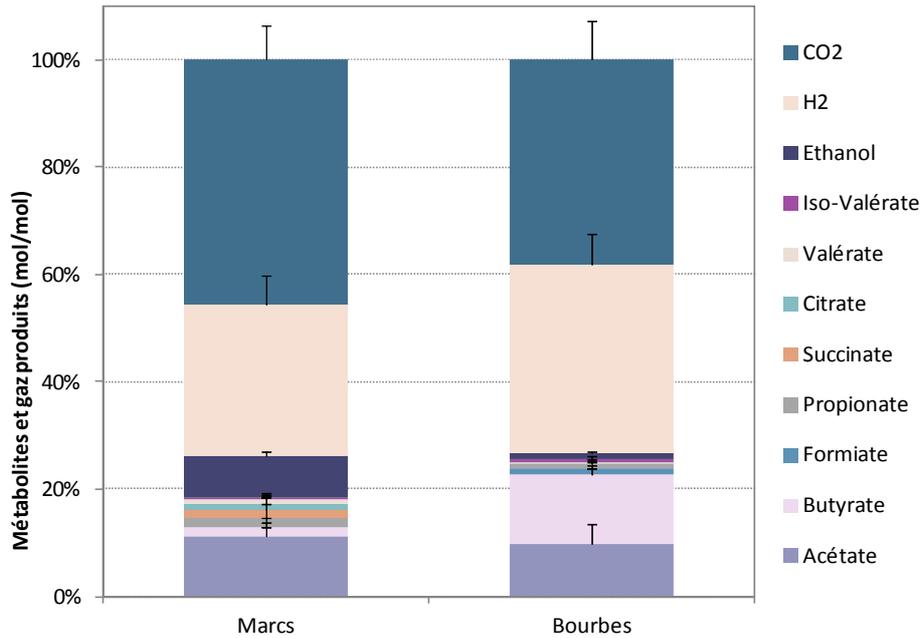


Figure 101 : Comparaison de la répartition gazeuse et métabolique entre les marcs et les bourbes.

Cette figure indique que les bourbes composées principalement de *Clostridium* produisent majoritairement de l'acétate et le butyrate alors que les marcs composés d'*Enterobacteriaceae* produisent de l'acétate et de l'éthanol. Le propionate, le formiate et l'éthanol sont les produits principaux du réseau métabolique minoritaire de la biomasse ‘bourbes’ alors que le succinate, le propionate et le butyrate sont ceux de la biomasse ‘marcs’. Malgré ces divergences de réseaux métaboliques, la production de métabolites reste minoritaire (environ 25 %) face à la production gazeuse (75 %) quel que soit le type de biomasse (bourbes ou marcs). Le rapport H₂/CO₂ obtenu pour les bourbes est proche de 1 (en moyenne $0,92 \pm 0,04$) alors qu'il est plus faible pour les marcs ($0,62 \pm 0,10$). Ceci est notamment expliqué par l'excès de CO₂ co-produit avec l'éthanol lors de la fermentation de la biomasse ‘marcs’.

A partir de ces résultats et de ceux obtenus dans le chapitre IV lors de l'étude de l'influence de la charge, il est possible de corréler : la production d'hydrogène à la somme des quantités d'acétate et de butyrate produits à partir de la biomasse ‘bourbes’ (figure 102a) et à la somme des quantités d'acétate et d'éthanol produits à partir de la biomasse ‘marcs’ (figure 102b).

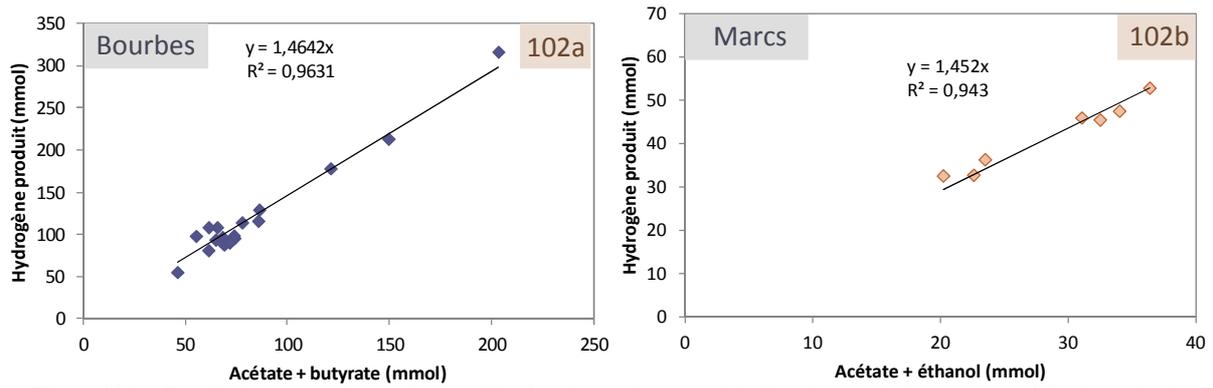


Figure 102 : Corrélations entre la production d'hydrogène et les quantités d'acétate et de butyrate produits à partir des biomasses 'bourbes' (a) et les quantités d'acétate et d'éthanol produits à partir des biomasses 'marcs' (b).

Lorsque l'on essaye de corrélérer, pour les bourbes, la production molaire avec le nombre de moles de butyrate produit (figure 103), on observe une pente proche de 2 (1,7) relative à la stœchiométrie de l'équation de la voie butyrate.

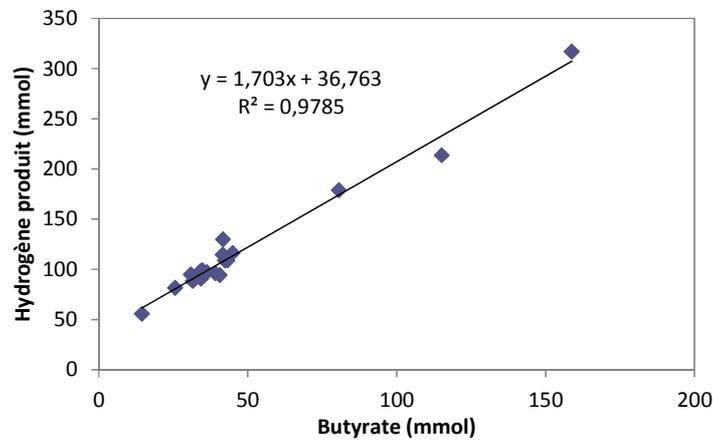


Figure 103 : Corrélation entre la production molaire d'hydrogène et la quantité de butyrate produit obtenue à partir de la biomasse 'bourbes'.

Ces résultats confirment donc ce qui a été établi au chapitre IV. En effet, alors que le butyrate provient en grande partie de la dégradation des sucres (figure 104), l'acétate peut être produit via plusieurs voies : la dégradation des sucres (équation 8), la consommation du tartrate (équations 13 à 15), la voie acétate homo-fermentaire (équation 16) et l'homo-acétogénèse (équation 17).

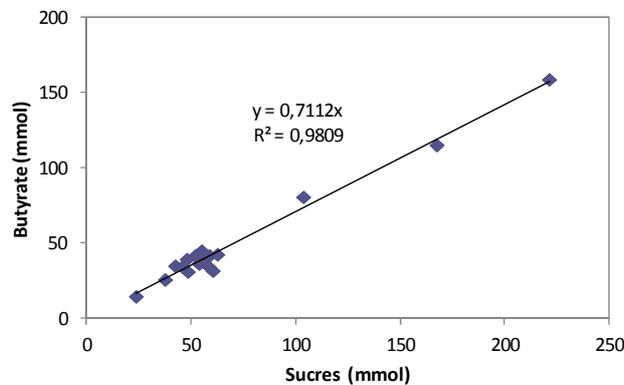
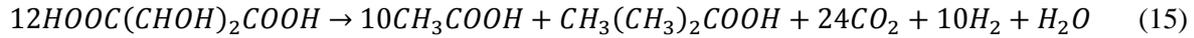
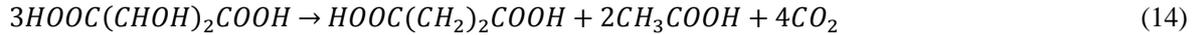
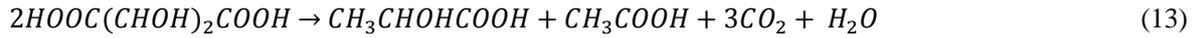


Figure 104 : Corrélation entre la production de butyrate et la quantité initiale de sucres à partir de la biomasse 'bourbes'.





La figure 105 représente la corrélation entre la production d'hydrogène et la quantité d'acétate produit obtenues à partir de la biomasse 'marcs'.

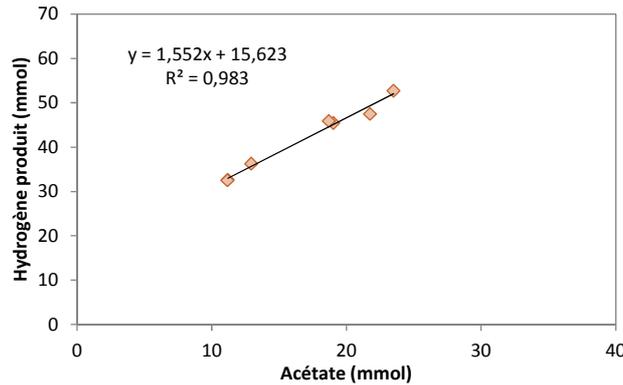


Figure 105 : Corrélation entre la production molaire d'hydrogène et la quantité d'acétate produit obtenue à partir de la biomasse 'marcs'.

Le test de Pearson a permis d'établir une corrélation positive linéaire ($r = 0,991$ sur les sept tests de ce chapitre) significative au seuil de 1 % entre la quantité d'hydrogène produit et la quantité d'acétate produit. Malgré les différences observées lors des études sur l'influence des cépages (biomasses 'bourbes' et 'marcs'), des modes de culture (biomasses 'bourbes' et 'marcs'), de la variabilité annuelle (biomasses 'bourbes' et 'marcs') et des rafles (biomasse 'marcs'), les performances de production d'hydrogène se distinguent surtout par rapport au type de biomasse utilisée 'bourbes' vs 'marcs' pour lequel la microflore endogène émergente identifiée à 24 h de fermentation diffère sans doute liée à la différence de microflore intrinsèque de la biomasse. Il est néanmoins possible de produire 50 ± 8 L/L_{bourbes} et 20 ± 4 L/kg_{marcs} via la voie butyrate/acétate pour la biomasse 'bourbes' et via la voie acétate pour la biomasse 'marcs', ce qui laisse une marge possible d'optimisation de la biomasse 'marcs' notamment par l'ajout d'une microflore productrice de butyrate.

4. Influence de l'introduction de perturbations biotiques et influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses 'gâteau' et 'lies' sur la production d'hydrogène

Ce sous-chapitre est composé de deux parties. Le chapitre IV ayant montré que la biomasse 'bourbes' nécessitait d'être diluée afin de maximiser les performances de production d'hydrogène, la première étude porte sur la faisabilité d'utiliser les eaux de rinçage des pressoirs (ayant servi au pressage des grappes de raisin) en tant que diluant de la biomasse, dans le but de, non seulement, recycler une partie des effluents produits par les viticulteurs mais également de s'affranchir des coûts liés à l'utilisation de l'eau de réseau. Enfin, la deuxième étude concerne la faisabilité d'utiliser les sous-produits viticoles 'gâteau de filtration' et 'lies de vin' pour la production d'hydrogène.

4.1. Perturbation biotique liée à l'ajout de la biomasse 'eaux de rinçage'

4.1.1 Influence des mélanges de microflores sur les performances de production d'hydrogène

Les eaux de rinçage (ER) ont été récoltées après chaque nettoyage des pressoirs ayant servi au pressage des grappes de raisin des cépages issus de la région Alsace (Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling), et des cépages issus de la région Bourgogne (Chardonnay Durable, Eco-phytosanitaire et Biologique). Les eaux de rinçage Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling (Alsace) ont été utilisées après un stockage à 4°C, alors que les eaux de rinçage Chardonnay (Bourgogne) ont été utilisées après un stockage à -20°C, pour des raisons pratiques de distance entre le lieu de récolte et le laboratoire. La figure 106 représente les performances de production d'hydrogène moyennes des biomasses bourbes et marcs, avec ou sans perturbation biotique liée à l'ajout de la biomasse 'eaux de rinçage'. Les biomasses réfrigérées testées sont situées à gauche du trait jaune, tandis que les biomasses congelées sont à sa droite. Les écart-types liés aux différents tests sont représentés par des barres d'erreur, à l'exception de la biomasse réfrigérée 'marcs' pour laquelle un test unique a été réalisé avec le cépage Pinot Gris. Le test des marcs congelés sans eaux de rinçage sera utilisé à titre de comparaison. Lorsque les valeurs de rendements étaient supérieures au rendement maximal *in vivo* (4 mol/mol) un damier a été utilisé.

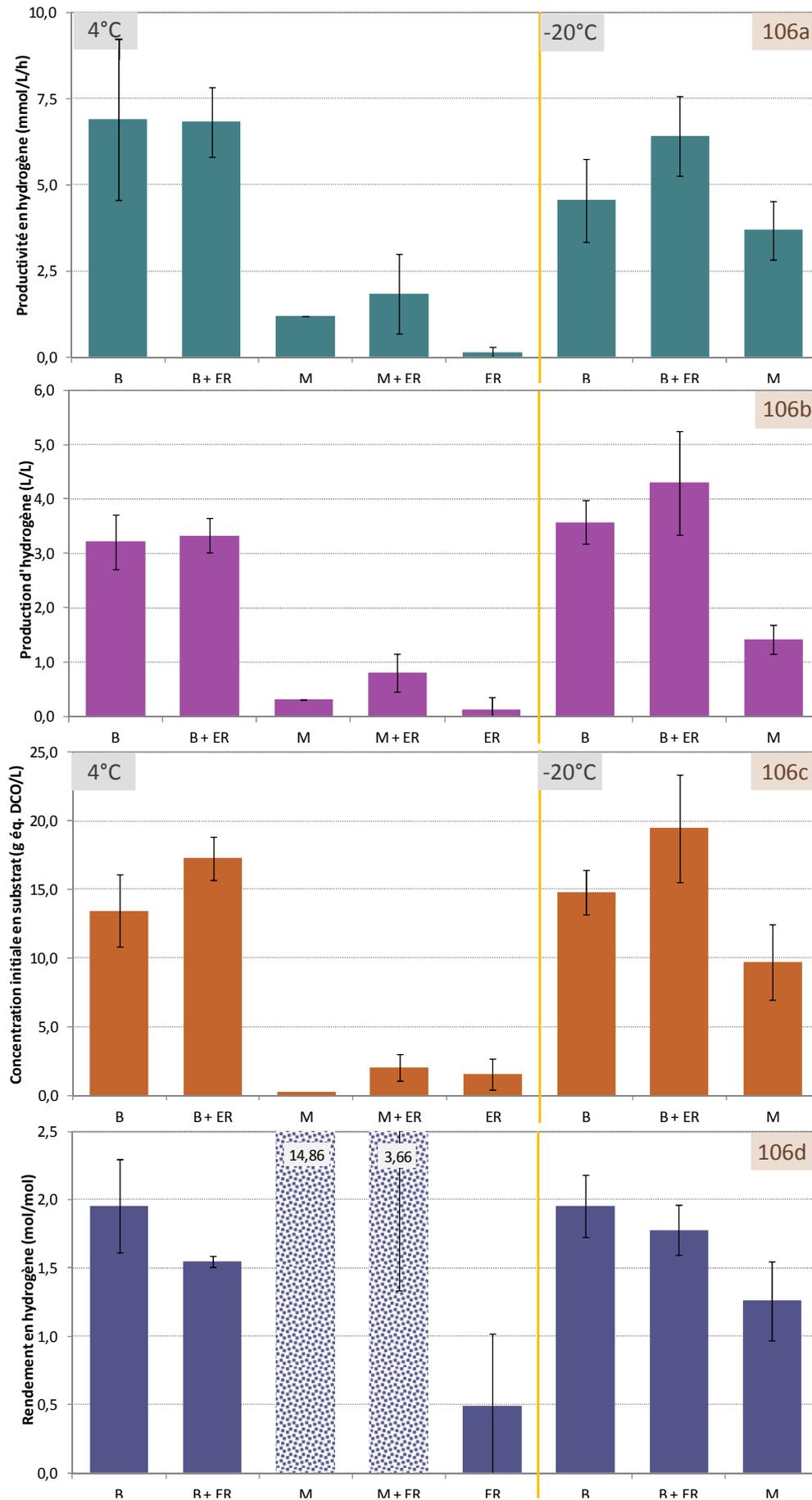


Figure 106 : Performances de production d'hydrogène obtenues à partir des mélanges de biomasses : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c). (B = bourbes, M = marcs, ER = eaux de rinçage)

Les résultats des figures 106a et 106b nous indiquent que les productivités et les volumes d'hydrogène produit sont liés à la concentration initiale en substrat (figure 106c). Les eaux de rinçage seules n'étant que très peu sucrées ($1,53 \pm 1,12$ g éq. DCO/L), les performances de production de cette biomasse sont les plus faibles ($0,14 \pm 0,14$ mmol/L/h et $0,1 \pm 0,2$ L/L) en comparaison avec les biomasses 'bourbes' et 'marcs'. Les écart-types élevés obtenus pour cette biomasse sont liés à l'hétérogénéité des eaux de rinçage. En effet, en fonction du mode opératoire pratiqué par le viticulteur pour rincer les pressoirs, le volume des eaux de rinçage utilisé n'est pas le même, ce qui a pour conséquence, de diluer plus ou moins la teneur initiale en substrat.

L'ajout des eaux de rinçage réfrigérées aux bourbes réfrigérées n'a pas modifié significativement ($p > 0,02$; t-test) les productivités et les volumes d'hydrogène produits (en moyenne $6,9$ mmol/L/h et $3,3$ L/L), contrairement au rendement en hydrogène qui est significativement ($p < 0,02$; t-test) plus faible que celui obtenu par la biomasse bourbes réfrigérées (respectivement $1,55 \pm 0,04$ et $1,96 \pm 0,34$ mol/mol). Or, on s'attendait à obtenir des performances de production d'hydrogène plus élevées pour le test 'bourbes + eaux de rinçage' que pour le test 'bourbes' car la teneur initiale en sucres est plus élevée. On suspecte alors, que l'ajout des eaux de rinçage à la biomasse 'bourbes' apporte des micro-organismes concurrents à la production d'hydrogène, ce qui est cohérent avec le rendement plus faible obtenu. L'ajout des eaux de rinçage congelées aux bourbes congelées induit des valeurs significativement plus élevées en termes de productivité et de volume d'hydrogène produit obtenues par la biomasse congelée 'bourbes + eaux de rinçage', qui sont uniquement liées aux teneurs initiales en sucres plus élevées ($19,5 \pm 3,6$ g éq. DCO/L contre $14,8 \pm 1,6$ g éq. DCO/L). Les valeurs de rendement en hydrogène sont en effet significativement ($p > 0,05$; t-test) similaires (en moyenne $1,87 \pm 0,13$ mol/mol).

Pour les marcs réfrigérés, l'ajout des eaux de rinçage réfrigérées améliore significativement ($p < 0,02$; t-test) les productivités et les volumes d'hydrogène produit ($1,85 \pm 1,16$ mmol/L/h et $0,8 \pm 0,3$ L/L contre $1,19$ mmol/L/h et $0,3$ L/L pour les marcs seuls), notamment à cause d'une augmentation significative de la concentration initiale en sucres ($2,0$ g éq. DCO/L contre $0,3$ g éq. DCO/L). Tout comme cela a été évoqué dans le sous-chapitre précédent (V.3), la méthode d'extraction des sucres par ultrasons n'est pas adaptée, ce qui a pour conséquence de biaiser les concentrations initiales en sucres et donc les rendements en hydrogène. Notons cependant que le même protocole d'extraction des sucres est appliqué. Ceci explique que le bilan de matière calculé soit très largement surestimé (484 %) ; les valeurs de rendements obtenues étant supérieures à la valeur maximale que l'on peut atteindre *in vivo* (respectivement $3,66 \pm 2,32$ mol/mol et $14,86$ mol/mol pour les biomasses 'marcs + eaux de Rinçage' et 'Marcs'). Le test d'ajout des eaux de rinçage congelées aux marcs congelés n'a pas été réalisé. Notons par ailleurs que la congélation de la biomasse marcs a permis de tripler la productivité en hydrogène et de multiplier par un facteur 4,5 le volume d'hydrogène produit (respectivement 3,7

mmol/L/h contre 1,2 mmol/L/h et 1,4 L/L contre 0,3 L/L) notamment grâce à une meilleure conservation des sucres initiaux.

4.1.2 Influence des mélanges de microflores sur le métabolisme

La distribution moyenne des métabolites produits en fin de fermentation de chaque biomasse est représentée sur la figure 107. Les barres d'erreur représentant les écarts-types sur la quantité de métabolites et de biogaz produit ont été retirées pour plus de lisibilité.

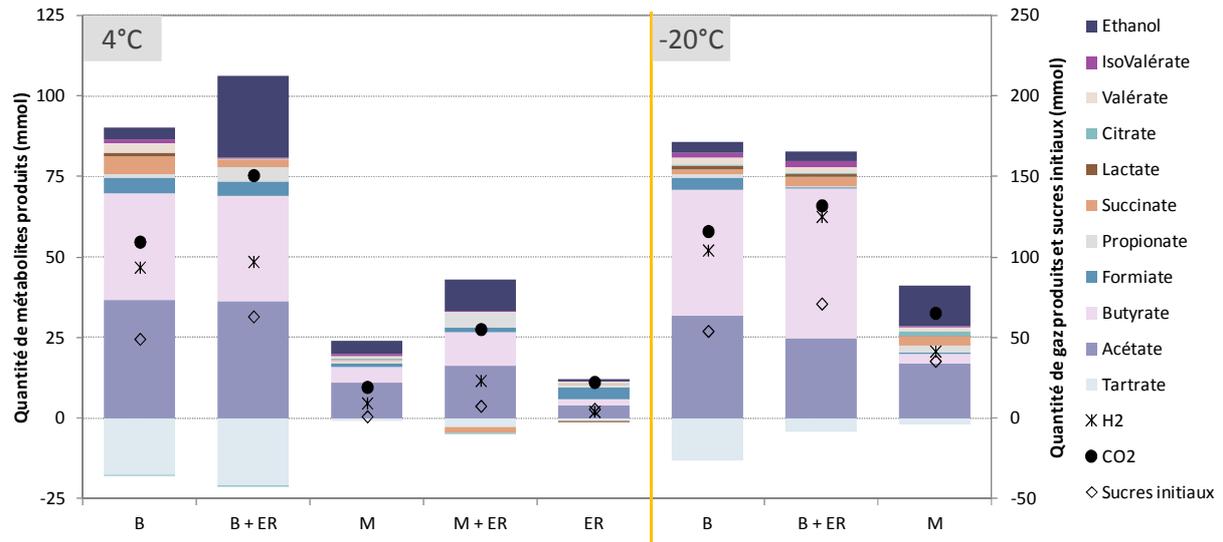


Figure 107 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des bourbes (B), des marcs (M) ou des eaux de rinçage (ER) seuls, ou des mélanges 'bourbes + eaux de rinçage' et 'marcs + eaux de rinçage' sur des biomasses réfrigérées ou congelées.

Comme précédemment observé, les biomasses de type 'bourbes' produisent, sans ajout des eaux de rinçage, majoritairement de l'acétate et du butyrate, alors que les biomasses de type 'marcs' produisent majoritairement de l'acétate et de l'éthanol et parfois, avec du butyrate en plus. L'ajout des eaux de rinçage à ces deux types de biomasses ne modifie que très peu ces répartitions. En revanche, on observe que les eaux de rinçage réfrigérées seules produisent majoritairement de l'acétate et du formiate.

L'ajout des eaux de rinçage réfrigérées à la biomasse bourbes réfrigérées redirige une partie du réseau métabolique secondaire vers la production d'éthanol dont la quantité est 6,7 fois plus élevée. Ceci explique en partie l'augmentation de CO₂ produit (150,6 mmol contre 109,3 mmol) et la diminution du rendement en hydrogène obtenu ($1,55 \pm 0,04$ mol/mol contre $1,96 \pm 0,34$ mol/mol). En revanche, l'ajout des eaux de rinçage congelées aux bourbes congelées n'influence que très légèrement le métabolisme : légère augmentation du butyrate produit en défaveur de l'acétate et, absence de formiate produit. Ainsi, la congélation des biomasses inhibe la redirection du métabolisme vers la production d'éthanol, comme pour les biomasses bourbes réfrigérées, ce qui explique que les valeurs de rendements en hydrogène soient similaires entre 'bourbes' congelées et 'bourbes + eaux de rinçage' congelées.

L'ajout des eaux de rinçage réfrigérées aux marcs réfrigérés redirige une partie du métabolisme primaire vers la voie butyrate (le rapport butyrate/acétate passe de 0,42 à 0,63) et une partie du métabolisme secondaire vers la voie propionate (quantité de propionate produit 8,8 fois plus élevée). La congélation des marcs, en revanche, redirige une partie du métabolisme primaire vers la voie acétate (rapport butyrate/acétate de 0,20) et une partie du métabolisme secondaire vers les voies citrate (15,4 fois plus élevé), succinate (4,4 fois plus élevé) et propionate (4,0 fois plus élevé) par rapport aux marcs réfrigérés.

Conformément à ce qui a été observé dans le sous-chapitre 3, la production majoritaire d'acétate et de butyrate (biomasses 'bourbes' et 'bourbes + eaux de rinçage') indique que l'hydrogène est produit par des bactéries appartenant à la famille *Clostridiaceae*, alors que la production majoritaire d'acétate et d'éthanol (biomasse 'marcs' congelés) indique que l'hydrogène est produit par les *Enterobacteriaceae*. Ainsi, il est cohérent d'attribuer la production d'hydrogène à la fois aux bactéries *Clostridiaceae* et *Enterobacteriaceae* lorsque l'acétate, le butyrate et l'éthanol ont été produits majoritairement (biomasse réfrigérée 'marc + eaux de rinçage').

4.1.3 Structure des communautés microbiennes par T-RFLP

La structure des communautés microbiennes obtenue à partir des biomasses réfrigérées 'bourbes' et 'bourbes + eaux de rinçage' est représentée sur la figure 108. Pour comparaison, les trois cépages Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling y figurent.



Figure 108. Profil de production d'hydrogène et structure des populations microbiennes obtenus avec deux enzymes de restriction *alul* et *hhal*.

702 703

236 237 218 224 229 231 371 373

59 60 67 73 74 78

Les structures des communautés microbiennes obtenues à partir des biomasses ‘bourbes’ sont globalement similaires à celles obtenues à partir des biomasses ‘bourbes + eaux de rinçage’. Dans le cas du Pinot Gris, on remarque tout de même quelques différences. La première différence est la présence de deux populations microbiennes supplémentaires (218 pb et 224 pb sur hhaI) lorsque la biomasse ‘bourbes’ est utilisée, ce qui est assez surprenant étant donné que lorsque l’on utilise les eaux de rinçage pour diluer les bourbes, elles sont absentes. La deuxième différence concerne les populations bactériennes majoritaires : 67 pb et 74 pb sur aluI, et 373 pb sur hhaI représentent les deux populations microbiennes majoritaires avec des abondances relatives respectives de 32 %, 33 % et 31 % pour les bourbes seules ; alors que pour les bourbes avec eaux de rinçage, les populations microbiennes majoritaires sont 74 pb et 237 pb sur aluI, et 231 pb et 371 pb sur hhaI, avec les abondances relatives respectives de 30 %, 27 %, 37 % et 34 %. Ces différences se reflètent sur les profils de production d’hydrogène qui diffèrent également.

Pour les deux autres cépages (Gewurztraminer et Riesling), les structures des populations microbiennes ainsi que les profils de production d’hydrogène sont quasiment identiques avec une population microbienne majoritaire : 67 pb sur aluI et 702 pb sur hhaI (identifiée comme étant *Clostridium butyricum*) avec les abondances relatives respectives de 51 % et 48 % pour les bourbes Gewurztraminer, 61 % et 49 % pour les bourbes + eaux de rinçage Gewurztraminer, 61 % et 59 % pour les bourbes Riesling et, 81 % et 78 % pour les bourbes + eaux de rinçage Riesling.

4.1.4 Structure des communautés microbiennes par séquençage

La classification taxonomique, au niveau de la famille, correspondant aux séquences représentatives des principaux OTUs des différentes biomasses est représentée sur la figure 109. Le cépage Pinot Gris a été sélectionné pour représenter les biomasses réfrigérées alors que le cépage Chardonnay Eco-phytosanitaire a été utilisé pour représenter les biomasses congelées.

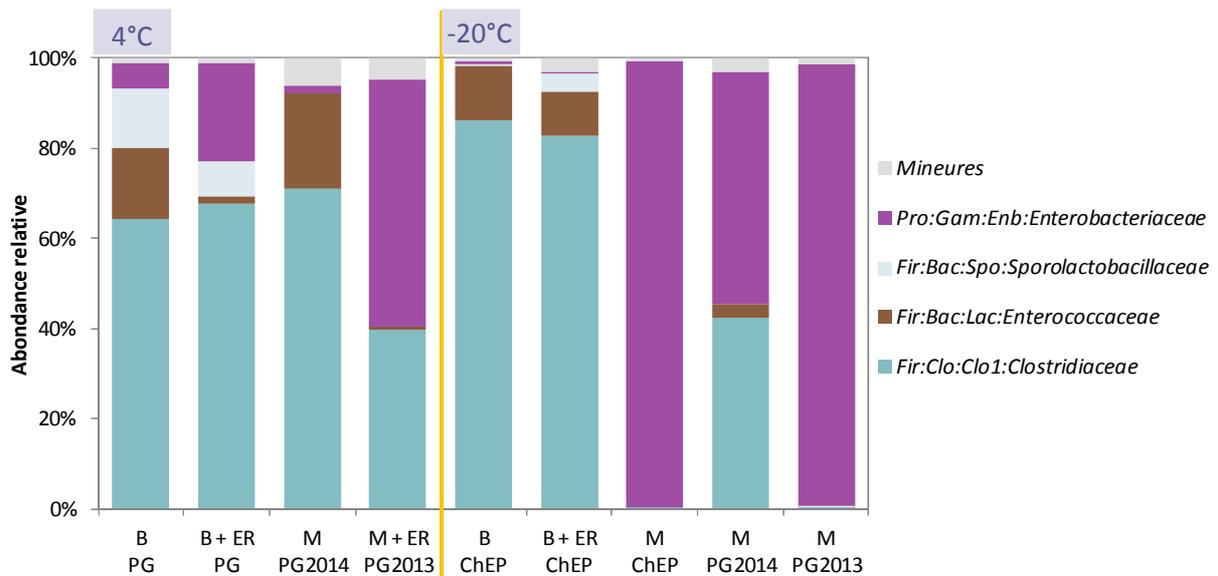


Figure 109 : Classification taxonomique au niveau de la famille, de chaque microflore endogène appartenant aux différentes biomasses, réfrigérées (à gauche du trait jaune) ou congelées (à droite). Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

Conformément à l'analyse des métabolites produits, *Clostridiaceae* est la famille majoritaire constitutive des biomasses réfrigérées et congelées 'bourbes' et 'bourbes + eaux de rinçage' avec des abondances relatives comprises entre 64,4 % et 84,3 %. L'ajout des eaux de rinçage réfrigérées aux bourbes réfrigérées augmente l'abondance relative de la famille *Enterobacteriaceae* (+ 16,5 %), au détriment de la famille *Enterococcaceae* (- 14,3 %). L'ajout des eaux de rinçage congelées aux bourbes congelées ne modifie que très peu la structure microbienne au niveau de la famille.

De manière surprenante, la classification taxonomique de la biomasse réfrigérée 'marcs' (issu des vendanges 2014) est proche de celle de la biomasse réfrigérée 'bourbes' ; on observe en effet même dans l'échantillon congelé issu des vendanges 2014, une abondance relative conséquente (42,5 %) de la famille *Clostridiaceae* contrairement à celui issu des vendanges 2013 pour lequel l'abondance est très faible (0,4 %) et représentative de la biomasse 'marcs' habituellement obtenue. Ainsi, cette classification taxonomique obtenue pour les marcs 2014 est une caractéristique ponctuelle liée à l'année de vendange. Il est donc difficile de comparer directement l'effet de l'ajout des eaux de rinçage réfrigérées aux marcs réfrigérés. En revanche, on peut tout de même remarquer, que la congélation des marcs augmente considérablement l'abondance relative de la famille *Enterobacteriaceae* (+ 49,4 %) au détriment des familles *Clostridiaceae* (-28,5 %) et *Enterococcaceae* (-18,1 %).

Afin de déterminer l'impact de l'ajout des eaux de rinçage aux différentes biomasses, l'affiliation des espèces ou des genres aux séquences représentatives des OTUs est représentée dans le tableau 15.

Tableau 15 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation des différents tests.

	Similarité	B PG	B + ER PG	M PG2014	M + ER PG2013	B ChEP	B + ER ChEP	M ChEP	M PG2014	M PG2013
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5%	33,7%	25,1%	34,8%	39,4%	45,5%	30,9%	0,4%	33,8%	0,3%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,6%	1,5%	1,9%	35,1%	0,3%	38,2%	42,0%	< 0,1%	6,1%	< 0,1%
<i>Clostridium</i> sp.	98,7%	19,9%	39,6%	1,1%	0,1%	1,6%	7,2%	-	2,5%	< 0,1%
<i>Clostridium pasteurianum</i>	100,0%	9,2%	1,1%	< 0,1%	< 0,1%	1,0%	2,8%	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	15,8%	1,5%	21,1%	0,6%	12,1%	9,6%	-	3,1%	< 0,1%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	13,2%	7,8%	< 0,1%	< 0,1%	0,2%	4,0%	-	< 0,1%	0,3%
<i>Klebsiella/Enterobacter/Proteus</i>	99,6%	5,6%	22,1%	1,9%	54,8%	0,9%	0,3%	98,9%	51,3%	98,0%

Les quatre espèces représentées par la famille *Clostridiaceae* sont *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*), *Clostridium intestinale*, *Clostridium* sp. et *Clostridium pasteurianum*.

L'ajout des eaux de rinçage réfrigérées aux bourbes réfrigérées inverse la dominance et sous-dominance des phylotypes majoritaires appartenant à la famille *Clostridiaceae*. *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est l'espèce dominante (37,7 %), et *Clostridium* sp. souche sous-dominante non encore identifiée (19,9 %) des bourbes réfrigérées ; alors que *Clostridium* sp. devient le phylotype dominant (39,6 %) et *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*), celui sous-dominant (25,1 %) en présence des eaux de rinçage. Lorsque les biomasses sont congelées, on assiste également à une inversion de la dominance/sous-dominance, mais avec des phylotypes différents. Les bourbes congelées sont constituées du même phylotype dominant que les bourbes réfrigérées (*Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*)) avec une abondance relative de 45,5 %, et, l'espèce sous-dominante est *Clostridium intestinale* (38,2 %). A l'inverse, *Clostridium intestinale* domine (42,0 %) et *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) sous-domine (30,9 %) lorsque les eaux de rinçage congelées sont ajoutées aux bourbes congelées.

Ces deux dernières espèces constituaient également les bactéries majoritaires co-dominantes de la biomasse 'marcs' réfrigérés issue des vendanges 2014 (34,8 % et 35,1 %) avec en plus *Enterococcus villorum* (21,1 %). On remarque que la biomasse 'marcs + eaux de rinçage' issue des vendanges 2013 est également constituée des phylotypes dominant *Klebsiella/Enterobacter/Proteus* (54,8 %) et sous-dominant *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) (39,4 %), de manière similaire aux marcs congelés issus des vendanges 2014 (respectivement, 51,3 % et 33,8 %).

4.1.5 Discussion

Les performances de production d'hydrogène ont permis de voir l'influence de la perturbation biotique liée à l'ajout des eaux de rinçage aux différentes biomasses. Outre la différence de concentration initiale en sucres entre les biomasses justifiant les différences de productivités et de volumes d'hydrogène produit, seul le rendement en hydrogène a permis de mettre en évidence que : l'ajout des

eaux de rinçage réfrigérées aux bourbes réfrigérées impacte négativement et de manière significative le rendement en hydrogène (diminution de 21 %), en induisant la consommation d'une partie des sucres vers des voies non productrices d'hydrogène, alors que l'ajout des eaux de rinçage congelées aux bourbes congelées n'ont pas d'effet sur le rendement en hydrogène. L'analyse des métabolites confirme ces deux observations. En effet, la perturbation biotique (liées à l'ajout des eaux de rinçage réfrigérées) redirige une partie du métabolisme vers la voie éthanolique co-productrice de dioxyde de carbone (équation 9), d'où le rendement en hydrogène plus faible ($1,55 \pm 0,04$ mol/mol contre $1,96 \pm 0,34$ mol/mol pour les bourbes seules), et la diminution du rapport H_2/CO_2 observée ($0,64 \pm 0,04$ contre $0,86 \pm 0,06$ pour les bourbes seules).



Toutefois, l'analyse des structures de populations bactériennes par T-RFLP ne permet pas d'attribuer l'émergence d'une nouvelle population liée à la perturbation biotique des bourbes réfrigérées (Pinot Gris, Gewurztraminer et Riesling), alors que les profils de production de biogaz montrent clairement l'excès de dioxyde de carbone produit pendant les dix premières heures de fermentation en présence des eaux de rinçage. Un exemple de profil de production de biogaz est représenté dans la figure 110, pour le cépage Gewurztraminer.

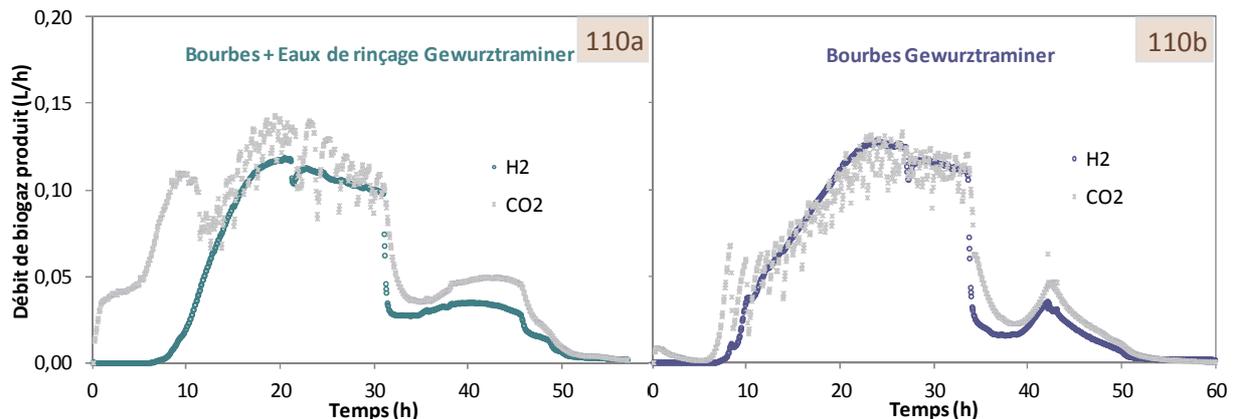


Figure 110 : Influence des eaux de rinçage sur le profil de production de biogaz pour les bourbes (Gewurztraminer) avec (a) et sans (b) ajout des eaux de rinçage.

Les biomasses étant issues de la viti-viniculture, nous avons émis l'hypothèse suivante : l'excès de dioxyde de carbone produit n'étant pas expliqué par une différence de microflore bactérienne, provient-il d'une activité liée à la présence de populations levuriennes ? Des analyses PCR-ITS réalisées par l'Université de Bourgogne, ont révélé la présence d'espèces de levures communes aux bourbes et aux eaux de rinçage, et qui produisent peu d'éthanol et mais de l'acétate d'éthyle et de l'acétaldéhyde (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012) telles que *Hanseniaspora guillermondii* ou *uvarum*, mais également des espèces fermentaires (productrices d'éthanol) supplémentaires présentes dans les eaux de rinçage, telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces partorianus* ou *bayanés*. Même s'il est rare de retrouver *Saccharomyces cerevisiae* sur les baies de raisin (et cela ne signifie pas qu'elle en soit totalement absente), après quelques jours de vendanges ces levures envahissent le matériel et

notamment les pressoirs (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012). Cette espèce est notamment responsable de la production éthanolique au cours de la vinification (équation 12). Sur nos profils de production de CO₂, on observe que les levures sont inhibées à partir de 10 h de fermentation puisque c'est à ce moment qu'il n'y a plus d'excès de CO₂ produit. La raison de cette inhibition reste indéterminée mais plusieurs hypothèses peuvent être formulées : (i) les levures sont inhibées par des bactériocines libérées (Kerr *et al.*, 1999) par de nombreux micro-organismes tels que *Enterococcus*, *Clostridium*, ou certaines *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*,...); (ii) les levures sont inhibées par des molécules libérées par la biomasse au cours de la fermentation telles que les furfural et hydroxy méthyl furfural, les acides faibles et les composés phénoliques (Klinke *et al.*, 2004 ; Almeida *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'analyse de séquençage a montré que la perturbation biotique influençait la structure bactérienne. En effet, l'ajout des eaux de rinçage a engendré une inversion des espèces dominante *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) et sous-dominante *Clostridium* sp., et l'émergence des *Enterobacteriaceae* en défaveur des bactéries lactiques. Ces changements de structures microbiennes n'ont pourtant pas affecté de façon significative le métabolisme global.

En ce qui concerne l'ajout des eaux de rinçage congelées aux bourbes congelées, les profils de production de biogaz n'ont pas montré d'excès de dioxyde de carbone produit, ni l'analyse de métabolites, un excès d'éthanol produit, ce qui explique la similarité des rendements en hydrogène obtenus ($1,78 \pm 0,18$ mol/mol pour la biomasse congelée 'bourbes + eaux de rinçage' contre $1,96 \pm 0,23$ mol/mol pour la biomasse congelée 'bourbes'). Ceci est expliqué par la sensibilité des levures à la congélation. Le séquençage a également confirmé la non influence de l'ajout des eaux de rinçage congelées aux bourbes congelées au niveau de la structure bactérienne.

Les marcs réfrigérés avec ou sans eaux de rinçage produisent également un excès de dioxyde de carbone (rapport final H₂/CO₂ respectifs de $0,42 \pm 0,11$ et $0,48$) en début de fermentation (figure 111), accompagné d'une production d'éthanol ($9,7 \pm 6,2$ mmol et $4,1$ mmol).

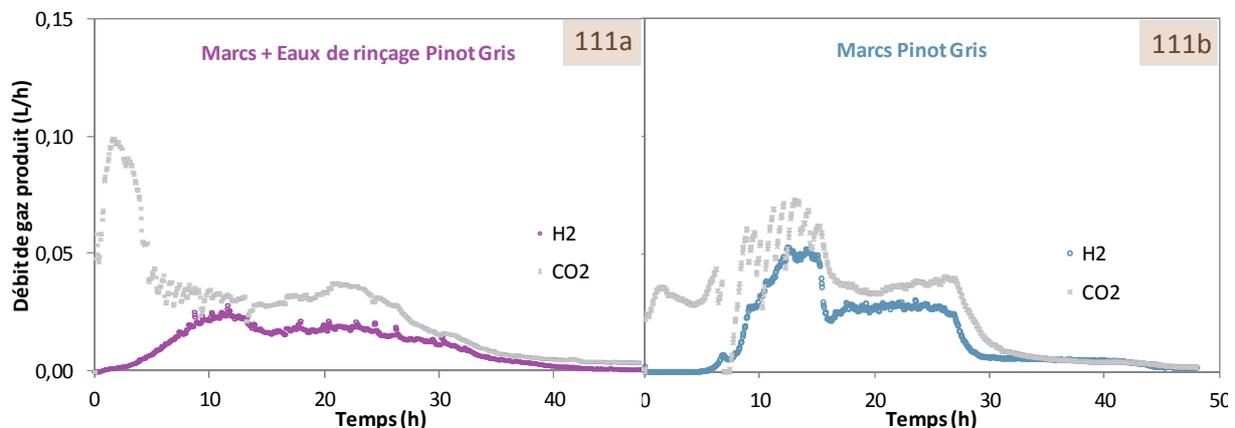


Figure 111 : Influence des eaux de rinçage sur le profil de production de biogaz pour les marcs (Pinot Gris) avec (a) et sans (b) ajout des eaux de rinçage.

Les levures fermentaires provenant essentiellement du pressoir, il serait donc normal de retrouver ces micro-organismes sur les marcs. Des analyses ITS-PCR permettraient de confirmer ces hypothèses. Le

séquençage a montré que la biomasse réfrigérée ‘marcs + eaux de rinçage’ était composée majoritairement des bactéries entériques et *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*). Ceci est cohérent avec les métabolites majoritaires produits (acétate, butyrate et éthanol).

4.1.6 Conclusion

La possibilité d'utiliser les eaux de rinçage des pressoirs avec d'autres biomasses présente plusieurs avantages. D'une part, cela permet une valorisation énergétique des eaux de rinçage, déchet dont le volume produit est important et que les viticulteurs doivent traiter. D'autre part, en fonction de sa concentration en sucres qui peut varier en fonction du mode opératoire pour le rinçage, l'association de ce déchet à la biomasse bourbes permet, au mieux, d'améliorer la production d'hydrogène et, tout au moins, d'obtenir une production en hydrogène équivalente si les eaux de rinçage n'étaient pas utilisées. Ces résultats sont donc au bénéfice de cette option permettant une économie d'eau en intrant sur le procédé. Au niveau microbiologique, l'ajout des eaux de rinçage aux bourbes modifie une partie de la structure des communautés bactériennes, qui ne sont pas les bactéries productrices d'hydrogène sans avoir d'impact sur le métabolisme global (voie acétate et butyrate). En revanche, le désavantage est que les eaux de rinçage apportent des levures productrices d'éthanol, consommatrices de substrat, qui font chuter le rapport H_2/CO_2 et le rendement en hydrogène de 30 %. Il est donc nécessaire d'effectuer un prétraitement sur les eaux de rinçage afin d'inhiber les levures et ainsi, de s'affranchir de l'excès de CO_2 et d'éthanol produit. La congélation est une technique qui répond à l'objectif mais dont la mise en œuvre à plus grande échelle que celle du laboratoire, reste complexe et surtout énergivore. L'ajout d'inhibiteurs chimiques est également possible à condition d'inhiber uniquement les levures et non les bactéries productrices d'hydrogène, mais reste cependant un coût non négligeable pour une transposition à grande échelle.

En ce qui concerne l'ajout des eaux de rinçage aux marcs, son influence n'est pas clairement établie par manque de données suffisantes. En effet, les différences microbiologiques observées entre les marcs congelés issus des vendanges 2013 et 2014 ont clairement montré une composition microbienne différente : ceux de 2013 étaient composés majoritairement des *Enterobacteriaceae* (98,0 %) conformément aux marcs des différents cépages étudiés dans le sous-chapitre 3 alors que ceux issus des vendanges 2014 sont composés co-majoritairement des *Enterobacteriaceae* (51,3 %) et des *Clostridiaceae* (42,5 %). Des tests de fermentation supplémentaires à partir des marcs réfrigérés avec ou sans eaux de rinçage issus d'une même année de vendange seront nécessaires et permettront de confirmer ou non les performances de production d'hydrogène et les métabolites produits obtenus. Des analyses de séquençage sur la structure des populations microbiennes et des analyses ITS-PCR complémentaires sur la microflore levurienne présente sur les marcs et les eaux de rinçage seront nécessaires afin de mieux comprendre l'impact de la perturbation biotique.

4.2. Influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ sur la production d’hydrogène

4.2.1 Influence des biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ sur les performances de production d’hydrogène

Le gâteau de filtration est le rétentat issu du pressage des bourbes sur un filtre presse. Les lies représentent le résidu solide extrait lors de l’étape de vinification. Les biomasses testées ont été stockées à -20°C . La figure 112 représente les performances de production d’hydrogène des différentes biomasses. Les performances moyennes ont été calculées sur les bourbes et les marcs (tous cépages confondus), et ont été comparées aux valeurs uniques obtenues par le gâteau et les lies de cépage Riesling (Alsace) issus des vendanges 2014.

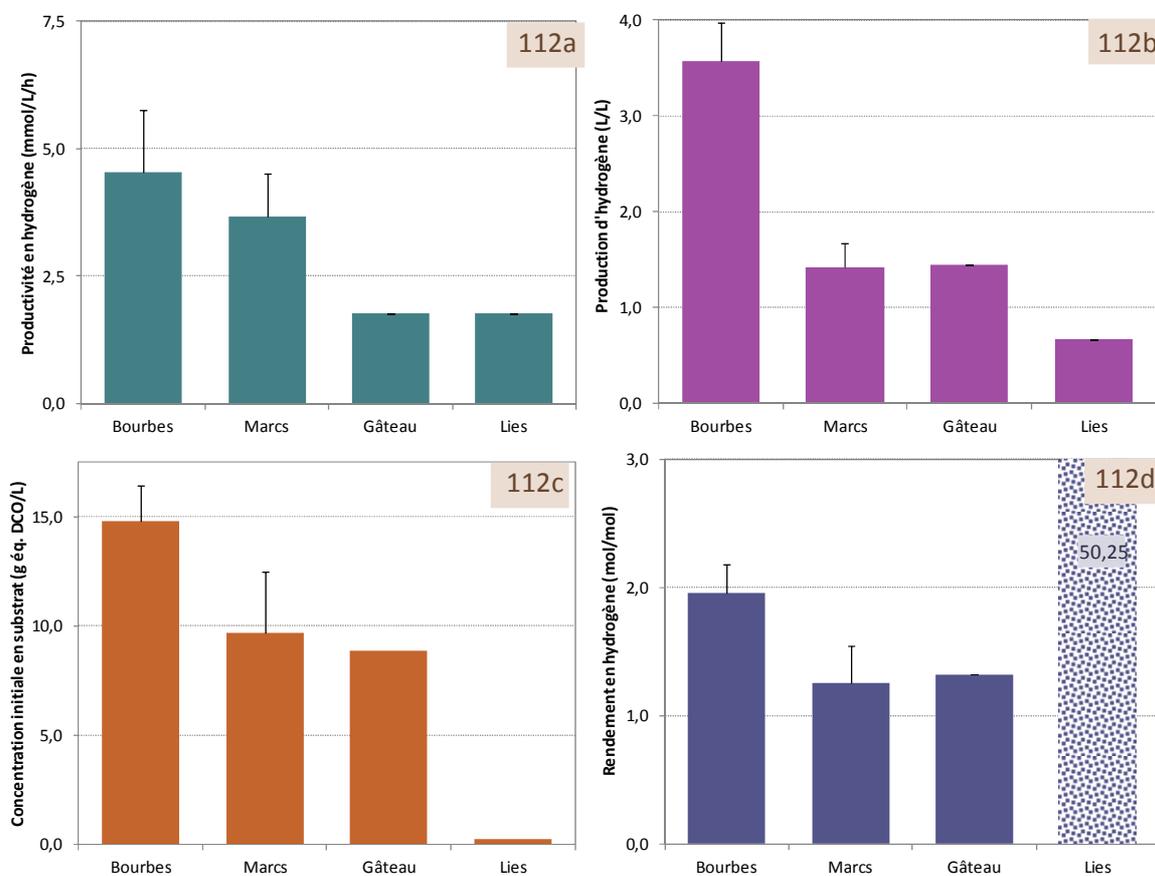


Figure 112 : Performances de production d’hydrogène obtenues à partir des différentes biomasses : productivité (a), production (b) et rendement (d) en hydrogène, et concentration en substrat (c).

Il est important de rappeler que la productivité et la production d’hydrogène sont notamment corrélées à la teneur initiale en sucres d’après le chapitre IV. Ainsi, la biomasse ‘gâteau’ pour laquelle la teneur initiale en sucres (figure 112c) est similaire à la biomasse ‘marcs’ (respectivement, $8,88 \text{ g éq. DCO/L}$ et $9,71 \pm 2,77 \text{ g éq. DCO/L}$), a obtenu une productivité (figure 112a) deux fois plus faible ($1,8 \text{ mmol/L/h}$) que celle obtenue par la biomasse ‘marcs’ mais un volume d’hydrogène produit (figure 112b) équivalent ($1,5 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$ soit $20,1 \text{ L/kg}_{\text{gâteau}}$ contre $1,4 \pm 0,3 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$ soit $20 \pm 4 \text{ L/kg}_{\text{marcs}}$). Ceci explique donc les rendements en hydrogène (figure 112d) similaires obtenus pour ces deux biomasses

(respectivement 1,32 mol/mol et $1,26 \pm 0,29$ mol/mol). Les performances de production en hydrogène obtenues par la biomasse 'gâteau' sont donc bien inférieures à celles de la biomasse 'bourbes' laquelle ayant une teneur initiale en sucres presque deux fois supérieures. Il est important de rappeler que la biomasse gâteau est le résidu solide issu du pressage des bourbes. Les sucres assimilables étant solubles, il ne reste que très peu de substrat dans le résidu solide, ce qui explique les performances plus faibles obtenues par le gâteau par rapport aux bourbes.

En tenant compte de la teneur initiale en sucres de la biomasse 'lies' qui est très faible (0,2 g éq. DCO/L), la productivité en hydrogène obtenue dépasse largement nos attentes. Plus concrètement, la productivité est aussi élevée que celle de la biomasse 'gâteau' (1,8 mmol/L/h) et, malgré une concentration en substrat 41 fois inférieure, le volume de production n'est que deux fois plus faible que cette dernière biomasse ($0,7 \text{ L/L}_{\text{réacteur}}$ soit $9,4 \text{ L/kg}_{\text{lies}}$). Le rendement en hydrogène obtenu par les lies (50,25 mol/mol) étant très largement supérieur au rendement théorique maximal *in vivo* (4 mol/mol), cela signifie que les lies contiennent d'autres matières métabolisables que les sucres.

4.2.2 Influence des biomasses 'gâteau' et 'lies' sur le métabolisme

La distribution des métabolites produits en fin de fermentation de chaque biomasse est représentée sur la figure 57. Seuls les métabolites produits par les bourbes et les marcs sont des moyennes, cependant, les barres d'erreur ne sont pas représentées pour une plus grande lisibilité. Le bilan de matière calculé pour les biomasses « gâteau » et « lies » sont représentés en annexe 9. La valeur obtenue pour la biomasse « gâteau » est de 130 %, ce qui s'explique par le relargage de tartrate de la biomasse solide au cours de la fermentation.

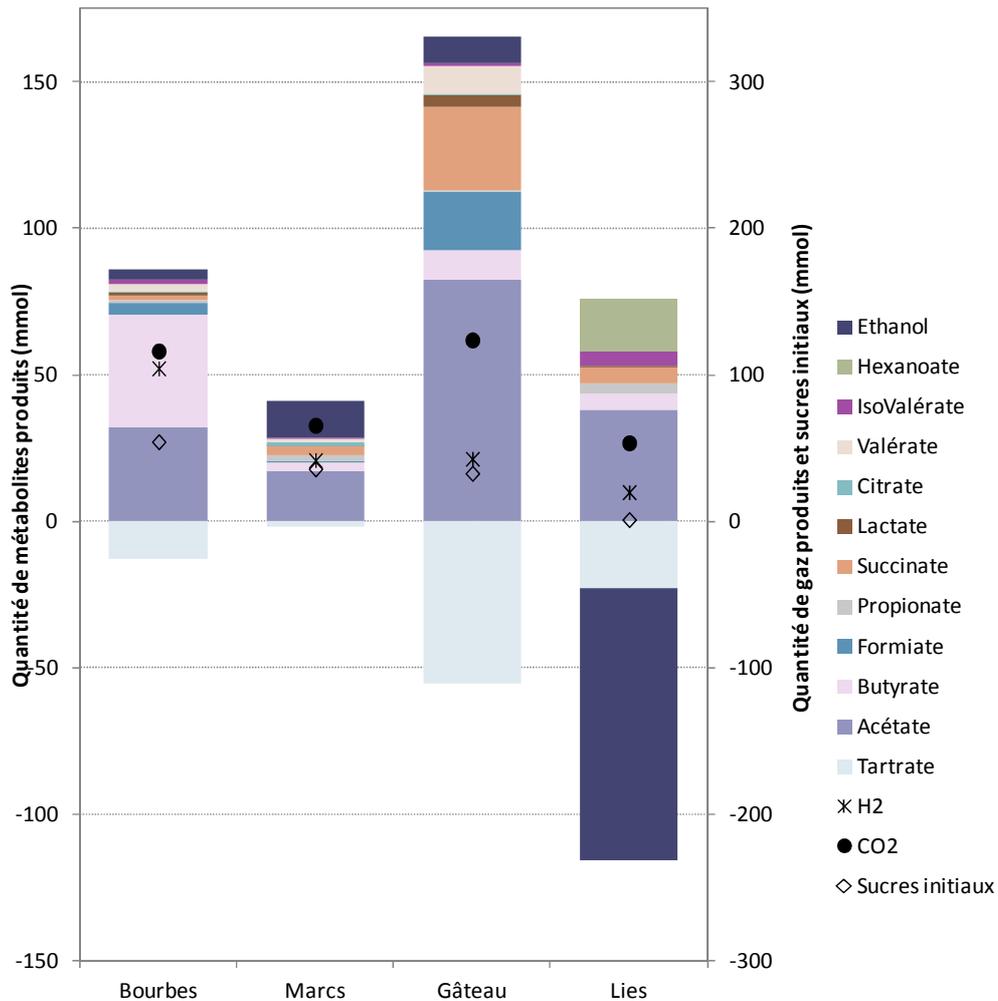


Figure 113 : Distribution des métabolites et des gaz produits à partir des différentes biomasses.

Les métabolites primaires majoritairement produits sont l'acétate aussi bien pour la biomasse gâteau que pour la biomasse 'lies' (respectivement, 82,3 mmol et 37,8 mmol). Ceci est surprenant car l'acétate est généralement accompagné du butyrate dans le cas des bourbes, ou d'éthanol dans le cas des marcs, à des quantités proches. La quantité totale de métabolites secondaires produit par la biomasse gâteau (82,9 mmol) est 5,4 fois plus élevée que celle de la biomasse 'bourbes' (15,2 mmol), 4,1 fois plus élevée que celle de la biomasse lies (20,1 mmol) et 3,4 fois plus élevée que la biomasse marcs (24,0 mmol). Les métabolites secondaires principalement produits sont : le succinate (28,2 mmol) et le formiate (20,2 mmol) pour la biomasse 'gâteau' et, l'hexanoate (18,1 mmol) pour la biomasse lies. Par ailleurs, on remarque que la quantité de tartrate consommée à partir de la biomasse 'gâteau' est 4,3 fois plus élevée que celle des bourbes et 2,6 fois plus élevée que celle des lies. En revanche, la biomasse 'lies' est la seule biomasse qui visiblement consomme 57 % de l'éthanol initial présent (243,7 mmol/L).

4.2.3 Structure des communautés microbiennes par séquençage

La structure des communautés microbiennes a été analysée par séquençage et la classification taxonomique au niveau des familles est représentée sur la figure 114. Les bourbes, le gâteau et les lies sont issus des vendanges 2014 et du cépage Riesling.

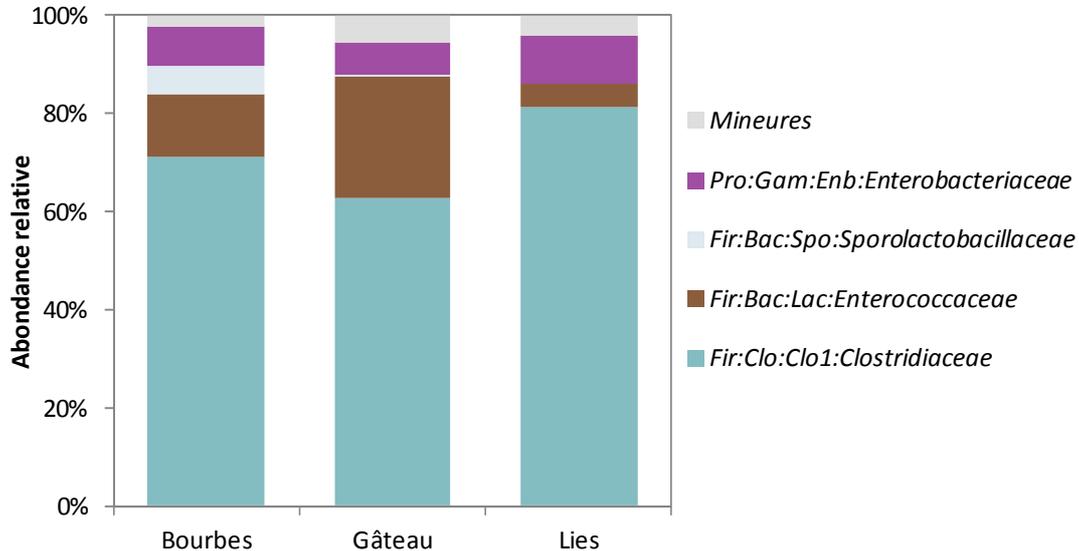


Figure 114 : Caractérisation des structures microbiennes, au niveau de la famille, de chaque microflore endogène appartenant aux biomasses congelées bourbes, gâteau et lies. Pro = Proteobacteria ; Fir = Firmicutes ; Gam = Gammaproteobacteria ; Bac = Bacilli ; Clo = Clostridia ; Enb = Enterobacteriales ; Spo = Sporolactobacillales ; Lac = Lactobacillales ; Clo1 = Clostridiales.

Le séquençage indique que les biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ ont une composition similaire à la biomasse ‘bourbes’ : elles sont constituées de la famille dominante *Clostridiaceae* (respectivement, 62,9 % et 81,1 %) et des deux familles plus minoritaires, *Enterobacteriaceae* (respectivement, 9,8 % et 6,5 %) et *Enterococcaceae* (respectivement, 24,5 % et 4,9 %). En revanche, la famille *Sporolactobacillaceae* reste très minoritaire (abondance relative < 0,4 %). A partir de la classification taxonomique au niveau des familles, les biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ sont comparables à la biomasse ‘bourbes’ ; restent à identifier les espèces bactériennes constitutives de la famille pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Le tableau 16 représente l’affiliation des séquences représentatives des OTUs majoritaires à l’espèce ou au genre bactérien le plus proche.

Tableau 16 : Affiliation des séquences majoritaires d'ADN codant pour l'ARNr 16S obtenues par séquençage à partir des échantillons prélevés à 24h de fermentation des différents tests.

	Similarité	Bourbes	Gâteau	Lies
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5%	30,7%	61,0%	40,9%
<i>Clostridium intestinale</i>	99,6%	8,5%	0,4%	33,7%
<i>Clostridium</i> sp.	98,7%	6,5%	0,1%	< 0,1%
<i>Clostridium pasteurianum</i>	100,0%	25,2%	1,3%	< 0,1%
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0%	0,1%	< 0,1%	6,5%
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7%	12,5%	24,5%	4,9%
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0%	5,8%	0,4%	< 0,1%
<i>Klebsiella/Enterobacter/Proteus</i>	99,6%	8,3%	6,5%	9,8%

La biomasse gâteau est constituée d'une structure simple d'espèces bactériennes : *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est l'espèce dominante avec une abondance relative de 61,0 %, *Enterococcus villorum* est l'espèce sous-dominante (24,5 %), et *Enterobacteriaceae* est la famille majoritaire principale (6,5 %), les autres espèces minoritaires ont une abondance relative inférieure à 1,3 %. La biomasse lies, a quant à elle, une structure un peu plus complexe : *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) et *Clostridium intestinale* sont les espèces co-dominantes avec les abondances relatives respectives de 40,9 % et 33,7 %, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*) et *Enterococcus villorum* sont les trois espèces/familles minoritaires principales (respectivement, 9,8 %, 6,5 % et 4,9 %).

Il apparaît clairement que les biomasses gâteau et lies ont une structure microbienne proche de celle de la biomasse bourbes. La biomasse gâteau étant le résidu solide issu du pressage des bourbes, il n'est donc pas surprenant que la structure microbienne obtenue soit proche de celles des bourbes. Quant aux lies (particules en suspension constituées essentiellement de levures récupérées dans les cuves en fin de fermentation), il est surprenant de voir que la structure microbienne obtenue lors de la fermentation obscure soit similaire à celle des bourbes, autrement dit, la microflore bactérienne endogène est viable, même après prolifération des levures.

4.2.4 Discussion

Le sous-chapitre précédent a montré la relation entre la présence de *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) et la production d'hydrogène produit. On remarque que l'abondance relative de cette espèce dans la biomasse gâteau est de 61,0 %, ce qui est le double de celle des bourbes (30,7 %), sans pour autant obtenir un rendement en hydrogène équivalent aux bourbes. L'abondance relative de l'espèce productrice d'hydrogène dans la biomasse 'lies' de 40,9 %, légèrement plus élevée que celle des bourbes, met en évidence la capacité de cette espèce à métaboliser des matières fermentescibles (protéines, ...) autres que le sucre soluble.

Un autre critère mis en évidence dans le chapitre IV est la concentration initiale en sucres: plus la quantité est importante et plus le volume d'hydrogène produit sera élevé. C'est pourquoi, il semblait logique que la biomasse gâteau dont la concentration initiale en sucres est similaire à celle des marcs,

produise le même volume d'hydrogène que la biomasse marcs. Or, on a remarqué au paragraphe 4.3.2., une différence au niveau de la quantité totale de métabolites produits et de la composition de ces métabolites. En effet, la biomasse gâteau produit une quantité totale de 165,2 mmol contre 41,0 mmol pour la biomasse marcs. La figure 115 représente les concentrations en métabolites et en sucres ainsi que le volume de biogaz produit en cours de fermentation.

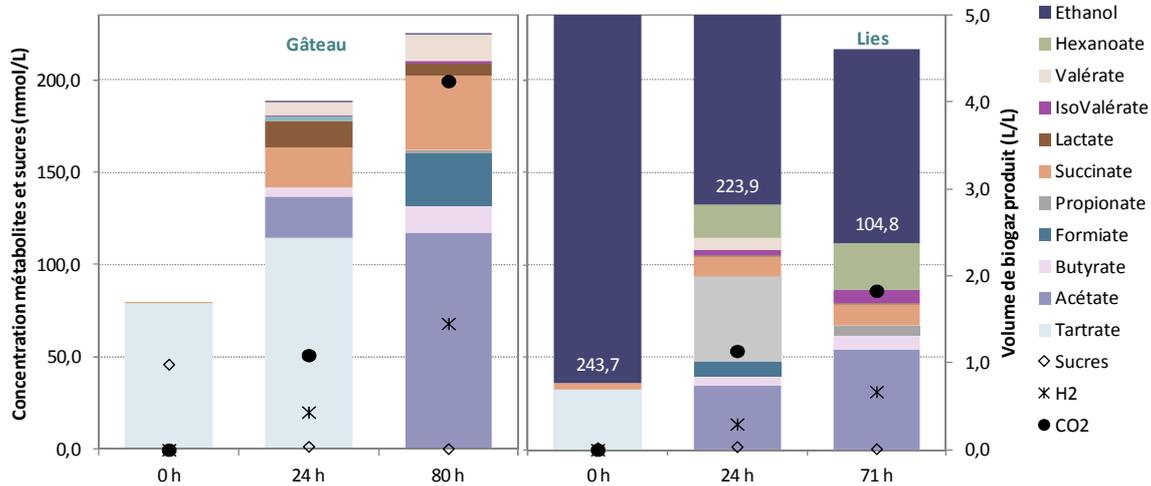


Figure 115 : Concentration des métabolites et des sucres au cours de la fermentation des biomasses gâteau et lies.

La relation entre la quantité initiale (ou à 24 h de fermentation pour les biomasses solides) de tartrate et la quantité totale de métabolites produits a été mise en évidence : plus la quantité initiale (ou à 24 h de fermentation) en tartrate est élevée, et plus la quantité totale de métabolites produits est importante, les lies étant mises à part à cause de la présence initiale d'éthanol. Il est certain que la totalité des métabolites n'est pas uniquement due au tartrate, mais bien évidemment aussi aux sucres. Le test de Pearson a permis d'établir une corrélation positive significative ($r = 1,000 ; 0,005$) sur trois observations entre la somme des quantités initiales de sucres et de tartrate et la quantité totale de métabolites produits (figure 116).

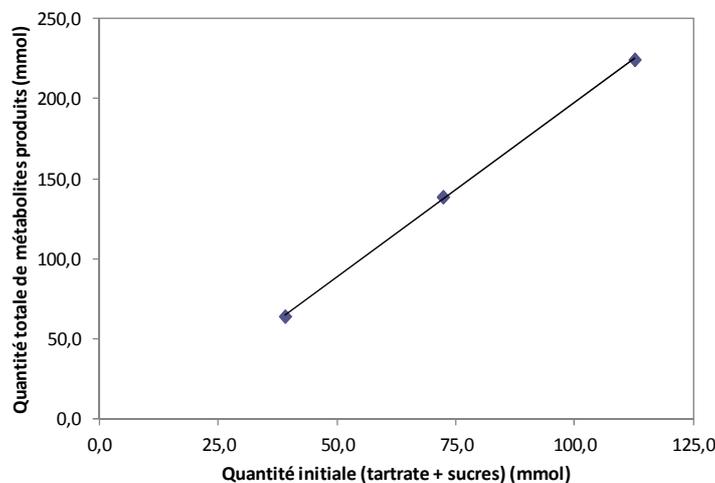
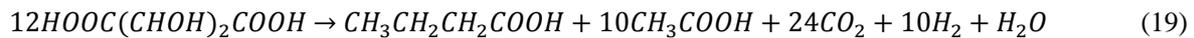
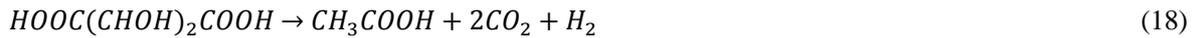
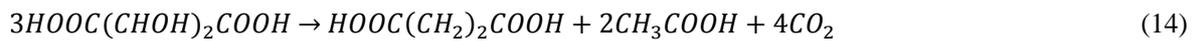
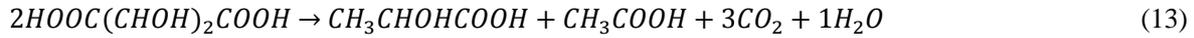


Figure 116 : Quantité totale de métabolites produits au cours de la fermentation des biomasses bourbes, gâteau et lies, en fonction de la quantité initiale sommée de tartrate et de sucres.

Selon Radler *et al.* (1972), le tartrate peut être converti en acétate et lactate par *Lactobacillus lactis* (équation 13), ou en acétate et succinate par *Lactobacillus brevis* (équation 14). Tabachnick & Vaughn ont découvert en 1948, la capacité de certaines *Clostridium*, telles que *Clostridium butyricum* ou *Clostridium beijerinckii* à convertir le tartrate en acétate (équation 18) avec co-production d'hydrogène (rapport $H_2/CO_2 = 0,5$) et parfois, en acétate et butyrate (équation 19) (rapport $H_2/CO_2 = 0,42$).



La quantité de lactate produite étant faible ou inexistante, dans le cas du gâteau et des lies, la conversion du tartrate en lactate est exclue. En revanche, il n'est pas exclu que le tartrate soit converti en acétate et succinate, et/ou en acétate et butyrate, compte tenu des quantités produites de ces métabolites par les biomasses 'gâteau' et 'lies'. Or, le séquençage a montré l'absence de *lactobacillus brevis* mais la présence d'une autre bactérie lactique *Enterococcus villorum*. Cette espèce n'est pas connue dans la littérature pour convertir le tartrate, mais l'abondance élevée de cette espèce dans la biomasse 'gâteau' est remarquable. De plus, l'espèce *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) est présente également dans toutes les biomasses. Le test de Pearson a permis d'établir une corrélation positive significative ($r = 0,991$; $0,01$) sur quatre observations entre la somme des abondances relatives des espèces *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) et *Enterococcus villorum*, et la quantité de tartrate initiale (figure 117).

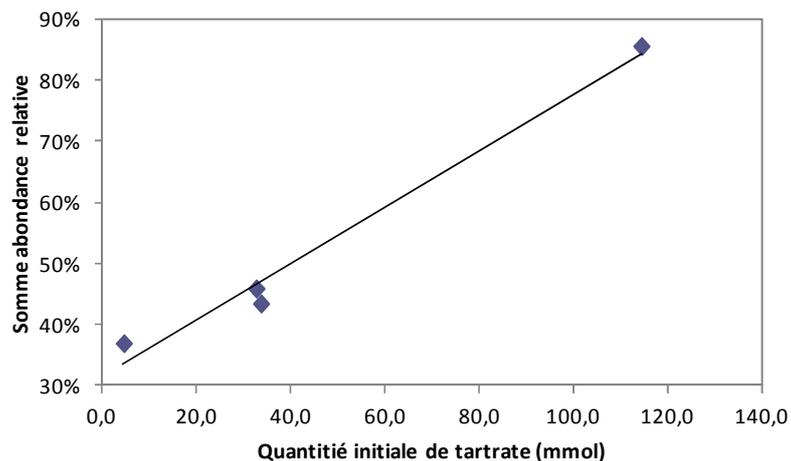
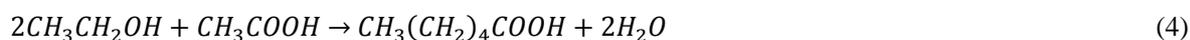


Figure 117 : Somme des abondances relatives de *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) et *Enterococcus villorum* en fonction de la quantité initiale de tartrate.

Les rapports butyrate/acétate (respectivement, 0,12 et 0,15 pour les biomasses 'gâteau' et 'lies') et les rapports H_2/CO_2 (respectivement, 0,34 et 0,37) étant faibles, cela va dans le sens de l'équation qui convertit le tartrate en acétate et butyrate pour laquelle les rapports butyrate/acétate et H_2/CO_2 sont de 0,10 et 0,42. De plus, si l'on calcule un nouveau rapport théorique $H_2/(10 \cdot \text{tartrate consommé}/12)$ pour

les biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’, on obtient les résultats respectifs suivants : 0,92 et 1,02, ce qui signifie que l’hydrogène produit est en partie expliqué par la voie de consommation du tartrate. Le rapport théorique $H_2/(10 \cdot \text{tartrate consommé}/12)$ obtenu est plus pertinent pour les biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ que le rapport $H_2/[2 \cdot (\text{butyrate} + \text{acétate})]$ dont les résultats sont respectivement de 0,23 et 0,22.

La biomasse ‘lies’ est particulière car elle contient une quantité initiale quasiment nulle de sucres (0,2 g éq. DCO/L), une quantité initiale d’éthanol élevée (170,6 mmol), dont une grande partie (97,3 mmol) est consommée, et en plus, une quantité initiale en protéines solubles 2,9 fois plus élevées que les bourbes du même cépage (respectivement $31,6 \pm 0,4$ mg/L contre $10,9 \pm 0,4$ mg/L). En effet, les lies se composent majoritairement de débris cellulaires et intracellulaires, d’enzymes hydrolytiques et de biopolymères libérés par l’autolyse des levures pendant la maturation (Pérez-Serradilla & de Castro, 2008). A cette composition initiale atypique, s’ajoute les productions particulières d’hexanoate (18,1 mmol) en fin de fermentation et de propionate (32,0 mmol) à 24 h de fermentation. Au niveau microbien, le séquençage a montré que la seule espèce présente dans les lies et quasiment absente des autres biomasses est *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*) avec une abondance relative de 6,5 %. Or, ces espèces ne sont pas connues pour métaboliser l’éthanol ou les protéines, ni de produire de l’hexanoate. *Clostridium kluyverii* est capable d’oxyder l’éthanol et l’acétate en hexanoate (équation 4) (Barker *et al.*, 1945), mais le séquençage n’a pas permis d’identifier cette bactérie. La possibilité que certaines bactéries aient acquis au cours du temps, la capacité de convertir l’éthanol en hexanoate n’est pas à exclure.



4.2.5 Conclusion

Les premiers essais de production d’hydrogène à partir des biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ sont prometteurs. En effet, même si les volumes d’hydrogène produit par ces biomasses sont inférieurs à ceux obtenus par la biomasse ‘bourbes’, ils ne sont pas négligeables : respectivement, $53 \text{ L}_{H_2}/\text{kg}_{MV}$ pour les biomasses ‘gâteau’ et ‘lies’ ce qui est plus faible que la biomasse ‘bourbes’ ($308 \pm 6 \text{ L}_{H_2}/\text{kg}_{MV}$) mais équivalent à la biomasse ‘marcs’ ($56 \pm 4 \text{ L}_{H_2}/\text{kg}_{MV}$). Il est important de rappeler que la biomasse ‘lies’ était très faiblement chargée en sucres (0,2 g éq. DCO/L) mais la teneur en protéines était trois fois plus élevée que celle des bourbes du même cépage ($31,6 \pm 0,4$ mg/L contre $10,9 \pm 0,4$ mg/L). Cette étude a notamment mis en évidence la conversion du tartrate pour la production d’hydrogène, ce qui est novateur dans le domaine de la fermentation obscure, qui jusqu’à présent considérait les sucres comme principal substrat pour les bactéries productrices d’hydrogène. D’autres tests de fermentation sont tout de même nécessaires pour confirmer cette hypothèse et optimiser au mieux les performances de production d’hydrogène à partir de ces biomasses.

5. Conclusion

L'étude de l'influence des caractéristiques endogènes liées aux biomasses congelées 'bourbes' et 'marcs' a montré que le cépage et le mode de culture n'impactaient pas directement la production d'hydrogène. C'est surtout la teneur initiale en sucres différente d'un cépage à l'autre qui se répercute sur la production et la productivité en hydrogène. Les teneurs initiales en sucres sont comprises entre 11,7 et 17,2 g éq. DCO/L pour la biomasse 'bourbes' et entre 6,8 et 13,8 g éq. DCO/L pour la biomasse 'marcs', ce qui a notamment permis d'expliquer les volumes d'hydrogène produit pour lesquels les valeurs étaient comprises entre 2,6 et 4,4 L/L_{réacteur} (soit 35,7 – 62,3 L/L_{bourbes}) et 1,1 et 1,8 L/L_{réacteur} (soit 15,2 – 24,6 L/L_{marcs}) ainsi qu'en partie les productivités en hydrogène pour lesquelles les valeurs étaient comprises entre 2,1 et 6,5 mmol/L/h pour les bourbes et entre 2,9 et 4,8 mmol/L/h pour les marcs. La comparaison des performances de production d'hydrogène des bourbes d'Alsace et de Bourgogne a permis d'établir une corrélation entre la teneur en fer de la fraction totale de la biomasse et la productivité, permettant notamment d'expliquer les différences de productivités en hydrogène obtenues par ces deux terroirs. La différence de rendements en hydrogène obtenue entre les biomasses 'bourbes' et 'marcs' (respectivement, $1,97 \pm 0,27$ mol/mol et $1,25 \pm 0,21$ mol/mol) peut en partie être expliquée par la différence de protocole utilisé pour déterminer la teneur initiale en sucres mais surtout par le fait que les bactéries identifiées par séquençage soient différentes engendrant un réseau métabolique différent. En effet, *Clostridiaceae* est la famille majoritaire (entre 62,5 % et 90,7 %) identifiée dans les bourbes, laquelle utilise majoritairement les voies butyrate et acétate, alors que dans les marcs *Enterobacteriaceae* est la famille majoritaire identifiée (entre 98,0 % et 99,8 %) utilisant les voies acétate et éthanol. Ces réseaux métaboliques utilisés ont notamment permis d'expliquer les plus faibles rapports molaires H₂/CO₂ obtenus par les marcs ($0,66 \pm 0,10$) comparativement aux bourbes ($0,92 \pm 0,04$).

L'étude des performances de production d'hydrogène obtenues à partir de biomasses 'bourbes' et 'marcs' issues de vendanges différentes a montré une variabilité plus prononcée pour la biomasse 'marcs' que la biomasse 'bourbes' au niveau de la composition majoritaire des métabolites produits (présence de butyrate) notamment expliquée par une composition microbienne différente (abondance relative de *Clostridiaceae* de 33,8 %). L'étude de l'influence des matières lignocellulosiques (rafles) au niveau des marcs n'a pas révélé d'inhibition de la production d'hydrogène puisque les profils de production d'hydrogène ainsi que les structures des populations microbiennes obtenues par T-RFLP étaient très similaires.

L'étude de l'ajout des eaux de rinçage à la biomasse 'bourbes' a permis de mettre en évidence que l'excès de CO₂ produit lorsque les biomasses sont réfrigérées est lié à la présence de levures productrices d'éthanol dans les eaux de rinçage réfrigérées, diminuant ainsi le rapport molaire H₂/CO₂ à une valeur de $0,64 \pm 0,04$. La sensibilité des levures à la congélation a permis en revanche d'éviter

ce phénomène, le rapport H_2/CO_2 obtenu par le mélange des biomasses congelées 'bourbes + eaux de rinçage' étant similaire à celui des bourbes congelées (respectivement, $0,95 \pm 0,03$ contre $0,90 \pm 0,03$). En revanche, la même étude réalisée sur les marcs n'a pas clairement établi l'influence du mélange de ces biomasses notamment à cause des différences microbiologiques des marcs provenant de vendanges différentes.

Enfin, l'étude de la production d'hydrogène à partir du gâteau de filtration et des lies de vin a mis en évidence des caractéristiques endogènes différentes : la biomasse 'gâteau' est caractérisée par une teneur initiale en tartrate élevée (79,1 mmol/L) et la biomasse 'lies' par des teneurs initiales en protéines ($31,6 \pm 0,4$ mg/L) et en éthanol (243,7 mmol/L) élevées et une faible teneur initiale en sucres (0,2 g éq. DCO/L). De plus, les faibles rapports molaires butyrate/acétate (respectivement, 0,12 et 0,15) et H_2/CO_2 (respectivement 0,34 et 0,37) obtenus pour ces deux biomasses témoignent d'une utilisation de voies métaboliques différentes de celles utilisées par les biomasses 'bourbes' (en moyenne $1,35 \pm 0,52$ et $0,90 \pm 0,06$ pour les rapports molaires butyrate/acétate et H_2/CO_2) ou 'marcs' (en moyenne $0,20 \pm 0,17$ et $0,63 \pm 0,10$ pour les rapports molaires butyrate/acétate et H_2/CO_2). Les lies ont notamment produit deux métabolites supplémentaires par rapport aux autres biomasses : l'hexanoate et un autre métabolite non encore identifié à ce jour. A partir de l'analyse des métabolites produits en cours de fermentation, nous avons pu émettre l'hypothèse que l'hydrogène est produit via la dégradation du tartrate. Le séquençage a permis de mettre en évidence le genre microbien majoritaire identifié *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) avec 61,0 % et 40,9 % d'abondance relative pour les biomasses 'gâteau' et 'lies'.

A travers les différentes études de ce chapitre, nous avons pu montrer que le type de biomasse est la principale caractéristique endogène qui influe sur la production d'hydrogène, non seulement par ses teneurs initiales en sucres, en tartrate et en protéines, mais également par leur microflore endogène (bactérienne et levurienne) qui oriente le métabolisme global. Si la biomasse 'bourbes' permet d'obtenir les volumes d'hydrogène produit et les rendements les plus élevés, il n'en reste pas moins que les biomasses 'marcs', 'gâteau' et 'lies' ont un fort potentiel, qu'il est nécessaire d'optimiser. La combinaison de différentes biomasses est une des voies possibles d'optimisation.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans un contexte de transition énergétique et avec la montée en puissance des énergies renouvelables, ce travail de recherche s'inscrit dans la dynamique d'explorer la potentialité de nouvelles biomasses pour la production d'un vecteur énergétique propre, l'hydrogène, dans le but ultime de développer un procédé de production continue d'hydrogène pour lequel les valeurs de productivités et de rendements en hydrogène soient les plus élevées.

L'étude préliminaire du chapitre III a mis en évidence le potentiel d'une biomasse viticole de type 'bourbes' à produire de l'hydrogène lorsque des boues de STEP sont additionnées à cette biomasse avec un prétraitement thermique réalisé (fermentation exogène) pour laquelle les rendements en hydrogène moyens obtenus sont vingt fois supérieurs à ceux obtenus par des biomasses similaires dans la littérature. Puis, nous avons montré la faisabilité d'utiliser cette biomasse à la fois en tant que substrat mais aussi en tant que consortium microbien, sans aucun ajout de nutriments supplémentaires et sans réaliser de prétraitement thermique (fermentation endogène) avec un rendement huit fois supérieur à celui obtenu dans des conditions similaires par une biomasse agro-alimentaire de la littérature. Les résultats de pyroséquençage nous ont permis d'identifier la microflore bactérienne comme étant composée majoritairement de bactéries appartenant au genre *Clostridium*. **Il a ainsi été mis en évidence que la production d'hydrogène par la microflore bactérienne adaptée naturellement à la biomasse (fermentation endogène), sans dépense énergétique supplémentaire, est aussi efficace que la fermentation exogène avec prétraitement thermique.** Ce bioprocédé fermentaire performant a fait l'objet d'un dépôt de brevet et a ainsi été sélectionné pour étudier l'influence des paramètres biotiques et abiotiques sur la production d'hydrogène et leurs impacts sur les communautés microbiennes.

Les travaux développés dans le chapitre IV ont permis de montrer que la congélation limite la consommation des sucres par les micro-organismes intrinsèques à la biomasse lors de son stockage ; qu'un stockage de la biomasse à 4°C pendant un court terme ne modifie pas les performances de production d'hydrogène ; qu'un **prétraitement thermique à chaud permet d'améliorer de 16 % la production d'hydrogène (3,7 L/L de milieu réactionnel), de 20 % le rendement en hydrogène (2,16 mol/mol d'hexoses consommés)** et d'atteindre des quantités équivalentes d'hydrogène et de dioxyde de carbone produit (rapport molaire de 1,01) ; que **l'utilisation du CO₂ comme gaz de balayage est possible** afin de recycler le CO₂ produit au cours de la fermentation **avec un maintien de la production d'hydrogène (3,3 L/L de milieu réactionnel) et de son rendement (1,96 mol/mol d'hexoses consommés)** sans impact significatif sur la productivité (4,16 mmol/L/h). Le séquençage a permis d'identifier *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) comme étant le genre bactérien majoritaire dans tous les tests associés à une production majoritaire d'acétate et de butyrate révélées par l'analyse des métabolites produits. L'étude de l'influence du pH du milieu réactionnel, paramètre clé du processus fermentaire, a montré que le pH initial a un impact sur le rendement et le rapport H₂/CO₂ pour lesquels les valeurs les plus élevées ont été obtenues à un pH initial de 7,0 ; le pH

de régulation a quant à lui eu un impact direct sur la productivité en hydrogène (diminution avec l'acidité) sans conséquence sur le volume final d'hydrogène produit. De plus, l'analyse des métabolites a mis en évidence que le pH de régulation oriente le métabolisme vers la production de butyrate, l'acétate étant quasiment absent en fin de fermentation et le tartrate initial n'étant plus consommé à un pH de régulation de 4,5. Le séquençage a permis d'établir que le phylotype majoritaire était le même que dans les études précédentes, quel que soit le pH de régulation : *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*). Enfin, l'étude de la charge en substrat, a **mis en évidence des corrélations linéaires entre la teneur initiale en substrat et le volume d'hydrogène produit d'une part et entre la teneur initiale en substrat et la productivité en hydrogène d'autre part**. Il a ainsi été possible d'augmenter d'un facteur 3,4 la production d'hydrogène et la productivité en hydrogène en utilisant une charge initiale de 60 g éq. DCO/L avec un rendement correct (1,44 mol/mol) et un rapport molaire H₂/CO₂ maintenu (0,81) sans impact majeur sur les communautés microbiennes. En revanche, il a été montré qu'une teneur initiale en substrat trop élevée inhibe partiellement les performances de production d'hydrogène en favorisant les bactéries concurrentes, consommatrices du substrat ; la dilution de la biomasse brute 'bourbes' étant donc préférable.

Le Chapitre V portant spécifiquement sur le potentiel de production d'hydrogène des sous-produits de la vigne (bourbes, marcs de raisin, lies de vins, gâteau de filtration et eaux de rinçage des pressoirs) a montré une influence indirecte du cépage et du mode de culture des biomasses congelées 'bourbes' et 'marcs' sur la production d'hydrogène. En effet, une corrélation entre la teneur initiale en fer de la fraction totale des bourbes et la productivité en hydrogène a été établie ($r^2 = 0,979$). **La microflore bactérienne endogène identifiée grâce au séquençage, est en revanche caractéristique du type de biomasse : Clostridiaceae pour la biomasse 'bourbes' et Enterobacteriaceae pour la biomasse 'marcs' ; et est associée respectivement aux voies acétate/butyrate et aux voies acétate/éthanol.** Ces caractéristiques endogènes liées au type de biomasse ont permis notamment d'expliquer des rendements en hydrogène obtenus deux fois plus élevés pour la biomasse 'bourbes' que pour la biomasse 'marcs' ainsi que les rapports molaires H₂/CO₂ obtenus 30 % plus élevés pour la biomasse 'bourbes' que la biomasse 'marcs'. L'étude de l'influence des matières lignocellulosiques (rafles) au niveau des marcs n'a pas révélé d'inhibition de la production d'hydrogène à l'échelle du laboratoire puisque les profils de production d'hydrogène ainsi que les structures des populations microbiennes obtenues par T-RFLP étaient très similaires. **La perturbation biotique engendrée par l'ajout des eaux de rinçage à la biomasse 'bourbes' a permis de mettre en évidence que l'excès de CO₂ produit (+ 38 %) lorsque les biomasses sont réfrigérées est lié à la présence de levures productrices d'éthanol diminuant ainsi le rapport molaire H₂/CO₂ de 25 %.** En revanche, la même étude réalisée sur les marcs n'a pas clairement établi l'influence du mélange de ces biomasses notamment à cause des différences microbiologiques des marcs provenant de vendanges différentes. Enfin, dans la dernière étude, nous avons montré qu'il était possible de produire de l'hydrogène, certes

avec des rapports H_2/CO_2 2 à 3 fois plus faibles que les biomasses précédentes, à partir d'autres sous-produits viticoles ($20 L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$ pour le gâteau de filtration et $9 L_{H_2}/L_{\text{biomasse}}$ pour les lies de vin) lesquels ont des teneurs initiales en sucres respectivement, 1,6 et 68 fois plus faibles que les bourbes ($50 \pm 6 L_{H_2}/L_{\text{biomasse}}$) et, 1,1 et 45 fois plus faibles que les marcs ($20 \pm 4 L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$) mais des teneurs initiales élevées en tartrate (gâteau de filtration) et en protéines et éthanol (lies de vin). Malgré ces compositions initiales différentes, le séquençage a permis d'identifier le même phylotype majoritaire que celui obtenu pour les bourbes, ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'hydrogène est produit via la dégradation de tartrate.

Bien que le métabolisme microbien des cultures mixtes soit souvent complexe et considéré comme une « boîte noire », les résultats obtenus tout au long de ce travail de recherche sont cohérents aussi bien au niveau des performances de production d'hydrogène, mais aussi au niveau des métabolites produits et des identifications microbiennes établies. Cette cohérence a permis d'établir en première approche plusieurs corrélations énoncées précédemment qu'il sera nécessaire de confirmer. Ces travaux de recherche constituant les premiers résultats de l'utilisation des sous-produits viticoles pour la production d'hydrogène par fermentation endogène, des études complémentaires seront à réaliser afin de mieux comprendre les interactions microbiennes et leurs voies métaboliques et ainsi que d'optimiser les performances de production d'hydrogène. Les pistes envisageables pour l'optimisation des performances de production d'hydrogène, sont : l'utilisation des techniques « omiques » telles que la métaprotéomique ou la métabolomique, pour mieux comprendre l'utilisation des voies métaboliques par les micro-organismes endogènes à la biomasse ; l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou enzymatiques pouvant limiter l'utilisation du substrat par des voies métaboliques concurrentes à la production d'hydrogène et orienter le métabolisme vers les voies les plus productrices d'hydrogène ; ou encore, la mise en œuvre de la fermentation endogène dans un bioréacteur fonctionnant en mode continu tels que les bioréacteurs à lit fluidisé.

Jusqu'à présent, les sous-produits viticoles (bourbes, marcs de raisin, gâteau de filtration, lies de vin...) chargés en DCO sont soumis à une réglementation européenne qui oblige les viticulteurs soit à les livrer en distillerie pour notamment la production de bioéthanol, soit à les composter, soit à les épandre. La valorisation énergétique des marcs de raisin par méthanisation a été expérimentée dès 2011 en Alsace en co-digestion avec d'autres biodéchets paliant à la saisonnalité de cette biomasse. Ainsi, la possibilité de valoriser la biomasse vitivinicole en couplant sur un même site une unité de fermentation obscure pour la production d'hydrogène directement convertible en électricité à une unité de digestion anaérobie, utilisant les digestats composés d'AGV de la première pour la production de biogaz, pourrait représenter un nouveau schéma de co-génération de vecteurs énergétiques au bénéfice des producteurs de biomasses.

Angelidaki, I., and Sanders, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 117–129.

Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., and Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22, 477–485.

Axley, M.J., Grahame, D.A., and Stadtman, T.C. (1990). *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* 265, 18213–18218.

Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., and Reid, G. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4064–4073.

Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., Delvigne, F., Toye, D., Crine, M., Thonart, P., and Hiligsmann, S. (2015). Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochem. Eng. J.* 98, 18–28.

Belenguer, A., Duncan, S.H., Holtrop, G., Anderson, S.E., Lobley, G.E., and Flint, H.J. (2007). Impact of pH on Lactate Formation and Utilization by Human Fecal Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6526–6533.

Bhat, J.V., and Barker, H.A. (1947). *Clostridium lacto-acetophilum* Nov. Spec. and the Role of Acetic Acid in the Butyric Acid Fermentation of Lactate. *J. Bacteriol.* 54, 381–391.

Booth, I.R. (2013). Glycerol and Methylglyoxal Metabolism. *EcoSal Plus* 1.

Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., and Wilmotte, A. (2010). The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. *Microbiology* 156, 1575–1588.

Chen, C.C., and Lin, C.Y. (2003). Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Adv. Environ. Res.* 7, 695–699.

Cheng, C.-H., Hsu, S.-C., Wu, C.-H., Chang, P.-W., Lin, C.-Y., and Hung, C.-H. (2011). Quantitative analysis of microorganism composition in a pilot-scale fermentative biohydrogen production system. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 14153–14161.

Chong, M.-L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., and Hassan, M.A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 3277–3287.

Clion, V., Dumas, C., Collin, S., and Ernst, B. (2015). Key factors for biohydrogen production by dark fermentation. *Can. J. Chem. Eng.* 93, 309–316.

Cui, M., and Shen, J. (2012). Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 37, 1120–1124.

Dabrock, B., Bahl, H., and Gottschalk, G. (1992). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1233–1239.

Das, D., and Veziroglu, T.N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 6046–6057.

-
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatríste-Mondragón, F., León-Rodríguez, A. de, Rosales-Colunga, L.M., and Razo-Flores, E. (2007). Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 27–45.
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., and Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 812–820.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative Test for Carbohydrate Material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18, 499–499.
- Elferink, S.J.W.H.O., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., and Driehuis, F. (2001). Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125–132.
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., and El Naggar, M.H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 4945–4966.
- Fan, Y., Li, C., Lay, J.-J., Hou, H., and Zhang, G. (2004). Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresour. Technol.* 91, 189–193.
- Fang, H.H.P., and Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.* 82, 87–93.
- Fang, H., Zhang, T., and Liu, H. (2002a). Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 112–118.
- Fang, H.H.P., Liu, H., and Zhang, T. (2002b). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 44–52.
- Ferry, J.G. (1990). Formate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Rev.* 7, 377–382.
- Fisher, K., and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757.
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F., and Whitney, R.A. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.* 101, 8915–8922.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., and Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy* 144, 73–95.
- Goñi, I., Martín, N., and Saura-Calixto, F. (2005). In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. *Food Chem.* 90, 281–286.
- González-Cabaleiro, R., Lema, J.M., and Rodríguez, J. (2015). Metabolic Energy-Based Modelling Explains Product Yielding in Anaerobic Mixed Culture Fermentations. *PLoS ONE* 10, e0126739.
- Gößner, A.S., Küsel, K., Schulz, D., Trenz, S., Acker, G., Lovell, C.R., and Drake, H.L. (2006). Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Juncus roemerianus*. *Microbiology* 152, 1209–1219.

-
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., and Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 10660–10673.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., and Steyer, J.-P. (2014). Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 7476–7485.
- Hallenbeck, P.C. (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52, 21–29.
- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., and Hawkes, D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrog. Energy* 32, 172–184.
- Huang, Y., Zong, W., Yan, X., Wang, R., Hemme, C.L., Zhou, J., and Zhou, Z. (2010). Succession of the Bacterial Community and Dynamics of Hydrogen Producers in a Hydrogen-Producing Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3387–3390.
- Hung, C.-H., Cheng, C.-H., Guan, D.-W., Wang, S.-T., Hsu, S.-C., Liang, C.-M., and Lin, C.-Y. (2011). Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 8704–8711.
- Hwang, J.-H., Choi, J.-A., Abou-Shanab, R.A.I., Min, B., Song, H., Kim, Y., Lee, E.S., and Jeon, B.-H. (2011). Feasibility of hydrogen production from ripened fruits by a combined two-stage (dark/dark) fermentation system. *Bioresour. Technol.* 102, 1051–1058.
- Infantes, D., González del Campo, A., Villaseñor, J., and Fernández, F.J. (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 15595–15601.
- Jones, D.T., and Woods, D.R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484–524.
- Kamm, B., and Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 137–145.
- Kapdan, I.K., and Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582.
- Karadag, D., and Puhakka, J.A. (2010). Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 8554–8560.
- Khanal, S.K., Chen, W.-H., Li, L., and Sung, S. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrog. Energy* 29, 1123–1131.
- Kim, J.-J.P., and Miura, R. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. *Eur. J. Biochem.* 271, 483–493.
- Kim, D.-H., Kim, S.-H., and Shin, H.-S. (2009). Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 181–187.
- Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H., and Puhakka, J.A. (2007). The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 742–758.

-
- Lay, C.-H., Wu, J.-H., Hsiao, C.-L., Chang, J.-J., Chen, C.-C., and Lin, C.-Y. (2010). Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 13445–13451.
- Lay, J.-J., Lee, Y.-J., and Noike, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.* 33, 2579–2586.
- Lee, H.-S., Vermaas, W.F.J., and Rittmann, B.E. (2010). Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends Biotechnol.* 28, 262–271.
- Lee, W.-K., Fujisawa, T., Kawamura, S., Itoh, K., and Mitsuoka, T. (1989). *Clostridium intestinalis* sp. nov., an Aerotolerant Species Isolated from the Feces of Cattle and Pigs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 334–336.
- Levin, D.B., Pitt, L., and Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrog. Energy* 29, 173–185.
- Li, C., and Fang, H.H.P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 1–39.
- Liang, T.-M., Cheng, S.-S., and Wu, K.-L. (2002). Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int. J. Hydrog. Energy* 27, 1157–1165.
- Liu, H., Wang, G., Zhu, D., and Pan, G. (2009). Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 9696–9701.
- Liu, I.-C., Whang, L.-M., Ren, W.-J., and Lin, P.-Y. (2011). The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 439–449.
- Luo, W., Cai, J., Zhu, L., Zhu, X., Huang, L., Xu, Z., and Cen, P. (2012). Toxic effects of acrylic acid on *Clostridium propionicum* and isolation of acrylic acid-tolerant mutants for production of acrylic acid. *Eng. Life Sci.* 12, 567–573.
- Lynen, F., and Ochoa, S. (1953). Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 12, 299–314.
- Mandal, B., Nath, K., and Das, D. (2006). Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* 28, 831–835.
- Marone, A., Izzo, G., Mentuccia, L., Massini, G., Paganin, P., Rosa, S., Varrone, C., and Signorini, A. (2014). Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. *Renew. Energy* 68, 6–13.
- Miron, Y., Zeeman, G., van Lier, J.B., and Lettinga, G. (2000). The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Res.* 34, 1705–1713.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., and Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* 73, 59–65.
- Mouillot, D., and Leprêtre, A. (1999). A comparison of species diversity estimators. *Res. Popul. Ecol.* 41, 203–215.

-
- Muradov, N.Z., and Veziroğlu, T.N. (2008). “Green” path from fossil-based to hydrogen economy: An overview of carbon-neutral technologies. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 6804–6839.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., and Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste Biomass Valorization* 1, 21–39.
- Pagliardini, J., Hubmann, G., Alfenore, S., Nevoigt, E., Bideaux, C., and Guillouet, S.E. (2013). The metabolic costs of improving ethanol yield by reducing glycerol formation capacity under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Factories* 12, 29.
- Pérez-Serradilla, J.A., and de Castro, M.D.L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chem.* 111, 447–456.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.-P., Carrère, H., and Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int. J. Hydrog. Energy* 37, 3150–3159.
- Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Orticoni, M.-T., and Steyer, J.-P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 4975–4985.
- Ren, N.-Q., Guo, W.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Liu, B.-F., Wang, X.-Z., Ding, J., and Chen, Z.-B. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4318–4324.
- Romano, A.H., and Conway, T. (1996). Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res. Microbiol.* 147, 448–455.
- Saad, N.M.C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 13172–13191.
- Sawers, R.G. (2005). Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 42–46.
- Saxena, R.K., Anand, P., Saran, S., and Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.* 27, 895–913.
- Shimizu, S., Fujisawa, A., Mizuno, O., Kameda, T., and Yoshioka, T. (2008). Fermentative Hydrogen Production From Food Waste Without Inocula. In *AIP Conference Proceedings*, (AIP Publishing), pp. 171–174.
- Singh, L., and Wahid, Z.A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *J. Ind. Eng. Chem.* 21, 70–80.
- Sivagurunathan, P., Sen, B., and Lin, C.-Y. (2014). Batch fermentative hydrogen production by enriched mixed culture: Combination strategy and their microbial composition. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 222–228.
- Skrally, F.A., Lytle, B.L., and Cameron, D.C. (1998). Construction and Characterization of a 1,3-Propanediol Operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 98–105.
- Sparling, R., Islam, R., Cicek, N., Carere, C., Chow, H., and Levin, D.B. (2006). Formate synthesis by *Clostridium thermocellum* during anaerobic fermentation. *Can. J. Microbiol.* 52, 681–688.

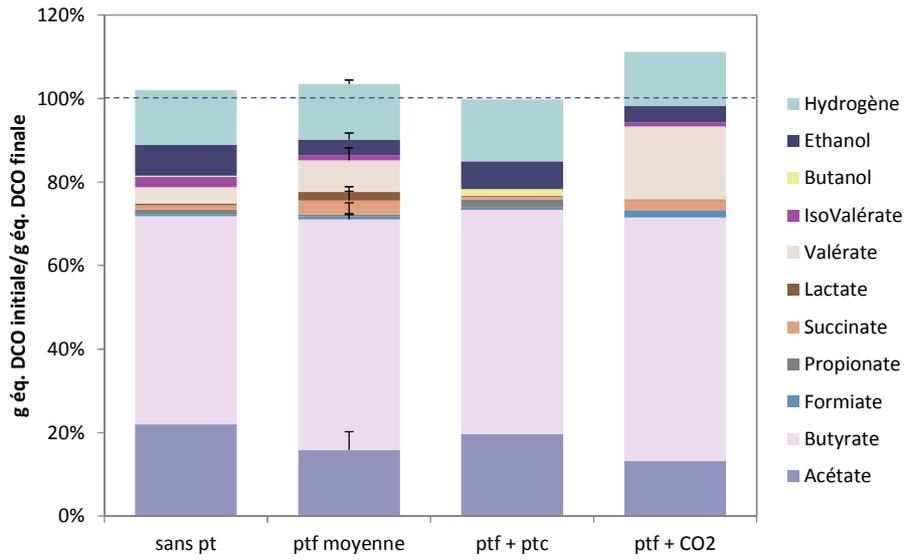
-
- Stenberg, B., Johansson, M., Pell, M., Sjö Dahl-Svensson, K., Stenström, J., and Torstensson, L. (1998). Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biol. Biochem.* *30*, 393–402.
- Sterling Jr., M.C., Lacey, R.E., Engler, C.R., and Ricke, S.C. (2001). Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. *Bioresour. Technol.* *77*, 9–18.
- Strassberger, Z., Tanase, S., and Rothenberg, G. (2014). The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv.* *4*, 25310.
- Suwannakham, S., and Yang, S.-T. (2005). Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* *91*, 325–337.
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., and Van Impe, J.F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int. J. Food Microbiol.* *94*, 137–159.
- Tabachnick, J., and Vaughn, R.H. (1948). Characteristics of Tartrate-fermenting Species of *Clostridium*. *J. Bacteriol.* *56*, 435–443.
- Temudo, M.F., Kleerebezem, R., and van Loosdrecht, M. (2007). Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.* *98*, 69–79.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* *41*, 100–180.
- Urbaniec, K., and Bakker, R.R. (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation – A review. *Int. J. Hydrog. Energy* *40*, 3648–3658.
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., and Poggi-Varaldo, H.M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrog. Energy* *30*, 1383–1391.
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Carmona-Martínez, A., Muñoz-Páez, K.M., and Poggi-Varaldo, H.M. (2006). Improvement of Biohydrogen Production from Solid Wastes by Intermittent Venting and Gas Flushing of Batch Reactors Headspace. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 3409–3415.
- Van Ginkel, S., and Logan, B.E. (2005). Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 9351–9356.
- Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V., and Sarma, P.N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour. Technol.* *99*, 59–67.
- Wang, J., and Wan, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *Int. J. Hydrog. Energy* *33*, 2934–2941.
- Wang, J., and Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrog. Energy* *34*, 799–811.
- Wang, X., and Zhao, Y. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *Int. J. Hydrog. Energy* *34*, 245–254.
- Wang, Q., Kuninobu, M., Ogawa, H.I., and Kato, Y. (1999). Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass Bioenergy* *16*, 407–416.

-
- Wang, Y.-Y., Ai, P., Hu, C.-X., and Zhang, Y.-L. (2011). Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. *Int. J. Hydrog. Energy* *36*, 390–396.
- Willquist, K., Claassen, P.A.M., and van Niel, E.W.J. (2009). Evaluation of the influence of CO₂ on hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Int. J. Hydrog. Energy* *34*, 4718–4726.
- Xue, J., Murrieta, C.M., Rule, D.C., and Miller, K.W. (2008). Exogenous or l-Rhamnose-Derived 1,2-Propanediol Is Metabolized via a pduD-Dependent Pathway in *Listeria innocua*. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 7073–7079.
- Yin, Y., and Wang, J. (2016). Changes in microbial community during biohydrogen production using gamma irradiated sludge as inoculum. *Bioresour. Technol.* *200*, 217–222.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y. (1998). H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol. Lett.* *20*, 143–147.
- Zhang, Y., and Shen, J. (2006). Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int. J. Hydrog. Energy* *31*, 441–446.
- Zhang, M.-L., Fan, Y.-T., Xing, Y., Pan, C.-M., Zhang, G.-S., and Lay, J.-J. (2007). Enhanced biohydrogen production from cornstarch wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass Bioenergy* *31*, 250–254.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and Riet, K. van 't (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 1875–1881.

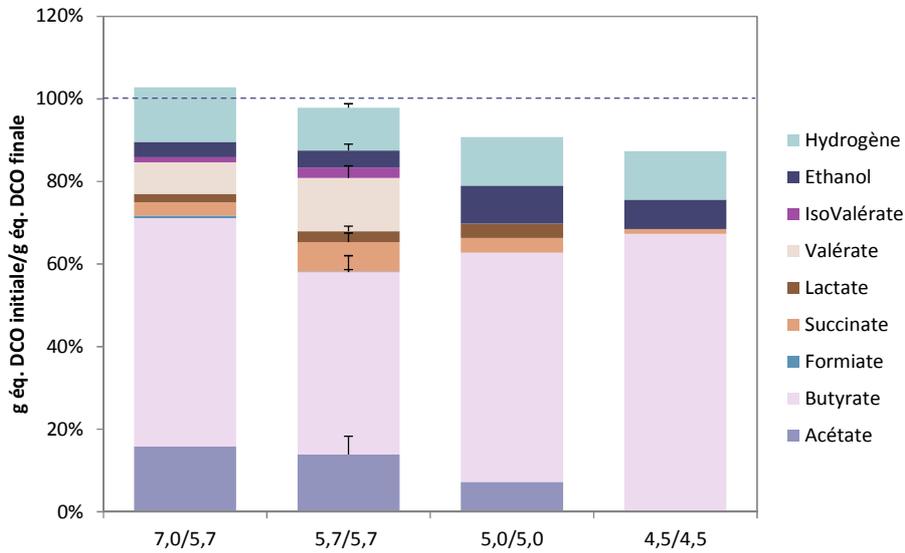


ANNEXES

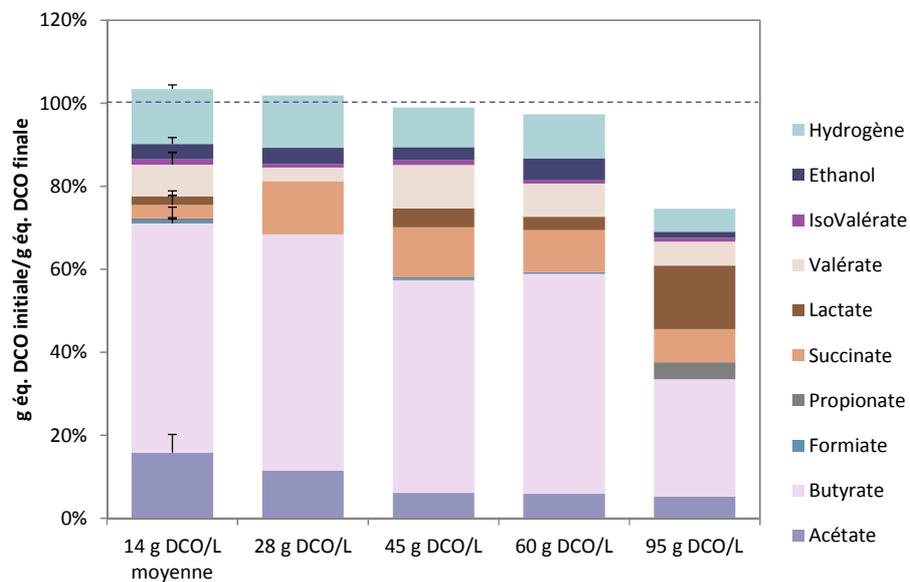
ANNEXE 1



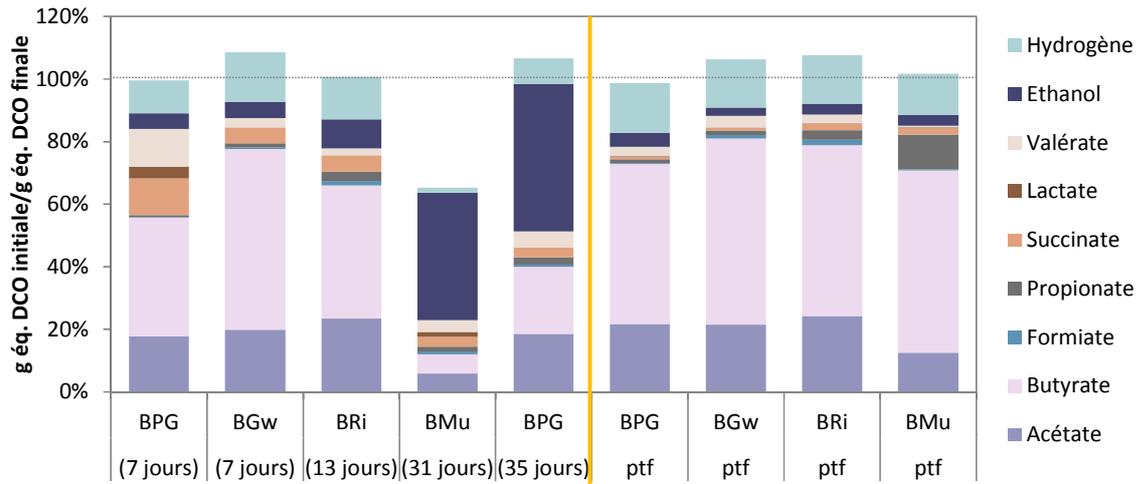
ANNEXE 2



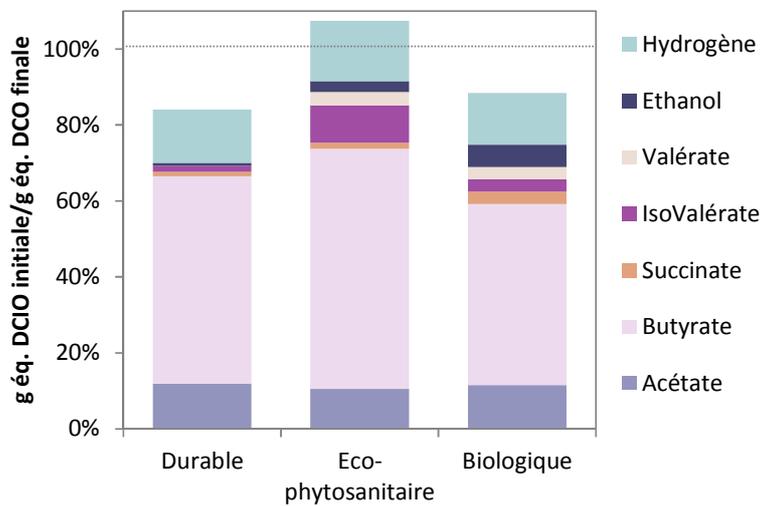
ANNEXE 3



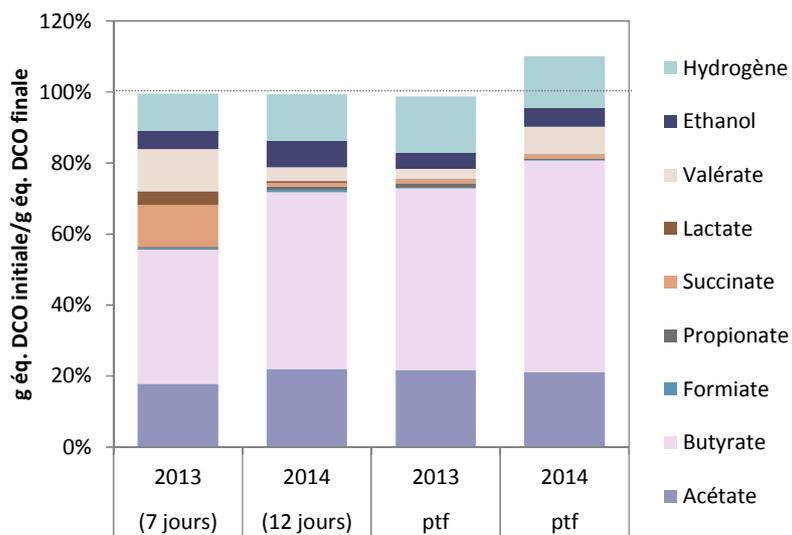
ANNEXE 4



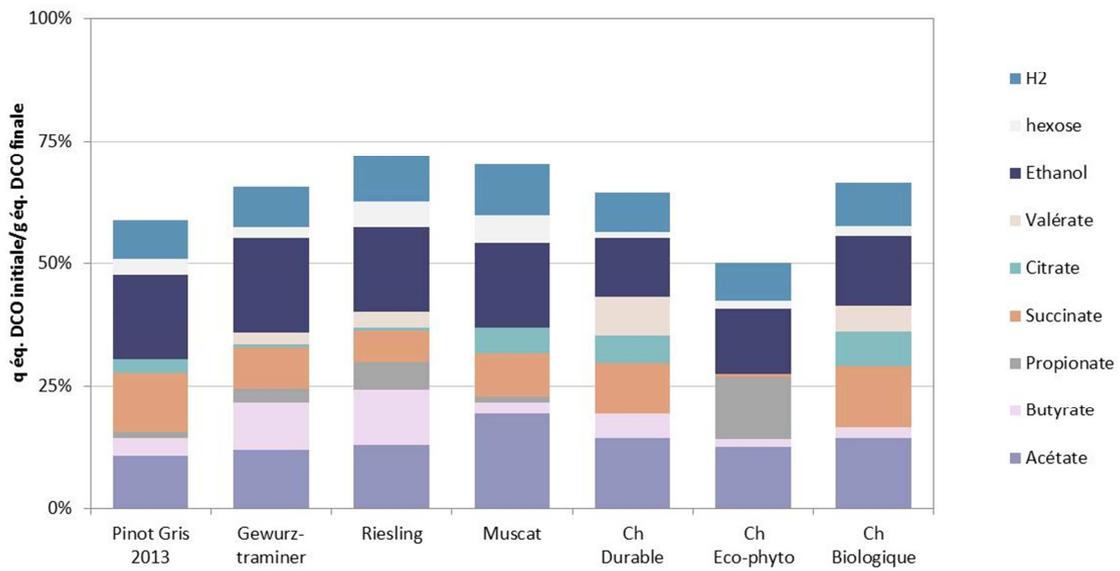
ANNEXE 5



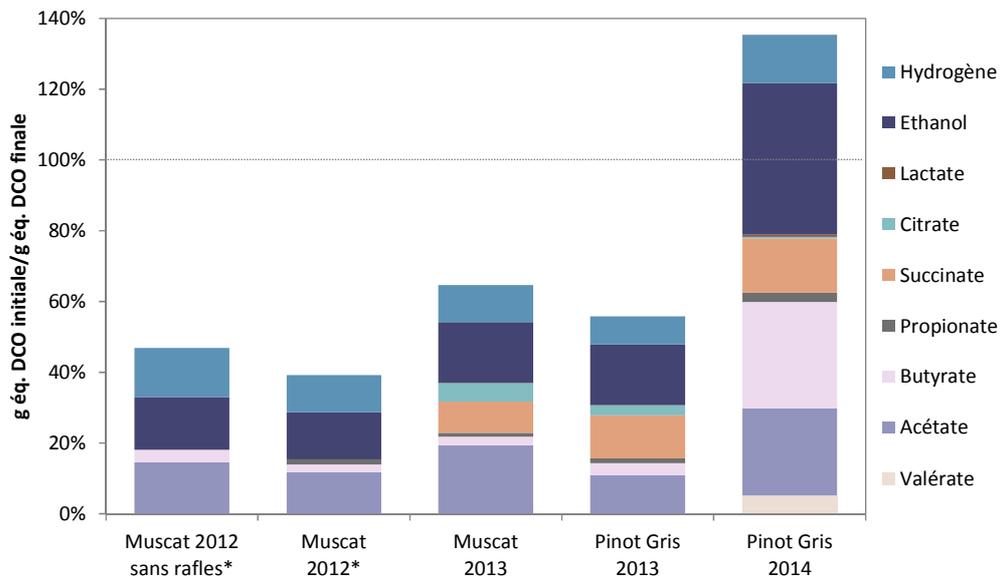
ANNEXE 6



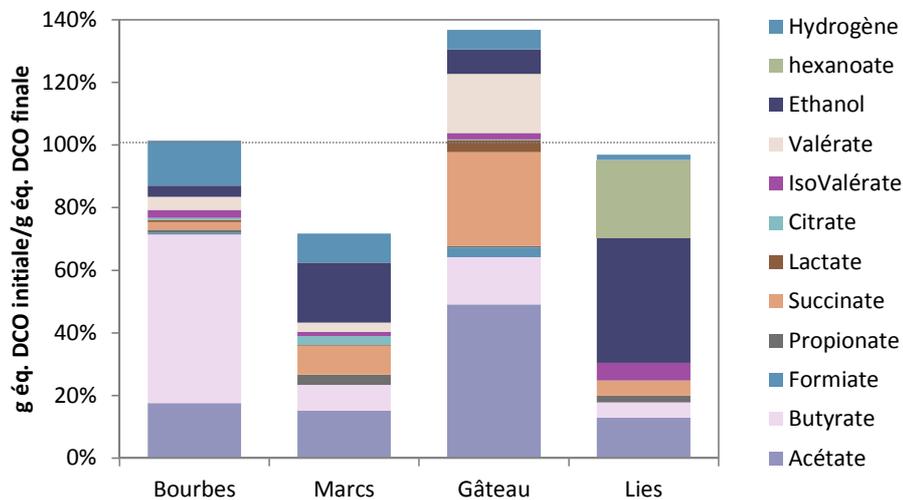
ANNEXE 7



ANNEXE 8



ANNEXE 9





Production de biohydrogène par fermentation obscure : potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne

Résumé

Dans un contexte de transition énergétique, ce travail de recherche s'inscrit dans la dynamique d'explorer la potentialité de nouvelles biomasses pour la production d'un vecteur énergétique propre, l'hydrogène (H₂). Au cours de cette thèse, un procédé de production d'H₂ par fermentation endogène et sans dépense énergétique supplémentaire, a été élaboré à partir de biomasses viticoles, et l'influence de paramètres opératoires a été testée. Enfin, le type de biomasses influe sur la production d'H₂, non seulement par sa composition biochimique, mais aussi par leur microflore endogène qui oriente le métabolisme. La microflore endogène responsable de la production d'H₂ à partir de 'bourbes' ($50 \pm 6 \text{ L/L}_{\text{bourbes}}$ avec un rendement de $2,0 \pm 0,2 \text{ mol/mol}$) appartient à la famille *Clostridiaceae* et est associée aux voies acétate/butyrate, alors que celle des 'marcs' ($20 \pm 4 \text{ L/kg}_{\text{marcs}}$ avec un rendement de $1,3 \pm 0,3 \text{ mol/mol}$) appartient aux *Enterobacteriaceae* et est associée aux voies acétate/éthanol.

Mots-clés : bioprocédé, hydrogène, fermentation obscure, sous-produits viticoles, valorisation

Abstract

In the context of energy transition, this work deals with the exploration of new potential biomasses for the production of a clean energy vector, hydrogen (H₂). During this thesis, a process of H₂ production by an endogenous fermentation from winery waste has been developed without any additional energetic consumption. The influence of operating parameters was studied. Finally, the type of biomass has an influence on the H₂ production, not only because of initial biochemical composition, but also because of the endogenous microflora which orientates the metabolism. The endogenous microflora responsible of H₂ production from 'solid grape residues' biomass ($50 \pm 6 \text{ L.L}^{-1}_{\text{biomass}}$ with a $2.0 \pm 0.2 \text{ mol.mol}^{-1}$ yield) through acetate/butyrate pathways belongs to *Clostridiaceae* family while the one responsible of H₂ production from 'grape pomace' biomass ($20 \pm 4 \text{ L.kg}^{-1}_{\text{biomass}}$ with a $1.3 \pm 0.3 \text{ mol.mol}^{-1}$ yield) through acetate/ethanol pathways belongs to *Enterobacteriaceae* family.

Key-words: bioprocess, hydrogen, dark fermentation, winery waste, valorization