

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

IPHC – Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien – UMR 7178

THÈSE en cotutelle présentée par :

Zineb GUELLOUT

Soutenance prévue le : **4 décembre 2019**

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

Docteur de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1

Discipline / Spécialité : Chimie / Bioprocédé

**Développement de modèles cinétiques et optimisation
paramétrique pour la bioproduction d'hydrogène par
fermentation obscure**

THÈSE dirigée par :

Mme Barbara ERNST

Professeur, IPHC, Université de Strasbourg

M. Yacine BENGUERBA

Maître de Conférences Classe A, Université Ferhat Abbas Sétif-1

RAPPORTEURS :

M. François LESAGE

Maître de Conférences, LRGP, Université de Lorraine

M. Abdeslam-Hassen MENIAI

Professeur, Université de Constantine 3

MEMBRE INVITE :

Mme Christine DUMAS

Maître de Conférences, IPHC, Université de Strasbourg

Remerciements

Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre l'Université de Strasbourg et l'Université de Ferhat Abbas Sétif 1 et entre l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) (équipe du RePSeM) et pour cela je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, le professeur Barbara ERNST, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses conseils, sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodigués. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Mes profonds et sincères remerciements vont à mon directeur de thèse, le Dr Yacine BENGUERBA, qui a toujours cru en moi. Je le remercie de m'avoir assuré les conditions nécessaires pour l'accomplissement de mon travail de thèse. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect.

Je désire aussi remercier le Dr Christine Dumas pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail.

Je remercie les membres de jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer cette thèse et pour leur participation à ce jury. Je remercie particulièrement les rapporteurs de cette thèse le Pr. Abdeslam-Hassen Meniai de l'Université de Constantine et le Dr François Lesage de l'Université de Lorraine.

Je remercie également les personnes qui ont contribué au financement de la première période de ma thèse, et notamment le gérant Noureddine KERKOUR et le co-gérant Lahcen NAHNAH de l'entreprise S.N.C PHYTOCHIM. Je remercie également Campus France pour sa contribution au financement pour les deux ans de thèse dans le cadre du programme PROFAS B+. Je remercie également les deux universités de Strasbourg et de Sétif pour leurs contributions au financement respectivement dans le cadre d'une bourse d'aide à la mobilité et un stage de courte durée.

Je remercie le Dr Abdenacer Mouffok pour son aide dans cette thèse.

Je remercie Valentin et Emilie d'avoir pu disposer des résultats expérimentaux de leur thèse pour la modélisation, et merci à Marie d'avoir partagé la biomasse caféicole.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes du RePSeM pour leur accueil et leur gentillesse. Je remercie Dominique Trébouet, Véronique Hubscher, Jérémy Brandel, Maud Villain-Gambier,

Caroline Bertagnolli, Anne Boos, Sylvia Michel et Sylvie Schuh. Je tiens à remercier également tous les jeunes du labo avec qui j'ai partagé de bons moments : Marie, Virginie, Clémence, Chaima, Islah, Paul, Abderrazak, Guillaume... Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées durant ma thèse.

Je ne saurai jamais comment exprimer mes chaleureux remerciements à mes parents : à mon père, mon ange gardien « l'encadreur secret de ma thèse », pour toute son aide durant la thèse, pour ses relectures durant des nuits, son aide financière et morale, ses appels quotidiens et à tous moments et surtout ses encouragements, et à ma mère, la flamme de ma vie, pour ces conseils et surtout ses *doua'ase*. Je vous souhaite une longue vie pleine de bonheur, mes parfaits parents dans le monde, et vous remercie encore pour vos précieux sacrifices, vos aides morale et matérielle, vos conseils, vos *doua'ase* durant toute ma vie, pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis, sans vous je n'aurai rien pu faire.

Mes profonds remerciements à mon mari, mon bonheur, pour toute sa patience, pour m'avoir soutenue durant la thèse et de m'être éloignée de lui durant des mois et des mois, pour ses encouragements et sa compréhension.

Un très grand remerciement à ma grande sœur Meriem, mon âme sœur, sans qui je n'aurai pas mené mes études aussi idéalement. Je remercie également son mari Yacine et ses petites anges Anais et Bissane.

Mes remerciements à mes chères sœurs Ameni, Aya et Takoua, pour tout leur soutien moral et leurs sentiments à mon égard durant les moments difficiles, je leur souhaite une vie pleine de bonheurs et de réussites.

Mes adorables remerciements à mon fils, mon petit ange, qui va venir à cette vie prochainement avec plein de bonheurs.

Finalement, je remercie toutes les personnes positives que j'ai rencontrées dans ma vie. Je remercie particulièrement mes profs de lycée : Monsieur Mekhalfa, mon prof de science, Monsieur Beroual, mon prof de math, et Monsieur Merniz, mon prof de français, ainsi que le professeur Brahim Djellouli pour tous leurs précieux conseils et pour avoir cru en moi.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1	9
Synthèse bibliographique	9
1- L'hydrogène, carburant du 21 ^e siècle.....	11
2- Procédés de production d'hydrogène	12
2.1- Production d'hydrogène à partir de ressources non renouvelables	12
2.1.1- Gaz naturel	12
2.1.2- Charbon	13
2.2- Production à partir de ressources renouvelables.....	14
2.2.1- Eau.....	14
2.2.1.1- Electrolyse.....	14
2.2.1.2- Photocatalyse	14
2.2.1.3- Thermolyse	15
2.2.2- Biomasse	16
2.2.2.1- Procédés thermochimiques	16
2.2.2.2- Procédés biologiques	17
2.2.2.2.1- Biophotolyse directe de l'eau	17
2.2.2.2.2- Biophotolyse indirecte de l'eau	18
2.2.2.2.3- Photo-fermentation.....	18
2.2.2.2.4- Fermentation obscure	19
2.2.2.2.5- Conclusion	19
3- Principe de la fermentation obscure.....	20
3.1- Voies de production d'hydrogène	23
3.2- Les facteurs affectant la production d'hydrogène	26
3.2.1- Substrat	26
3.2.2- Inoculum bactérien	27
3.2.3- pH du milieu réactionnel	28
3.2.4- Pression partielle en hydrogène	29
3.2.5- Température de fermentation	29
4- Modélisation des procédés biologiques	30
4.1- Introduction à la modélisation	30
4.2- Classification des modèles mathématiques	31
4.2.1- Modèle ADM1 (Anaerobic Digestion Model number 1)	33
4.2.2- Modèle modifié ADM1	34
4.2.3- Modèles décrivant les cinétiques de réactions	35
4.2.4- Modèle de Gompertz	37
4.2.5- Modèles à boîte noire	37
4.2.5.1- Définition des modèles à boîte noire.....	37
4.2.5.2- Méthodologie des surfaces de réponse (RSM) (Response Surface Methods).....	38
Objectifs de la thèse	42
Bibliographie.....	44
Chapitre 2	55
Matériels et méthodes	55
1- Introduction.....	57
2-Procédures expérimentales	57

2.1- Fermentation exogène	57
2.1.1- Inoculum externe [1]	57
2.1.2- Substrat	58
2.2- Fermentation endogène	58
2.3- Protocoles expérimentaux	59
2.4- Echantillonnage du milieu réactionnel	60
3- Procédures analytiques	60
3.1- Caractérisation de la biomasse	60
3.1.1- Mesure des matières sèches et volatiles	60
3.1.2- Mesure des matières en suspension et matières volatiles en suspension	61
3.2- Analyse de la composition du biogaz	61
3.3- Analyse des métabolites de fermentation	62
3.3.1- Analyse des alcools	62
3.3.2- Analyse des acides organiques	62
3.3.3- Analyse quantitative des sucres	63
3.4- Analyse microbienne	63
3.5- Modélisation de la production d'hydrogène	63
4- Procédures numériques	64
4.1- Modélisation du procédé de fermentation	64
4.2- Les plans d'expériences	64
Bibliographie	65
Chapitre 3	67
Développement d'un modèle à boîte blanche pour le procédé de production d'hydrogène par fermentation exogène : effet de la teneur initial en substrat modèle	67
1- Introduction	69
2- Description des modèles biologiques	71
2.1- Description de la croissance bactérienne	72
2.2- Description de la dégradation du substrat	73
2.3- Description de la production des métabolites et des gaz	74
2.4- Modèles pour la description de l'effet du substrat	75
3- Méthodes de résolution des modèles mathématiques	75
3.1- Plans de développement du modèle mathématique	75
3.2- Méthode de calibrage du modèle et identification des paramètres	76
4- Développement du modèle	77
4.1- Hypothèses du modèle	78
4.2- Description du modèle	78
4.3- Résultats de la modélisation	80
4.3.1- Choix du modèle cinétique	80
4.3.2- Validation du modèle développé	88
5- Etude de l'effet de la concentration en substrat sur le processus de production d'hydrogène par fermentation	90
5.1- Effet de la concentration initiale en substrat sur l'efficacité de sa dégradation	90
5.2- Effet de la concentration initiale de substrat sur la croissance des bactéries	91
5.2- Effet de la concentration initiale en substrat sur la production d'hydrogène	93
6- Conclusion	95
Bibliographie	97
Chapitre 4	101
Modélisation des cinétiques réactionnelles du procédé de production d'hydrogène par fermentation endogène : effet de la teneur initiale en biomasse	101
1- Introduction	103

2- Mise en œuvre des expériences de fermentation.....	104
2.1- Métabolites produits	104
2.2- Analyse des microorganismes	105
3- Voies métaboliques empruntées	106
4- Développement d'un modèle mathématique.....	108
5- Résultats et discussion	114
5.1- Validation numérique et paramétrique.....	114
5.2- Effet de la charge de la biomasse sur la production d'hydrogène	119
6- Conclusion	125
Bibliographie.....	126
Chapitre 5	129
Optimisation du procédé de production d'hydrogène par un plan d'expériences	129
1-Introduction.....	131
2- Mise en œuvre du procédé	133
2.1- Bioréacteur et biomasse.....	133
2.2- Plan d'expériences.....	133
3- Choix des facteurs affectant la production d'hydrogène.....	134
3.1- Effet du prétraitement thermique sur la performance de la production d'hydrogène	135
3.2- Effet du prétraitement enzymatique et des prétraitements avec acide et base	137
3.3- Effet des paramètres de fonctionnement du bioréacteur.....	139
4- Optimisation de la production d'hydrogène en appliquant le plan d'expériences	140
4.1- Définition des réponses, objectifs et facteurs sélectionnés	140
4.2- Construction de la matrice du plan d'expériences	141
4.3- Analyse globale des résultats des essais.....	142
4.4. Analyse statistique des modèles.....	143
4.4.1- Analyse globale des modèles	143
4.4.2- Analyse statistique des facteurs.....	145
4.5- Etude de l'interaction entre les facteurs	148
4.6- Production des métabolites.....	149
5- Conclusion	156
Bibliographie.....	158
Conclusion générale et perspectives	161
Annexes.....	169

Liste des figures

Figure 1 : Principaux procédés de production d'hydrogène	12
Figure 2 : Schéma explicatif du processus de fermentation	21
Figure 3 : Principales voies métaboliques de production d'hydrogène par fermentation obscure (adaptée de [44]).....	22
Figure 4 : Schéma simplifié du traitement des eaux usées de station d'épuration avec point de prélèvement des boues utilisées comme inoculum.....	57
Figure 5 : Etapes de vinification en blanc avec extraction de la biomasse 'bourbes' [2]	58
Figure 6 : Etape d'extraction de la biomasse 'pellicules argentées'	59
Figure 7: Configuration du bioréacteur en mode semi batch (adaptée de [1, 4]).....	60
Figure 8 : Méthode de développement d'un modèle	76
Figure 9 : Variation de formation des métabolites (éthanol, acétate, butyrate, propionate) et des gaz (hydrogène et dioxyde de carbone) au cours du temps.....	77
Figure 10: Représentation des variations de croissance bactérienne (a), consommation du substrat (b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Contois (MMCC) avec facteur de correction (FC)	81
Figure 11 : Représentation des variations de croissance bactérienne (a), consommation de substrat (b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Monod (MMCM) avec facteur de correction (FC)	82
Figure 12 : Représentation des variations de croissance bactérienne (a), dégradation de substrat (b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Aiba (MMCA) avec facteur de correction (FC).....	83
Figure 13 : Représentation des variations de croissance bactérienne(a), dégradation de substrat(b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Aiba (MMCA) sans coefficient de correction.....	85
Figure 14 : Production d'hydrogène cumulé en fonction du temps pour une concentration en substrat de 7,5 mmol/L. Comparaison des données expérimentales avec le modèle cinétique de Aiba avec facteur de correction.....	89
Figure 15 : Efficacité de dégradation de l'hexose pour différentes concentrations initiales de substrat	91
Figure 16 : Variation de la croissance des bactéries en fonction du temps à différentes concentrations initiales en substrat (S_0), établie sur le modèle de Aiba avec facteur de correction (MMCA-FC).....	91
Figure 17 : Variation des quantités totales d'acides organiques produits en fonction des concentrations initiales de substrat obtenue par le modèle de Aiba avec facteur de correction (MMCA-FC)	93
Figure 18 : Effet de la concentration en substrat sur la production d'hydrogène (a) modélisation selon le modèle MMCA-FC (b) données expérimentales.....	94
Figure 19 : Variation de la consommation des substrats (hexoses et tartrate) et de la formation des métabolites (éthanol, acétate, butyrate, formiate, valérate et succinate) et des gaz (hydrogène et dioxyde de carbone) au cours du temps.....	104
Figure 20 : Schéma n°1 (modèle 1) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par, respectivement, les espèces des genres Clostridium et Lactobacillus	107
Figure 21 : Schéma n°2 (modèle 2) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par les microorganismes issus de la littérature	107
Figure 22 : Schéma n°3 (modèle 3) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par les espèces du genre Clostridium	108
Figure 23 : Schéma n°4 (modèle 4) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par les microorganismes présents dans le milieu réactionnel expérimental et analysés par séquençage de l'ARN 16S	108
Figure 24 : Vitesse de consommation des substrats (hexoses et tartrate), croissance bactérienne (biomasse) et production d'hydrogène en fonction du temps	109

Figure 25 : Variation de sensibilité du coefficient de mortalité bactérienne (K_d) (a), du coefficient de demi-saturation (K_s) (b) et de la vitesse spécifique maximale de Monod μ_{maxS} (c) sur les variables d'état.....	113
Figure 26 : Représentation des variations de croissance bactérienne (a), consommation d'hexose (b), consommation de tartrate (c) et formation des produits : butyrate (d), acétate (e), formiate (f), dioxyde de carbone (g) et hydrogène (h) par les quatre modèles proposés et pour les points expérimentaux	115
Figure 27 : Quantité de biomasse bactérienne (a), consommation d'hexose (b), consommation de tartrate (c) et formation d'acétate (d), butyrate (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) en fonction de la charge initiale en biomasse dans le bioréacteur	122
Figure 28 : Production d'hydrogène cumulée en fonction du temps et selon le mode de conservation de la biomasse pellicules argentées (expériences réalisées en triplicat)	134
Figure 29 : Production d'hydrogène cumulée en fonction du temps avec et sans prétraitement thermique (expériences réalisées en triplicat)	135
Figure 30 : Production d'hydrogène cumulée au cours du temps en fonction du prétraitement utilisé (prétraitements enzymatique, thermique et avec acide et base) et test de référence (sans prétraitement) ...	137
Figure 31 : Production d'hydrogène cumulée au cours du temps en fonction des paramètres de fonctionnement du bioréacteur	139
Figure 32 : Comparaison des valeurs expérimentales avec les valeurs des modèles du volume d'hydrogène produit, de la vitesse de production d'hydrogène, du rapport H_2/CO_2 et du temps de latence.	144
Figure 33 : Résultats des diagrammes de Pareto des modèles du volume d'hydrogène produit (a), la vitesse de production d'hydrogène (b), le rapport H_2/CO_2 (c) et le temps de latence (d). Code couleur : bleu : effet positif, rouge : effet négatif	147
Figure 34 : Résultats d'interaction et d'effet de la régulation du pH et du prétraitement avec base (a), de la régulation de pH et du prétraitement avec acide (b) sur le volume d'hydrogène produit et résultats d'interaction et d'effet de la régulation du pH et du prétraitement enzymatique sur la vitesse de production d'hydrogène (les résultats expérimentaux sont symbolisés par les points)	148
Figure 35 : Variation des quantités d'acide acétique, d'acide butyrique et d'hydrogène (taille des bulles) en fonction des essais du plan d'expériences	150
Figure 36 : Variation des volumes d'hydrogène produit en fonction des rapports B/A	150
Figure 37 : Pourcentages molaires d'hydrogène produit à partir du butyrate (a) et de l'acétate (b) calculées en fonction de la quantité totale d'hydrogène produit expérimentalement.....	152
Figure 38 : Variation de rapport $H_2/(2 \times (A+B))$ en fonction de volume d'hydrogène produit.....	153
Figure 39 : Quantités des métabolites (formiate, lactate, propionate, éthanol) produits ou consommés pour les différents essais du plan d'expériences.....	153

Liste des tableaux

Tableau 1 : Approches de classification des modèles mathématiques.....	31
Tableau 2 : Application de plans d'expériences pour l'optimisation de la production d'hydrogène par fermentation.....	40
Tableau 3 : Cinétiques de croissance des bactéries descriptives de différents paramètres	73
Tableau 4 : Valeurs d'initialisation des paramètres cinétiques.....	79
Tableau 5 : Valeurs des racines d'erreur quadratique moyenne pour chaque modèle	80
Tableau 6 : Rendements de formation des produits.....	86
Tableau 7 : Paramètres cinétiques estimés de croissance et de mortalité des bactéries.....	88
Tableau 8 : Paramètres estimés par le modèle de Aiba avec facteur de correction pour deux différentes concentrations en substrat.....	89
Tableau 9 : Paramètres cinétiques pour différentes concentrations initiales en substrat	92
Tableau 10 : Variation des rendements et des vitesses maximales de production d'hydrogène à différentes concentrations initiales de substrat	95
Tableau 11 : Espèces bactériennes présentes dans le milieu réactionnel pour différentes charges de biomasse	105
Tableau 12 : Equations différentielles et cinétiques utilisées pour les 4 schémas réactionnels proposés. ...	110
Tableau 13 : Valeurs des racines des erreurs quadratiques moyennes pour chaque modèle	114
Tableau 14: Paramètres cinétiques (K), rendements (Y) et coefficients de facteur de correction (K_{fp}) optimisés selon les quatre modèles.....	116
Tableau 15 : Rendements instantanés (mol/mol) des métabolites optimisés selon les quatre modèles	117
Tableau 16 : Valeurs des racines des erreurs quadratiques moyennes pour chaque modèle	119
Tableau 17 : Paramètres cinétiques, rendements et coefficients de facteur de correction optimisés pour les quatre charges de biomasse	123
Tableau 18 : Rendements instantanés des métabolites optimisés pour les quatre charges de biomasse.....	124
Tableau 19 : Etudes utilisant le plan d'expériences Plackett-Burman pour optimiser la performance de production d'hydrogène par fermentation	132
Tableau 20 : Volume de gaz produits, rapport molaire H_2/CO_2 , rendement en hydrogène, production maximale (H_{max}), productivité maximale (R_{max}) et temps de latence (λ) en fonction l'état de conservation de la biomasse de pellicules argentées	135
Tableau 21 : Volume de gaz produits, rapport molaire H_2/CO_2 , rendement en hydrogène, production maximale (H_{max}), productivité maximale (R_{max}) et temps de latence (λ) pour la biomasse traitée et non traitée thermiquement.....	136
Tableau 22 : Volume de gaz produits, rapport molaire H_2/CO_2 , rendement en hydrogène, production maximale (H_{max}), productivité maximale (R_{max}) et temps de latence (λ) en fonction des prétraitements utilisés.....	138
Tableau 23 : Variation des volumes des gaz produits, productivité, H_{max} , R_{max} et temps de latence en fonction des paramètres de configuration.....	140
Tableau 24 : Liste des facteurs codés, testés dans le plan d'expériences	141
Tableau 25 : Liste des essais proposés par le plan d'expériences.....	141
Tableau 26 : Résultats des tests du plan d'expériences	143
Tableau 27 : Modèles mathématiques proposés pour chaque réponse	143
Tableau 28 : Résultats des analyses statistiques de Plackett-Burman.....	145
Tableau 29 : Quantités finales d'acétate, de butyrate et d'hydrogène produits pour les essais proposés par le plan d'expériences	149

Introduction générale

Les progrès réalisés en science et technologie pour faciliter nos modes de vie [1] et gérer l'accroissement de la population mondiale [2], ainsi que les efforts des pays en voie de développement pour combler leur décalage économique [3], concourent à l'heure actuelle à une augmentation de la demande en énergie avec 149% de plus, entre 1971 et 2016 [4]. Les émissions de gaz à effet de serre, dépendantes en grande partie de la production et de la consommation d'énergie est une question environnementale centrale. Une hausse des émissions de gaz à effet de serre depuis le XVIII^e siècle à nos jours de 46% a été relevée avec 1,4 % d'augmentation des émissions de CO₂ au cours de l'année 2017 [4,5].

Ces problèmes d'approvisionnements énergétiques et de dégradation environnementale poussent la recherche à innover dans le domaine des énergies propres et issues de ressources renouvelables. Les recherches récentes dans le domaine des énergies renouvelables ont prouvé que l'hydrogène est un vecteur énergétique prometteur car alternatif aux carburants (même ceux issus de ressources renouvelables et considérés comme propre) en raison de sa combustion ou de sa mise en œuvre dans des piles à combustibles, qui ne génère que de l'eau et de l'énergie [6-8]. Grâce à son pouvoir calorifique par unité de masse élevé par rapport aux autres carburants [9], il est de plus en plus considéré comme une importante source d'énergie pour des applications variées [9-11] : (i) dans le domaine des transports, avec notamment des systèmes embarqués permettant une autonomie accrue des véhicules électriques (hydrogène-mobilité), (ii) la production de carburant conventionnel permettant la capture du CO₂ (système « Power-To-Gas »), (iii) la production d'électricité et le chauffage par ajout d'hydrogène directement dans le réseau de gaz naturel à hauteur de 20% en volume pour former l'hythane®, sans impact significatif sur l'efficacité énergétique du mélange ni adaptation nécessaire des infrastructures (hydrogène-énergie).

L'hydrogène est actuellement d'abord un réactif pour l'industrie chimique. En effet, la quasi-totalité de l'hydrogène produit dans le monde est consommé pour la synthèse de l'ammoniac, l'aniline et l'hexaméthylènediamine, ainsi que dans l'industrie du raffinage pour l'hydrocraquage et l'hydrotraitement des hydrocarbures pétrosourcés [12,13].

L'un des obstacles rencontrés pour avoir une économie « hydrogène » plus développée est de pouvoir promouvoir efficacement des procédés de production respectueux de l'environnement et relativement peu coûteux. Les procédés actuels de production d'hydrogène par reformage des combustibles fossiles représentent 96% de la production mondiale d'hydrogène ; ce sont des méthodes coûteuses d'un point de vue environnemental de par leur contribution à l'effet de serre liée à l'émission de quantités élevées de dioxyde de carbone et de soufre [14]. L'hydrogène est aussi produit à partir de l'électrolyse de l'eau à hauteur de 4% ; ce procédé nécessite de l'énergie électrique [15] d'origines diverses selon le mix énergétique des pays. L'hydrogène-énergie et -

mobilité n'a en effet de sens que si celui-ci est issu de voies de production renouvelables ou décarbonées et en phase avec les ressources des territoires (soleil, vent, biomasses).

Ainsi, depuis quelques années, des recherches intensives ont été menées pour produire de l'hydrogène à partir de la biomasse, considérée comme une ressource d'énergie renouvelable et respectueuse de l'environnement. Les technologies de transformation de la biomasse en hydrogène actuellement développées peuvent se décliner en deux catégories, les processus thermochimiques : gazéification, pyrolyse, liquéfaction hydrothermale et les processus biochimiques : fermentation éthanolique, estérification, digestion anaérobie. Ces derniers, bien que peu énergivores par rapport aux processus thermochimiques, produisent respectivement de l'éthanol, du biodiesel et du biogaz qui devront subir un traitement de reformage pour produire de l'hydrogène. Ainsi, seuls les procédés biologiques mettant en œuvre la photolyse de l'eau, la photofermentation, l'électrolyse microbienne et la fermentation obscure produisent directement de l'hydrogène avec une faible consommation d'énergie [16].

La production d'hydrogène par fermentation obscure (*dark fermentation*) de composés organiques a un rendement énergétique maximum (conversion de la biomasse en hydrogène) de 67% (en pratique de 15% à 33%) ; cette valeur est bien supérieure à celle du procédé de photolyse de l'eau [17]. De plus, le procédé de fermentation obscure ne nécessite pas de rayonnement lumineux contrairement aux procédés de photofermentation et de biophotolyse. Ses principaux avantages sont non seulement une mise en œuvre simplifiée du procédé mais également une vitesse de production en hydrogène (productivité) élevée ; la fermentation obscure offre aussi la possibilité de convertir en énergie une grande diversité de matières organiques [18].

Récemment, de nombreuses études ont été développées, pour augmenter le rendement de production d'hydrogène, ainsi que la diminution du coût de fonctionnement, avec la sélection de l'*inoculum* bactérien, l'optimisation des conditions de fonctionnement, l'utilisation de divers substrats, le choix de biomasses à double fonction (substrat et *inoculum*) et l'analyse des voies métaboliques [14].

D'un point de vue compréhension de la production d'hydrogène par fermentation obscure, il apparaît nécessaire de modéliser le processus de fermentation afin de réaliser la cartographie de production en temps réel, pour bien comprendre les phénomènes ayant lieu lors du processus. En outre, l'efficacité du procédé de fermentation obscure par l'approche de recherches expérimentales ne correspond à l'optimum que dans de rares cas, il est donc nécessaire d'étudier les phénomènes qui régissent ces processus.

La modélisation vise à sélectionner et à optimiser les paramètres des processus affectant la production d'hydrogène. Par conséquent, la prévision du procédé de fermentation menant à la production d'hydrogène est importante pour (i) concevoir le système en tenant compte des facteurs

opérationnels appropriés, (ii) gagner du temps et augmenter l'efficacité d'utilisation des ressources renouvelables, et (iii) passer de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle [19].

D'après les récentes recherches, il n'existe pas de classification mondiale de la modélisation des procédés biologiques. Selon Lauwers *et al.* (2013) [20], les modèles sont classés en modèles dynamiques ou non-dynamiques et modèles à boîte noire, à boîte blanche ou à boîte grise. Lubken *et al.* (2010) [21] ont classé les modèles en modèles basés sur la stœchiométrie, modèles à une étape limitante et modèles multi-espèces [19]. Généralement ces classifications comprennent trois types de modèles : des modèles qui utilisent des équations différentielles pour décrire les phénomènes physico-chimiques et biologiques du procédé, les modèles qui décrivent le procédé de façon globale par une seule équation et enfin, les modèles fondés sur les données d'entrée et de sortie, sans aucune connaissance des réactions physiques, chimiques ou biologiques ayant lieu lors du procédé [20].

Dans cette étude, trois types de modèles ont été utilisés pour optimiser plusieurs paramètres sur trois biomasses différentes. Dans un premier temps, le développement d'un modèle de type boîte blanche a été appliqué à la fermentation d'un substrat modèle (hexose) par des cultures mixtes pour optimiser le rendement d'hydrogène produit en se focalisant sur l'effet de la concentration initiale en substrat sur les performances de production en hydrogène et de croissance de la biomasse bactérienne. Dans un second temps, un modèle de type boîte blanche intégrant les cinétiques de réactions du métabolisme bactérien a été développé sur un cas de fermentation endogène à la biomasse utilisée, pour expliquer l'interaction entre les diverses bactéries présentes dans le milieu réactionnel et pour extraire des informations sur les paramètres de cinétique. Enfin, une optimisation de plusieurs paramètres, utilisant un modèle à boîte noire, sera réalisée pour obtenir un rendement optimal d'hydrogène produit par fermentation endogène d'une biomasse originale.

Ce manuscrit de thèse composée de cinq chapitres, commencera par une synthèse bibliographique suivie d'une partie descriptive du matériel et des méthodes de bioproduction utilisées dans le cadre de cette étude ; le troisième chapitre présentera la modélisation de la production d'hydrogène par fermentation exogène à partir de boues des lignes de traitement biologique de la station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg. Le quatrième chapitre présentera la modélisation de la production d'hydrogène par fermentation endogène d'une biomasse vitivinicole (bourbes) avec une étude plus détaillée sur les voies métaboliques empruntées par les bactéries de différents genres bactérien. Le cinquième chapitre présentera l'optimisation de la production d'hydrogène par fermentation d'une biomasse caféicole (pellicules argentées) avec une optimisation de plusieurs facteurs opérationnels et de prétraitements.

Bibliographie

- [1] H.M. Mahmudula, F.Y. Hagosa, R. Mamata, A. Abdul Adama, W.F.W. Ishakb, R. Alenezic, Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 72 (2017) 497–509
- [2] World Population Prospects - Key Findings, 2017 Revision, UN - ESA (United Nations - Economic and Social Affairs ONU - Département des affaires économiques et sociales), site web: <https://population.un.org/wpp/> (consulté le 19/09/2019)
- [3] consoGlobe : Consommation énergétique mondiale, site web : <https://www.planetoscope.com/Source-d-energie/229-consommation-mondiale-d-energie-en-tep-.html> (consulté le 07/09/2019)
- [4] Global Energy & CO2 Status Report : Agence Internationale d'énergie (AIE) 2018, site web : <https://www.iea.org/geco/> (consulté le 19/09/2019)
- [5] Organisation météorologique mondiale (OMM), site web : (consulté le 19/09/2019) <https://public.wmo.int/fr/medias/communiqu%C3%A9s-de-presse/lorganisationm%C3%A9t%C3%A9orologique-mondiale-confirme-que-2017-se-classe-parmi>
- [6] N. Kannan, D. Vakeesan, Solar energy for future world - A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 62 (2016) 1092–1105
- [7] T.S. Uyar, D. Besikci, Integration of hydrogen energy systems into renewable energy systems for better design of 100% renewable energy communities, *Int. J. Hydrog. Energ.*, 42 (4) (2017) 2453-2456
- [8] A. Mostafaeipour, M. Khayyami, A. Sedaghat, K. Mohammadi, S. Shamshirband, M.A. Sehati, E. Gorakifard, Evaluating the wind energy potential for hydrogen production: a case study, *Int. J. Hydrog. Energ.*, 41 (15) (2016) 6200-6210
- [9] R. Łukajtis, I. Hołowacz, K. Kucharskaa, M. Glinkaa, P. Rybarczyk, A. Przyjazny, M. Kamiński, Hydrogen production from biomass using dark fermentation, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 91 (2018) 665-694
- [10] A. Ahmed, A.Q. Al-Amin, A.F. Ambrose, R. Saidur, Hydrogen fuel and transport system: A sustainable and environmental future, *Int. J. Hydrog. Energ.*, 41 (3) (2016) 1369-1380
- [11] L. Prananto, M. Biddinika, M. Aziz, Combined dehydrogenation and hydrogen-based power generation, *Energy Procedia*, 142 (2017) 1603-1610
- [12] C.A. Grimes, O.K. Varghese, S. Ranjan, *The solar generation of hydrogen by water photoelectrolysis*, Springer Science and Business Media, LLC, New York (2008),
- [13] J.G. Speight, *Hydrogen in Refineries*, Hydrogen Science and Engineering: Materials, Processes, Systems and Technology (2016) 1-18
- [14] S.E. Hosseini, M.A. Wahid, Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 57 (2016) 850-866
- [15] C. Acar, A. Beskese, G.T. Temur, Sustainability analysis of different hydrogen production options using hesitant fuzzy AHP, *Int. J. Hydrog. Energ.*, 43 (39) (2018) 18059-18076
- [16] D. Das, Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrog. Energy*, 26 (2001) 13-28
- [17] I. Valdez-Vazquez, H.M. Poggi-Varaldo, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (2009) 1000-1013.

- [18] J. Wang, Y. Yin, Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 92 (2018) 284–306.
- [19] K. Kucharska, I. Hołowacz, D. Konopacka-Lyskawa, P. Rybarczyk, M. Kamiński, Key issues in modeling and optimization of lignocellulosic biomass fermentative conversion to gaseous biofuels, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 129 (2018) 384-408
- [20] J. Lauwers, L. Appels, I. P. Thompson, J. Degève, J. F. Van Impe, R. Dewil, Mathematical modelling of anaerobic digestion of biomass and waste: Power and limitations, *Prog. Energ. Combust.* 39 (4) (2013) 383-402
- [21] M. Lübken, T. Gehring, M. Wichern, Microbiological fermentation of lignocellulosic biomass: current state and prospects of mathematical modeling, *Appl. Microbiol. Biot.*, 85 (2010) 1643-1652

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1- L'hydrogène, carburant du 21^e siècle

Au cours de ces dernières années, l'hydrogène a suscité un intérêt croissant en tant que vecteur d'énergie en raison de la disponibilité abondante de ses ressources potentielles, du développement de l'ingénierie nécessaire à sa production, de sa pureté et de son efficacité de transformation en différentes formes d'énergie (thermique, électrique) pour diverses applications finales dans le domaine des transports et de l'industrie [1].

L'hydrogène est l'élément le plus abondant sur terre, l'atome d'hydrogène est un élément essentiel de nombreuses molécules : l'eau (H_2O) est une source efficace pour la production d'hydrogène par électrolyse, les hydrocarbures (C_xH_y) soumis à la chaleur libèrent de l'hydrogène par reformage. De plus, l'hydrogène est présent dans la matière organique comme les sucres ($C_xH_yO_z$), qui après dégradation par des organismes microbiens sous différentes conditions, peuvent générer de l'hydrogène.

Le pouvoir calorifique supérieur et inférieur élevé de l'hydrogène (respectivement 141,9 MJ/kg et 119,9 MJ/kg), est un autre avantage par rapport aux carburants comme le méthane et l'éthanol, qui ont un pouvoir calorifique plus faible (respectivement de 55,5 MJ/kg et 50 MJ/kg, et de 51,9 MJ/kg et 47,8 MJ/kg) [2]. Ces avantages permettent l'utilisation et l'application de l'hydrogène sur de nombreux aspects que ce soit industriel, domestique ou spatial.

L'application de l'hydrogène dans le secteur du transport, comme combustible dans les moteurs à combustion interne (MCI) ou dans les piles à combustible, suscite beaucoup d'intérêt grâce à son efficacité trois fois plus élevée comparativement à celle des moteurs à essence [3]. Dans le moteur à combustion interne, l'hydrogène subit une combustion en présence d'oxygène, cette réaction aboutissant à libérer de l'eau et de l'énergie utilisée pour propulser le véhicule. D'autres véhicules à hydrogène utilisent en un moteur électrique alimenté par une pile à combustible dans laquelle la réaction électrochimique inverse de l'électrolyse de l'eau a lieu, transformant l'hydrogène en électricité. En général, les véhicules à hydrogène utilisent des piles de type PEMFC (*Proton Exchange Membrane Fuel Cell*) avantageuses pour leur température d'utilisation faible (80°C) contrairement aux piles de type SOFC (*Solid Oxide Fuel Cell*), qui nécessitent une température d'utilisation nettement plus élevée (800°C) [4].

L'hydrogène produit dans des sites industriels de chimie, est actuellement utilisé comme matière première, principalement dans la production d'ammoniac et d'autres engrais et représente 51 % de la demande en hydrogène. La synthèse de l'ammoniac en présence d'un catalyseur consiste à faire réagir l'hydrogène avec de l'azote (N_2) à haute température (de 300 à 550°C) et sous haute pression (entre 200 et 350 bar) [5].

Le deuxième plus gros consommateur d'hydrogène est l'industrie du raffinage, dans laquelle l'hydrogène est utilisé pour l'hydrocraquage et l'hydrotraitement des hydrocarbures, comme la désulfuration, qui représente environ 31% de la demande totale en hydrogène industriel [6]. Les autres consommateurs d'hydrogène en tant que matière première industrielle sont la production de méthanol, d'éthanol et de diméthyléther (DME), et la production de verre [1].

2- Procédés de production d'hydrogène

Malgré la présence abondante de l'hydrogène dans de nombreuses molécules, il n'est pas abondant au niveau moléculaire (H_2) ; ainsi, il est nécessaire de l'extraire à partir de matières premières. De nos jours, l'hydrogène est produit essentiellement à partir des ressources fossiles par vaporeformage ou par pyrolyse, ces méthodes répondant à presque toute la demande en hydrogène grâce à leur rentabilité. Par contre, ces méthodes induisent des émissions de gaz à effet de serre, en plus de l'épuisement continu des ressources primaires [7]. Ainsi, des recherches approfondies sont en cours pour développer des méthodes plus économiques à partir de ressources renouvelables et ayant peu d'impact environnemental. La figure 1 récapitule les principales voies de production de l'hydrogène.

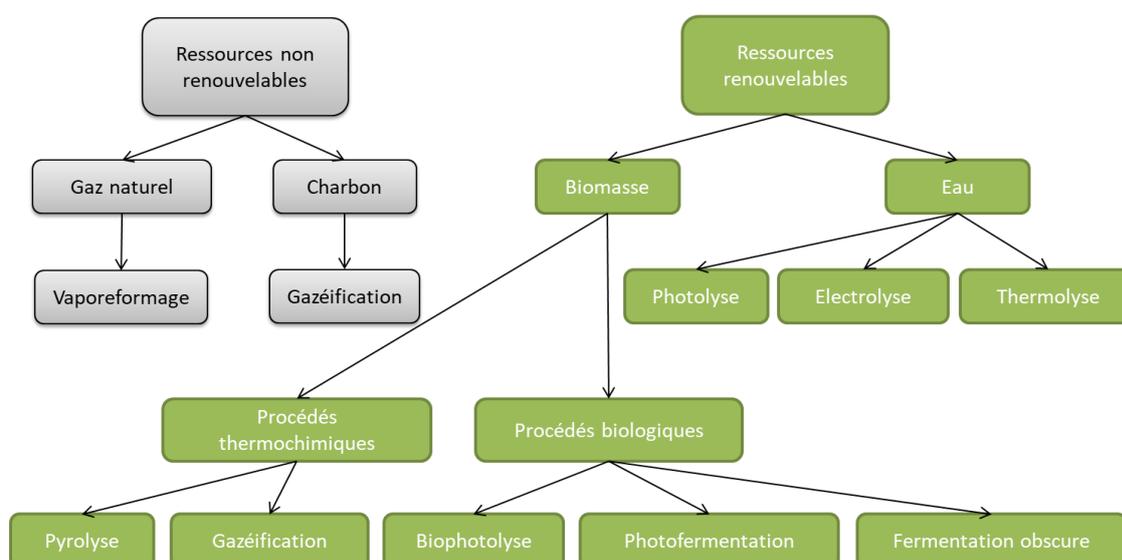


Figure 1 : Principaux procédés de production d'hydrogène

2.1- Production d'hydrogène à partir de ressources non renouvelables

2.1.1- Gaz naturel

Plus de 50% de l'hydrogène produit dans le monde est généré par le vaporeformage du gaz naturel [8]. Ce dernier est utilisé comme matière première pour la production d'hydrogène, ainsi

que comme source d'énergie pour piloter le processus. Le vaporeformage consiste en une réaction endothermique du méthane avec de la vapeur d'eau (1) à haute température (800-1000°C) et sous pression (13-20 bar) en présence de catalyseurs à base de nickel qui permettent de produire un mélange gazeux composé principalement de monoxyde de carbone (CO) et d'hydrogène (H₂), appelé gaz de synthèse.



La réaction du monoxyde de carbone et de la vapeur d'eau à haute température (500°C) selon la réaction de conversion du gaz à l'eau (2) (*Water Gas Shift* (WGS)) engendre une production supplémentaire d'hydrogène et de dioxyde de carbone.



Le mélange de gaz H₂, CO₂, CO et CH₄ non converti est recueilli après la phase de réaction du vaporeformage et du WGS. Le dioxyde de carbone produit peut être piégé par absorption chimique par une solution alcaline, par exemple composée de méthyldiéthanolamine [9]. Une purification supplémentaire par adsorption modulée en pression (*Pressure Swing Adsorption* (PSA)) peut être mise en œuvre pour obtenir l'hydrogène à distribuer [9].

2.1.2- Charbon

La combustion directe du charbon, ressource fossile, libère de grandes quantités de CO₂ et autres polluants dans l'atmosphère. Pour éviter cela, le charbon peut être utilisé pour produire de l'hydrogène par gazéification. En plus de la production d'hydrogène, une coproduction d'électricité (cogénération) peut être réalisée. Cependant, il est à noter que 50 % à 70 % de cette électricité sera consommée par le procédé [10].

Le processus réactionnel démarre par une oxydation du charbon avec de l'oxygène en présence de vapeur d'eau à haute température pour produire de la chaleur pour la réaction de gazéification ; lors de cette étape, du dioxyde de carbone est généré. Ce dernier réagit avec le reste du carbone contenu dans le charbon pour former du monoxyde de carbone par l'équilibre de Boudouard (3).



Le monoxyde de carbone dans le flux de gaz réagit avec la vapeur d'eau générant l'hydrogène et le dioxyde de carbone selon la réaction du WGS (2). La réaction de gazéification, endothermique correspond à la réaction entre le carbone et la vapeur d'eau selon (4).



L'hydrogène peut ensuite être utilisé par une pile à combustible sur site pour générer de l'électricité à haut rendement. La teneur élevée en carbone contenue dans le charbon est le facteur d'efficacité principal de la gazéification du charbon mais les émissions de CO₂ sont en général plus élevées que celles des autres matières premières. Afin de résoudre ce problème, des technologies de capture et de stockage du carbone (*Carbon Capture and Storage (CCS)*) sont en cours de développement [11]. Sur le plan économique, la fabrication de l'hydrogène à partir du charbon diffère de celle des autres combustibles fossiles bien que les coûts unitaires de la matière première soient moins élevés, les étapes de fabrication (coût) sont plus élevées pour les usines de gazéification du charbon [12].

2.2- Production à partir de ressources renouvelables

2.2.1- Eau

2.2.1.1- Electrolyse

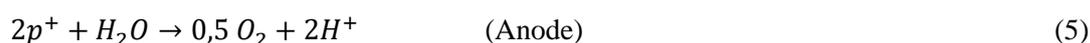
L'électrolyse est un processus permettant de convertir directement les molécules d'eau en molécules d'hydrogène et d'oxygène grâce à une activation électrique. Lorsqu'un courant électrique est appliqué, l'eau se dissocie : de l'hydrogène est produit à la cathode et de l'oxygène se dégage à l'anode. Les trois types d'électrolyseurs les plus courants sont l'électrolyse alcalin utilisant un électrolyte à base d'hydroxyde de potassium, le PEM (*Polymer electrolyte membrane*) utilisant un électrolyte à membrane polymère et l'électrolyse à haute température avec des piles SOEC (*Solid Oxide Electrolysis Cell*). L'efficacité de l'électrolyse de l'eau peut varier de 70% à 90% selon le type de procédé et la source d'énergie électrique (énergie solaire, hydraulique ou éolienne).

Bien que les avantages de la production d'hydrogène par électrolyse de l'eau soient connus depuis environ deux siècles, avec notamment une production d'hydrogène de haute pureté, ses applications restent toutefois limitées et à petite échelle à cause du coût élevé des métaux précieux utilisés dans les électrodes tel que le platine, ainsi que de la consommation élevée en électricité par le fonctionnement des électrolyseurs. En effet, l'électrolyse de l'eau représente uniquement 4% de la production mondiale d'hydrogène [13]. Ainsi, des recherches sur les électrolyseurs sont nécessaires pour augmenter l'efficacité énergétique, réduire le coût du processus et accélérer encore le développement commercial de cette technologie. Une méthode permettant de réduire le coût des électrodes et d'améliorer l'efficacité consiste à introduire un deuxième métal moins coûteux, tel que l'étain et le cobalt [14].

2.2.1.2- Photocatalyse

L'eau peut être aussi utilisée pour produire l'hydrogène par photolyse qui est un processus similaire à celui de l'électrolyse mais avec une activation grâce à l'énergie lumineuse. Ainsi,

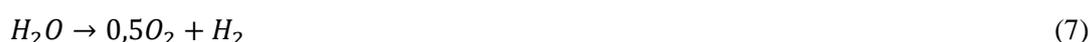
l'énergie de la lumière est absorbée à l'aide d'un photocatalyseur pour décomposer l'eau en hydrogène et dioxygène. Le photocatalyseur est composé de matériaux semi-conducteurs permettant une bonne absorption de la lumière solaire. En particulier, si un photon, ayant une énergie supérieure ou égale à la bande interdite du semi-conducteur, frappe la surface semi-conductrice de l'anode, une paire d'électrons est générée et séparée par un champ électrique entre le semi-conducteur et l'électrolyte. Les trous (p^+) restant à l'anode divisent l'eau en oxygène et en protons (H^+) (5), qui traversent l'électrolyte jusqu'à la cathode où ils interagissent avec les électrons pour former de l'hydrogène gazeux (6) [15].



Bien que l'énergie libre requise pour la décomposition de l'eau en H_2 et en O_2 ne soit que de 1,23 eV, la séparation de l'électron du trou nécessite par contre une énergie de bande interdite élevée, ce qui entraîne une diminution considérable du rendement global. Certains matériaux ont été étudiés comme électrodes dans des cellules de photo-électrolyse comme le platine, alors que certains chercheurs ont conclu que la combinaison du SiC et de TiO_2 comme semi-conducteurs fournissait un système plus efficace et moins coûteux [16].

2.2.1.3- Thermolyse

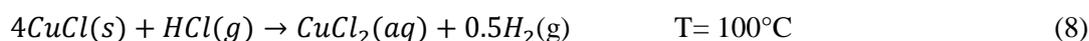
L'hydrogène peut être produit par thermolyse de l'eau qui consiste à utiliser de l'énergie solaire concentrée pour la décomposition thermique de l'eau en une seule étape. La thermolyse de l'eau (7) est un processus réversible et la prévention de la recombinaison des produits dans l'eau est essentielle.



La réaction (7) nécessite une source de chaleur à haute température (supérieure à 2500 K) pour atteindre un degré de dissociation raisonnable [15]. Le degré de dissociation de l'eau varie directement en fonction de la température (de 1% à 2000 K à 34% à 3000 K). Plusieurs cycles de fractionnement thermochimiques de l'eau ont été proposés pour abaisser la température et améliorer le rendement global. Les cycles thermochimiques consistent en une série de réactions chimiques à différentes températures et constituent l'un des processus les plus prometteurs permettant de convertir la chaleur en énergie chimique sous forme d'hydrogène [17]. Près de 2000 à 3000 cycles thermochimiques ont été étudiés, dont 20 à 30 pourraient convenir à la production d'hydrogène à grande échelle. Des rendements allant jusqu'à 50% peuvent être atteints avec ces cycles thermochimiques. Un exemple de cycle thermochimique (Cu-Cl), représenté par les réactions chimiques (5), (6) et (7), est présenté ci-dessous, ce qui permet la comparaison en termes de

complexité avec l'étape de décomposition de l'eau de l'équation (7), le procédé restant coûteux chimiquement et thermiquement.

Multi-cycles à base de Cu-Cl [18]



2.2.2- Biomasse

La biomasse est considérée comme une ressource énergétique importante grâce à son abondance, sa diversité et à son efficacité de conversion en hydrogène par des méthodes physiques, chimiques ou biologiques. Le bois, les cultures agricoles, les sous-produits agricoles, les déchets d'animaux, les sous-produits issus de la transformation des aliments, les plantes aquatiques et les algues sont les ressources les plus importantes de biomasses exploitables [19].

Les méthodes thermochimiques et biologiques sont les processus de conversion de la biomasse les plus développés. Parmi tous les procédés de conversion, les procédés biologiques présentent en général l'avantage de conditions de mise en œuvre simplifiée par des réactions à basse pression et faible température ; leur faisabilité économique est de plus en plus étudiée [20] .

2.2.2.1- Procédés thermochimiques

Les processus de conversion thermochimique de la biomasse nécessitent un apport énergétique important, bien que celui-ci puisse être également alimenté par l'énergie issue de la combustion de la biomasse elle-même. La gazéification est une méthode thermochimique efficace avec le principal inconvénient de devoir éliminer le goudron des produits issus de la réaction.

La gazéification de la biomasse est réalisée à haute température (600-1000°C) avec un accès limité à l'oxygène, à l'air et à la vapeur, ce qui entraîne une combustion incomplète. Le processus se déroule de manière analogue à la gazéification du charbon, ce qui entraîne la formation d'un mélange gazeux contenant des produits combustibles, principalement le gaz de synthèse et du méthane, ainsi que d'autres hydrocarbures tels que l'acétylène, l'éthylène et des composés non combustibles tels que l'ammoniac, le dioxyde de carbone et la vapeur d'eau. L'avantage de la gazéification réside dans la possibilité de l'appliquer à diverses biomasses. Cependant, la composition de la biomasse affecte la composition des produits finis. Plus la taille des particules de la biomasse est faible, plus le temps nécessaire pour atteindre la température souhaitée est court. En outre, plus l'humidité de la biomasse est élevée, plus la production en hydrogène est élevée et plus le pouvoir calorifique du mélange gazeux est faible [21-22].

Une autre méthode thermochimique de conversion de la biomasse en hydrogène est la pyrolyse. Le procédé est réalisé à des températures élevées (200-600°C) et à une pression dans une gamme de 0,1-0,5 MPa, sous atmosphère contrôlée en l'absence d'oxygène et d'eau [23]. L'efficacité de la production d'hydrogène par pyrolyse dépend de la température, de la vitesse de chauffage de la biomasse et du temps de traitement.

La pyrolyse rapide à haute température à temps de réaction court permet d'obtenir les rendements les plus élevés en hydrogène, car le charbon de bois est le principal réactif. Tout comme pour la gazéification, l'un des principaux avantages de la pyrolyse est la possibilité de l'appliquer à diverses biomasses, tandis que l'inconvénient réside dans une exigence énergétique élevée. Plusieurs réacteurs sont développés pour la pyrolyse : lit fluidisé, lit fluidisé circulant et réacteur à flux entraîné. Les réacteurs à lit fluidisé sont les plus communs en raison du chauffage plus rapide de la biomasse par rapport aux autres types de réacteurs [20].

2.2.2.2- Procédés biologiques

Les procédés biologiques sont des méthodes de production d'hydrogène assistées par des microorganismes. Plusieurs microorganismes photosynthétiques et non photosynthétiques peuvent en effet produire de l'hydrogène, notamment les algues vertes, les cyanobactéries, les bactéries photosynthétiques et les bactéries anaérobies pour la fermentation obscure [24]. La physiologie et le métabolisme de ces microorganismes sont très variés, ce qui leur permet de générer de l'hydrogène par différentes voies métaboliques et dans différentes conditions. La production d'hydrogène par voies biologiques est un domaine relativement nouveau. Ces voies de production suscitent l'intérêt en raison de leur potentiel en tant que procédé de production d'énergie renouvelable, consommant peu d'énergie grâce à un fonctionnement à basses température et pression et utilisant des ressources naturelles abondantes.

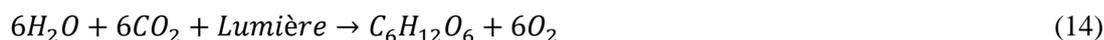
2.2.2.2.1- Biophotolyse directe de l'eau

La biophotolyse de l'eau est un processus biologique anaérobie qui utilise le principe de la photolyse des plantes, c'est-à-dire la dissociation des molécules d'eau en H₂ et O₂ à partir d'énergie lumineuse. Les algues vertes contiennent des enzymes capables de dissocier les molécules d'eau en ions d'hydrogène (H⁺) et en oxygène dans des conditions anaérobies et en présence de la lumière. Les ions d'hydrogène générés (H⁺) sont ensuite convertis, grâce à un excès d'électrons produits par des processus biochimiques complexes lors de la photosynthèse, en hydrogène gazeux par une enzyme appelée hydrogénase. Cette enzyme étant très sensible à l'oxygène, il est nécessaire de maintenir la teneur en oxygène à un faible niveau, inférieur à 0,1% [17,25].



2.2.2.2- Biophotolyse indirecte de l'eau

La photolyse indirecte, réalisée par des cyanobactéries, consiste en deux étapes, dans lesquelles les réactions de formation de l'oxygène et de l'hydrogène sont séparées. Une première étape de photosynthèse produit des glucides et de l'oxygène (14), la seconde étape correspond à la consommation des glucides par fermentation anaérobie donnant lieu à la production de H₂ et CO₂ (15).



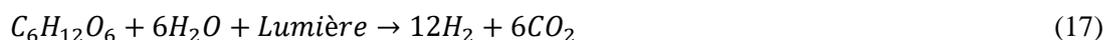
Les avantages de ce processus sont : un dégagement d'hydrogène séparé de celui de l'oxygène, un rendement en hydrogène plus élevé qu'en biophotolyse directe et la conversion efficace de sous-produits en hydrogène [26].

2.2.2.2.3- Photo-fermentation

La photo-fermentation est un processus qui permet de dégrader des acides organiques en hydrogène et en dioxyde de carbone en présence de lumière et dans des milieux pauvres en azote par des bactéries pourpres photosynthétiques non sulfureuses comme *Rhodobacter*, *Rhodobium*, *Rhodospseudomonas* et *Rhodospirillum* [27]. La formation de l'hydrogène est due à l'oxydation des acides organiques par le cycle de Krebs, produisant des électrons, des protons et du dioxyde de carbone et à la présence de nitrogénases qui réduisent les protons en hydrogène [28] (16).



Les bactéries photohétérotrophes peuvent utiliser une large gamme de composés organiques pour convertir des déchets organiques complexes ou des substrats simples (glucose) en hydrogène en utilisant de l'énergie lumineuse (17).



L'augmentation de l'intensité lumineuse a un effet stimulant sur le rendement d'hydrogène et le taux de production, mais un effet négatif sur l'efficacité de conversion de la lumière. Dans le cas de déchets industriels utilisées pour la production d'hydrogène par photo-fermentation, un problème majeur se pose lié à l'opacité des eaux usées qui réduisent la pénétration de la lumière au sein du bioréacteur ainsi qu'à la présence de composés toxiques tels que les métaux lourds rendant nécessaires un prétraitement [29].

2.2.2.2.4- Fermentation obscure

La production d'hydrogène par fermentation obscure est un processus microbiologique complexe fondé sur la dégradation des matières organiques par des bactéries anaérobies cultivées à l'obscurité, donnant lieu à de l'hydrogène, du dioxyde de carbone et des métabolites.

Lorsque les bactéries ont besoin d'énergie pour leur croissance, celles-ci dégradent les substrats organiques par oxydation pour générer l'adénosine triphosphate (ATP), qui peut être converti en énergie par des enzymes spécifiques. Ce processus génère également des électrons qui doivent être éliminés pour maintenir la neutralité électrique. En milieu aérobie, l'oxygène joue le rôle de capteur d'électrons, qui sont réduits en produisant de l'eau. Dans les milieux anoxiques, d'autres composés, par exemple des protons, peuvent être réduits en hydrogène et agissent donc en tant qu'accepteurs d'électrons.

Le glucose est en général le substrat privilégié pour la fermentation obscure produisant des acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide butyrique avec une co-production d'hydrogène à des rendements variables. Lorsque l'acide acétique est le métabolite final, un maximum théorique de 4 moles d'hydrogène par mole de glucose est obtenu (18). Lorsque le butyrate est le produit final, un maximum théorique de 2 moles d'hydrogène par mole de glucose est obtenu (19).



Il existe différents genres de microorganismes pouvant produire de l'hydrogène par fermentation obscure. Les anaérobies stricts (par exemple, le genre *Clostridium*) sont la classe de microorganismes, producteurs d'hydrogène, la plus courante dans la littérature. Des microorganismes anaérobies facultatifs (par exemple le genre *Enterobacter*) ont également été identifiés comme producteurs d'hydrogène lors de la fermentation obscure [30].

2.2.2.2.5- Conclusion

Chaque voie biologique de production d'hydrogène décrit ci-dessus présente des avantages et des inconvénients. Chaque processus présente différentes conditions de réaction avec de multiples substrats et rendements de conversion obtenus. Cependant, pour que le processus de production d'hydrogène devienne concurrentiel sur le plan commercial, plusieurs critères doivent être évalués. Le potentiel de production d'hydrogène à des vitesses (productivités) suffisantes pour une application pratique, un rendement élevé de production en hydrogène, la pureté de l'hydrogène, ainsi que la faible demande énergétique sont les critères essentiels.

Bien que la production d'hydrogène par photofermentation ait généralement une productivité assez importante (de l'ordre de 200 mL H₂/L/h [31]), le faible rendement de conversion

de l'énergie solaire et le besoin d'un photobioréacteur anaérobie couvrant de vastes superficies, ainsi que la disponibilité limitée en acides organiques, sont les principaux obstacles au développement de ce procédé [32].

Bien que le processus de biophotolyse directe génère de l'hydrogène avec une pureté plus élevée, il semble souffrir de la sensibilité à l'oxygène généré, des limitations intrinsèques d'efficacité de conversion de la lumière et de faibles productivités en hydrogène (de l'ordre de 5 mL H₂/L/h [33]), des problèmes de séparation des gaz (H₂, O₂) et des coûts économiques élevés.

La comparaison des taux de production d'hydrogène (volume d'hydrogène produit/volume de réacteur/unité de temps) par les divers procédés biologiques suggère toutefois que le procédé de fermentation obscure offre une excellente productivité (en moyenne de l'ordre de 700 mL H₂/L/h [31]). D'autres avantages sont la large gamme de matières organiques utilisables, la simplicité du procédé, ainsi qu'une production d'hydrogène sans besoin de lumière [30].

3- Principe de la fermentation obscure

Les principales étapes de la fermentation sont l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse. Elles se déroulent de manière synergique et successive, de sorte que le produit d'une réaction devient un substrat pour la réaction suivante. Comme il est expliqué dans la figure 2, ces étapes sont réalisées par quatre groupes de microorganismes : (i) les bactéries hydrolytiques, qui dégradent les polymères organiques complexes comme les protéines polymériques et les glucides complexes en monomères comme les sucres simples (hexose ou pentose) ou les acides aminés, (ii) les bactéries acidogènes, qui fermentent les substrats organiques simples en acides gras volatils (AGV) et en alcools avec production ou consommation d'hydrogène et de dioxyde de carbone, (iii) les bactéries acétogènes, qui transforment les acides gras volatils (AGV) en acétate, hydrogène et dioxyde de carbone et (iv) les *archées* méthanogènes acétoclastiques et hydrogénotrophes, qui convertissent respectivement l'acétate en méthane et l'hydrogène et le dioxyde de carbone en méthane. Il existe également des bactéries homoacétogènes qui convertissent l'hydrogène et le dioxyde de carbone en acétate [34, 35].

Une deuxième réaction générant l'ATP comme source d'énergie peut avoir lieu à partir de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA et en formiate chez les bactéries facultatives par la voie pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) [38,39]. De plus, la dégradation de l'acétyl-CoA fournit un ATP supplémentaire et forme finalement de l'acétate. Cette dernière réaction est généralement catalysée par les actions ultérieures du phosphate acétyltransférase et de l'acétate kinase qui se trouve chez les *Thermococcus* maritimes, ainsi que chez les clostridies et les *Thermococcus kodakaraensis* [37, 40, 41].

D'autre part, le NADH peut être généré lors de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate avec la génération parallèle de l'ATP par la transformation de l'ADP et de NAD^+ par un complexe multienzymatique (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et la présence du phosphate minéral (P_i) [42, 43].

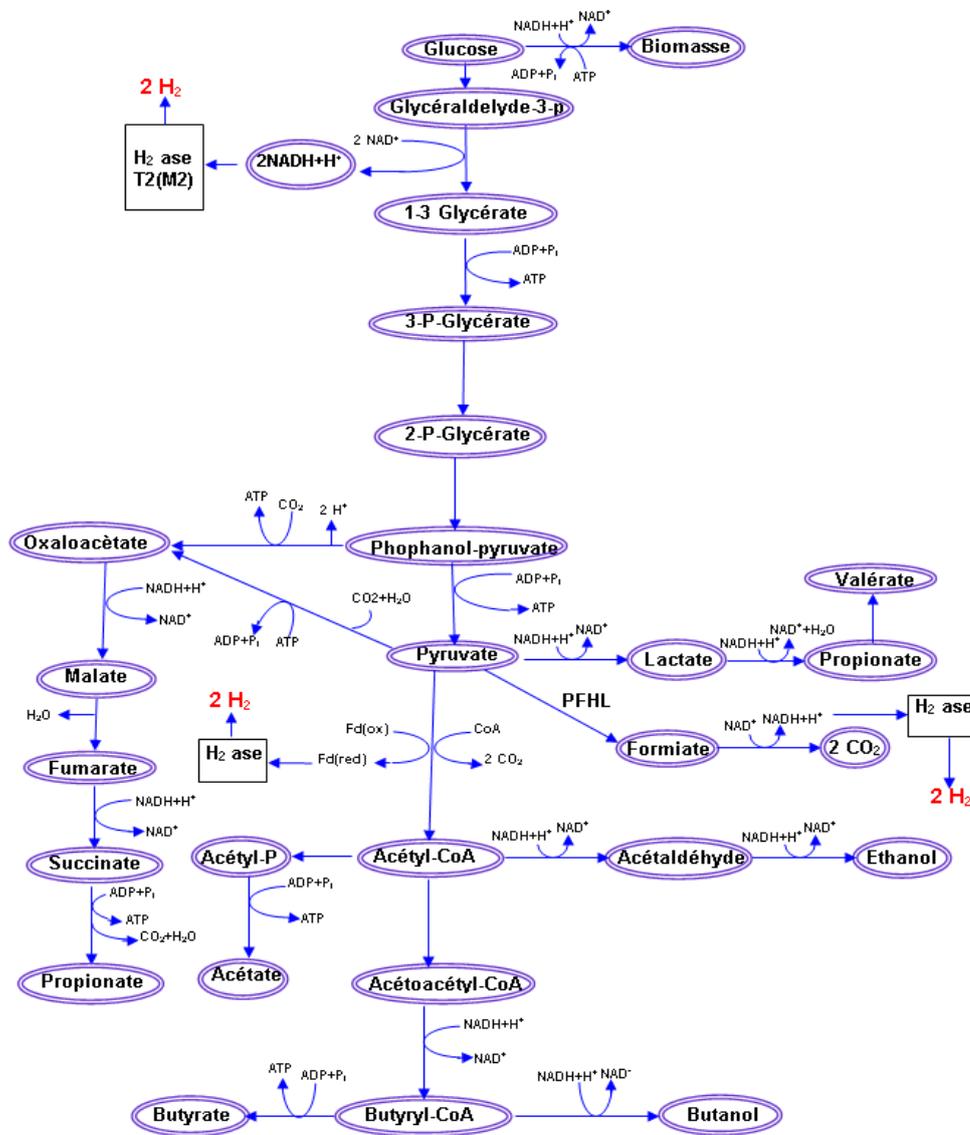


Figure 3 : Principales voies métaboliques de production d'hydrogène par fermentation obscure (adaptée de [44])

Le NAD⁺ est utilisé dans une seule réaction d'oxydoréduction pour former le pyruvate ainsi que le NADH pendant l'étape de glycolyse. Ce dernier doit être régénéré pour permettre la poursuite de la glycolyse. Le NADH est oxydé par la production de divers composés à carbone réduit, tels que le lactate, qui est produit à partir du pyruvate [45], l'éthanol, qui est produit à partir de l'acétyl-CoA ou à partir du pyruvate, voie observée chez certaines bactéries comme *Zymomonas mobilis* [46], le succinate, qui peut être généré à partir à partir du fumarate [47] et le propionate, qui peut être généré à partir du lactate ou du succinate [46]. L'excès de NADH est utilisé pour produire d'autres produits de fermentation tels que le butyrate et le butanol [34].

De plus, le NADH peut également être utilisé dans la production d'hydrogène, soit en réduisant directement l'hydrogénase (NADH-[FeFe]) [46], soit en tant que cosubstrat avec la ferrédoxine réduite (Fd-NADH-[FeFe]) [48].

Chez certaines bactéries comme les *Enterobacteriaceae*, la coenzyme ferrédoxine oxydoréductase, responsable de la production de l'hydrogène par la régénération de NADH produit lors de la glycolyse, n'existe pas. Néanmoins, la réoxydation de NADH est faite en ralentissant ou en arrêtant l'activité de l'enzyme pyruvate déshydrogénase et en utilisant le pyruvate ou l'un de ses dérivés comme accepteur d'électrons et de protons. En conséquence, l'état d'oxydo-réduction doit être équilibré par la consommation de NADH pour former une grande quantité d'acides et d'alcools, dont la plupart sont des produits réduits contenant des protons [49, 50]. L'absence de cette coenzyme explique les rendements en hydrogène plus faibles obtenus en présence de bactéries du genre *Enterobacteriaceae*

Le lactate peut être produit à partir de pyruvate par l'enzyme lactate-déshydrogénase avec une régénération du NADH chez *Clostridium barkeri* [51], ainsi que chez *Lactobacillus plantarum* qui produit le lactate à partir du pyruvate par une oxydation de NADH généré lors de la production d'acétate en réduisant le 2-oxaloacétate en pyruvate [52]. Le NADH peut être aussi régénéré chez *Clostridium barkeri* par la formation de l'éthanol à partir de l'acétyl-CoA par une coenzyme (alcool déshydrogénase) [51].

Le succinate est un autre produit qui conduit à l'oxydation de NADH par sa formation à partir de phosphoenolpyruvate par l'enzyme fumarate-réductase chez les *Clostridium*. *Lactobacillus brevis* peut aussi générer le succinate à partir du fumarate en oxydant les deux NADH produits lors de la formation de l'acétate à partir de pyruvate [53].

3.1- Voies de production d'hydrogène

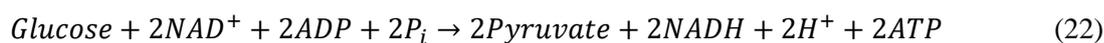
La production d'hydrogène par fermentation obscure est basée sur la régénération de NAD⁺ en NADH par des enzymes spécifiques comme l'hydrogénase ou par oxydo-réduction de la ferrédoxine (Fd(réd)) [37]. La formation de l'hydrogène est généralement suivie par trois voies en

présence de coenzymes spécifiques [54] : (i) la voie de décomposition de l'acide formique (FHL) [55], la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), qui consiste en la ré-oxydation du NADH généré lors de la glycolyse (NFOR) [26, 54] ou (iii) par l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA (PFOR) [28].

Les anaérobies facultatifs comme *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* et *Bacillus*, peuvent métaboliser le pyruvate en acide formique et en autres produits en utilisant un complexe enzymatique appelé enzyme pyruvate-formiate hydrogénylase (PFHL). Comme avec les *Clostridia*, ces organismes doivent se débarrasser de l'excès de réducteurs produits pendant la fermentation, ce qui est accompli par la production d'hydrogène. Le pyruvate est d'abord converti en acide formique par la pyruvate-formiate lyase lors de la production d'acétyl-CoA et l'énergie est conservée par la formation d'ATP via le phosphate d'acétyl (20). L'acide formique sera ensuite dégradé en hydrogène et en dioxyde de carbone par l'action du formiate hydrogénase (FHL) [56, 57] selon l'équation (21).



Chez les bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium*, *Ethanoligenens* et *Desulfovibrio*, la voie de glycolyse est utilisée pour convertir le glucose en pyruvate associée à la conversion du NAD⁺ en NADH via la glycolyse anaérobie (22). Puis, une oxydation du NADH a lieu en présence de la ferrédoxine oxydoréductase, appelée aussi complexe (Rnf) [58] et d'hydrogénase de type TE (M2) à faibles pressions partielles d'hydrogène (NFOR) [59] (23), la production d'hydrogène est générée par oxydation de la ferrédoxine réduite (24) :



La voie du pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) est commune chez les anaérobies stricts. Dans cette voie PFOR, le glucose est converti initialement en pyruvate par les voies glycolytiques. Celui-ci est oxydé en acétyl-CoA, qui peut être converti en phosphate d'acétyl et entraîne la génération d'ATP et l'excrétion d'acétate, ou en acétoacétyl-CoA, qui peut être réduit en butyrate ou en butanol. L'acétyl-CoA peut être aussi converti en acétaldéhyde, qui peut être réduit en éthanol après oxydation du NADH. L'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA nécessite une réduction de la ferrédoxine. La ferrédoxine réduite est oxydée par l'hydrogénase qui génère du Fd (ox) et libère des électrons pour produire l'hydrogène [51], la réaction globale du processus peut être décrite comme suit :

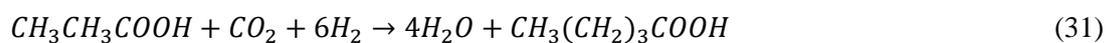


Ainsi à la lumière de ces éléments, on constate que lors du procédé de fermentation obscure, l'hydrogène n'est de loin pas le produit unique. D'autres métabolites comme les acides gras volatils (AGV) et les alcools ainsi que le dioxyde de carbone sont également produits.

La fermentation obscure par les bactéries anaérobies comporte deux phases distinctes. La première phase (appelée phase acidogène ou phase de croissance exponentielle) est caractérisée par une croissance rapide des bactéries avec une production élevée d'hydrogène, ainsi que par la production d'acétate (18), de butyrate et de dioxyde de carbone, tandis que la seconde phase (appelée phase solvantogène ou phase stationnaire) est caractérisée par une croissance plus lente des bactéries avec une faible production d'hydrogène conjuguée à la production de solvants comme le butanol et l'acétone. La production des acides organiques comme le lactate (27), le propionate (28), le butyrate (29) et la production d'alcools comme l'éthanol (30), conduit à la consommation du NADH en tant que donneur d'électrons et empêche la formation de Fd(red). Par conséquent, il entraîne la formation d'hydrogène [53].



La consommation d'acide propionique produisant l'acide valérique conduit aussi à la consommation d'hydrogène [51] (31).



L'hydrogène peut être aussi consommé par des bactéries hydrogénotrophes comme les bactéries homoacétogènes qui produisent l'acétate en consommant les quatre moles d'hydrogène produit et le dioxyde de carbone (32). Les archées méthanogènes consomment l'hydrogène par la production de méthane (33). De plus, les bactéries réductrices de sulfates peuvent aussi consommer l'hydrogène par la réduction du sulfate [60, 61] (34).



Les bactéries réduisant le nitrate sont un autre genre de bactéries consommateurs d'hydrogène. Ces bactéries utilisent l'hydrogène comme donneur d'électrons pour produire de l'ammoniac [62].

3.2- Les facteurs affectant la production d'hydrogène

L'amélioration du rendement de production en hydrogène par fermentation obscure est déterminante pour l'adaptation du procédé aux futures conditions industrielles. La production d'hydrogène dépend fortement des conditions expérimentales telles que la nature et la concentration du substrat, la nature de l'*inoculum* bactérien, la nature et la concentration des produits de fermentation, le pH en cours de bioréaction, la température du bioréacteur, la pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel et la configuration du bioréacteur [22, 61, 63].

3.2.1- Substrat

Le rendement de production en hydrogène varie en fonction du substrat utilisé, ainsi que de sa concentration par rapport à l'*inoculum* bactérien. L'augmentation des concentrations initiales de substrat dans une plage optimale améliore généralement la production d'hydrogène lors de la fermentation obscure. Cependant, des concentrations trop élevées en substrat peuvent être défavorables à la production d'hydrogène, car l'activité des microorganismes produisant de l'hydrogène peut être inhibée de plusieurs manières [64] : notamment par l'accumulation d'acides gras volatils (AGV) dans le milieu réactionnel, par un pH intracellulaire trop faible et/ou par une pression partielle en hydrogène élevée [22]. Par conséquent, l'optimisation de la concentration en substrat, du taux de charge en matières organiques ou du ratio substrat/microorganismes est essentielle pour éviter l'inhibition par le substrat. Cependant, le seuil d'inhibition peut être variables en raison de plusieurs facteurs : les *inocula* microbiens peuvent être très diversifiés en raison de l'utilisation de cultures mixtes, en plus de la variabilité des concentrations en microorganismes producteurs d'hydrogène et des différences de configurations des bioréacteurs ; tout ceci peut conduire à concentrations d'inhibition par le substrat très différentes [60].

L'utilisation de sucres simples, tels que le glucose, le saccharose et le lactose comme substrats modèles permet d'avoir une biodégradabilité élevée ainsi qu'une bonne production d'hydrogène [65-68]. Par contre ce type de substrats modèles est très coûteux et ces coûts peuvent tripler celui de la production d'hydrogène au niveau industriel. Cependant, l'utilisation de ressources renouvelables comme les déchets agricoles ou de l'industrie, les boues d'épuration et les déchets alimentaires, qui contiennent des pourcentages importants de matières organiques dégradables, a pris de l'importance [69-71]. Cependant, ces biomasses peuvent contenir des substrats plus complexes, comme la lignocellulose, et plus difficiles à dégrader par les microorganismes et par conséquent inhiber la production d'hydrogène et/ou favoriser la présence

des bactéries consommatrices d'hydrogène, concurrentes vis-à-vis du substrat ou productrices d'autres métabolites. Ces inconvénients nécessitent des prétraitements spécifiques de la biomasse, chimiques, physiques ou biologiques pour faciliter la délignification des parois lignocellulosiques, hydrolyser la matière complexe et améliorer le rendement de la production d'hydrogène. Les prétraitements chimiques comprennent l'utilisation de liquides ioniques [72], d'acides généralement l'acide chlorhydrique (moins coûteux) [73, 63] et de bases comme la soude [74, 63]. Le broyage de la biomasse [65], ainsi que le prétraitement thermique [75] ou à micro-ondes [76] constituent les prétraitements physiques les plus utilisés. Enfin, les prétraitements biologiques impliquent l'utilisation des champignons ou d'enzymes dans l'objectif de dégrader les matières complexes de la biomasse comme la cellulose donnant lieu à un substrat plus facile métaboliser par les microorganismes [77, 78].

3.2.2- *Inoculum* bactérien

Les bactéries anaérobies stricts comme les *Clostridium* ou facultatifs comme les *Enterobacter* sont les genres bactériens capables de générer l'hydrogène via la fermentation obscure [79]. Une des limites de l'optimisation du processus de fermentation est la thermodynamique des voies métaboliques des microorganismes, qui produisent d'autres produits métaboliques au cours de la croissance d'une culture, tels que l'acide acétique, l'éthanol et le butanol ou qui consomment l'hydrogène pour produire d'autres métabolites (acide propionique, acide lactique). La composition des produits de fermentation, y compris le rapport de leurs concentrations, dépend du type de microorganismes [64].

Les microorganismes utilisés pour produire de l'hydrogène peuvent être sous forme de souches uniques (cultures pures), d'un mélange de deux à plusieurs espèces bactériennes (co-cultures). Les espèces *Clostridium* (*C.*) sont les plus espèces productrices d'hydrogène dominantes car elles donnent lieu à des productivités élevées en hydrogène et ont une capacité de convertir, avec efficacité, une grande variété de substrats glucidiques. Ces espèces comprennent notamment *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. paraputrificum*, *C. pasteurianum*, *C. acetobutyricum* et *C. bifermentans* [80-82]. Les espèces pures de *Clostridium* n'existent pas dans la nature et nécessitent donc pour leur culture une étape d'isolement. Une autre caractéristique importante permettant d'isoler ces bactéries est leur capacité à former des spores leur permettant de survivre dans des conditions difficiles, telles que des températures extrêmes, un pH faible ou élevé, ou en présence de produits chimiques toxiques comme le nickel et le zinc [83].

Le procédé de fermentation est également adapté à l'usage de matières premières non stériles, comme des sous-produits ou des déchets valorisables, et mis en œuvre le plus souvent avec un ensemencement exogène à la biomasse constitué de cultures mixtes de bactéries, présentes en abondance dans des boues d'épuration ou issues de digesteurs. Ces cultures mixtes contiennent des

espèces productrices d'hydrogène, mais aussi des microorganismes hydrogénotrophes (consommateurs d'hydrogène) et concurrents des microorganismes producteurs d'hydrogène pour la consommation des substrats, comme évoqué plus haut. La présence et la croissance de ces microorganismes dépendent de nombreux facteurs et peuvent donc varier selon les conditions de culture. Par exemple les bactéries lactiques et les bactéries propioniques prédominent dans des conditions à taux de charge élevés. Néanmoins, les bactéries méthanogènes ont la plus grande contribution en termes de consommation d'hydrogène ; leur présence dans la microflore mixte réduit, en effet, considérablement le rendement en hydrogène [84, 85].

Compte tenu de ces inconvénients liés à l'usage de cultures mixtes en fermentation exogène, des prétraitements de l'*inoculum* sont nécessaires pour éliminer les microorganismes compétiteurs. Grâce aux propriétés de sporulation de nombreux microorganismes producteurs d'hydrogène leur permettant de résister à des conditions difficiles, des chocs thermiques et chimiques peuvent être appliqués. Ainsi, des endospores producteurs d'hydrogène peuvent germer et devenir plus actifs dans ces conditions, aboutissant à une augmentation de la production d'hydrogène. Néanmoins, ces prétraitements peuvent également inhiber l'activité des bactéries productrices d'hydrogène non sporulantes du genre *Enterobacter*, alors que d'autres bactéries hydrogénotrophes sporulantes telles que *Clostridium aceticum* et *Clostridium thermoautotrophicum* peuvent survivre aux conditions extrêmes du prétraitement [86].

Le choc thermique, appliqué généralement à hautes températures (65°C-120°C) [68], est la méthode de prétraitement la plus largement utilisée pour enrichir les *inocula* mixtes de bactéries productrices d'hydrogène. Cependant, il n'est pas toujours aussi efficace car il peut réduire l'activité de certaines bactéries hydrogénogènes du consortium initial comme les *Enterobacter* [87]. En guise d'alternative [88], un prétraitement acido-basique des cultures mixtes par ajout d'acides ou de bases à des pH allant de 3 à 5 et de 10 à 12, permet d'inhiber la croissance de méthanogènes ou de bactéries non sporulantes [63, 89, 90].

3.2.3- pH du milieu réactionnel

Le pH est l'un des facteurs clés du processus de production d'hydrogène par fermentation obscure. En effet, le pH affecte non seulement le rendement de production en hydrogène, mais peut également modifier la production finale des métabolites ainsi que la structure des communautés microbiennes [91]. Toute modification de la concentration en ions d'hydrogène entraîne une modification du pH et éventuellement une modification du potentiel redox. Ces séries d'événements peuvent déclencher une modification du taux de réception des électrons par les protons et enfin du taux de production en hydrogène. Pour une production optimale d'hydrogène, le pH se situe dans une gamme comprise entre 5 et 7 et est fonction de l'*inoculum* bactérien utilisé, ainsi que de la source de substrat [92].

Un taux élevé d'hydrolyse de la biomasse conduit à une production plus rapide des acides gras volatils. Si les vitesses de réactions d'acidogénèse et d'acétogénèse sont faibles par rapport à celle de l'hydrolyse, les acides gras volatils peuvent s'accumuler dans le bioréacteur. Par conséquent, une forte diminution du pH du milieu réactionnel est observée pouvant inhiber la production d'hydrogène [93]. Ainsi, le maintien du pH du réacteur au-dessus d'une valeur seuil ($\text{pH} > 4,8$), correspondant aux pK_a de plusieurs acides produits est nécessaire. En laboratoire, le contrôle du pH d'un réacteur est relativement aisé car la quantité requise d'additifs chimiques est faible et bien inférieure à celle requise pour une production à grande échelle pour laquelle des méthodes moins coûteuses seront requises pour contrôler le pH du système.

3.2.4- Pression partielle en hydrogène

Une autre contrainte de la production d'hydrogène par fermentation obscure est l'augmentation de la pression partielle en hydrogène lors du processus car une concentration élevée d'hydrogène produit dans la phase liquide entraîne une pression partielle élevée dans le ciel gazeux du réacteur. D'un point de vue thermodynamique, la réduction des protons en hydrogène est favorable uniquement lorsque la pression partielle en hydrogène est faible avec des valeurs limite de l'ordre de 0,001 bar. Une pression partielle élevée entraîne non seulement une diminution de la production d'hydrogène mais aussi réoriente la consommation du substrat vers des voies métaboliques de production de lactate, d'éthanol, d'acétone ou de butanol [94].

Il est donc essentiel d'éliminer l'hydrogène lors de sa formation afin de maintenir une productivité élevée et constante. Il existe actuellement plusieurs méthodes permettant de réduire la pression partielle d'hydrogène dans le bioréacteur. Un flux gazeux continu en utilisant un gaz de balayage inerte comme l'azote, l'utilisation d'un plus grand volume d'espace de tête, d'une extraction sous vide, d'une agitation continue du milieu réactionnel favorisant l'extraction des gaz ou d'une séparation par membrane peuvent être appliqués pour limiter ce phénomène [68, 95-97].

3.2.5- Température de fermentation

La température lors de la fermentation peut influencer de manière significative la vitesse de dégradation du substrat, l'activité des enzymes producteurs d'hydrogène (par exemple, les hydrogénases), ainsi que le taux de la croissance des microorganismes. La température de fonctionnement a également un impact sur les voies métaboliques empruntées lorsque certaines bactéries deviennent prédominantes pour une température donnée. L'augmentation de la température dans une plage appropriée peut considérablement augmenter la production d'hydrogène, car une température de fonctionnement élevée permet d'éliminer les microorganismes consommateurs d'hydrogène tels que les méthanogènes et les homoacétogènes. Cependant, une température de fonctionnement très élevée peut inhiber les producteurs d'hydrogène via

l'inactivation des enzymes essentielles à la croissance cellulaire ainsi qu'à la dénaturation des protéines cellulaires [97], à l'exception de microorganismes producteurs d'hydrogène extrémophiles comme *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* [98], résistant à des températures entre 65°C et 80°C ou hyperthermophiles, qui résistent à plus de 80°C tels que *Thermotoga maritima* et *Pyrococcus furiosus* [99] et qui peuvent produire à des rendements en hydrogène intéressants (de l'ordre de 2,2 mol/mol) par rapport aux autres bactéries [98]. Les microorganismes thermophiles résistent en général à des températures comprises entre 40°C et 65°C comme *Thermococcus* et *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* [100].

Le choix de température optimale du procédé dépend du type de bactéries sélectionné lors de la fermentation. La plupart des études suggèrent une température de fonctionnement optimale entre 37°C et 40°C pour une fermentation par des bactéries mésophiles afin de réduire le coût énergétique du procédé. D'autre part, l'application de températures élevées dans le bioréacteur permet d'augmenter l'activité des enzymes responsables de l'hydrolyse, de diminuer la solubilité des gaz dans le milieu ainsi que de diminuer le risque de contamination par des bactéries méthanogènes. Ces avantages favorisent l'utilisation des déchets contenant des substrats complexes qui peuvent être hydrolysés facilement au cours de la fermentation [101]. Cependant, l'utilisation de hautes températures lors de l'utilisation des cultures mixtes peut inhiber la production d'hydrogène liée à l'inhibition de bactéries productrices d'hydrogène non résistantes comme les *Enterobacter* [102]. De plus, les changements dans les métabolites solubles observés, lorsque la température augmente, en utilisant des cultures mixtes suggèrent des changements dans les voies métaboliques causés par un changement de température dans lequel les bactéries dominantes pour chaque température sont différentes [103].

4- Modélisation des procédés biologiques

4.1- Introduction à la modélisation

Parallèlement au développement de nouveaux procédés mis au point par la recherche expérimentale, des efforts considérables ont été consacrés à la modélisation mathématique dans le domaine de la production d'hydrogène par fermentation. Le développement de modèles mathématiques permet, en effet, de mieux comprendre et d'analyser une grande quantité d'informations issues des phénomènes biologiques, chimiques et physiques (transfert), ayant lieu durant la fermentation et de déterminer les possibilités d'optimisation, qui sont les conditions préalables à l'amélioration des performances de bioproduction d'hydrogène par fermentation. Les modèles mathématiques peuvent également être utilisés pour tester des hypothèses scientifiques, concevoir des expériences ou pour contrôler et optimiser un bioprocédé déjà existant. Un autre avantage majeur de la modélisation est le gain de temps nécessaire à la réalisation des expériences et à moindre coût.

Au cours de ces vingt dernières années, différents modèles mathématiques ont été développés dans le domaine de la production d'hydrogène par fermentation. Cependant, la modélisation n'est pas une tâche aisée, sachant que les modèles mathématiques en biologie dépendent de lois empiriques. En effet, même les réactions biologiques simples imposent un nombre de processus conséquents et qui dépendent de divers mécanismes comme les phénomènes d'adsorption et de catalyse enzymatique, qui dépendent à leur tour de variables chimiques, physiques et biologiques. Par conséquent, une description mathématique détaillée de tous les processus impliqués est presque impossible. La construction d'un modèle réalisable nécessite alors une simplification sachant que certains aspects de la réalité ne seront plus pris en compte par le modèle. C'est pour cela que la qualité d'un modèle, ainsi que sa structure, doivent correspondre aux objectifs pour lesquels le modèle a été conçu.

4.2- Classification des modèles mathématiques

La diversité des matières premières à métaboliser et des *inocula* bactériens, ainsi que la complexité des processus de fermentation lors de la production d'hydrogène ou généralement des procédés biologiques, conduit à une absence de classification universelle de ces modèles mathématiques. Cependant, plusieurs travaux [104-108] proposent des approches et des critères de références pour classer les modèles mathématiques, comme résumé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Approches de classification des modèles mathématiques

Critère de référence	Classification proposée	Référence
Période de prévisions du modèle	Modèle dynamique Modèle non dynamique	F. Pascal [104]
Connaissance approfondie du système étudié	Modèle structuré Modèle non-structuré	Roubos <i>et al.</i> [105]
Quantité d'équations <i>a priori</i> incluses	Modèle à boîte blanche Modèle à boîte grise Modèle à boîte noire	Kucharska <i>et al.</i> [106]
Complexité du modèle	Modèle inspiré par des mécanismes Modèle de complexité réduite Modèle basé sur des données	Lauwers <i>et al.</i> [107]
Constitution du modèle fondée sur les étapes de digestion anaérobie	Modèle basé sur la stoechiométrie Modèle basé sur une étape limitante Modèle multi-spécifique	Lübken <i>et al.</i> [108]

F. Pascal (1992) [104] a classé les modèles selon deux approches : dynamique ou non dynamique. Cette classification se réfère à la période de prévisions du modèle. Les modèles dynamiques utilisent plusieurs équations différentielles ordinaires, qui sont généralement basées sur des considérations de bilans massiques et génèrent des prédictions en fonction du temps. Les modèles non dynamiques relient les résultats finaux du procédé aux conditions initiales et le substrat

aux produits en utilisant la stœchiométrie des réactions considérées. De plus, ces modèles intègrent des variables indépendantes du temps.

Une autre classification est faite par Roubos *et al.* (1998) [105], en se fondant sur la connaissance approfondie du système. Deux groupes de modèles ont été proposés : des modèles structurés et des modèles non structurés. Les modèles non structurés sont similaires aux modèles non dynamiques proposées par F. Pascal (1992) [104], ces modèles sont donc fondés sur l'observation du système en considérant que les cinétiques des bioréactions sont macroscopiques. Le développement de ce type de modèle est rapide et ne requiert que *a priori* peu de connaissances du système. Les modèles structurés sont développés à partir d'une connaissance approfondie du système étudié en intervenant sur les lois fondamentales de la chimie et de la physique, ainsi que des connaissances poussées sur les principes de la biochimie et le métabolisme des microorganismes. Ces modèles s'appuient sur un savoir et demandent peu d'expérimentations.

Une autre approche est fondée sur la quantité d'informations ou d'équations *a priori* incluses au modèle [94]. Trois groupes de modèles ont été proposés : les modèles à boîte blanche, les modèles à boîte grise et les modèles à boîte noire. Les modèles à boîte blanche sont déductifs et utilisent des informations *a priori* pour décrire les phénomènes ayant lieu lors du processus. Les modèles à boîte grise sont des modèles inspirés par le mécanisme des réactions, qui permet d'approximer et de simplifier le procédé comprenant des procédures d'estimation de paramètres. Les modèles à boîte noire sont des modèles basés uniquement sur les données, qui lient directement l'entrée à la sortie.

D'autre part, Lauwers *et al.* (2013) [107] ont proposé une autre approche de classification, basée sur la complexité du modèle, avec le développement de modèles inspirés par les mécanismes réactionnels, les modèles de complexité réduite et les modèles basés sur des données. Les modèles inspirés des mécanismes réactionnels comprennent la cinétique des diverses étapes de production d'hydrogène selon un modèle cinétique proposé telles que la cinétique de Monod [109], la cinétique de Haldane [110] ou la cinétique d'Andrews [111]. Ce groupe de modèles est similaire aux modèles dynamiques, aux modèles structurés et aux modèles à boîte blanche. Le modèle ADM1 modifié (*anaerobic digestion model number 1*) [112] est un exemple de modèle le plus utilisé de ce groupe. Les modèles à complexité réduite présentent des équations relatives au bilan massique et à la cinétique globale du processus et peuvent être utilisés pour des stratégies de contrôle expérimental. Le modèle de Gompertz modifié [113] ou le modèle logistique [114], développé pour la croissance bactérienne, sont des exemples de ce groupe. Les modèles basés sur les données visent à prédire le comportement du système sans aucune connaissance préalable du processus en cours comme les modèles à boîte noire, les modèles non structurés et les modèles non dynamiques. Les modèles

RSM (*Response Surface Methods*) et ANN (*Artificial Neural Network*) sont les modèles les plus utilisés de ce groupe [115].

Une autre classification est proposée par Lübken *et al.* (2010) [108]. Les modèles mathématiques de la fermentation biologique peuvent être divisés en trois groupes : les modèles basés sur la stœchiométrie, les modèles avec une étape limitante, les modèles multi-spécifiques. Les modèles basés sur la stœchiométrie supposent que la composition finale des produits est uniquement liée à la stœchiométrie des réactions de consommation du substrat ; ce type de modèle utilise la formule de Buswell [116] complétée par l'équation de Boyle [117], pour notamment déterminer le potentiel méthanogène théorique. L'approche par étape limitante souligne la nécessité de décrire l'étape limitante lors des digestions anaérobies (par exemple, l'élimination de l'étape de production d'acides, comme le lactate lors la modélisation de la production de méthane par fermentation). Les modèles multi-spécifiques prennent en compte de consortia microbiologiques complexes, responsables des processus anaérobies.

En raison de l'absence d'une classification universelle des modèles et selon les classifications proposées ci-dessus, on peut proposer une classification selon les récents progrès en modélisation pour la production d'hydrogène par fermentation, en regroupant les modèles aux propriétés similaires en trois groupes :

- i) Groupe 1 : Modèles les plus complexes avec une diversité d'informations et fonction du temps (comme le modèle ADM1 modifié) [112]
- ii) Groupe 2 : Modèles avec une approche générale du processus réactionnel (comme le modèle modifié de Gompertz) [113]
- iii) Groupe 3 : Modèles les plus simples nécessitant une large série de données expérimentales (comme le modèle de Plackett-Burman) [118].

4.2.1- Modèle ADM1 (Anaerobic Digestion Model number 1)

Le modèle de digestion anaérobie n°1 (ADM1) est une consolidation de plusieurs modèles mathématiques utilisés le plus souvent pour optimiser le processus de digestion anaérobie. Le modèle ADM1 est un modèle structuré basé sur un système d'équations différentielles ordinaires représentant les interactions entre le substrat, les microorganismes et les produits de la digestion anaérobie. ADM1 est décrit par 19 réactions biochimiques, 3 équations faisant références aux phénomènes de transfert de masse entre phases liquide et gazeuse et 6 processus cinétiques acide-base supplémentaires, impliqués dans la bioconversion de substrats organiques complexes en méthane, hydrogène, dioxyde de carbone et sous-produits. Il comprend 24 composants et 56 paramètres stœchiométriques et cinétiques permettant de prendre en compte les processus

biologiques et des paramètres supplémentaires permettant de déterminer les processus physico-chimiques (par exemple la diffusion et la dissolution des gaz dans la phase liquide), qui ont lieu dans le système. Le modèle ADM1 comprend cinq étapes de dégradation biochimique de matières organiques complexes : la décomposition des matières complexes, leur hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse [112].

4.2.2- Modèle modifié ADM1

Certaines limitations ont été identifiées, qui ne permettent pas l'applicabilité d'ADM1 aux systèmes non méthanogènes. Une des limitations est la prise en compte insuffisante de certaines voies métaboliques de fermentation. En effet, seuls quatre acides (acétique, butyrique, propionique et valérique) sont pris en compte, alors que les autres métabolites tels que formiate, le lactate, le pyruvate et l'éthanol, potentiellement impliqués dans le procédé sont ignorés. Or, ces composés doivent être inclus lors de la modélisation pour la production d'hydrogène car ils peuvent être également générés dans le milieu réactionnel lors du processus fermentaire. Une autre limitation du modèle ADM1 est que la structure du modèle initial utilise une stœchiométrie constante pour décrire les produits générés par fermentation. Cependant, les conditions de fermentation, comme la température, le pH, la concentration en substrat, la charge de la biomasse et la nature de l'*inoculum* bactérien, ainsi que l'accumulation des produits métaboliques comme l'hydrogène et les acides gras volatils, influent fortement sur les voies de fermentation. Aussi, les modifications de conditions environnementales influent sur la stœchiométrie du processus fermentaire.

Sur la base de ces limites, plusieurs modèles ont été proposés pour modéliser la fermentation obscure de substrats organiques dans diverses conditions de fonctionnement dans le but de produire de l'hydrogène. Peiris *et al.* (2006) [119] ont utilisé le modèle ADM1 pour simuler la production d'hydrogène en ajoutant des modifications mineures, en particulier liées à la fois à la production du lactate et de l'éthanol en tant que voies concurrentes. Néanmoins, la prédiction du modèle a montré un désaccord important avec les valeurs mesurées. Selon les auteurs, cela provient des différentes voies métaboliques empruntées par les microorganismes. Une solution pour surmonter ce problème a été présentée par Penumathsa *et al.* (2008) [120], qui ont modifié le modèle ADM1 avec une approche de stœchiométrie variable afin de prédire la production d'hydrogène mésophile dans un réacteur continu alimenté avec différentes concentrations de saccharose. Rodríguez *et al.* (2006) [121] ont proposé aussi une fonction de stœchiométrie variable intégrée à ADM1 afin de décrire la formation des produits en se basant sur les flux énergétiques et métaboliques. Ntaikou *et al.* (2010) [122] ont développé et appliqué une version modifiée du modèle pour décrire et prédire la production d'hydrogène fermentaire en continu à partir d'extrait de sorgho sucré par la bactérie fibrolytique *Ruminococcus albus*, en extrayant les principaux paramètres cinétiques de la croissance bactérienne sur le substrat à partir d'expériences réalisées en

réacteur batch. Antonopoulou *et al.* (2012) [123] ont aussi utilisé le modèle ADM1 modifié pour simuler et prédire le processus fermentaire utilisant des cultures microbiennes mixtes, en tenant compte de l'acide lactique et de l'éthanol parmi les métabolites de fermentation et en supposant une stœchiométrie variable des réactions biochimiques. Dans cette étude, une optimisation du rendement en hydrogène a été faite en testant différents temps de rétention. Gadhamshetty *et al.* (2010) [124] ont présenté une comparaison entre le modèle de Gompertz et un modèle adapté du modèle ADM1 en simplifiant le modèle et en faisant varier la constante de demi-saturation (K_s) en fonction des conditions de fonctionnement du réacteur, pour optimiser la concentration en substrat initiale. Pradhan *et al.* (2016) [125] ont construit un modèle basé sur le modèle ADM1 pour simuler la production d'hydrogène à partir de la fermentation du glucose effectuée par une bactérie marine *Thermotoga neapolitana*, en tenant compte des voies de production du pyruvate et du lactate à partir du glucose. Alexandropoulou *et al.* (2018) [126] ont pu calibrer un modèle proposé avec une nouvelle approche pour la modélisation de la fermentation en continu, en prenant en compte différents paramètres cinétiques pour chaque voie de consommation de sucre et avec des coefficients stœchiométriques fixes. Montecchio *et al.* (2018) [127] ont proposé un modèle avec stœchiométrie variable, en incluant la production d'éthanol et la voie d'homoacétogénèse négligées dans le modèle ADM1 d'origine. Une modélisation de la fermentation obscure utilisant *Clostridium beijerinckii* et du dextrose en tant que substrat a été réalisée par Valentín-Reyes *et al.* (2018) [128], en prenant en compte les réactions biochimiques, les équilibres physico-chimiques ainsi que les processus de transfert de masse lors de la fermentation.

Bien que ces types de modèles décrivent plus en détail le processus de fermentation obscure, ils sont trop complexes pour être utilisés pour comprendre et pour optimiser le processus. En effet, la plupart de ces modèles utilisent jusqu'à 33 équations différentielles ordinaires et plus de 90 paramètres, ce qui peut conduire à une incertitude sur la validité des résultats et potentiellement à une mauvaise compréhension du processus fermentaire et des phénomènes ayant eu lieu lors de la production d'hydrogène. Ce qu'il faut rechercher est donc un compromis entre simplicité d'application et sens biochimique, c'est-à-dire maintenir un modèle simple tout en décrivant de manière mécanistique les processus impliqués.

4.2.3- Modèles décrivant les cinétiques de réactions

En raison de la limitation des modèles à représenter tous les phénomènes ayant lieu durant la fermentation, des modèles moins complexes ont été développés pour inclure la cinétique de croissance des microorganismes. Par cette approche, l'activité des microorganismes, le taux de production d'hydrogène et d'autres métabolites ainsi que les voies de dégradation du substrat peuvent donc être étudiés pour une variété de substrats et d'*inocula* bactériens. De plus, certains modèles visent aussi à évaluer les effets de certains facteurs sur le processus fermentaire, par

exemple, comme l'influence du pH ou de la concentration initiale en substrat sur la production d'hydrogène et les performances des microorganismes. Les constantes cinétiques obtenues à partir de ces modèles fournissent des informations utiles pour l'analyse, la conception, le fonctionnement et l'optimisation du processus de production d'hydrogène par fermentation. Ntaikou *et al.* (2009) [129] ont étudié les voies de production d'hydrogène par les *Ruminococcus albus* utilisant le glucose comme substrat modèle en prenant en compte les interactions entre les produits métaboliques produits au cours de leur production. Dans cette étude, la voie de production d'hydrogène par le formiate est prise en compte, ainsi que l'effet de la pression partielle d'hydrogène et du pH. Singh *et al.* (2019) [130] ont étudié les cinétiques de réactions de *Thermotoga maritima* utilisant le maltose comme substrat. L'approche logistique a été utilisée pour modéliser la croissance des bactéries, tandis que la production d'hydrogène et des autres métabolites est explicitée par l'équation de Leudking-Piret. Boni *et al.* (2013) [131] ont développé et calibré un modèle basé sur l'équation classique de Monod pour la description de la production d'hydrogène à partir de déchets organiques. Enfin, très récemment, Björkmalm *et al.* (2018) [132] ont publié un modèle, qui décrit la croissance de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* sur un mélange de sucres lignocellulosiques avec la variation du rendement de production en hydrogène en fonction de la nature des sucres utilisés simultanément ou individuellement, en tenant compte des métabolites présents dans le milieu réactionnel (acétate et lactate).

En outre, plusieurs recherches ont été faites pour étudier l'effet de divers facteurs sur la production d'hydrogène par des cultures mixtes. Wang *et al.* (2008) [133] ont étudié l'effet de la concentration en substrat sur la production d'hydrogène par fermentation par des cultures mixtes utilisant le glucose comme substrat modèle. Dans ce modèle, l'évolution des bactéries et la production d'hydrogène par le modèle logistique ont été étudiées en utilisant l'équation de Hans-Levenspiel, qui décrit l'effet du substrat. Akobi *et al.* (2017) [134] ont étudié l'impact du furfural sur la production d'hydrogène dans un environnement de cultures mixtes soumises à diverses conditions thermiques avec un substrat complexe lignocellulosique, en utilisant les cinétiques de croissance microbienne et de dégradation du substrat basées sur l'équation de Monod.

Plusieurs modèles sont conçus pour un substrat spécifique ou un genre de microorganismes spécifique et dans des conditions spécifiques, mais les paramètres obtenus par ces études ne sont pas applicables à d'autres types de substrats ou d'autres genres de microorganismes. De plus, il n'y a que quelques travaux qui ont étudié des procédés utilisant des substrats organiques complexes dégradés par des *consortia* bactériens. De plus, il est à souligner que la modélisation de la production d'hydrogène à partir d'un consortium bactérien endogène à une biomasse complexe n'a pas encore fait l'objet d'études dans la littérature.

4.2.4- Modèle de Gompertz

Le modèle d'ADM1 modifié ou les autres modèles décrits ci-dessus décrivent plus en détail le processus de fermentation obscure, mais apporte aussi une complexité supplémentaire, ce qui entraîne une incertitude sur la validité des résultats. L'utilisation des modèles complexes pour une évaluation rapide des processus et des données acquises au cours d'une phase expérimentale n'est pas souhaitable. De plus, les conditions initiales et les données d'entrée des variables d'état sont nécessaires et l'étape de mise en place du modèle peut nécessiter l'estimation de plusieurs paramètres du processus (paramètres d'hydrolyse, paramètres cinétiques, facteurs de rendement), dont le nombre augmente avec la complexité croissante du modèle. C'est pourquoi la majorité des chercheurs ont utilisé des modèles plus simples, tels que l'équation de Gompertz modifiée, pour décrire leurs données expérimentales [135-138]. Le modèle de Gompertz modifié décrit l'évolution du processus de production d'hydrogène en déterminant le volume cumulé de production d'hydrogène, la vitesse maximale de production (productivité) des gaz et le temps de latence avec en général des valeurs de coefficient de corrélation élevées entre les données expérimentales et celle ajustées par le modèle [139,140].

Cependant, on notera que ces données (temps de latence, productivité et volume d'hydrogène cumulé) peuvent être déduites directement sur la base des valeurs de production d'hydrogène mesurées expérimentalement. De plus, les paramètres du modèle sont limités à des conditions expérimentales spécifiques et ne peuvent pas être étendues pour prédire le processus de fermentation de diverses combinaisons de substrats, de souches bactériennes et de paramètres du procédé (pH, température, etc.).

La modélisation du processus fermentaire de production d'hydrogène comprend la description mathématique des autres composants du processus de fermentation obscure, telles que la cinétique de croissance microbienne, la consommation du substrat et la production des autres produits comme les acides gras volatils, ce que ne peut prédire le modèle de Gompertz.

4.2.5- Modèles à boîte noire

4.2.5.1- Définition des modèles à boîte noire

Les modèles à boîte noire ou modèles de plan d'expériences sont très intéressants pour la description du processus global de production d'hydrogène par fermentation. Les relations entre les principales variables d'entrée et les caractéristiques de sortie indiquées sous forme d'équations sont des outils utiles pour optimiser le procédé. Ces modèles empiriques n'exigent pas de connaître les mécanismes des processus décrits, mais ils sont capables de prédire les relations entre les variables d'entrée et de sortie sur la base de l'ensemble des données expérimentales. Cette approche permet d'obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs sans connaître les détails des

transformations complexes et des réactions se produisant au cours des processus de conversion du substrat et de production en hydrogène par fermentation.

Il existe plusieurs types de modèles de plans d'expériences, à savoir les plans factoriels complets ou fractionnaires [141]. Dans la conception des plans factoriels complets, chaque combinaison de chaque valeur des différents facteurs est testée. Un modèle polynomial approprié peut être utilisé pour décrire les effets des facteurs étudiés sur une réponse commune comme par exemple le rendement de production en hydrogène, puis optimiser la réponse si nécessaire. Étant donné que toutes les combinaisons possibles des différentes valeurs des facteurs peuvent être étudiées à l'aide d'un plan factoriel complet, cette méthode a été largement utilisée pour étudier les effets de plusieurs facteurs simultanément sur les processus de production d'hydrogène par fermentation [142]. Par exemple, Wu et Chang (2007) [66] ont étudié les effets du pH initial (pour 4 valeurs) et de la température (pour 3 valeurs) sur la production d'hydrogène par fermentation en utilisant un plan factoriel complet de 12 expériences. Deux modèles polynomiaux du second ordre ont été construits pour décrire les effets des deux facteurs sur le rendement et la vitesse de production en hydrogène. Puis, ces auteurs ont conclu que le pH et la température optimaux pour la production fermentaire d'hydrogène étaient respectivement de 6,0 et 35°C. Le principal inconvénient de cette conception est que le nombre d'analyses pour une conception factorielle complète augmente de façon exponentielle avec le nombre de facteurs étudiés. Par exemple, le nombre d'essais fait pour quatre facteurs est $a*b*c*d$, avec les paramètres a, b, c et d correspondant aux valeurs testées pour chaque facteur. Ainsi, si deux valeurs pour chaque facteur sont testées, le nombre d'essais sera de 2^4 . Généralement, cela se traduit par des essais expérimentaux chronophages et économiquement non souhaitables [143].

Il s'avère que, lorsque le nombre total d'analyses pour un plan factoriel complet est relativement grand, il est souvent possible d'obtenir les informations souhaitées en ne réalisant qu'une partie du plan factoriel complet, qu'on appelle alors plan factoriel fractionnaire. Avec ce plan d'expériences, les effets de certains facteurs sur une réponse peuvent être étudiés dans des conditions plus économiques et pratiques. La méthodologie des surfaces de réponse (RSM) (*Response Surface Methods*) offre une approche commune et puissante du modèle et est très utilisée à l'heure actuelle pour modéliser le processus de production d'hydrogène par fermentation [144].

4.2.5.2- Méthodologie des surfaces de réponse (RSM)

(Response Surface Methods)

Dans le cas de systèmes complexes, les méthodes statistiques permettent de déterminer les modèles empiriques basés sur des expériences bien conçues. Ces modèles empiriques sont généralement utilisés pour l'optimisation du processus. De nombreuses méthodes de conception expérimentale sont proposées, et certaines d'entre elles ont été adoptées pour la modélisation et

l'optimisation de la production d'hydrogène par fermentation, la RSM étant la méthode la plus utilisée. Le principe de RSM est de déterminer la sensibilité de la production d'hydrogène aux facteurs, notamment le type de substrat et sa concentration initiale, la température, l'agitation, la pression partielle d'hydrogène et le pH. Il évalue aussi l'importance des facteurs et permet de trouver les valeurs des facteurs qui donnent la meilleure combinaison de plusieurs réponses (comme le rendement en gaz produit, la vitesse de production et d'autres réponses). De plus, il étudie la manière dont les réponses de multiples facteurs dépendent les unes des autres et permet d'identifier les paramètres les plus importants qui contrôlent le processus ainsi que leur degré d'interaction.

Le design des points centraux, le design de Box-Behnken ou le design de Plackett-Burman sont les modèles les plus utilisés permettant de traiter efficacement les essais expérimentaux par rapport au plan d'expériences factoriel complet, car il est possible d'obtenir suffisamment d'informations à partir d'un nombre d'expériences relativement réduit.

Le design des points centraux et le design de Box-Behnken sont des conceptions expérimentales permettant d'estimer une approximation polynomiale du second ordre d'une réponse dans une région précise selon l'équation (35) :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (35)$$

où y est la réponse, β_0 est la constante, β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique, β_{ij} est le coefficient d'interaction et x_i et x_j sont les niveaux de facteur codé. Le design des points centraux est développé par Box et Wilson et composé de cinq niveaux [145]. Le plan consiste généralement en une conception factorielle de 2^n et de m points centraux, où n est le nombre des facteurs testés et m le nombre des valeurs des facteurs. Le design de Box-Behnken est un plan factoriel fractionnaire à trois niveaux développé par Box et Behnken [146]. La conception peut être conçue comme une combinaison d'une conception factorielle à deux niveaux et d'une conception de blocs incomplets. Dans chaque bloc, un certain nombre de facteurs sont soumis à toutes les combinaisons pour le plan factoriel, tandis que d'autres facteurs sont conservés aux niveaux centraux. Le design de Box-Behnken offre une alternative économique au design des points centraux, car il a moins de niveaux de facteurs et ne contient pas de niveaux extrêmement élevés ou extrêmement bas [147].

Le plan d'expériences Plackett-Burman, qui est un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux mis au point par Plackett-Burman (1946) [118], a été largement utilisé pour examiner l'importance et l'effet des facteurs sur la réponse. L'avantage de ce modèle est que le nombre d'essais est réduit ; ce modèle peut examiner jusqu'à $n=N-1$ facteurs avec un nombre d'essais égal à N. L'équation utilisée pour décrire les effets des facteurs est la suivante :

$$y = \beta_0 + \sum_i^j \beta_i x_i \quad (36)$$

où y est la réponse, β_0 est la constante, β_i est le coefficient linéaire et x_i est le niveau de facteur codé.

Plusieurs études rapportent des méthodes statistiques de conception expérimentale qui impliquent tout d'abord d'identifier les paramètres d'influence par la méthode de criblage de Plackett-Burman, puis d'approfondir l'interaction entre les paramètres et d'identifier ainsi les valeurs optimales permettant d'obtenir la vitesse ou le rendement maximum de production d'hydrogène par la méthode de Box-Behnken. Le tableau 2 résume certaines études utilisant la méthodologie de surface de réponse pour étudier les effets de divers facteurs sur le processus de production d'hydrogène par fermentation.

Tableau 2 : Application de plans d'expériences pour l'optimisation de la production d'hydrogène par fermentation

Substrat	Inoculum bactérien	Facteurs étudiés	Réponse	Méthode d'optimisation	Référence
Glucose	<i>E. coli</i> <i>DJT135</i>	- Concentration initiale en substrat - Température - pH	Rendement H ₂	Box–Behnken	Ghosh and Hallenbeck (2010) [144]
Déchets de jatropha déshuilés	Boues anaérobies prétraitées thermiquement	- Concentration initiale en substrat - Température - pH	H ₂ produit total	Design des points centraux	Kumar <i>et al.</i> (2015) [148]
Déchets alimentaires	Boues anaérobies prétraitées thermiquement	- Température - pH	-Rendement H ₂ - Vitesse de production H ₂	Design des points centraux	Ismail <i>et al.</i> (2009) [149]
Déchets de pommes de terre	Boues anaérobies prétraitées thermiquement	- Concentration initiale de substrat - Température - pH	Rendement H ₂	Box–Behnken	Sekoai <i>et al.</i> (2016) [150]
Bagasse de canne hydrolysée	Boues prétraitées thermiquement	- Concentration initiale de substrat - Concentration initiale de l' <i>inoculum</i>	H ₂ produit total	Design des points centraux	Sangyoka <i>et al.</i> (2016) [151]
Déchets de feuilles de canne à sucre	Boues anaérobies	- Concentration initiale de substrat - Concentration initiale de l' <i>inoculum</i>	Rendement H ₂	Box–Behnken	Moondley <i>et al.</i> (2017) [152]
Xylose	<i>Enterobacter</i> <i>sp.</i> CN1	- Concentration initiale de substrat - Concentration de FeSO ₄ - Concentration de peptone	Rendement H ₂	Plackett-Burman	Long <i>et al.</i> (2010) [153]
Glucose	<i>Caloranaerobacter</i> <i>azorensis</i> H53214	- Concentration initiale de substrat - Température - pH - Concentration de NaCl - Concentration de Fe ²⁺ - Concentration de Mg ²⁺	Rendement H ₂	Plackett-Burman	Jiang <i>et al.</i> (2014) [154]
Glucose	<i>Clostridium</i> <i>sp.</i> Fanp2	- Concentration de 7 nutriments - pH	Rendement H ₂	Plackett-Burman	Pan <i>et al.</i> (2008) [155]

En réalité, un grand nombre de facteurs peuvent influencer le processus, mais cela ne signifie pas que tous les facteurs aient un effet important sur celui-ci. De façon logique, les facteurs qui impactent significativement le processus peuvent faire l'objet d'une plus grande attention que

ceux qui influent peu, car ils sont essentiels au bon déroulement du processus. L'utilisation de plans d'expériences seuls, comme Box-Behnken, n'est pas toujours réalisables en raison de la nécessité d'un grand nombre d'expériences afin de prédire avec précision la réponse. Ainsi, la première étape pour optimiser un processus consiste à identifier les facteurs qui ont des effets significatifs sur le processus. Pour cela, un modèle polynomial de premier ordre est généralement utilisé pour décrire les effets de divers facteurs sur celui-ci. Dans la littérature, les facteurs clés étudiés sont principalement la concentration initiale en substrat, le pH, la température et la concentration des additifs au milieu réactionnel.

La plupart des études traitant de la modélisation de la production d'hydrogène concernent principalement des substrats simples, pouvant être considérés comme modèles, tels que le glucose, le xylose ou le saccharose. Il existe relativement peu d'informations sur la modélisation de la production d'hydrogène dans des processus fermentaires endogènes à la biomasse, les études antérieures envisagent systématiquement l'ajout d'un *inoculum* bactérien exogène. De même, l'impact des prétraitements sur des biomasses plus complexes comme les déchets végétaux ou issus de procédés industriels agroalimentaires est peu étudié.

Objectifs de la thèse

Les principaux objectifs des études menées dans cette thèse sont centrés sur trois différentes approches de modélisation du processus de fermentation pour la production d'hydrogène :

Un modèle mathématique de type boîte blanche basé sur les modèles de cinétique classiques sera modifié par l'ajout de termes mathématiques rendant compte des spécificités de la production d'hydrogène par voie fermentaire. Il permettra de répondre à l'existence d'un optimum en termes de teneur en substrat modèle sur la croissance de la biomasse bactérienne (cultures mixtes) et la production d'hydrogène en réacteur semi-batch.

Un modèle de type boîte blanche, utilisant les cinétiques de réaction du métabolisme bactérien, sera développé sur la base des voies empruntées par les bactéries dans le but de comprendre leurs fonctions et leurs interactions. L'objectif de cette partie sera d'améliorer de fermentation d'une biomasse complexe en réacteur semi-batch pour la production d'hydrogène en jouant sur la charge du bioréacteur.

Un modèle de type boîte noire sera appliqué pour optimiser les facteurs critiques affectant la production d'hydrogène par fermentation d'une biomasse originale en utilisant le plan d'expériences Plackett-Burman. L'objectif sera d'appliquer ce modèle à une fermentation endogène à la biomasse et de proposer une optimisation des différents paramètres nécessaires pour atteindre une production d'hydrogène maximale.

Dans un objectif d'amélioration de la production d'hydrogène par fermentation obscure, multiplier les essais expérimentaux présente en effet des limites alors que la modélisation, conjuguée à ces études, permet d'apporter une compréhension des processus par des modèles mathématiques et d'optimisation du procédé par une approche plus rapide et moins coûteuse. La difficulté réside, pour chaque système biologique, dans la multiplicité des modèles représentatifs ; le choix du modèle dépendant de l'objectif de la modélisation. Ainsi, la première étape de la modélisation consiste à définir l'objectif du modèle à construire. Ce travail de thèse est partagé en trois volets avec des approches différentes et adaptées au questionnement scientifique.

Ainsi, dans le chapitre 3, l'objectif principal est d'étudier l'influence de la concentration initiale en substrat modèle sur le système biologique développé. Ce système se base sur la production d'hydrogène par fermentation du glucose dans un réacteur semi-batch en utilisant un *inoculum* bactérien extrait de boues de station d'épuration de Strasbourg et avec une extraction des gaz du bioréacteur par balayage à l'azote. Des modèles mathématiques de type boîte blanche basés sur les cinétiques de Monnot, Contois et Aiba seront développés pour étudier la performance des bactéries à différentes concentrations en substrat, ainsi que l'interaction entre les différents métabolites et l'effet de pH sur la production d'hydrogène. Une étude de plusieurs modèles de

cinétique sera effectuée dans le but d'extraire les paramètres cinétiques qui nous permettent de comprendre le processus fermentaire et optimiser le rendement en hydrogène.

Le chapitre 4 présentera une étude de modélisation sur une biomasse viticole à double fonction, c'est-à-dire à la fois substrat et culture mixte, donnant lieu à une fermentation endogène. Tout d'abord, plusieurs schémas des voies de dégradation des substrats trouvés dans la biomasse seront testés, par des modèles de cinétique de multiples réactions pour identifier l'interaction entre les bactéries de genres divers. Puis, une optimisation du procédé sera réalisée en testant différentes charges de cette biomasse. Enfin, une étude sur les cinétiques des bactéries et les voies empruntées par chaque microorganisme sera présentée en se basant sur le modèle mathématique. Le calibrage de ce modèle sera effectué sur la base des résultats expérimentaux.

Le chapitre 5 sera consacré au test du potentiel de production d'hydrogène par fermentation endogène d'une biomasse caféicole ainsi qu'à une optimisation paramétrique au moyen d'un modèle de type boîte noire. Plusieurs facteurs comme le prétraitement enzymatique, le prétraitement thermique, prétraitement avec un acide et une base, la régulation du pH, la vitesse d'agitation et le débit de gaz de balayage (N_2) seront testés sur cette biomasse pour optimiser la production d'hydrogène en utilisant le plan d'expériences Plackett-Burman.

Bibliographie

- [1] C. Acar, I. Dincer, Review and Evaluation of Hydrogen Production Options for Better Environment, *J. Clean. Prod.* (2019) 835-849
- [2] G. Yang, J.L. Wang, Co-fermentation of sewage sludge with ryegrass for enhancing hydrogen production: performance evaluation and kinetic analysis, *Bioresour. Technol.*, 243 (2017) 1027-1036
- [3] M. Momirlan, T. Veziroglu, The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet, *Int. J. Hydrog. Energy*, 30 (2005) 795-802
- [4] Y. Wang, K.S. Chen, J. Mishler, S.C. Cho, X.C. Adroher, A review of polymer electrolyte membrane fuel cells: Technology, applications, and needs on fundamental research, *Appl. Energ.*, 88 (2011) 981-1007
- [5] P. Kuntke, M. Rodríguez Arredondo, L. Widyakristi, A. ter Heijne, T.H. Sleutels, H.V. Hamelers, C.J. Buisman Hydrogen gas recycling for energy efficient ammonia recovery in electrochemical systems, *Environ. Sci. Technol.*, 51 (5) (2017) 3110-3116
- [6] J.G. Speight, Hydrogen in Refineries, *Hydrogen Science and Engineering: Materials, Processes, Systems and Technology* (2016) 1-18
- [7] I. Dincer, C. Acar, Innovation in hydrogen production, *Int. J. Hydrog. Energy*, 42 (22) (2017) 14843-14864
- [8] A.P. Simpsona, A.E. Lutz, Exergy analysis of hydrogen production via steam methane reforming, *Int. J. Hydrog. Energy*, 32 (18) (2017) 4811-4820
- [9] S.E. Hosseini, M.A. Wahid, Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 57 (2016) 850-866
- [10] K. Damen, M. Troost, A. Faaij, W. Turkenburg, A comparison of electricity and hydrogen production systems with CO₂ capture and storage. Part A: Review and selection of promising conversion and capture technologies, *Prog Energy Combustion Science*, 32 (2006) 215-246
- [11] S.L. Seigoa, S. Dohleab, M. Siegrist, Public perception of carbon capture and storage (CCS): A review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 38 (2014) 848-863
- [12] M.G. Klett, J.S. White, R.L. Schof, T.L. Buchanan, Hydrogen production facilities: plant performance and cost comparisons, final report, prepared for the national energy technology laboratory, US DOE. Reading: Parsons Infrastructure and Technology Group, Inc; 2002
- [13] K. Zeng, D. Zhang, Recent progress in alkaline water electrolysis for hydrogen production and applications, *Prog. Energy. Combust. Sci.*, 36 (2010) 307-326
- [14] M. Rashid, K. Al Mesfer, H. Naseem, M. Danish, Hydrogen Production by Water Electrolysis: A Review of Alkaline Water Electrolysis, PEM Water Electrolysis and High Temperature Water Electrolysis, *International Journal of Engineering and Advanced Technology*, 4 (2015) 80-93
- [15] S. Baykara, Experimental solar water thermolysis, *Int. J. Hydrog. Energy*, 29 (2004) 1459-1469
- [16] J. Akikusa, S.U.M. Khan, Photo electrolysis of water to hydrogen in p-SiC/Pt and p-SiC/n-TiO₂ cells, *Int. J. Hydrog. Energy*, 27 (9) (2002) 863-870
- [17] P. Nikolaidis, A. Poullikkas, A comparative overview of hydrogen production processes, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 67 (2017) 597-611

- [18] M.F. Orhan, I. Dincer, M.A. Rosen, Energy and exergy assessments of the hydrogen production step of a copper-chlorine thermochemical water splitting cycle driven by nuclear-based heat, *Int. J. Hydrog. Energy*, 33 (22) (2008) 6456-6466
- [19] A. Demirbaş, Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals, *Energy. Convers. Manag.*, 42 (11) (2001) 1357-1378
- [20] H. Balat, E. Kirtay, Hydrogen from biomass: present scenario and future prospects, *Int. J. Hydrog. Energy*, 35 (14) (2010) 7416-7426
- [21] C.A. García, R. Betancourt, C.A. Cardona, Stand-alone and biorefinery pathways to produce hydrogen through gasification and dark fermentation using *Pinus patula*, *J. Environ. Manag.*, 203 (2015) 695-703
- [22] R. Łukajtis, I. Hołowacz, K. Kucharska, M. Glinkaa, P. Rybarczy, A. Przyjazny, M. Kamiński, Hydrogen production from biomass using dark fermentation, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 91 (2018) 665-694
- [23] M. Ni, D.Y.C. Leung, M.K.H. Leung, K. Sumathy. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*, 87(5) 2006 461-72
- [24] W. Khetkorn, P. Rastogi, A. Incharoensakdi, P. Lindblad, D. Madamwar, A. Pandey, C. Larroche, Microalgal hydrogen production – A review, *Bioresource Technol.*, 243 (2017) 1194-1206
- [25] M. Winkler, A. Hemschemeier, C. Gotor, A. Melis, T. Happe, [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation, *Int. J. Hydrog. Energy*, 27 (2002) 1431-1439
- [26] A. Sharma, S.K. Arya, Hydrogen from algal biomass: A review of production process, *Biotechnology Reports*, 15 (2017) 63-69
- [27] N. Basak, D. Das, The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art, *World J Microbiol Biotechnol*, 23 (2007) 31-42
- [28] J.R. Bolton, Solar photo production of hydrogen, *Sol. Energy*, 57 (1996) 37-50
- [29] I.K. Kapdan, F. Kargi, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzym. Microb. Technol.*, 38 (5) (2006) 569-582
- [30] D.B. Levin, L. Pitt, M. Love, Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application, *Int. J. Hydrog. Energy*, 29 (2004) 173-185
- [31] H. Argun, F. Kargi, Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview, *Int. J. Hydrog. Energy*, 36 (13) (2011) 7443-7459
- [32] D. Das, T. Veziroglu, Advances in biological hydrogen production processes, *Int. J. Hydrog. Energy*, 33(2008) 6046-6057
- [33] S. Manish, R. Banerjee, Comparison of biohydrogen production processes, *Int. J. Hydrog. Energy*, 33 (1) (2008) 279-286
- [34] A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, N.L. Lens, G. Esposito, A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products, *Applied Energy*, 144 (2015) 73-95
- [35] N.M.C. Saady, Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge, *Int. J. Hydrog. Energy*, 38 (2013) 13172-13191
- [36] M.W.W. Adams, L.E. Mortenson, J.S. Chen, Hydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, 594 (1980), 105-176

- [37] D.J. Lee, K.Y. Show, A. Su, Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture, *Bioresource Technol.*, 102 (2011) 8393-8402
- [38] P.C. Hallenbeck, Fundamentals of the fermentative production of hydrogen, *Water. Sci. Techno.*, 52 (2005) 21-29
- [39] H.S. Lee, W.F.J. Vermaas, B.E. Rittmann, Biological hydrogen production: prospects and challenges, *Trends Biotechnol.*, 28 (2010) 262-271
- [40] C. Schröder, M. Selig, P. Schönheit, Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyper-thermophilic eubacterium *Thermotoga-maritima* - Involvement of the Embden–Meyerhof pathway, *Arch. Microbiol.*, 161 (1994) 460-470
- [41] T. Kanai, H. Imanaka, A. Nakajima, K. Uwamori, Y. Omori, T. Fukui, H. Atomi, T. Imanaka Continuous hydrogen production by the hyper-thermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, *J. Biotechnol.*, 116 (2005) 271-282
- [42] M. Rehberg, J.B. Ritter, U. Reichl, Glycolysis is governed by growth regime and simple enzyme regulation in adherent MDCK cells, *PLoS Comput Biol.*, 10(2014)10-16
- [43] P. Jouhten, E. Rintala, A. Huuskonen, A. Tamminen, M. Toivari, M. Wiebe, L. Ruohonen, M. Penttilä, H. Maaheimo, Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bmc. Syst. Biol.* (2008) 2-60
- [44] E. Latrille, E. Trably, C. Larroche, Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre, *Techniques de l'Ingénieur* 2011
- [45] S. Khanal, W.H. Chen, L. Li, S. Sung, Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *Int J Hydrog. Energy*, 29(2003) 1123-1131
- [46] P. Hallenbeck, M. Abo-Hashesh, D. Ghosh, Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technol.*, 110 (2012) 1-9
- [47] C. Xu, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Guo, H. Xu, J. Xu, Long chain alcohol and succinic acid co-production process based on full utilization of lignocellulosic materials, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14 (2018) 1-9
- [48] J. Turner, Renewable hydrogen production, *Int. J Energ. Res.*, 32 (2008) 379-407
- [49] M. Ciani, F. Conitini, I. Mannazzu, *Encyclopedia of ecology: Ecological Processes (Fermentation)* 1, (2008), Amsterdam, Elsevier Science 1548-1557
- [50] L. Luo, G. Kaur, J.W.C. Wong, A mini-review on the metabolic pathways of food waste two-phase anaerobic digestion system, *Waste Manage. Res*, 37 (4) (2019) 333-346
- [51] L. Häggström, Kinetics of product formation in batch and continuous culture of *Clostridium barkeri*, *Appl. Microbiol. Biot.*, 23 (1986) 187-190
- [52] G. Caspritz, F. Radler, Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*, *J. Biol. Chem.*, 258 (25) (1983) 4907-4910
- [53] F. Radler, Problematik des Bakteriellen Saireabbaus, *WEINBERG KELLER*, 19 (1972) 357-370
- [54] G. Yang, J. Wang, Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review, *Renew Sust Energ Rev*, 95 (2018) 130-146
- [55] F.R. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D.L. Hawkes, Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress, *Int J Hydrog. Energy*, 32 (2007) 172-84

- [56] L. Cabrol, A. Marone, E. Tapia-Venegas, J.P. Steyer, G. Ruiz-Filippi, E. Trably, Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function, *FEMS Microbiol Rev*, 41(2017) 158-181
- [57] E. Tapia-Venegas, L. Cabrol, B. Brandhoff, Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production, *Appl Microbiol Biot*, 99 (2015) 8295-308
- [58] C.D. Boiangiu, E. Jayamania, D. Brügelet, Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 10 (2005) 105-19
- [59] N. Azbar, D.B. Levin, State of the Art and Progress in Production of Biohydrogen, Dubai, United Arab Emirates: Bentham eBooks (2012) 275
- [60] R. Nandi, S. Sengupta, Microbial production of hydrogen: an overview, *Crit Rev Microbiol*, 24 (1998) 61-84
- [61] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee, Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrog. Energ.*, 41 (2016) 6713-6733
- [62] I. Valdez-Vazquez, H.M. Poggi-Varaldo, Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 13 (2009) 1000-1013
- [63] M.A. Khan, H.H. Ngo, W. Guo, Y. Liu, X. Zhang, J. Guo, S.W. Chang, D.D. Nguyen, J. Wang, Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy, *Renew. Energ.*, 129 (2018) 754-76
- [64] S.W.V. Ginkel, B. Logan, Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Res*, 39 (2005) 3819-26
- [65] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee, M.A. Hassan, Effects of pretreatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review, *J Environ Manage*, 157 (2015) 20-48
- [66] K.J. Wu, J.S. Chang. Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix, *Process Biochem*, 42 (2007) 279–84
- [67] D. Xing, N. Ren, A. Wang, Q. Li, Y. Feng, F. Ma, Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition, *Int J Hydrog. Energy*, 33 (2008) 1489-1495
- [68] V. Clion, C. Dumas, S. Collin, B. Ernst, Key factors for biohydrogen production by dark fermentation, *The Can. J. Chem. Eng.*, 93 (2) (2015) 309-316
- [69] X.Y. Cao, Y.C. Zhao, The influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation, *J Mater Cycles Waste Manag*, 11(2009) 244-250
- [70] L. Guo, X.M. Li, X. Bo, Q. Yang, G.M. Zeng, D. Xiang Liao, Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge, *Bioresour Technol*, 99 (2008) 3651-3658
- [71] F.M.S. Silva, L.B. Oliveira, C.F. Mahler, J.P. Bassin, Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions, *Int J Hydrog. Energy*, 42 (2017) 22720-22729
- [72] A.A.N. Gunny, D. Arbain, Ionic liquids: Green solvent for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Adv. Mater. Res.*, 701 (2013) 399-402

- [73] S.R. Chaganti, D.H. Kim, J.A. Lalma, Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield, *Renew. Energy*, 48 (2012) 117-121
- [74] P. Mohammadi, S. Ibrahim, M.S.M. Annuar, Comparative study on the effect of various pretreatment methods on the enrichment of hydrogen producing bacteria in anaerobic granulated sludge from brewery wastewater, *Korean J. Chem. Eng.*, 29 (10) (2012) 1347-1351
- [75] T. Assawamongkholisiri, A. Reungsang, S. Pattra, Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures, *Int. J. Hydrog. Energy*, 38 (2013) 6146-6153
- [76] S.M. Laghari, M.H. Isa, A. bin Abdullah, A.J. Laghari, H. Saleem, Microwave individual and combined pre-treatments on lignocellulosic biomasses, *IOSR J. Eng.*, 4 (2014), pp. 14-28
- [77] N. Srivastava, M. Srivastava, D. Kushwaha, V.K. Gupta, A. Manikanta, P.W. Ramteke, P.K. Mishra. Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw, *Bioresour Technol*, 238 (2017) 552-558
- [78] M. Quéméneur, M. Bittel, E. Trably, C. Dumas, L. Fourage, G. Ravot, J.P. Steyer, H. Carrère, Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw, *Int J Hydrog. Energy*, 37 (2012) 10639–10647
- [79] B. Ruggeri, T. Tommasi, S. Sanfilippo, Pretreatment to increase Hydrogen Producing Bacteria (HPB) : BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion: From Research to Full Scale Applications, *Green Energy and Technology*, Springer, London (2015) 25-36
- [80] D.B. Levin, R. Islam, N. Cicek, R. Sparling, Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates, *Int J Hydrog. Energy*, 31 (2006) 1496-1503
- [81] D. Evvyernie, S. Yamazaki, K. Morimoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium, *J Biosci Bioeng*, 89 (6) (2000) 596-601
- [82] J. Wang, W. Wan, Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *Int J Hydrog. Energy*, 34(2009) 799-811
- [83] N. Ren, G. Cao, A. Wang, D.J. Lee, W. Guo, Y. Zhu, Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermanoaccharolyticum* W16, *Int J Hydrog. Energy*, 33 (2008) 6124-6132
- [84] K. Kampmann, S. Ratering, R. Baumann, M. Schmidt, W. Zerr, S. Schnell, Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates, *Syst Appl Microbiol*, 35 (2012) 404-413
- [85] N. Mirzoyan, H.J. Schreier, Effect of sulfide on growth of marine bacteria, *Arch Microbiol*, 196 (2014) 279-287
- [86] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee, Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review, *Int J Hydrog. Energy*, 41 (2016) 6713-6733
- [87] Y.Y. Wang, P. Ai, C.X. Hu, Y.L. Zhang, Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose, *Int. J. Hydrog. Energy*, 36 (2011) 390-396

- [88] L. Ding, J. Cheng, D. Qiao, L. Yue, Y. Li, J. Zhou, K. Cen, Investigating hydrothermal pretreatment of food waste for two-stage fermentative hydrogen and methane coproduction, *Bioresour Technol*, 241(2017) 491-499
- [89] J. Wang, Y. Yin, Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 92 (2018) 284-306
- [90] T. Jarunglumlert, C. Prommuak, N. Putmai, P. Pavasant, Scaling-up bio-hydrogen production from food waste: Feasibilities and challenges, *Int J Hydrog. Energy*, 43 (2018) 634-648
- [91] G.D. Gioannis, M. Friargiu, E. Massi, A. Muntoni, A. Poletti, R. Pomi, D. Spiga, Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: influence of pH. *Int J Hydrog. Energy*, 39 (2014) 20930-20941
- [92] G. Kumar, G. Zhen, T. Kobayashi, P. Sivagurunathan, S.H. Kim, K.Q. Xu, Impact of pH control and heat pre-treatment of seed inoculum in dark H₂ fermentation: a feasibility report using mixed microalgae biomass as feedstock, *Int J Hydrog. Energy*, 41 (2016) 4382-4392
- [93] G. Luo, D. Karakashev, L. Xie, Q. Zhou, I. Angelidaki, Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.*, 108 (2011) 1816-1827
- [94] A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products, *Appl Energy*, 144 (2015) 73-95
- [95] S. Esquivel-Elizondo, I. Chairez, E. Salgado, J.S. Aranda, G. Baquerizo, E.I. Garcia-Pena, Controlled continuous bio-hydrogen production using different biogas release strategies, *Appl Biochem Biotechnol*, 173 (2014) 1737-1751
- [96] J.R. Bastidas-Oyanedel, Z. Mohd-Zaki, R.J. Zeng, N. Bernet, S. Pratt, J.-P. Steyer, Gas controlled hydrogen fermentation, *Bioresour. Technol.*, 110 (2012) 503-509
- [97] Z. Qiao, Z. Wang, S. Yuan, J. Wang, S. Wang, Preparation and characterization of small molecular amine modified PVAm membranes for CO₂/H₂ separation, *J. Membr. Sci.*, 475 (2015) 290-302
- [98] K. Willquist, E.W.J. van Niel, Growth and hydrogen production characteristics of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on chemically-defined minimal media, *Int J Hydrog. Energy*, 37(6) (2012) 4925-4929
- [99] C. Boileau, R. Auria, S. Davidson, L. Casalot, P. Christen, P-P. Liebgott, Y. Combet-Blanc, Hydrogen production by the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* part I: effects of sulfured nutrients, with thiosulfate as model, on hydrogen production and growth, *Biotechnology for Biofuels*, 9 (269) (2016) 1-13
- [100] G.L. Cao, L. Zhao, A.J. Wang, Z.Y. Wang, N.Q. Ren, Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria, *Biotechnol. Biofuels*, 7 (82) (2014) 1-13
- [101] C. Arslan, A. Sattar, J. Changying, A. Nasir, I.A. Mari, F. Huimin, Comparing the effect of total solids concentration on bio-hydrogen production potential of food waste and its derivatives under mesophilic thermophilic conditions, *Pak. J. Agr. Sci.*, 53 (2016) 687-694
- [102] E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H.-S. Lee, A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation, *Renew Sust Energ Rev*, 79 (2017) 656-668

- [103] J.L. Wang, W. Wan, Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures, *Int J Hydrog. Energy*, 33 (2008) 5392-5397
- [104] F. Pascal, Modélisation de bioprocédés dans le cadre d'un simulateur de procédés chimique. Application à la simulation statique et dynamique d'un atelier industriel de fermentation alcoolique, Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 1992.
- [105] J.A. Roubos, P. Krabben, M. Setnes, R. Babuska, J.J. Heijnen, H. B. Verbruggen, Hybrid model development for fed-batch bioprocesses; combining physical equations with the metabolic network and black-box kinetics, 6th UK Workshop on Fuzzy systems, Recent advances of fuzzy systems, nunal fuzzy, fuzzy genetic and soft computing systems, Brunel University, Uxbridge, September 8-9, (1999) 231-239.
- [106] K. Kucharska, I. Hołowacz, D. Konopacka-Łyskawa, P. Rybarczyk, M. Kamiński, Key issues in modeling and optimization of lignocellulosic biomass fermentative conversion to gaseous biofuels, *Renew Energ*, 129 (2018) 384-394
- [107] J. Lauwers, L. Appels, I.P. Thompson, J. Degève, J.F. Van Impe, R. Dewil, Mathematical modelling of anaerobic digestion of biomass and waste: Power and limitations, *Prog. Energy Combust.*, 39 (2013) 383-402
- [108] M. Lübken, T. Gehring, M. Wichern, Microbiological fermentation of lignocellulosic biomass: current state and prospects of mathematical modeling, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5 (2010) 1643-1652
- [109] J. Monod, The Growth of Bacterial Cultures », *Annual Review of Microbiology*, 3 (1949) 371-394
- [110] J.B.S. Haldane, *Enzymes* (Longmans, Green, New York, 1930 and MIT Press, Cambridge, MA, 1965)
- [111] J.F. Andrews, A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, 10 (1968) 707-723
- [112] D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin, The IWA anaerobic digestion model no 1 (ADM1), *Water Sci. Technol.*, 45 (2002) 65-73
- [113] M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts, K. van't Riet, Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (1990) 1875-1881.
- [114] H. Fujikawa, A. Kai, S. Morozumi, A new logistic model for bacterial growth, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 44 (2003) 155-160
- [115] K.M. Desai, S.A. Survase, P.S. Saudagar, S.S. Lele, R.S. Singhal, Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan, *Biochem Eng J.*, 41 (2008) 266-273
- [116] A.M. Buswell, H.F. Müller, Mechanism of methane fermentation, *Ind. Eng. Chem*, 44 (3) (1952) 550-552
- [117] W.C. Boyle, Energy recovery from sanitary landfills – a review, *Microbial Energy Conversion*, Oxford, Pergamon Press, 1976
- [118] R.L. Plackett, J.P. Burman, The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, 33 (1946) 305-325

- [119] B.R.H. Peiris, P.G. Rathnashri, J.E. Johansen, A. Kuhn, R. Bakke, ADM1 simulations of hydrogen production, *Water. Sci. Technol.*, 53 (2006) 29–37
- [120] B.K.V. Penumathsa, G.C. Premier, G. Kyazze, R. Dinsdale, A.J. Guwy, S. Esteves, J. Rodriguez, ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach, *Water Res.*, 42 (2008) 4379-4385
- [121] J. Rodríguez, R. Kleerebezem, J.M. Lema, M.C.M. van Loosdrecht, Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 93 (2006) 592-606.
- [122] I. Ntaikou, H.N. Gavala, G. Lyberatos, Application of a modified Anaerobic Digestion Model 1 version for fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract by *Ruminococcus albus*, *Int. J. Hydrog. Energy*, 35 (8) (2010) 3423-3432
- [123] G. Antonopoulou, H.N. Gavala, I.V. Skiadas, G. Lyberatos, Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1, *Int. J. Hydrog. Energy*, 37 (2012) 191-208
- [124] V. Gadhamshetty, Y. Arudchelvam, N. Nirmalakhandan, D.C. Johnson, Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model, *Int. J. Hydrog. Energy*, 35 (2010) 479-490
- [125] N. Pradhan, L. Dipasquale, G. D'Ippolito, A. Fontana, A. Panico, P.N.L. Lens, F. Pirozzi, G. Esposito, Kinetic modeling of fermentative hydrogen production by *Thermotoga neapolitana*, *Int. J. Hydrog. Energy*, 41 (2016) 4931-4940
- [126] M. Alexandropoulou, G. Antonopoulou, G. Lyberatos, A novel approach of modeling continuous dark hydrogen fermentation, *Bioresource Technol.*, 250 (2018) 784-792
- [127] D. Montecchio, Y. Yuan, F. Malpei, Hydrogen production dynamic during cheese whey Dark Fermentation: New insights from modelization, *Int. J. Hydrog. Energy*, 43 (2018) 17588-17601
- [128] J. Valentín-Reyes, R.B. García-Reyes, A. García-González, L.H. Álvarez-Valencia, P. Rivas-García, F.J. Cerino-Córdova, Mathematical modelling for biohydrogen production by *Clostridium beijerinckii*, *Int. J. Hydrog. Energy*, 43 (2018) 17602-17610
- [129] I. Ntaikou, H.N. Gavala, G. Lyberatos, Modeling of fermentative hydrogen production from the bacterium *Ruminococcus albus*: Definition of metabolism and kinetics during growth on glucose, *Int. J. Hydrog. Energy*, 34 (2009) 3697-3709
- [130] R. Singh, R. Tevatia, D. White, Y. Demirel, P. Blum, Comparative kinetic modeling of growth and molecular hydrogen overproduction by engineered strains of *Thermotoga maritima*, *Int. J. Hydrog. Energy*, 44 (14) (2019) 7125-7136
- [131] M.R. Boni, S. Scaffoni, L. Tuccinardi, P. Viotti, Development and calibration of a model for biohydrogen production from organic waste, *Waste Management*, 33 (2013) 1128-1135
- [132] J. Björkmalm, E. Byrne, E.W.J. van Niel, K. Willquist, A non-linear model of hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* for diauxic-like consumption of lignocellulosic sugar mixtures, *Biotechnology for Biofuel*, 11 (175) (2018) 1-15
- [133] J. Wang, W. Wan, The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models, *Sci China Ser B*, 51(2008) 1110-1117

- [134] C. Akobi, H. Hafez, G. Nakhla, Impact of furfural on biological hydrogen production kinetics from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic and thermophilic mixed cultures, *Int. J. Hydrog. Energy*, 42 (2017) 12159-12172
- [135] G. Kumar, B. Sen, P. Sivagurunathan, C.Y. Lin, Comparative evaluation of hydrogen fermentation of de-oiled Jatropha waste hydrolyzates, *Int. J. Hydrog. Energy*, 40 (2015) 10766-10774
- [136] Y. Yin, J. Wang, Fermentative hydrogen production from waste sludge solubilized by low-pressure wet oxidation treatment, *Energy Fuel*, 30 (2016) 5878-5884
- [137] S. Eker, M. Sarp, Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: effects of initial substrate and biomass concentrations, *Int. J. Hydrog. Energy*, 42 (2017) 2562-2568
- [138] C. Gou, J. Guo, J. Lian, Y. Guo, Z. Jiang, L. Yue, J. Yang, Characteristics and kinetics of biohydrogen production with Ni²⁺ using hydrogen-producing bacteria, *Int. J. Hydrog. Energy*, 40 (2015) 161-167
- [139] M. Cui, Z. Yuan, X. Zhi, L. Wei, J. Shen, Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria, *Int. J. Hydrog. Energy*, 35 (2010) 4041-4047
- [140] P.S. Chong, J.M. Jahim, S. Harun, S.S. Lim, S.A. Mutalib, O. Hassan, M.T.M. Nor, Enhancement of batch biohydrogen production from prehydrolysate of acid treated oil palm empty fruit bunch, *Int. J. Hydrog. Energy*, 38 (2013) 9592-9599
- [141] M. Anderson, P. Whitcomb, Design of experiments: statistical principles of research design and analysis, *Technometrics*, 43 (2) (2001) 236–237
- [142] J. Wang, Y. Yin, Optimization of Hydrogen Production Process, in *Biohydrogen Production from Organic Wastes*, Singapore: Springer Singapore, 1 (2017) 291-337
- [143] I. Z. Boboescu, V. D. Gherman, M. Ilie, I. Mirel, T. Vintilă, G. Maróti, Exploitation of experimental design methods and mathematical modeling for improving fermentative biohydrogen production processes, *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (2) (2014) 9097-9109
- [144] D. Ghosh, P.C. Hallenbeck, Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135, *Bioresour. Technol.*, 101 (2010) 1820–1825
- [145] G. Box, K. Wilson, On the experimental attainment of optimum conditions, *J Roy Stat Soc B*, 13 (1951) 1-45
- [146] G. Box, D. Behnken, Some new three-level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2 (1960) 455–75
- [147] J. Wang, W. Wan, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *Int. J. Hydrog. Energy*, 34 (1) (2009) 235-244
- [148] G. Kumar, P. Sivagurunathan, S.-H. Kim, P. Bakonyi, C.-Y. Lin, Modeling and optimization of biohydrogen production from de-oiled jatropha using the response surface method, *Arabian J. Sci. Eng.*, 40 (2015) 15-22
- [149] F. Ismail, S. Abd-Aziz, C.M. Ling, M.A. Hassan, Statistical optimization of biohydrogen production using food waste under thermophilic conditions, *Open Renew. Energy J.*, 2 (2009) 124-131
- [150] P.T. Sekoai, Modelling and Optimization of Operational Setpoint Parameters for Maximum Fermentative Biohydrogen Production Using Box-behnken Design, *Fermentation*, 2 (2016) 15.

- [151] S. Sangyoka, A. Reungsang, C.-Y. Lin, Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method, *Sustain. Environ. Res.*, 26 (2016) 235-242
- [152] P. Moondley, E.B.G. Kana, Optimization of operational parameters for biohydrogen production from waste sugarcane leaves and semi-pilot, *Bioresources*, 12 (2017) 2015-2030
- [153] C. Long, J. Cui, Z. Liu, Y. Liu, M. Long, Z. Hu, Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1, *Int. J. Hydrog. Energy* 35 (2010) 6657-6664
- [154] L. Jiang, C. Long, X. Wu, H. Xu, Z. Shao, M. Long, Optimization of thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Caloranaerobacter azorensis* H53214 from deep-sea hydrothermal vent environment, *Int. J. Hydrog. Energy*, 39 (26) (2014) 14154-14160
- [155] C.M. Pan, Y.T. Fan, Y. Xing, H.W. Hou, M.L. Zhang, Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2, *Bioresource Technol.*, 99 (8) (2008) 3146-3154

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1- Introduction

Ce chapitre expose les moyens matériels, procédés et conditions utilisés pour réaliser des fermentations exogènes et endogènes en réacteur semi-batch, ainsi que les méthodes utilisées pour la caractérisation de la biomasse. Les méthodes analytiques mises en œuvre pour déterminer la composition du biogaz et des métabolites produits dans le milieu réactionnel sont aussi décrites dans ce chapitre, ainsi que l'établissement des concentrations en sucres et l'analyse microbienne des consortia présents dans le milieu réactionnel. Les paramètres de performance de production en hydrogène sont donnés. Enfin, la dernière partie concerne les analyses statistiques utilisées dans ce manuscrit en se basant sur les plans d'expériences, ainsi que les procédures numériques utilisées pour réaliser la partie relative à la modélisation du processus de fermentation.

2-Procédures expérimentales

2.1- Fermentation exogène

Ce type de fermentation consiste à ajouter un *inoculum* externe au substrat utilisé. Les données expérimentales en fermentation exogène, utilisées dans ce manuscrit pour la modélisation, ont été générées au laboratoire dans le cadre de la thèse de Valentin Clion [1].

2.1.1- *Inoculum* externe [1]

L'*inoculum* bactérien utilisé dans cette étude est issu des lignes de traitement de la station d'épuration (STEP) de l'Eurométropole de Strasbourg. Les *inocula* de cette STEP ont été choisis pour leur disponibilité en quantités importantes (190 000 m³ d'eau traitée par jour) à proximité du laboratoire, permettant l'utilisation de boues fraîchement prélevées pour chaque test. Le traitement des eaux usées au sein de la station d'épuration est réalisé en plusieurs étapes spécifiques, décrites sur la figure 4.

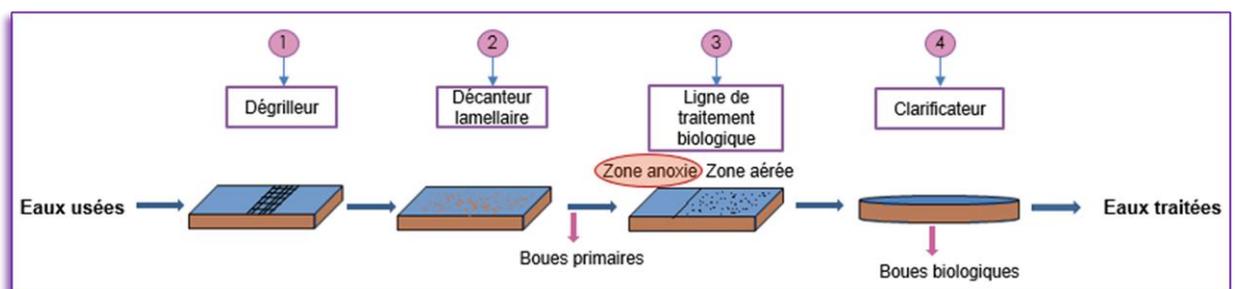


Figure 4 : Schéma simplifié du traitement des eaux usées de station d'épuration avec point de prélèvement des boues utilisées comme *inoculum*

Arrivées sur le site, les eaux usées sont dégrillées, dessablées, dégraissées et enfin mise à décantier pour en extraire les boues primaires chargées en matières en suspension (MES \approx 20 g/L)

minérales et organiques. Le surnageant des décanteurs primaires est envoyé vers les lignes de traitement biologique inoculées en continu avec des cultures mixtes prélevées en aval du traitement biologique. Des boues activés à faible charge (MES ≈ 4 g/L) provenant de la zone anoxie de la station d'épuration ont été utilisées comme *inoculum* externe lors des fermentations exogènes.

2.1.2- Substrat

L'utilisation d'un substrat modèle composé exclusivement de glucose permet une reproductibilité de l'alimentation. Lors des tests de fermentation en mode de fonctionnement semi batch, un ajout ponctuel de substrat (hexose) alimente le bioréacteur sous forme de poudre en début de fermentation.

2.2- Fermentation endogène

Dans cette partie, les fermentations sont réalisées à partir de microflores endogènes aux biomasses, c'est-à-dire sans ajout d'*inoculum* externe ; ainsi, les biomasses sont utilisées en tant que substrat, nutriments et consortium microbien. Deux types de biomasses ont été testés.

Biomasse vitivinicole : Les données expérimentales ont été produites au laboratoire dans le cadre de la thèse d'Emilie François-Lopez [2]. La biomasse 'bourbes' est issue de l'étape de décantation du moût de raisin, obtenu après pressage des grappes de raisin (figure 5). En effet, lors de cette étape de débouillage, sont séparées par gravité les particules en suspension du moût clair, qui sera ensuite fermenté. Les bourbes utilisées dans cette étude sont issues du moût de raisins de cépage Pinot Gris et proviennent du domaine Pfister à Dalhenheim, en Alsace.

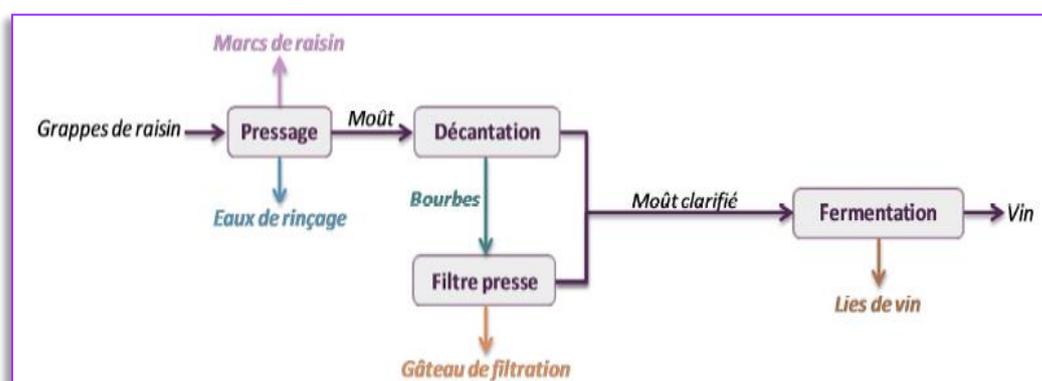


Figure 5 : Etapes de vinification en blanc avec extraction de la biomasse 'bourbes' [2]

Biomasse caféicole : Les pellicules argentées sont obtenues durant la torréfaction des grains de café (figure 6). Lors de ce processus, les grains de café subissent un gonflement dû à des dégagements gazeux, ce qui entraîne le détachement d'une fine pellicule, appelée pellicule argentée.

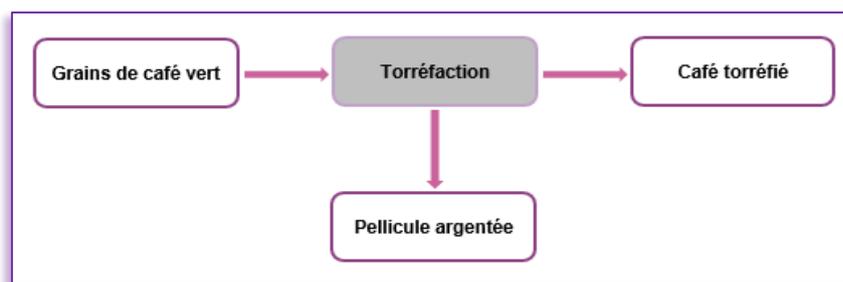


Figure 6 : Etape d'extraction de la biomasse 'pellicules argentées'

2.3- Protocoles expérimentaux

Les tests de fermentation ont été réalisés à l'obscurité dans un réacteur à double enveloppe de 1 L (Büchi AG) agité, utilisé avec un volume de 0,7 L de milieu réactionnel. Un prétraitement thermique de 1h15min à 70°C sous atmosphère d'air statique à pression atmosphérique est systématiquement appliqué aux boues de STEP pour la fermentation exogène du substrat modèle. La température de fermentation (37°C) est ensuite programmée à la fin du traitement thermique, 30 min avant le début du test de fermentation, et suivie au cours de la fermentation par une sonde de température. Le pH du mélange, prétraité thermiquement ou non, est ajusté afin d'être supérieur à 5,6 avec un régulateur de pH (HANNA Instruments BL 7916), par injection d'une solution de soude à 3M ou 1M. Un prétraitement de la biomasse caféicole par des enzymes produits au Laboratoire ProBioGEM Polytech'Lille (EA 1026) dans le cadre de la thèse de Marie Renaudie [3] a été réalisé. Un prétraitement de la biomasse à l'acide chlorhydrique (HCl, 3M) en diminuant le pH à 2 pendant 30 min à une température de 37°C a été également appliqué à la biomasse caféicole. Le pH du milieu réactionnel est ensuite ajusté jusqu'à 6 en ajoutant de la soude (NaOH, 3M) avant le début du test de fermentation. Le prétraitement de la biomasse avec une base (NaOH, 3M) a été également appliqué en augmentant le pH à 10 pendant 30 min, l'ajustement du pH du milieu (jusqu'à 6) est ensuite réalisé en ajoutant de l'acide chlorhydrique (HCl, 3M).

Pendant la phase de fermentation, un gaz inerte (azote N₂) balaye le milieu réactionnel pour extraire les gaz produits par bullage dans le réacteur via une canne. Le débit de gaz est régulé par un débitmètre massique (5850E Brooks) sur une gamme de débits allant de 25 à 50 mL/min. Le bioréacteur est placé sous agitation de 220 tr/min à 420 tr/min. Deux pièges froids (2-3°C) (Cryostat Huber TC40) sont installés en série sur la ligne de sortie des gaz du bioréacteur afin de condenser les liquides avant l'arrivée du flux de gaz vers l'analyse en ligne par micro chromatographie. Le surplus de gaz est évacué à l'évent. La représentation schématique du montage, utilisé lors de ce travail, est présentée sur la figure 7 [1, 4].

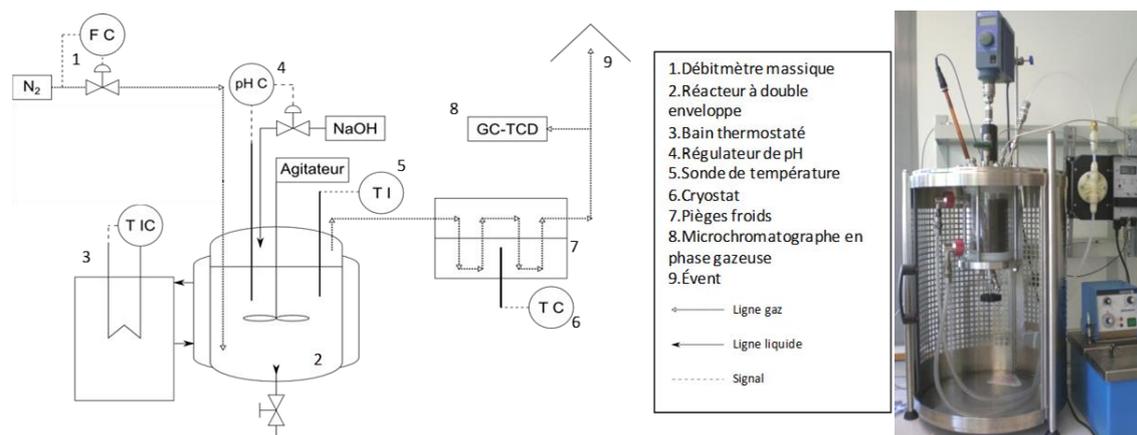


Figure 7: Configuration du bioréacteur en mode semi batch (adaptée de [1, 4])

A la suite de chaque test de fermentation, un nettoyage complet du réacteur est réalisé par broissage avec de l'eau de javel et un détergent, suivi d'un rinçage à l'éthanol (70%) des zones moins accessibles afin de limiter la formation d'un biofilm microbien sur les surfaces du dispositif.

2.4- Echantillonnage du milieu réactionnel

Lors de la fermentation, des prélèvements réguliers de 7 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- Procédures analytiques

3.1- Caractérisation de la biomasse

La caractérisation des biomasses permet de connaître les quantités de matières sèches et volatiles des échantillons, permettant par la suite de comparer le potentiel des biomasses en calculant les volumes d'hydrogène produit par rapport à ces masses.

3.1.1- 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 pesé de masse 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 :

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

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 :

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

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

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

Une masse de biomasse (m) est filtrée sous vide sur un filtre constitué de microfibrilles de verres ayant un diamètre de pores 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 de biomasse initiale (m) 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).

3.2- Analyse de la composition du biogaz

La composition du biogaz produit est analysée en ligne par un micro-chromatographe en phase gazeuse (Agilent M200/T3000 SRA Instrument) 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 de type 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 75 secondes chacune.

3.3- Analyse des métabolites de fermentation

3.3.1- Analyse des alcools

Pour analyser les alcools produits lors de la fermentation (éthanol, butanol et propanol), nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890Q GC) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). Une colonne DB-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 μ m), contenant une phase stationnaire composée de polyéthylène glycol modifié avec de l'acide nitrotéréphtalique, a été utilisée pour l'ensemble des échantillons des études expérimentales de V. Clion [1] et E. François-Lopez [2]. La procédure était la suivante : une aliquote de surnageant centrifugé est prélevée et mélangée à parts égales avec une aliquote de solution d'acide trifluoroacétique (TFA) pour un pH final inférieur à 2, car les acides organiques (acétate et butyrate) de certains tests ont été également analysés par cette méthode. Le contenu est filtré à l'aide de filtres seringues ayant un diamètre de pores de 0,2 μ m. Si nécessaire, une dilution des échantillons dans la gamme d'étalonnage est réalisée avec de l'eau ultra pure avant le mélange avec le TFA. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement, de 220°C et 250°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 0,4 mL/min et à une pression initiale de 3,6 bar. Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier les alcools présents dans les échantillons. Pour la biomasse caféicole testée dans le cadre de cette thèse, l'analyse des alcools est réalisée avec une colonne chromatographique HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm, 0,5 μ m) ; le débit d'hélium utilisé est de 0,6 mL/min.

3.3.2- Analyse des acides organiques

La chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquide Chromatography (HPLC)) a été utilisée pour analyser le milieu réactionnel liquide issu de la fermentation par quantification du citrate, tartrate, pyruvate, succinate, lactate, formiate, acétate, propionate, butyrate, isovalérate et valérate.

Pour réaliser cette analyse nous disposons :

- d'un chromatographe en phase liquide haute performance (Agilent 1260 Infinity LC) avec un détecteur ultra-violet (UV) et une colonne Hi-Plex H (300 mm x 6,5 mm, 8 μ m) composée d'une résine échangeuse de cations constituée de billes de styrène-divinylbenzène greffés de groupements d'acide sulfonique ayant un diamètre de 7 à 11 μ m,
- d'une pré-colonne PL Hi-Plex (50 mm x 7,7 mm, 8 μ m) disposée en amont de la colonne afin de protéger la colonne d'éventuels contaminants et d'augmenter sa durée de vie.

Le débit de la phase mobile composé d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 mM est de 0,4 mL/min.

Les échantillons ont été préparés et centrifugés à 15 000 tr/min pendant 15 min, puis filtrés à l'aide de filtres seringues ayant un diamètre de pores de 0,2 µm. 20 µL de l'échantillon ou du standard sont injectés dans la colonne placée à une température de 65°C. La détection des acides organiques est réalisée par spectrométrie UV à 210 nm. Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier les acides organiques présents dans les échantillons.

3.3.3- Analyse quantitative des sucres

Pour mesurer la concentration en sucres dans les échantillons la méthode colorimétrique à l'antrone (Dreywood, 1946) [5] a été utilisée suivant le protocole suivant. Une aliquote (1 mL) de surnageant mélangée avec 2 mL de solution d'antrone (2 g/L) dans H₂SO₄ concentré (95%) est placée dans des tubes à essai en verre. Les échantillons sont chauffés à 80°C pendant 20 min, puis refroidis dans de la glace et conservés à l'obscurité pendant 20 min. L'analyse des échantillons est réalisée par spectroscopie UV-visible (spectrophotomètre Varian Cary 3) avec mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 625 nm. Une courbe d'étalonnage est établie pour chaque lot d'échantillons à partir d'une gamme étalon entre 0 et 100 ppm de glucose.

Les résultats obtenus sont donnés en équivalent hexose, cette méthode permettant d'obtenir un résultat indépendant de la nature des sucres présents dans l'échantillon.

3.4- Analyse microbienne

L'analyse microbienne a été réalisée dans le cadre de la thèse d'Emilie François-Lopez (2016) [1]. Dans un premier temps, l'extraction de l'ADN présent dans les échantillons de biomasse a été réalisée en partenariat avec le laboratoire de Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie (GMGM, UMR 7156). Dans un second temps, un séquençage de l'ADN extrait (séquençage Illumina) a été réalisé par l'INRA *Transfert Environnement* de Narbonne, dans le but d'identifier les communautés bactériennes.

3.5- Modélisation de la production d'hydrogène

La production d'hydrogène cumulée ainsi que la croissance des bactéries peut être modélisée en utilisant l'équation de Gompertz modifiée. La productivité en hydrogène ou la vitesse de croissance des bactéries ainsi que le temps de latence ont été calculée à partir de l'équation suivante (Zwietering *et al.* 1990) [6] :

$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max} e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

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

4- Procédures numériques

4.1- Modélisation du procédé de fermentation

Les équations différentielles des modèles mathématiques développés dans ce manuscrit ont été résolues en utilisant les fonctions (routines) disponibles dans le logiciel Matlab R2015a (MathWorks, Inc) : une routine d'intégration variable des équations différentielles "**ode45**" et une deuxième routine "**lsqcurvefit**" pour l'estimation des paramètres des modèles obtenus après intégration lors de la première phase.

Dans la première phase, on propose des valeurs initiales arbitraires pour les paramètres des modèles pour l'intégration des équations différentielles. Dans la seconde phase, on essaie de calculer les nouvelles valeurs des paramètres qui minimisent la fonction objective F_{obj} . Ce schéma est répété jusqu'à ce que les paramètres ne varient plus.

Le programme Matlab, utilisant ces deux fonctions, a pour objectif la minimisation de F_{obj} comme suit :

$$F_{obj} = \sum_i (y_i^{exp} - y_i^{mod})^2 \quad (6)$$

y_i^{exp} et y_i^{mod} sont respectivement les valeurs des données expérimentales et celles estimées par le modèle au temps i .

4.2- Les plans d'expériences

Pour optimiser les facteurs opérationnels (prétraitements, paramètres opératoires du fonctionnement du bioréacteur) qui peuvent impacter la performance de production d'hydrogène par fermentation, des analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un plan d'expériences de type fractionnel (Plackett et Burman) [7].

Le logiciel choisi dans cette étude est le logiciel JMP®, utilisé pour l'optimisation d'un modèle polynomial proposé pour (i) calculer les réponses et déterminer la signification des facteurs étudiés, (ii) résumer les analyses de variance en prenant en compte le coefficient de corrélation R^2 et le coefficient R^2 ajusté, qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression, (iii) établir le test de Fisher, sa probabilité associée $P(F)$ et construire les surfaces de réponses.

Bibliographie

- [1] V. Clion, Production d'hydrogène par fermentation obscure : Intensification du procédé par extraction des gaz et développement d'un bioréacteur à membrane, Thèse en Chimie/Bioprocédés, Université de Strasbourg 2016.
- [2] E. François-Lopez, Production de biohydrogène par fermentation obscure : potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne, Thèse en Chimie/Bioprocédés, Université de Strasbourg 2016.
- [3] M. Renaudie, Intensification du procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure en bioréacteur membranaire : valorisation énergétique de biomasses, Thèse en Chimie/Bioprocédés, Université de Strasbourg 2019.
- [4] V. Clion, C. Dumas, S. Collin, B. Ernst. Key factors for biohydrogen production by dark fermentation, *Can. J. Chem. Eng.* 93 (2) (2015) 309-316.
- [5] R. Dreywood, Qualitative Test for Carbohydrate Material, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18 (8) (1946) 499
- [6] M. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts, T. Van, Modeling of Bacterial Growth Curve, *Appl. Environn. Microbiol.* 56 (1990) 1875-1881.
- [7] R.L. Plackett, J.P. Burman, The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, 33 (1946) 305–325.

Chapitre 3

Développement d'un modèle à boîte blanche
pour le procédé de production d'hydrogène par
fermentation exogène : effet de la teneur initiale
en substrat modèle

1- Introduction

Plusieurs études de modélisation ont été réalisées dans le domaine de la production d'hydrogène par fermentation obscure et chaque étude s'appuie sur un objectif pour lequel le modèle peut être développé. Le substrat, généralement composé de glucides pouvant fournir du carbone et sources d'énergie au consortium bactérien, revêt, en effet, une grande importance pour la croissance des bactéries et donc pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. En outre, le pH est un facteur essentiel, qui a un effet sur la performance des bactéries productrices d'hydrogène et par conséquent sur le rendement d'hydrogène produit et ce d'autant que des recherches ont prouvé que le pH du milieu variait selon la nature et la quantité du substrat ajouté au milieu réactionnel [1].

Ainsi, plusieurs études, recensées dans un article de review [2], ont étudié l'effet de la nature du substrat utilisé ainsi que sa quantité ajoutée, en prenant en compte l'impact du pH du milieu sur le consortium bactérien producteur d'hydrogène, et en utilisant des modèles mathématiques, qui peuvent fournir des informations supplémentaires, comme l'identification de la dépendance entre le substrat et la biomasse bactérienne et par conséquent, une optimisation de ce facteur.

Certaines études ont proposé des modèles cinétiques pour décrire l'effet de la concentration en substrat ; parmi eux, le modèle classique de Monod a largement été utilisé. Ainsi, Lo *et al.* (2008) [3] ont appliqué le modèle de Monod classique pour optimiser la concentration ainsi que la nature du substrat sur le rendement en hydrogène en testant plusieurs cultures pures (*Clostridium butyricum* (CGS2 et CGS5), *Clostridium pasteurianum* (CH1, CH4, CH5 et CH7) et *Klebsiella sp.*) dans un réacteur batch. De même, Zhao *et al.* (2019) [4] ont étudié l'effet du rapport de masse glucose sur xylose, sur *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* W16, en utilisant le modèle de Monod permettant une optimisation du pourcentage de chacun des substrats. Lee *et al.* (2008) [5] ont appliqué ce même modèle pour étudier l'effet de la concentration en substrat mais cette fois sur des cultures mixtes extraites à partir de boues de station d'épuration.

Cependant, lorsque le substrat inhibe le processus de production d'hydrogène par fermentation à des concentrations élevées, le modèle classique de Monod devient inopérant. Dans ce cas, d'autres modèles de cinétique, y compris les modèles de Monod modifiés [6-14] avec un élément d'inhibition lié à la concentration en substrat, sont utilisés pour décrire les effets de la concentration en substrat sur la variation de la production d'hydrogène et sur la croissance et la performance des bactéries productrices d'hydrogène. Ntaikou *et al.* (2008) [6] ont utilisé un modèle de Monod modifié incorporant des termes relatifs à l'inhibition du pH et à la vitesse de *deadline* (décroissance) des bactéries pour décrire les effets de concentrations en glucose sur le taux de la croissance de *Ruminococcus albus*, le taux de dégradation du substrat et sur le rendement en

hydrogène produit. Wang et Wei (2008) [7] ont comparé l'aptitude du modèle d'Andrews et de celui du modèle de Han-Levenspiel à décrire les effets de concentration en glucose sur le rendement de production en hydrogène et ont conclu que le modèle de Han-Levenspiel, avec un meilleur ajustement (modèle/données expérimentales), était le plus adéquat. Singh *et al.* (2019) [8] ont présenté la relation entre l'utilisation du maltose comme substrat, la performance de *Thermotoga maritima* productrice d'hydrogène et la synthèse d'acétate, en utilisant la cinétique du modèle logistique ; les paramètres cinétiques ont été utilisés ensuite pour simuler la production d'hydrogène dans un système continu. Un nouveau modèle de cinétique composé de trois termes d'inhibition, extrait à partir des cinétiques de Haldane, Aiba et Luong, a été proposé par Putra *et al.* (2018) [9] pour étudier l'influence de 3 substrats (glucose, fructose et saccharose) utilisés simultanément sur les levures *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. Zhang *et al.* (2015) [10] ont construit un modèle capable de simuler toutes les phases de croissance de *Rhodospseudomonas palustris* lors du processus de production d'hydrogène. Ils ont également comparé ce modèle avec le modèle de Contois et étudié l'effet de plusieurs paramètres, comme le pH et les concentrations ajoutées en nutriments.

Ainsi, au travers de la littérature cités ci-dessus, on comprend que de nombreuses études ont été effectuées sur la production d'hydrogène par des genres de bactéries spécifiques et en utilisant différentes cinétiques, descriptives de l'effet du substrat sur la performance de ces bactéries, permettant d'optimiser la concentration en substrat. Par contre, notons aussi que les paramètres obtenus ne sont pas applicables à d'autres genres bactériens. De plus, jusqu'à présent, peu d'études ont été réalisées pour optimiser le rendement d'hydrogène en utilisant des cultures mixtes, donnant lieu à un degré de difficulté supplémentaire lié aux différentes espèces présentes dans le consortium bactérien et induisant une baisse de la précision des résultats obtenus par le modèle. Cependant, Gadhe *et al.* (2014) [11] ont pu étudier le potentiel de production d'hydrogène en utilisant des eaux usées de laiterie comme source de carbone avec une culture bactérienne mixte, provenant de digestats d'origine alimentaire, dans un réacteur batch. Les modèles cinétiques de Monod, d'Andrews et de Michaelis-Menten, suivant l'équation logistique et l'équation modifiée de type Leudeking-Piret, se sont avérés appropriés pour analyser l'effet du substrat. Chu *et al.* (2013) [12] ont fait une étude comparative entre des modèles cinétiques d'Aiba, Haldane et Teisse pour la production d'hydrogène anaérobie à partir d'eaux usées de l'industrie alimentaire par des cultures mixtes (boues activées de STEP) ; il a été constaté que le modèle de Haldane était le meilleur modèle dans ce cas.

À ce jour, à notre connaissance, le modèle classique de Monod et ses formes modifiées n'ont pas été utilisés pour décrire les effets de concentrations en substrat sur les quantités de production des métabolites solubles dans le milieu réactionnel et produits au cours de la production d'hydrogène par fermentation. Albanez *et al.* (2016) [13] ont étudié l'influence de plusieurs

paramètres y compris le substrat sur le rendement d'hydrogène en utilisant un bioréacteur anaérobie séquentiel avec un biofilm (AnSBBR - *Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor*) en prenant en compte l'acétate et le butyrate produits. Pour comprendre les voies de production d'hydrogène ainsi que pour optimiser la concentration en substrat, ils ont utilisé le modèle de Monod. Chorukova *et al.* (2019) [14] ont proposé un modèle qui décrit la production d'hydrogène ainsi que celle du méthane dans deux réacteurs en série. Dans cette étude, le modèle de Monod est appliqué pour étudier l'effet du substrat sur le flux d'hydrogène produit ; de plus, trois autres métabolites (acétate, butyrate et propionate) ont été pris en compte.

Il est donc intéressant de pouvoir développer un modèle adapté à la production d'hydrogène par fermentation à partir de cultures mixtes en tenant en compte des interactions avec la production d'autres métabolites coproduits, consommateurs d'hydrogène ou concurrents vis-à-vis du substrat et de tester l'effet de la teneur en substrat sur la globalité du procédé.

Ainsi, ce chapitre est constitué de deux parties. Dans un premier temps, plusieurs modèles cinétiques décrivant l'effet de la concentration en substrat sur la croissance et la performance des bactéries productrices seront testés ; un calibrage et une validation du modèle seront réalisés en utilisant des données expérimentales. La deuxième partie porte sur l'application du modèle à différentes concentrations en substrat (hexose) pour étudier son effet sur le procédé de production d'hydrogène par des cultures mixtes.

2- Description des modèles biologiques

Il est nécessaire d'utiliser des modèles d'estimation pour suivre les variations du processus de fonctionnement du procédé de production d'hydrogène par fermentation. Ces modèles fournissent des mesures indirectes d'une ou plusieurs variables, à partir de variables connues et mesurées.

D'un point de vue général, la structure des modèles qui décrivent les processus biologiques dans un réacteur semi batch peut être décrite par une équation différentielle :

$$\frac{d\xi}{dt} = \beta * \mu(\xi, t) \pm f(\xi) \quad (1)$$

où ξ est la variable d'état, qui peut être la croissance des bactéries, la concentration en substrat dégradé ou la quantité de gaz ou de métabolites produits. β représente la matrice de rendement, μ est la vitesse de réaction et f décrit d'autres états de la variable ξ comme par exemple la *deadline* (mort) des bactéries. Enfin, t correspond au temps de fermentation.

2.1- Description de la croissance bactérienne

Dans les procédés de fermentation en réacteurs semi batch visant à produire de l'hydrogène, le cycle de vie des bactéries est caractérisé par différentes phases de croissance. Les cultures bactériennes passent par des phases de croissance active, puis une phase stationnaire et finalement une phase de mortalité. La variation de la croissance des bactéries décrite par l'équation (2) peut être divisée en deux termes : un terme qui décrit la dépendance de la croissance des bactéries au substrat, appelé terme de croissance, et un terme indépendant du substrat qui décrit la *deadline* (mort) du consortium bactérien, appelé terme de mortalité.

$$\frac{dX}{dt} = \underbrace{\mu X}_{\text{Croissance}} - \underbrace{K_d X}_{\text{Mortalité}} \quad (2)$$

où X (mol DCO/L) est la concentration en bactéries (appelée également biomasse bactérienne), μ est la vitesse spécifique de croissance des bactéries (h^{-1}) et K_d est la vitesse de mortalité des bactéries (h^{-1}). Le modèle de Monod (3) est le plus couramment appliqué pour décrire la croissance microbienne liée à l'utilisation du substrat [15]. Il propose que la vitesse spécifique de croissance soit inversement proportionnelle à la concentration en substrat ; c'est-à-dire que la vitesse spécifique de croissance augmente rapidement lorsque les concentrations en substrat sont faibles et lentement lorsque les concentrations de substrat sont élevées, jusqu'à atteindre une saturation.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (\text{Monod}) \quad (3)$$

où μ est la vitesse spécifique de croissance des bactéries, qui dépend de la concentration du substrat (S) et de la concentration des bactéries (X). Les constantes du modèle de Monod K_S et μ_{\max} sont respectivement la constante de demi-saturation, également appelée constante d'affinité, et la vitesse spécifique maximale de croissance.

La constante K_S peut être aussi définie comme la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de croissance bactérienne atteint la moitié de la valeur de la vitesse spécifique maximale. Ces deux constantes reflètent les propriétés physiologiques d'un type particulier de microorganismes, de même qu'ils dépendent du substrat utilisé et de la température du milieu [2].

Bien que l'équation de Monod soit simple, facile à comprendre et à utiliser, elle présente néanmoins certaines limites. Ce modèle ne fonctionne pas pour des situations complexes, telles que lorsque la concentration intracellulaire du substrat est réduite en raison d'une croissance cellulaire rapide, même si une quantité suffisante d'éléments nutritifs est présente dans le milieu, ainsi que dans le cas de concentrations élevées en substrat ou le cas de substrats complexes [16]. La corrélation du taux de croissance spécifique et de la concentration en substrat ne se produit donc

pas. Pour résoudre ces problèmes, d'autres modèles cinétiques ont été développés en se basant sur le modèle de Monod ou non, comme cela est décrit dans le tableau 3.

Tableau 3 : Cinétiques de croissance des bactéries descriptives de différents paramètres

Modèle	Expression	Paramètres	Référence
Modèle de Contois	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S X + S}$	S : concentration en substrat ; X : concentration de biomasse bactérienne ; μ_{max} : vitesse spécifique maximale de croissance bactérienne ; K_S : constante de saturation.	[17]
Modèle d'Andrews	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S \pm S^2/K_I}$	K_I : constante d'inhibition du substrat.	[18]
Modèle de Chen et Hashimoto	$\mu = \mu_{max} \frac{S/S_i}{K_S + (1 - K)S/S_i}$	S_i : concentration initiale en substrat.	[2]
Modèle de Luong	$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{K_S + S^n}$	n : constante de Luong.	[20]
Modèle de Moletta	$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{S^n(1 + K_b G_S S^n)}$	K_b : constante de saturation ; G_S : concentration des gaz produits.	[21]
Modèle de Birjukow	$\mu = \mu_{max} \frac{K_H}{K_H + H^+}$	K_H : constante de saturation ; H^+ : concentration des ions positifs.	[22]
Modèle de Bergter	$\mu = K_1 \exp\left(-\frac{E_1}{RT}\right) - K_2 \exp\left(-\frac{E_2}{RT}\right)$	Le premier terme décrit l'augmentation commune de la vitesse de réaction due à la température. Le deuxième terme, avec une énergie d'activation généralement plus élevée, décrit la diminution rapide de la vitesse de réaction au-dessus d'une certaine limite de température (vitesse d'inactivation). K_1 et K_2 : facteurs pré-exponentiels ; E_1 et E_2 : énergies d'activation.	[19]

Chaque modèle présenté dans le tableau 3 a été développé pour définir l'effet de la concentration en substrat, des gaz produits, du pH et de la température sur la croissance bactérienne. Cependant, les paramètres des modèles proposés, obtenus dans des conditions bien déterminées, ne peuvent pas être appliqués à d'autres conditions.

2.2- Description de la dégradation du substrat

La croissance bactérienne peut être modélisée en utilisant les relations appropriées pour la cinétique de croissance et incluant l'effet d'inhibition lié à la concentration en substrat et à celles des produits de fermentation, l'impact de la valeur du pH, l'équilibre ionique, l'équilibre liquide-gaz et la température, dont résulte l'expression de la vitesse spécifique de croissance. La dégradation du substrat basée sur cette vitesse, peut ainsi être calculée pour compléter le bilan de la quantité de la quantité de substrat, dépendant du changement de concentration de biomasse bactérienne en fonction du temps $\frac{dX}{dt}$, et qui peut être exprimée par l'équation (4) :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_S} \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

où Y_S est le rendement de croissance bactérienne après consommation du substrat. D'autres termes peuvent être ajoutés à l'expression de la variation de la concentration en substrat pour décrire un autre phénomène ayant eu lieu durant la fermentation, comme par exemple l'inhibition liée au pH, à la température ou à la pression partielle d'hydrogène ou pour décrire la formation d'autres substrats obtenus par hydrolyse de substrats complexes.

2.3- Description de la production des métabolites et des gaz

Bien que les produits finaux du processus soient les biogaz comme l'hydrogène et le dioxyde de carbone, un certain nombre d'intermédiaires et coproduits concurrents sont également produits comme les acides gras volatils (acides propionique, lactique, etc.), ceux-ci ayant un impact sur le rendement de production d'hydrogène.

Le modèle de Luedeking-Piret [23] (5) et sa forme simplifiée [24] (6) sont largement utilisés pour décrire la relation entre la variation de la croissance des bactéries produisant de l'hydrogène et la variation de formation des produits. En outre, un certain nombre d'auteurs ont utilisé l'équation (7), qui décrit la relation entre la variation de la dégradation du substrat et la variation de la formation des produits [25].

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (5)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

où P est la concentration en produit, X est la concentration de la biomasse bactérienne, $Y_{P/X}$ est le rendement de formation du produit P à partir de la biomasse X. $Y_{P/S}$ est le rendement de formation du produit P à partir du substrat S et β est le coefficient de Luedeking-Piret.

Les cultures mixtes ont des propriétés différentes de celles des cultures pures ; de plus, la relation entre les bactéries dans des cultures mixtes et les produits formés peut être non linéaire, c'est pourquoi l'équation (7), qui décrit la relation entre la variation de dégradation du substrat et la vitesse de formation des produits est la plus recommandée dans ce cas. Un terme supplémentaire peut être ajouté (5) pour décrire la formation de produit non associé à la croissance bactérienne ou à la dégradation de substrat. Obeid *et al.* (2009) [26] ont intégré ce terme supplémentaire dans l'équation de Luedeking-Piret pour étudier l'effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène en photofermentation par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus*. Paulo *et al.* (2013) [27] ont également utilisé ce terme pour étudier le processus de production

d'hydrogène par fermentation obscure en utilisant une culture mixte extraite de boues de station d'épuration traitées thermiquement.

2.4- Modèles pour la description de l'effet du substrat

Dans certains processus biologiques, comme par exemple la production d'hydrogène par des cultures mixtes à des concentrations en substrat importantes, dans les premières heures de fermentation l'effet des produits est considéré comme négligeable à cause de leurs concentrations faibles. Par conséquent, l'étude de l'effet de la teneur en substrat a la plus haute importance. Des modèles tels que ceux de Haldane [28], Andrews [18], Luong [20] et Aiba *et al.* [29] présentent diverses modifications du modèle classique de cinétique de Monod, qui tiennent compte des inhibitions liées à la concentration en substrat. Haldane [28] (8) et Andrews [18] (9) ont modifié le terme dominant de l'inhibition du substrat dans l'équation de Monod (3). A mesure que la constante d'inhibition du substrat se rapproche de l'infini, le modèle se rapproche de la courbe hyperbolique de la relation de Monod.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S \pm S^2/K_I} \quad (\text{Haldane}) \quad (8)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S \pm S/K_I} \quad (\text{Andrews}) \quad (9)$$

D'autre part, Luong [20] et Aiba *et al.* [29] ont présenté de nouveaux modèles (10, 11), qui incluent des termes supplémentaires pour expliquer l'inhibition complète de la croissance au-dessus d'une concentration critique en substrat, exprimé respectivement sous la forme d'une puissance et d'une exponentielle.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{K_s + S^n} \quad (\text{Luong}) \quad (10)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \exp\left(\frac{-S}{K_I}\right) \quad (\text{Aiba}) \quad (11)$$

Dans le modèle de Luong, la relation entre le taux de croissance spécifique et la concentration initiale en substrat peut être linéaire ($n=1$), rejoignant le modèle de Monod, avoir une concavité à la hausse ($n>1$) ou une concavité à la baisse ($n<1$) en fonction de la valeur du paramètre constant (n).

3- Méthodes de résolution des modèles mathématiques

3.1- Plans de développement du modèle mathématique

Le développement d'un modèle mathématique nécessite plusieurs étapes successives, comme cela est montré sur la figure 8. La première étape est la définition de l'objectif pour lequel

est construit le modèle, qui permet d'orienter le développement de celui-ci. L'étape suivante est le développement mathématique du modèle en fonction des données expérimentales dont on dispose. Le modèle est également défini en fonction des informations de la littérature, de ses limites et de son domaine de validité.

L'estimation des paramètres, ainsi que le calibrage du modèle est une autre étape essentielle, qui nous donne des informations et des explications sur les phénomènes ayant eu lieu durant le procédé de production d'hydrogène par fermentation. Cette étape est liée à l'étape précédente, car le calibrage du modèle nécessite des données expérimentales, qui donnent le degré de validité du modèle. L'étape finale constitue l'étude de sensibilité des paramètres ainsi que la validation du modèle calibré avec d'autres données expérimentales.

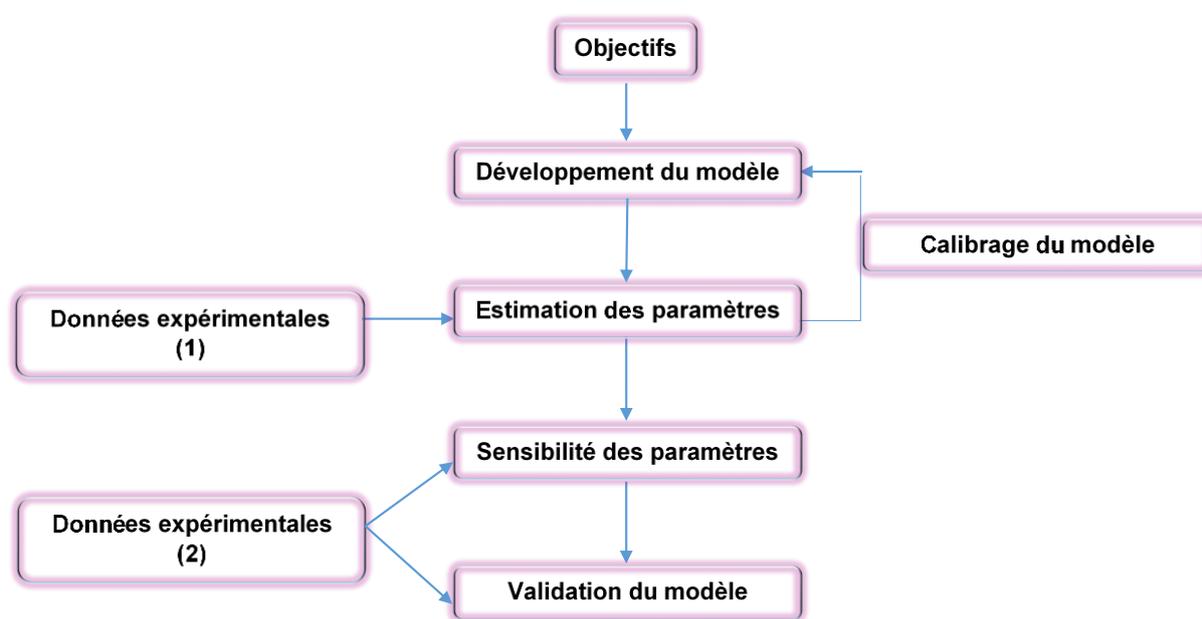


Figure 8 : Méthode de développement d'un modèle

3.2- Méthode de calibrage du modèle et identification des paramètres

Chaque modèle se caractérise par un domaine de validité qui nous donne la compatibilité entre les valeurs de sorties du modèle et les valeurs mesurées. Ce domaine de validité est fixé en prenant en compte les objectifs proposés. Généralement, pour ajuster un modèle composé d'équations différentielles ordinaires et pour identifier leurs paramètres, il est nécessaire de proposer une fonction objective et la minimiser. Ces fonctions se basent sur l'erreur entre les résultats expérimentaux et les résultats trouvés par le modèle. La fonction sélectionnée influence la procédure d'optimisation et agit, par conséquent, sur l'identification des paramètres. La fonction des sommes des moindres carrés (12) a été choisie dans ce travail.

$$f = \sum_{i=1}^n \{Y_{exp}(t_i) - Y_{mod}(t_i, \text{paramètres})\}^2 \quad (12)$$

Pour minimiser cette fonction, une procédure itérative avec un algorithme d'optimisation locale (méthode à région de confiance) a été utilisée.

4- Développement du modèle

Notre étude de modélisation et d'optimisation repose sur les données expérimentales extraites des travaux de thèse de V. Clion [30]. La réalisation des essais à 37°C dans un réacteur semi batch (volume réactionnel 800 mL) porte sur la variation des concentrations en hexose de 3,7 à 75 mmol/L utilisé comme substrat modèle. Les boues activées de la zone anoxie de la station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg sont utilisées comme source microbienne après un traitement thermique à 70°C pendant 1h15min sous atmosphère d'air statique, permettant la sélection des bactéries productrices d'hydrogène. Le dispositif est équipé d'une extraction des gaz produits par un gaz de balayage (azote) à un débit de 50 mL/min.

Dans un premier temps, un essai avec une concentration initiale de glucose de 10,4 mmol/L a été réalisé comme expérience de référence pour l'estimation des paramètres et la validation du modèle. Un suivi analytique en fonction du temps a été réalisé grâce à des prélèvements du milieu réactionnel toutes les heures jusqu'à 10h ainsi qu'un échantillon à 20h, en fin de fermentation. Les concentrations en métabolites sont analysées pour chaque échantillon par HPLC-UV et GC-FID. D'après la figure 9, une production majoritaire des métabolites coproduits de la production d'hydrogène (acétate et butyrate) est observée en fin de fermentation. Comme il est indiqué dans le premier chapitre, la production des métabolites a un impact sur les voies de production d'hydrogène, ainsi que sur les voies de dégradation de glucose. Pour cela, la variation de formation des produits (acétate, butyrate, propionate et éthanol), ainsi que la variation de formation du dioxyde de carbone, sont pris en considération dans le modèle proposé.

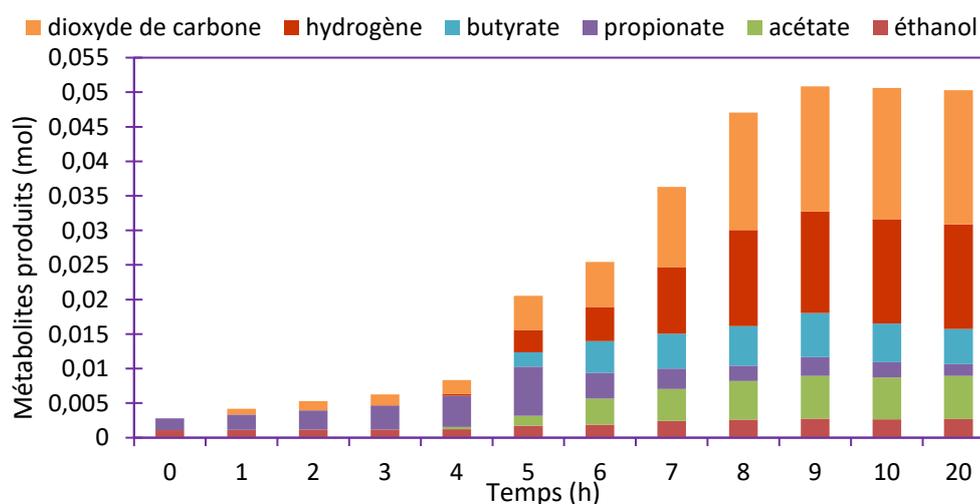


Figure 9 : Variation de formation des métabolites (éthanol, acétate, butyrate, propionate) et des gaz (hydrogène et dioxyde de carbone) au cours du temps

4.1- Hypothèses du modèle

Les hypothèses fondamentales prises en compte dans la construction du modèle mathématique du bioprocédé dans un réacteur fonctionnant en mode semi batch sont les suivantes :

- les gaz produits ne s'accumulent pas dans le milieu réactionnel,
- la température est constante,
- le consortium bactérien producteur d'hydrogène est pris dans sa globalité,
- après traitement thermique des boues de station d'épuration, il est supposé que les bactéries productrices d'hydrogène sont les seuls microorganismes actifs et les *clostridies* les bactéries majoritaires,
- aucun autre nutriment que le substrat n'est limitant,
- aucun sous-produit toxique du métabolisme ne s'accumule hormis les acides organiques,
- la formation de métabolites, comme le butanol, est considérée comme négligeable car liée à de très faibles quantités produites ; les quantités de propionate produites n'ont pas été prises en compte.

4.2-Description du modèle

Dans ce qui suit, on note X (mol/L) et S (mol/L), les concentrations respectives des microorganismes (biomasse bactérienne) et du substrat. L'expression de la variation de consommation du substrat est composée de deux termes (13). μ (h^{-1}) représente la cinétique spécifique de croissance bactérienne et I_{pH} (14), le terme d'inhibition du pH du milieu.

$$\frac{dS}{dt} = -Y_S \mu X I_{pH} + C_S X \quad (\text{modèle développé dans ce travail}) \quad (13)$$

Le premier terme représente la consommation du glucose par des bactéries en tenant en compte de l'inhibition liée au pH, Y_S représente le coefficient de rendement de consommation du substrat. Le second terme est introduit pour prendre en compte l'hydrolyse de substrats complexes contenus dans les boues de station d'épuration utilisées comme source microbienne pour produire un substrat facilement métabolisable, où C_S est la constante d'hydrolyse.

$$I_{pH} = \exp\left(-3\left(\frac{pH - pH_{VI}}{pH_{VS} - pH_{VI}}\right)^2\right) \quad (14)$$

Le pH optimal, selon les données expérimentales et selon la littérature, est fixé dans notre cas entre deux valeurs supérieure (pH_{VS}) et inférieure (pH_{VI}) égales à 5,9 et 4,8 respectivement. Dans cette étude, le rendement d'hydrogène optimal est trouvé à un pH égal à 5,6 ; il est donc régulé expérimentalement à cette valeur lors de la phase de production. Ainsi, le pH est considéré comme constant et égal à 5,6 dans le modèle.

L'expression de la variation de la concentration en microorganismes est composée de deux termes selon l'équation (15).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X I_{pH} - K_d X \quad (15)$$

Le premier terme donne la variation de la croissance des bactéries, le deuxième terme décrit le taux de mortalité, où K_d (h^{-1}) est le coefficient de mortalité cellulaire.

Dans notre étude, trois modèles cinétiques spécifiques décrits précédemment ont été utilisées pour les deux expressions de variation du substrat et de la biomasse bactérienne (tableau 4). En première approche, le choix s'est porté sur les modèles cinétiques de Monod, Contois et Aiba ; l'analyse des modèles de Andrews, Haldane et d'autres modèles donnant lieu à une inadéquation avec les données expérimentales. Selon l'algorithme local de minimisation de la fonction objective utilisé dans cette étude, il est nécessaire de fixer des paramètres d'initialisation en s'appuyant sur les données de la littérature pour l'utilisation de cultures mixtes.

Tableau 4 : Valeurs d'initialisation des paramètres cinétiques

Modèle cinétique	Paramètres		
Monod	$\mu_{max}=0,70 h^{-1}$	$K_S=0,08 mol/L$	
Contois	$\mu_{max}=0,01 h^{-1}$	$K_S=5,40$	
Aiba	$\mu_{max}=0,33 h^{-1}$	$K_S=0,02 mol/L$	$K_I= 0,009 mol/L$

Pour décrire la variation de la concentration des gaz produits (16) et des métabolites (17), l'équation modifiée de Luedeking-Piret, qui décrit la relation entre le taux de consommation du substrat et le taux de formation des produits, a été utilisée :

$$\frac{dP}{dt} = -F_{g/S} \frac{dS}{dt} FC \quad (16)$$

$$\frac{dP}{dt} = -F_{P/S} \frac{dS}{dt} FC + C_P X \quad (17)$$

où $F_{g/S}$ et $F_{P/S}$ sont respectivement, les coefficients de rendement des gaz (hydrogène et dioxyde de carbone) et des métabolites (acétate, butyrate et éthanol).

Dans notre étude, lorsque la concentration en substrat est très importante, la vitesse de croissance spécifique bactérienne diminue. Par conséquent, un terme d'inhibition a été ajouté dans les équations (16) et (17) correspondant à un facteur de correction (FC) :

$$FC = 1 - \exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) \quad (18)$$

Le choix de l'expression du facteur de correction est basé sur le profil de croissance des bactéries, qui présente un profil exponentiel avec une phase de latence, une phase de croissance rapide et une phase stationnaire. L'effet de la concentration du substrat peut impacter la globalité des phases et de manière significative la phase de croissance.

Des essais de modélisation cinétique de nos courbes expérimentales ont montré qu'il n'était pas possible d'ajuster correctement les paramètres du modèle. C'est pourquoi, il a décidé d'appliquer le facteur de correction aux modèles classiques de Monod, Contois et Aiba.

Seule la cinétique de Aiba a été testée avec et sans facteur de correction. Dans le cas où le facteur de correction est intégré, il a été supposé que le coefficient d'inhibition de la cinétique de Aiba (K_I) prend la même valeur que celle du coefficient du facteur de correction.

4.3- Résultats de la modélisation

4.3.1- Choix du modèle cinétique

Les figures 10 et 11 illustrent l'adaptation des deux modèles cinétiques de Contois et de Monod aux données expérimentales pour la croissance de la biomasse bactérienne, la consommation du substrat, la production cumulée des métabolites et des gaz en fonction du temps. Pour déterminer la concentration des bactéries, un fitting du profil de variation de la production de l'hydrogène utilisant le modèle logistique a été réalisé. Les valeurs en début et fin de fermentation des matières en suspension et des matières volatiles, dont le calcul est détaillé dans le chapitre Matériels et méthodes, ont été prises en compte pour le calcul de la DCO. La figure 12 décrit l'ajustement du modèle proposé avec le modèle cinétique de Aiba avec facteur de correction et donne l'évolution des métabolites principaux (acétate, butyrate et éthanol). Une présentation des résidus de chaque modèle est regroupée dans l'annexe 1. Les valeurs de la racine de l'erreur quadratique moyenne (REQM) sont résumées dans le tableau 5 pour évaluer la précision de chaque modèle.

Des différences significatives entre les résultats expérimentaux et théoriques sont observées sur les figures présentant les modèles de Monod et de Contois. De façon générale, ces modèles sous-estiment la croissance des bactéries et la dégradation du substrat en fin de fermentation. De façon systématique et dans la première phase de fermentation ($\leq 5h$), les deux modèles cinétiques surestiment à la fois la croissance bactérienne, la consommation d'hexose et par conséquent la quantité d'hydrogène, de dioxyde de carbone et des métabolites produits hormis l'éthanol. Un mauvais ajustement (REQM = 0,0212 pour le modèle de Monod avec facteur de correction (FC) et = 0,0215 pour le modèle de Contois avec FC) est observé. Ces écarts peuvent être dus à des effets d'inhibition liée à la teneur en produits ou en substrat. Comme le produit est un gaz et avec des concentrations peu importantes dans le milieu réactionnel liquide par rapport au substrat, son inhibition peut donc être négligée. Les autres produits présents dans le milieu réactionnel comme les acides et leur formation peuvent modifier le pH du milieu. Ainsi, l'effet de l'inhibition du substrat, ainsi que celui lié à la variation du pH, doivent être pris en compte.

Tableau 5 : Valeurs des racines d'erreur quadratique moyenne pour chaque modèle

Modèle	REQM
Monod avec facteur de correction	0,0212
Contois avec facteur de correction	0,0215
Aiba sans facteur de correction	0,0145
Aiba avec facteur de correction	0,0081

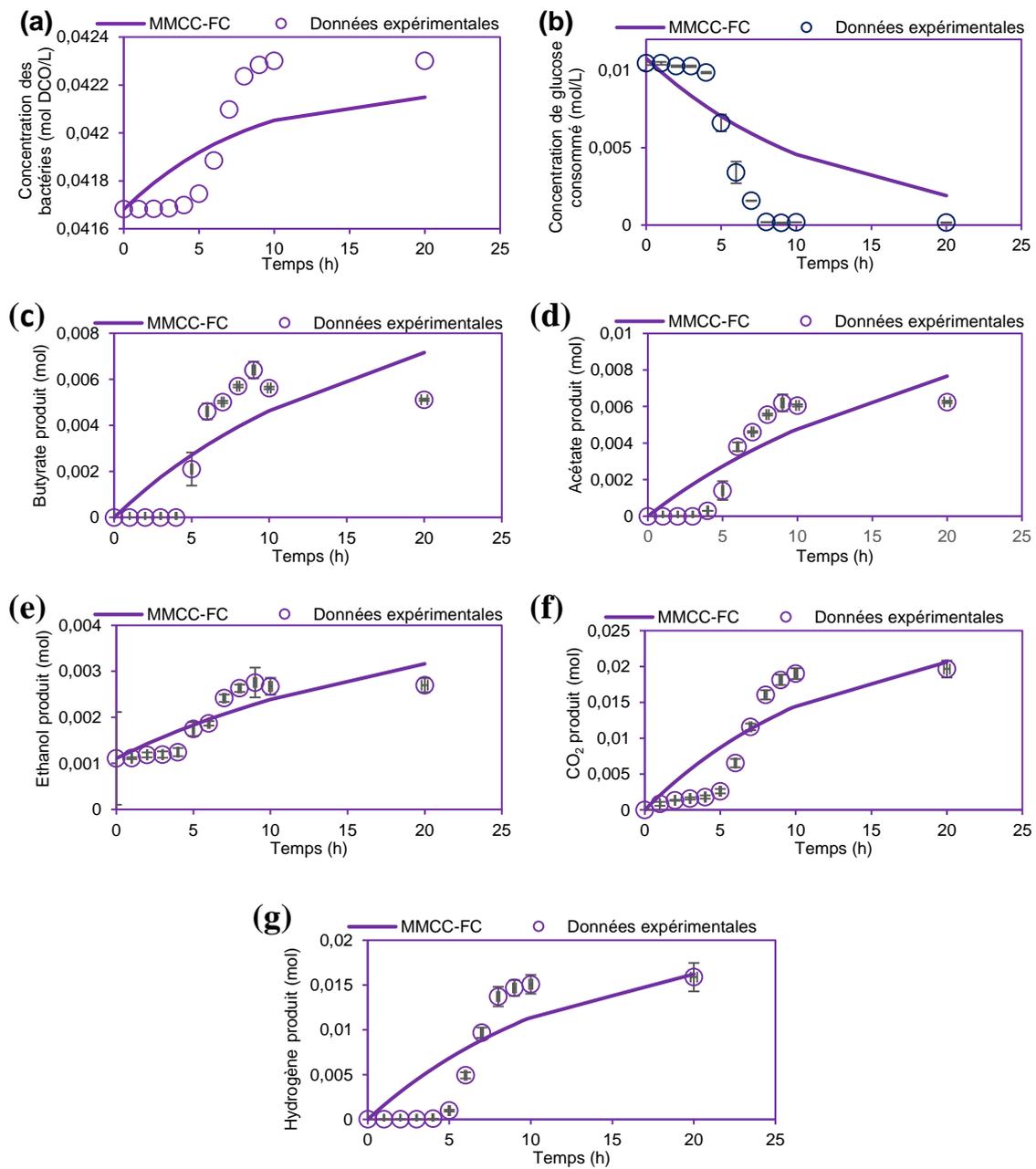


Figure 10: Représentation des variations de croissance bactérienne (a), consommation du substrat (b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Contois (MMCC) avec facteur de correction (FC)

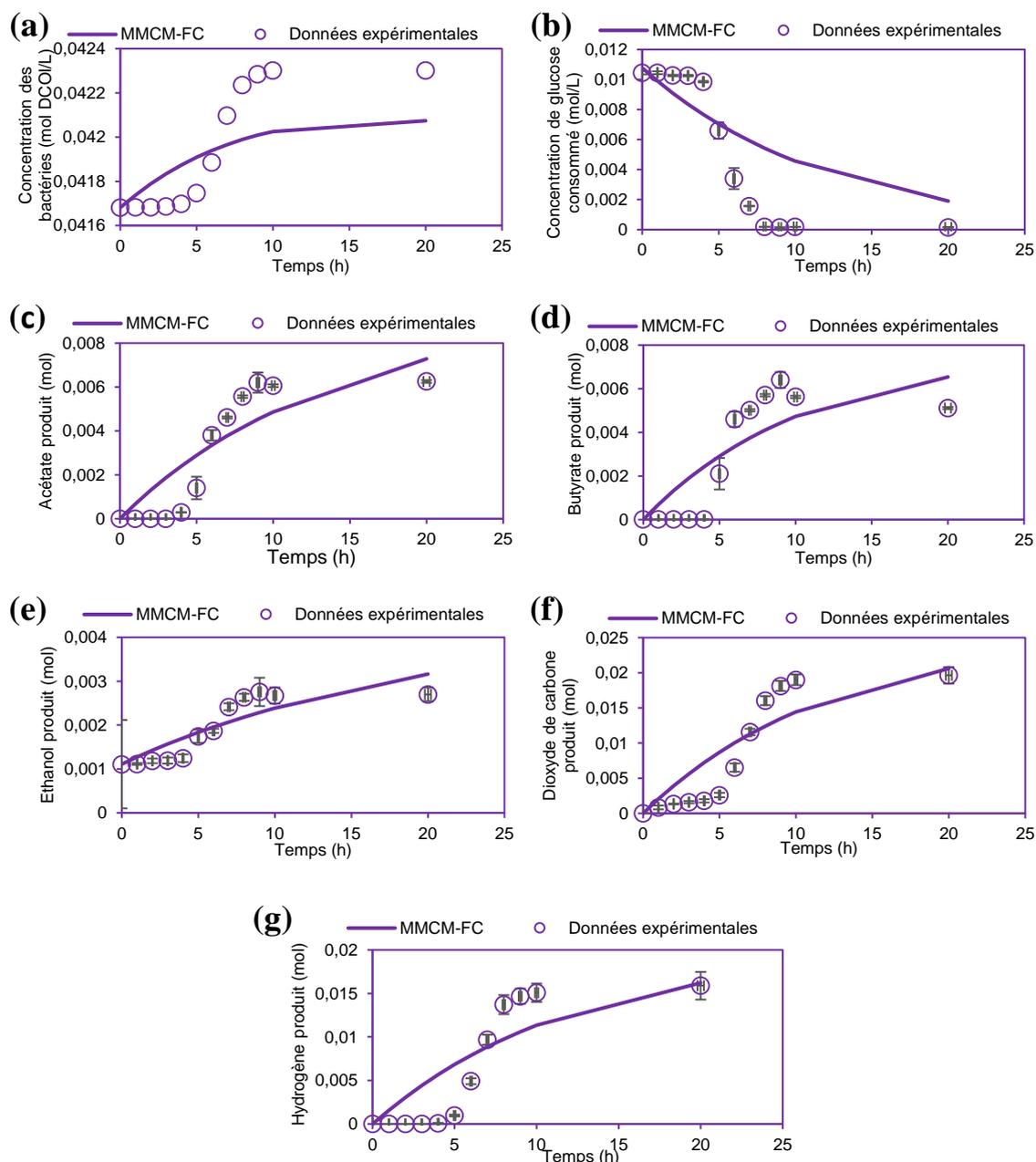


Figure 11 : Représentation des variations de croissance bactérienne (a), consommation de substrat (b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Monod (MMCM) avec facteur de correction (FC)

Parmi les trois modèles de cinétique proposées, le modèle de Aiba avec facteur de correction est le meilleur et ces valeurs sont très proches des résultats expérimentaux comme le montrent la figure 12 et le tableau 5. Le modèle proposé montre une excellente adaptation globale aux données expérimentales avec un $REQM = 0,0081$. Cependant, le modèle sous-estime légèrement les données de dégradation du substrat et sur-estime la formation de l'hydrogène aux faibles concentrations. La sur-estimation du profil d'hydrogène est observée durant les premières heures de fermentation, alors que le profil de substrat est sous-estimé en fin de fermentation. En

plus des trois éléments essentiels du processus de fermentation : croissance de la biomasse bactérienne, consommation du substrat et formation d'hydrogène, le modèle de Aiba avec FC permet de suivre l'évolution des métabolites comme l'acétate, le butyrate et l'éthanol avec une très bonne corrélation. Cependant, il est à noter que le modèle n'a pas pu représenter fidèlement la variation de la formation du butanol et du propionate, liée aux très faibles quantités analysées pour le butanol (aux limites de détection) et sans doute à une analyse expérimentale non conforme du propionate car en effet, la consommation de celui-ci en cours de fermentation n'est en général pas observée (Annexe 2).

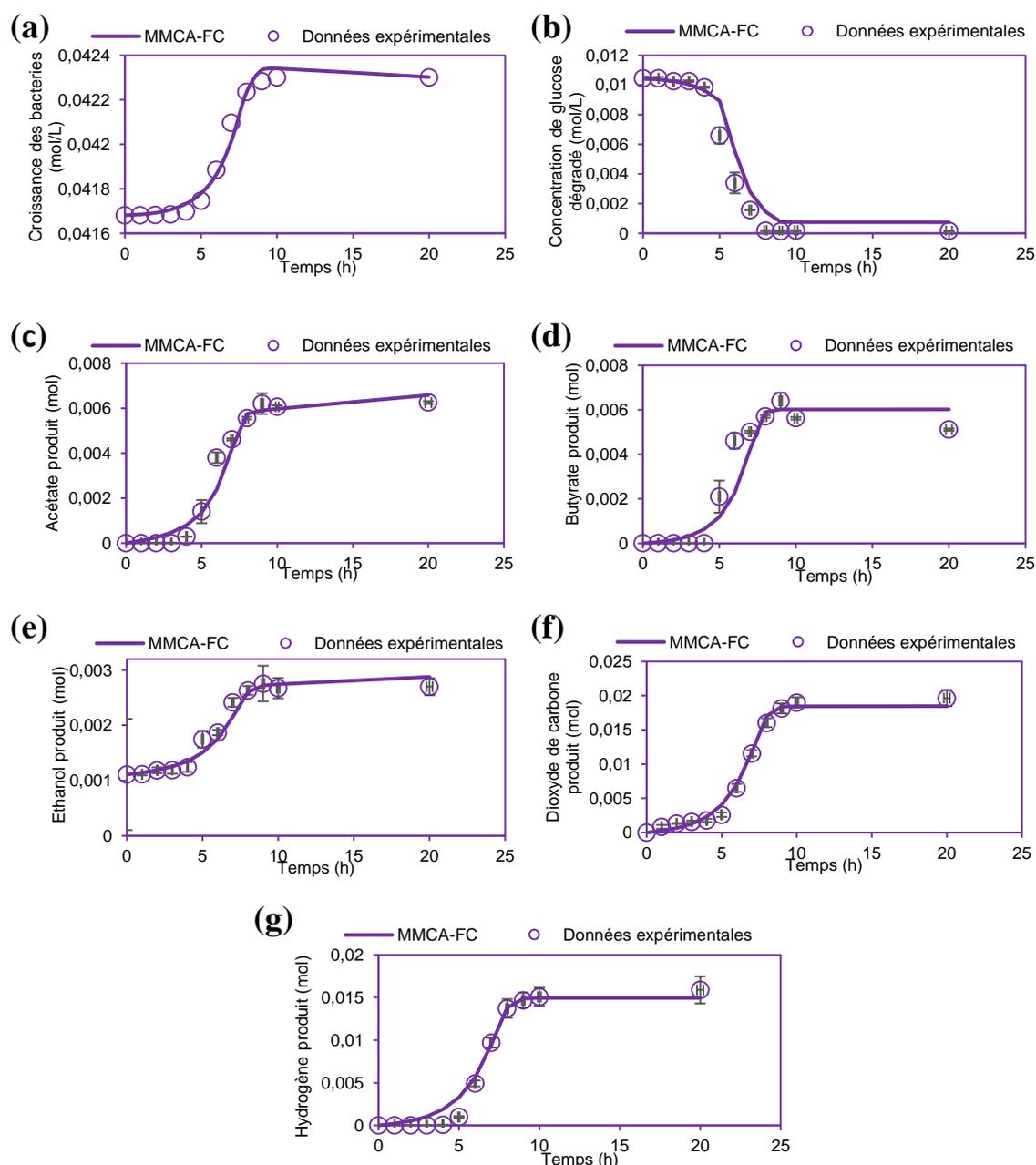


Figure 12 : Représentation des variations de croissance bactérienne (a), dégradation de substrat (b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Aiba (MMCA) avec facteur de correction (FC)

Le faible écart entre les données expérimentales et celles prédites par le modèle pourrait être dû à l'hypothèse selon laquelle le rendement de consommation du substrat Y_s reste constant dans le système, quel que soit le temps de fermentation. Ceci a été supposé en négligeant l'effet de l'énergie de « maintenance » nécessaire à la croissance et au métabolisme des cellules bactériennes. Le critère des résidus est pris en compte dans cette étude pour déterminer la signification statistique des points de données expérimentales et de ceux prédits par le modèle.

Selon la figure 9, on observe que tous les métabolites solubles sont générés simultanément avec la dégradation du substrat, alors que les produits gazeux sont générés avec un léger retard par rapport aux autres métabolites, de même que pour la croissance des bactéries qui commence à augmenter simultanément avec la formation des produits gazeux. Par la suite, toutes les quantités cumulées des métabolites ainsi que celles des gaz restent constantes après consommation complète de l'hexose. Ce temps de latence plus long peut être attribué au volume mort du circuit des gaz (ciel gazeux, tubulures, pièges froids,...) alors que l'analyse est directe dans le milieu liquide (prélèvement par une vanne de fond).

La figure 13 présente la corrélation entre les données mesurées et celles du modèle qui inclut la cinétique de Aiba sans introduire le facteur de correction. Cette figure montre un calibrage du modèle avec les données expérimentales moins bon par rapport à la figure 12, ainsi qu'une valeur de REQM (0,0145) calculée relativement élevée. Ce modèle est moins précis que celui obtenu avec le même modèle en introduisant le facteur de correction. Cette mauvaise estimation est observée surtout durant les premières heures de fermentation pour les profils de croissance des bactéries et de formation d'hydrogène. Ceci confirme l'effet de l'inhibition du substrat sur la croissance des bactéries et la formation de l'hydrogène globalement mais aussi sur le temps de latence, la vitesse de production, la vitesse spécifique de la croissance bactérienne et même sur la vitesse de dégradation de l'hexose.

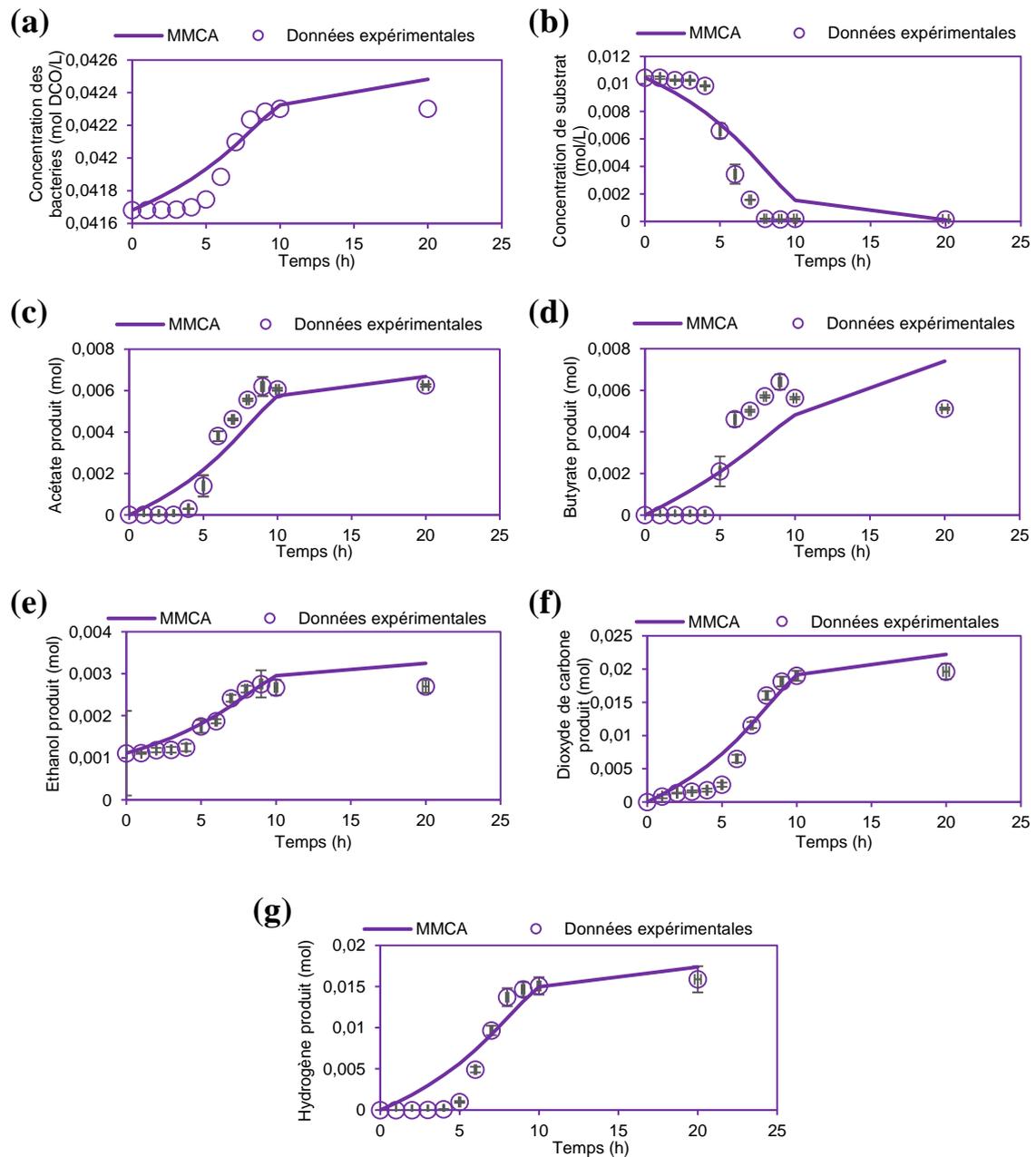


Figure 13 : Représentation des variations de croissance bactérienne(a), dégradation de substrat(b) et formation des produits : butyrate (c), acétate (d), éthanol (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) par le Modèle Mathématique de la Cinétique de Aiba (MMCA) sans coefficient de correction

Le rendement de formation des métabolites, ainsi que celui des gaz sont estimés par le modèle développé. Les rapports des rendements $\frac{F_{butyrate}/S}{F_{acétate}/S}$ (aussi noté rapport B/A) et

$\frac{F_{H_2}/S}{2\left(\frac{F_{acétate}}{S} + \frac{F_{butyrate}}{S}\right)}$ (aussi noté $H_2/2*(B+A)$) ont également été calculés à l'aide des rendements

estimés. Pour une validation du modèle, les paramètres estimés répertoriés dans le tableau 6 sont

comparés à ceux calculés à partir des données expérimentales. Une analyse statistique de la corrélation entre les différents paramètres a été réalisée.

Le rendement estimé (Y_s), correspondant à la concentration en substrat sur la concentration de biomasse bactérienne, se situe dans la plage des valeurs rapportées dans la littérature (13,55-38,57 mol/mol) [31-34] en supposant que l'hexose est le substrat unique. Un rendement de 18,09 mol/mol a été obtenu à partir de nos expériences ; cette valeur est comparable à la valeur estimée égale à 16,01.

Le rendement en butyrate produit $F_{butyrate/S}$ est sensiblement plus élevé que celui de l'acétate et très nettement supérieur à celui de l'éthanol. Ceci est conforme aux données expérimentales, mettant en évidence que la quantité de butyrate produit est légèrement supérieure à celle de l'acétate. Les coefficients de corrélation pour les rendements des gaz, de l'acétate, ainsi que celui du rapport du rendement de butyrate sur le rendement d'acétate et le rendement de consommation du substrat sont proches de 1 (0,875 et 0,966), ce qui indique l'exactitude des paramètres estimés. Cependant, une plus faible corrélation est observée entre les rendements de butyrate (0,796), ainsi que le rapport du rendement d'hydrogène sur la somme des rendements de butyrate et d'acétate (0,821).

Tableau 6 : Rendements de formation des produits

Rendement (mol/mol)	Modèle Aiba - FC	Littérature [31-34]	Valeur expérimentale	Coefficient de corrélation (données exp/modèle)
Y_s	16,01	13,55-38,57	18,09	0,884
$F_{acétate/S}$	0,778	0,654-1,067	0,708	0,910
$F_{butyrate/S}$	0,872	0,715-3,910	0,694	0,796
$F_{éthanol/S}$	0,226	0,032-0,341	0,264	0,856
$F_{CO_2/S}$	2,602	-	2,696	0,965
$F_{H_2/S}$	2,106	1,012-3,090	2,181	0,966
$\frac{F_{butyrate/S}}{F_{acétate/S}}$	1,120	0,880-6,260	0,980	0,875
$\frac{F_{H_2/S}}{S}$	0,638	0,840-1,1460	0,777	0,821
$2 \left(\frac{F_{acétate/S}}{S} + F_{butyrate/S} \right)$				

Le rendement d'hydrogène produit après consommation de l'hexose est estimé à une valeur égale à 2,11 mol/mol d'hexose, tandis que le rendement théorique maximal en hydrogène lors de la fermentation de l'hexose est de 4 mol/mol, à condition que l'acide acétique soit l'unique produit final [35]. Les rendements de production d'hydrogène rapportés dans la littérature à partir de cultures mixtes varient de 25% à 77% (sur la base de 4 moles d'hydrogène par mole de hexose) avec des substrats carbonés modèles tels que l'hexose [30-32]. Dans ce travail, l'efficacité de production d'hydrogène est d'environ 52% ($2,1 / 4 = 0,52$), ce qui est au milieu de la gamme des valeurs indiquées dans la littérature.

Comme nous l'avons observé, outre la croissance de la biomasse et la formation d'hydrogène, la fermentation d'hexose par les cultures mixtes entraîne la production d'un mélange de principaux produits de fermentation, notamment l'acétate, le butyrate et l'éthanol. Parmi ces principaux métabolites, la formation d'acétate et de butyrate accompagne la production nette d'hydrogène, contrairement à la production d'éthanol, qui coproduit uniquement du CO₂. Les équations (19) à (21) résument les relations stœchiométriques entre l'hexose et les produits formés au cours de la fermentation :



Le rapport du rendement de butyrate sur le rendement d'acétate (rapport B/A) a été considéré comme un indicateur permettant d'évaluer l'efficacité de la production d'hydrogène lors de fermentation de l'hexose avec des cultures mixtes [37]. Basé sur la stœchiométrie de fermentation d'un hexose comme indiqué dans les équations (19) et (20), la voie « acétate » dégage deux fois plus d'hydrogène que la voie « butyrate ».

Cependant, d'autres études [11], utilisant des cultures mixtes ou des souches pures, ont montré qu'il semble exister une forte corrélation positive entre les valeurs du rapport B/A et le rendement en hydrogène. La valeur de ce rapport (B/A) proche de 1 confirme que l'équivalent des électrons générés par la dégradation du substrat pour la production d'acétate et/ou de butyrate est essentiellement utilisé pour la production d'hydrogène. Cependant, une valeur inférieure à 1 indique que l'équivalent des électrons générés dans la glycolyse et la décarboxylation du pyruvate serait utilisé non seulement pour la production d'hydrogène, mais également pour d'autres métabolites concurrents à la production d'hydrogène tels que le lactate, le propionate et l'éthanol. *Gadhe et al.* (2014) [11] ont introduit le rapport $H_2/2*(B+A)$ pour déterminer l'équilibre de fermentation entre l'acétate, le butyrate et l'hydrogène, sur la base de la corrélation stœchiométrique selon laquelle 2 moles d'hydrogène sont formées par mole d'acétate et de butyrate. Dans leur étude, les ratios obtenus, à partir de la fermentation des eaux usées de laiterie comme source de carbone avec une culture bactérienne mixte, étaient constamment proches de 1, confirmant les relations stœchiométriques montrées dans les équations (19) et (20). Dans notre étude, la valeur calculée du rapport $H_2/2*(B+A)$ est égale à 0,777 ; cette valeur est inférieure à 1, expliquant la production d'acétate par homoacétogénèse.

Les valeurs estimées de la cinétique maximale de croissance bactérienne (μ_{max}) du modèle de Aiba avec facteur de correction, présentées dans le tableau 7, diffèrent légèrement de celles estimées par le modèle cinétique de Aiba sans introduire de facteur de correction, pour lequel

l'inhibition du substrat n'a pas été prise en compte. Sa valeur correspond à un temps de génération (durée de doublement de la biomasse) de 1 h ; pour le modèle de Aiba sans FC, ce temps est de 55 min.

Tableau 7 : Paramètres cinétiques estimés de croissance et de mortalité des bactéries

	Modèle Aiba-FC	Modèle Aiba sans FC	Littérature [27], [38-41]
μ_{max} (h ⁻¹)	0,6939	0,7622	1,0210
K_S (mol/L)	0,0657	0,3891	0,075
K_I (mol/L)	0,0037	/	/
K_d (h ⁻¹)	0,0044	1,40.10 ⁻⁵	0,001-0,04
$C_{acétate}$ (h ⁻¹)	0,0014	4,51.10 ⁻⁵	0,0001
$C_{butyrate}$ (h ⁻¹)	2,2.10 ⁻¹⁴	0,0051	/
$C_{éthanol}$ (h ⁻¹)	0,0001	2,8.10 ⁻¹⁴	/
C_S (h ⁻¹)	0,0708	0,0025	0,028

Une variation par rapport à la littérature est observée pour le modèle de Aiba sans facteur de correction en ce qui concerne la constante de mortalité (K_d). Ceci confirme que l'inclusion du facteur d'inhibition du substrat dans les équations (16) et (17) s'est avéré nécessaire, car il a été trouvé que les valeurs des paramètres de cinétique de croissance (K_S) et de mortalité estimée (K_d) pour le modèle de Aiba sans facteur de correction ne pouvaient pas simuler de manière satisfaisante les données expérimentales avec des concentrations de substrat élevées.

Une légère diminution du paramètre cinétique K_S du modèle de Aiba avec facteur de correction est observée, ce qui explique la sur-estimation du profil de production d'hydrogène au démarrage de la fermentation ainsi que le temps de latence par rapport aux données expérimentales. Par définition, le paramètre K_S est la concentration en substrat à laquelle la vitesse de consommation du substrat par les microorganismes est égale à la moitié de la vitesse maximale atteinte [42]. Par conséquent, une valeur de K_S moins élevée entraîne une consommation plus rapide du substrat et un temps latence de fermentation plus court pour les microorganismes producteurs d'hydrogène.

4.3.2- Validation du modèle développé

La validation du modèle développé est réalisée en diminuant la concentration initiale du substrat dans le réacteur à une valeur égale à $S_0 = 7,5$ mmol/L et en utilisant les mêmes paramètres cinétiques du modèle. La quantité de biomasse bactérienne ajoutée est la même que pour la première expérience. Les résultats du modèle ainsi que les données expérimentales sont comparés sur la figure 14, qui représente la quantité d'hydrogène produite cumulée en fonction du temps. Le tableau 8 montre que le paramètre estimé K_I , correspondant au coefficient d'inhibition de la cinétique de

Aiba, doit être modifié pour un meilleur ajustement du modèle aux données expérimentales, les autres paramètres étant inchangés.

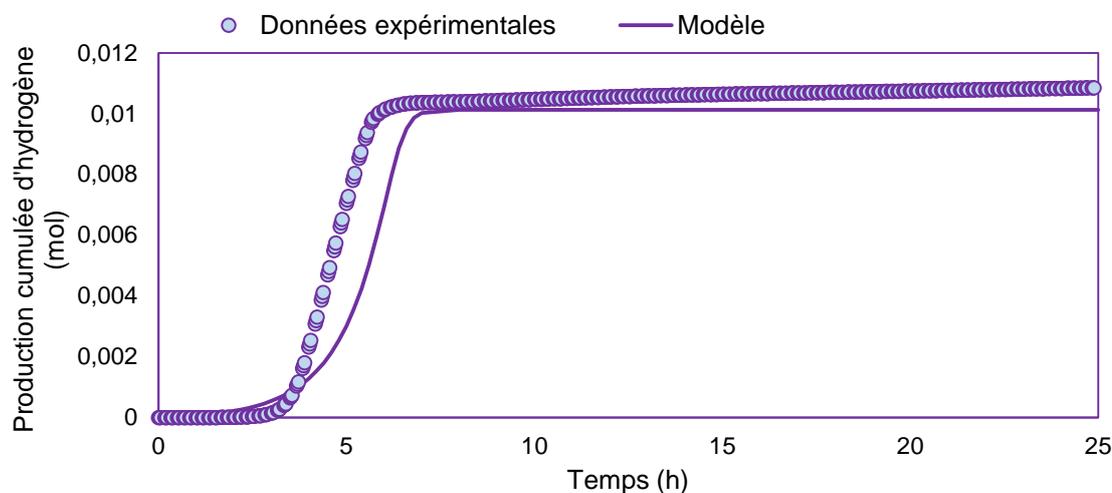


Figure 14 : Production d'hydrogène cumulé en fonction du temps pour une concentration en substrat de 7,5 mmol/L. Comparaison des données expérimentales avec le modèle cinétique de Aiba avec facteur de correction

Les résultats du modèle s'ajustent avec une bonne adaptation globale aux données expérimentales, cependant une sous-estimation du modèle est observée entre 4 et 6 heures après le début de la fermentation. Ceci s'explique par la diminution significative de la constante d'inhibition du substrat, d'une diminution de la vitesse de dégradation du substrat et par conséquent une augmentation de la vitesse de production d'hydrogène. Malgré tout, le rendement en hydrogène estimé est très proche pour les deux teneurs en substrat.

Tableau 8 : Paramètres estimés par le modèle de Aiba avec facteur de correction pour deux différentes concentrations en substrat

Concentration initiale de substrat	K_I	$F_{H_2/S}$
$S_0=7,5$ mmol/L	0,0028	2,05
$S_0=10,4$ mmol/L	0,0037	2,11

Le modèle développé avec la cinétique de Aiba avec facteur de correction permet de bien modéliser les trois phases de croissance des bactéries : phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire. Ce modèle permet de prédire correctement les performances de croissance des bactéries ainsi que la formation d'hydrogène et des métabolites. Les paramètres cinétiques déterminés sont pour la plupart en accord avec les résultats obtenus dans la littérature, ainsi que ceux calculés à partir des données expérimentales, ce qui permet de valider les hypothèses utilisées ainsi que le modèle proposé.

5- Etude de l'effet de la concentration en substrat sur le processus de production d'hydrogène par fermentation

Le modèle développé ayant été validé avec une concentration initiale en substrat différente, il est maintenant intéressant d'étudier son comportement pour des concentrations initiales de substrat plus élevées et l'une plus faible afin de vérifier si la cinétique de Aiba avec facteur de correction est applicable à toutes les concentrations de substrat et d'étudier les performances des bactéries productrices d'hydrogène en fonction de la concentration en substrat.

La croissance des bactéries, l'efficacité de dégradation du substrat, la quantité d'hydrogène cumulée, la variation de la vitesse de production d'hydrogène, ainsi que les quantités totales des acides produits ont été étudiés.

5.1- Effet de la concentration initiale en substrat sur l'efficacité de sa dégradation

Pour comparaison, l'efficacité de dégradation du substrat a été estimée en divisant la concentration en hexose consommée après huit heures de fermentation (correspondant à une consommation d'hexose totale pour l'expérience de référence ($S_0 = 10,4$ mmol/L)) par la concentration d'hexose initiale. La figure 15 montre l'effet de la concentration initiale en substrat sur l'efficacité de dégradation du substrat. Les résultats mettent en évidence que l'efficacité de dégradation du substrat varie légèrement dans un intervalle de 86,6% à 95,7% lorsque la concentration initiale en substrat varie de 3,7 à 22 mmol/L ; une tendance relativement similaire est rapportée par plusieurs études [43-44]. Cependant, l'efficacité de dégradation du substrat diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en substrat de 22 à 73 mmol/L. En effet, on observe que dans une plage de faibles concentrations initiales de substrat, l'augmentation de cette dernière a relativement peu d'impact (même si la consommation en hexose est très élevée) sur la capacité des cultures mixtes à dégrader le substrat pendant la production d'hydrogène, alors que pour une gamme de concentrations plus élevées, la concentration du substrat a un effet négatif sur la dégradation de ce dernier et par conséquent induit sans doute une diminution de la capacité des bactéries productrices d'hydrogène à consommer l'hexose. Dans cette étude, l'efficacité maximale de dégradation du substrat est de 95,7% pour une concentration de substrat de 22 mmol/L, ce qui est supérieur à celle rapportée par *Mullai et al.* (2013) [44] (90,0%). Ce résultat montre que les cultures mixtes traitées thermiquement utilisées dans notre étude ont une plus grande capacité à dégrader le substrat.

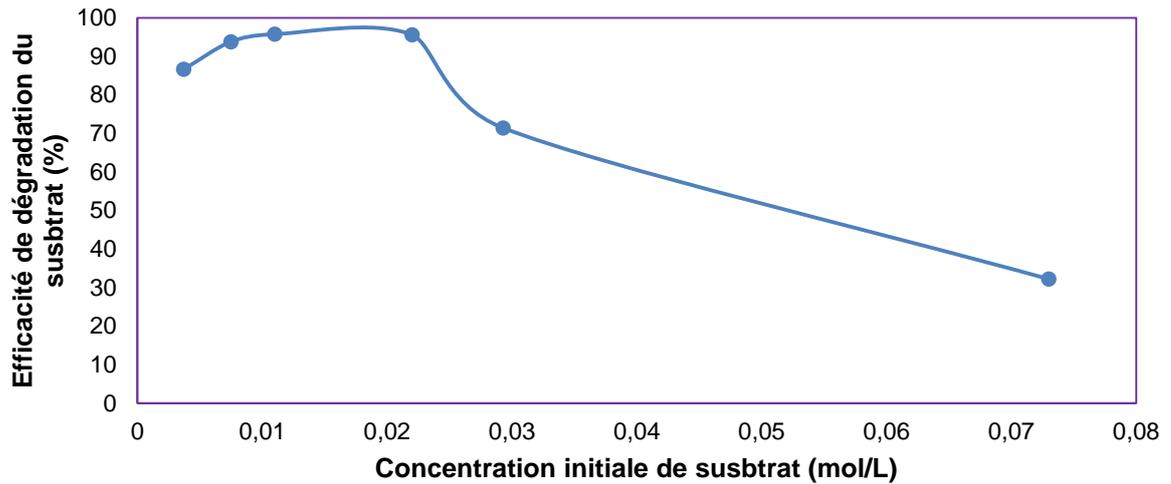


Figure 15 : Efficacité de dégradation de l'hexose pour différentes concentrations initiales de substrat

L'effet de la concentration en substrat sur l'efficacité de dégradation de celui-ci laisse supposer que la croissance des bactéries peut aussi être inhibée à des concentrations élevées en substrat.

5.2- Effet de la concentration initiale de substrat sur la croissance des bactéries

La figure 16 représente la variation de la croissance des bactéries en fonction du temps à différentes concentrations initiales en substrat établie sur la base du modèle de Aiba avec facteur de correction. Une estimation des paramètres cinétiques (K_I et μ_{max}) est présentée dans le tableau 9.

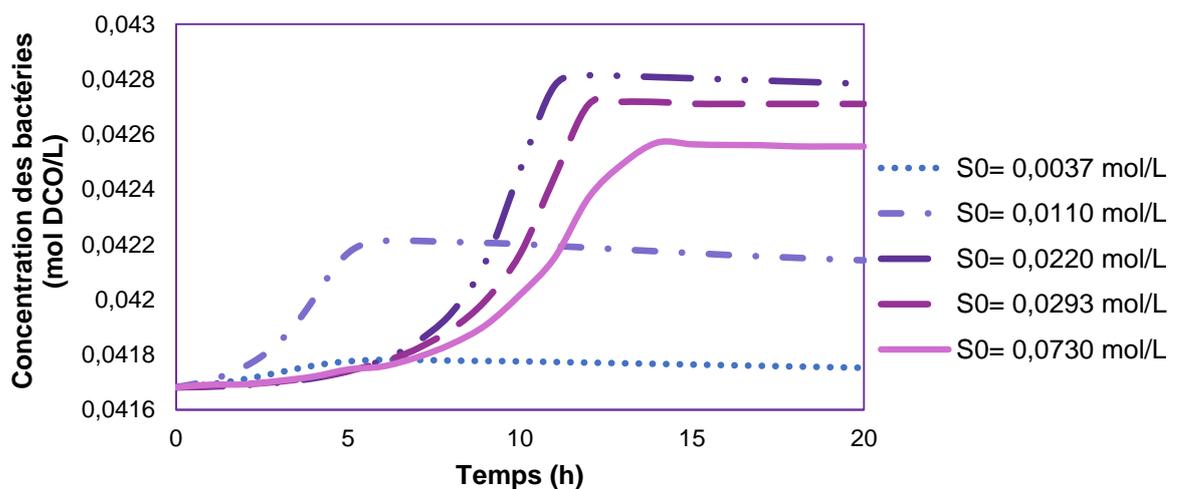


Figure 16 : Variation de la croissance des bactéries en fonction du temps à différentes concentrations initiales en substrat (S_0), établie sur le modèle de Aiba avec facteur de correction (MMCA-FC)

Tableau 9 : Paramètres cinétiques pour différentes concentrations initiales en substrat

Concentration initiale de substrat (S_0) (mol. L ⁻¹)	K_I (mol L ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)
0,0037	0,0017	0,735
0,0110	0,0037	0,694
0,0220	0,0064	0,689
0,0293	0,0082	0,652
0,0730	0,0195	0,601

Comme le montre la figure 16, le temps de latence varie en fonction de la teneur initiale en substrat. Pour des valeurs inférieures à 11 mmol/L, le temps de latence est court (2 heures) alors que pour une concentration en substrat plus élevée, il augmente de façon significative. En fonction de la concentration en substrat, on obtient une vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) décroissante (tableau 9). La faible concentration en substrat (3,7 mmol/L) entraîne une croissance cellulaire plus lente, ce qui peut être attribué à une disponibilité insuffisante de la source de carbone. On observe une vitesse de croissance des bactéries moins élevées lorsque la concentration en substrat croît, ce phénomène pourrait être attribué à un processus de réadaptation du consortium bactérien aux concentrations élevées.

D'autre part, on observe que la concentration bactérienne en fin de fermentation augmente avec l'augmentation de la concentration initiale de substrat, jusqu'à 22 mmol/L. Un maximum pour la concentration en biomasse bactérienne de 0,0428 mol DCO/L a été atteint à cette concentration. Puis, une légère diminution de la croissance est observée jusqu'à une concentration de 73 mmol/L.

Ceci s'explique par la diminution de la vitesse spécifique maximale de croissance bactérienne avec l'augmentation de la concentration en substrat présentée dans le tableau 9. En outre, l'augmentation de la constante d'inhibition (K_I), estimée par le modèle, avec l'augmentation de la concentration en substrat confirme l'effet inhibiteur du substrat sur la croissance des bactéries.

D'un point de vue biologique, on peut dire qu'une concentration initiale élevée en substrat modifie le sens et la nature des voies métaboliques conduisant à la production d'autres produits agissant en tant qu'inhibiteurs [45]. Cela pourrait être dû à la production de quantités élevées d'acides (acétate, butyrate, propionate et formiate) dans le milieu réactionnel. Gerber et Span (2008) [46] expliquent cet effet d'inhibition du substrat par l'existence d'une pression osmotique élevée du milieu réactionnel ou à une toxicité spécifique du substrat. En effet, à une concentration de 73 mmol/L, la pression osmotique, calculée par la loi de Van't Hoff, est de 1,86 atm, pouvant expliquer l'effet de cette dernière. Ces auteurs expliquent également l'inhibition par le substrat due à une concentration croissante des produits formés comme les acides organiques, qui sont inhibiteurs de

la croissance bactérienne. Le taux de cette inhibition est aussi exprimé de manière similaire par l'approche de Haldane dans une étude de Agelidaki *et al.* [47].

La figure 17 montre que la production totale d'acides (acétate et butyrate) en fin de fermentation augmente de façon logique avec l'augmentation de la concentration initiale en substrat. Une production d'acides organiques élevée affecte négativement la croissance bactérienne et peut inhiber par conséquent la formation d'hydrogène. De plus, d'autres recherches [48-49] ont constaté que l'augmentation de la production totale d'acides entraînait une variation du pH menant à l'inhibition des bactéries dans des conditions acidogènes. Une autre raison de la diminution de la croissance bactérienne pourrait être l'augmentation de la viscosité de la solution en fonction de sa concentration, affectant ainsi le transfert de masse du substrat aux microorganismes [50]. Enfin, une autre possibilité est la variation en espèces de la biomasse bactérienne avec une diversification des bactéries pour certaines non productrices d'hydrogène, lié à une teneur en substrat élevée.

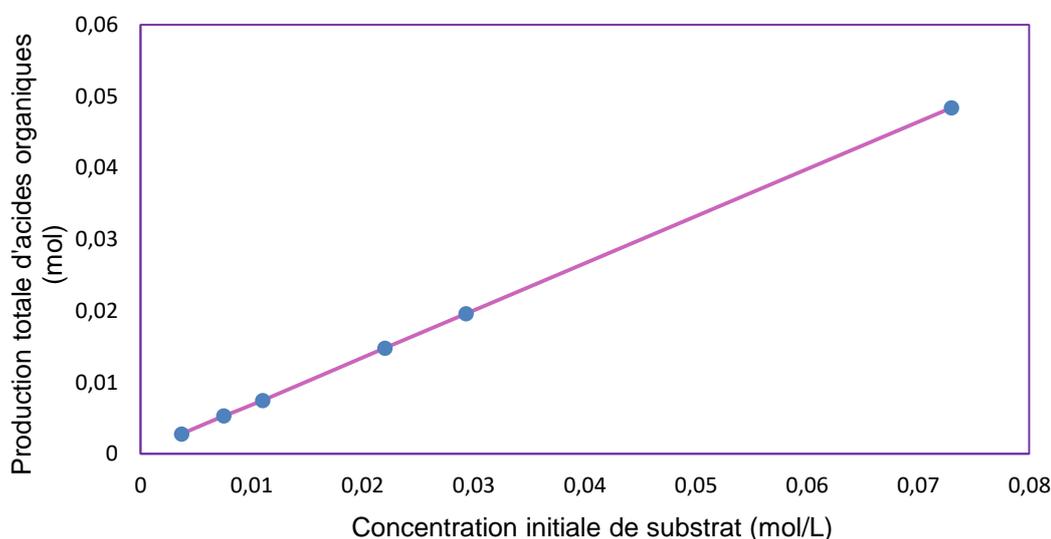


Figure 17 : Variation des quantités totales d'acides organiques produits en fonction des concentrations initiales de substrat obtenue par le modèle de Aiba avec facteur de correction (MMCA-FC)

5.2- Effet de la concentration initiale en substrat sur la production d'hydrogène

Les performances de production d'hydrogène des cultures mixtes à différentes concentrations initiales de substrat ont été étudiées. La figure 18 présente les résultats de la modélisation de la variation de la production d'hydrogène cumulée en fonction du temps (a) ainsi que les résultats expérimentaux (b). Le modèle suit relativement bien les données expérimentales pour les concentrations initiales de substrat de 3,7 à 22 mmol/L ainsi que pour les quantités d'hydrogène cumulées en fin de fermentation. Cependant, une légère variation est observée au niveau des vitesses de production à partir de 10 heures de fermentation pour les tests à fortes

concentrations initiales en substrat ($S_0 = 29,3 \text{ mmol/L}$ et $S_0 = 73 \text{ mmol/L}$), car la courbe est asymptotique, alors que les valeurs expérimentales montrent un ralentissement du taux de production d'hydrogène, pour tendre enfin, vers la valeur de l'asymptote. On peut en conclure que les fortes concentrations de substrat jouent clairement un rôle dans la cinétique de production d'hydrogène non anticipée par le modèle ; lorsque la concentration en substrat est supérieure au maximum tolérable, le terme d'inhibition (facteur de correction) ne convient pas à la description des valeurs élevées de concentrations en substrat (22).

$$S \sim \infty \rightarrow \exp\left(-\frac{S}{K_I}\right) \sim 0 \rightarrow FC \sim 1 \quad (22)$$

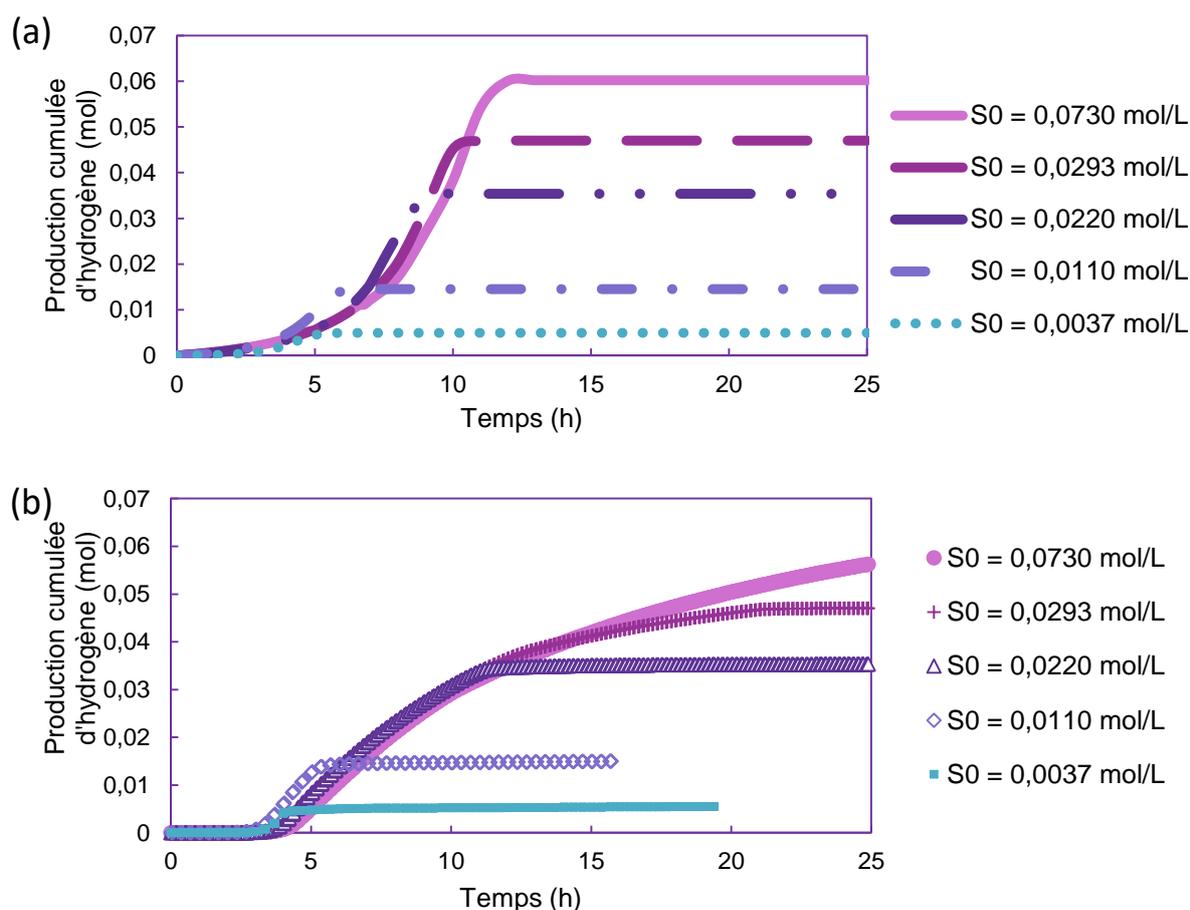


Figure 18 : Effet de la concentration en substrat sur la production d'hydrogène (a) modélisation selon le modèle MMCA-FC (b) données expérimentales

Selon la figure 18, la quantité d'hydrogène cumulée augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en substrat. On constate en effet une bonne corrélation entre les quantités d'hydrogène produit et la teneur initiale en substrat ; ceci est significatif d'une bonne robustesse de la mise en œuvre de la fermentation et de l'évaluation des paramètres.

Cependant, les vitesses de production d'hydrogène à différentes concentrations initiales en substrat présentées dans le tableau 10 et selon les profils de la figure 18, montrent que la vitesse de

production augmentent avec l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à une valeur de 22 mmol/L. Au-delà, une diminution de la vitesse de production est observée. Les performances en termes de rendement d'hydrogène pour les différentes concentrations initiales de substrat diminuent avec l'augmentation de la concentration en substrat. La valeur maximale du rendement d'hydrogène est de 2,39 mol d'hydrogène par mol d'hexose pour la plus faible concentration initiale de substrat (3,7 mmol/L).

Tableau 10 : Variation des rendements et des vitesses maximales de production d'hydrogène à différentes concentrations initiales de substrat

Concentration initiale de substrat (S_0) (mmol. L ⁻¹)	Rendement d'hydrogène (mol H ₂ /mol hexose)	Vitesse maximale de production d'hydrogène (mmol.h ⁻¹)
3,7	2,39	3,5
11,0	1,98	4,7
22,0	2,24	7,0
29,3	2,20	6,4
73,0	1,10	5,8

Dans cette étude, il convient de noter que la vitesse de production d'hydrogène maximale a été obtenue à une concentration initiale en substrat de 22 mmol/L et le rendement maximal en hydrogène est obtenu à une concentration de substrat de 3,7 mmol/L. L'explication possible de cette observation est, d'une part, qu'à une concentration de substrat de 22 mmol/L, la vitesse d'hydrogène produit étant maximale, la quantité d'hexose consommée pour produire cette quantité d'hydrogène est également importante. Ainsi, lorsque le rendement en hydrogène à cette concentration de substrat est calculé en divisant la quantité d'hydrogène produit par l'hexose consommé, il est légèrement plus faible qu'à une concentration de 3,7 mmol/L. En conclusion, un meilleur rendement en hydrogène comparativement à une quantité d'hydrogène produit, est un indicateur de la capacité des bactéries à produire de l'hydrogène.

6- Conclusion

Trois modèles : Monod, Contois et Aiba, ont été utilisés pour décrire la production d'hydrogène en fermentation obscure dans un réacteur avec extraction de gaz en fonctionnement semi-batch. Le modèle de cinétique de Aiba avec facteur de correction s'est révélé être le meilleur modèle avec une très bonne fiabilité. La force de ce modèle modifié est de pouvoir modéliser fidèlement les différentes périodes (latence, croissance bactérienne exponentielle et stationnaire) pour la production d'hydrogène. Les effets de la concentration initiale en substrat sur la production d'hydrogène ont été bien décrits par ce modèle. Dans ces tests de fermentation obscure, en utilisant des cultures mixtes, la vitesse maximale de production d'hydrogène est de 7 mmol.h⁻¹ (168 mL/h) pour une concentration en substrat de 22 mmol/L (13 g/L). Il a été constaté que travailler à une

concentration de substrat plus élevée réduirait l'activité des bactéries et diminuerait donc la production d'hydrogène, inhibée par les conditions de concentration élevée en acides organiques. Une production d'hydrogène accrue a été observée à des conditions de concentration en substrat moins élevées, qui se sont révélées plus favorables à l'amélioration de la vitesse et du rendement de production en hydrogène. Ainsi, il a été confirmé que, non seulement le fait de travailler à des concentrations de substrat plus élevées réduirait l'activité bactérienne et par conséquent la production d'hydrogène, mais aussi que la modélisation permet d'établir un optimum de concentration en substrat pour un système donné. De plus, sur la base de ces travaux de modélisation, le profil de production d'hydrogène en fonction du temps peut être généré de manière fiable [51], ainsi que la période pendant laquelle une production maximale (débit d'hydrogène) peut être établie.

Bibliographie

- [1] I. Boboescu, V. Gherman, M. Ilie, I. Mirel, T. Vintilă, G. Maróti, Exploitation of experimental design methods and mathematical modeling for improving fermentative biohydrogen production processes, *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (2) (2014) 9097-9109
- [2] N. Kythreotou, G. Florides, S.A. Tassou, A review of simple to scientific models for anaerobic digestion, *Renewable Energy*, 71 (2014) 701-714
- [3] Y.C. Lo, W.M. Chen, C.H. Hung, S.D. Chen, J.S. Chang, Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies *Water Res.*, 42 (2008) 827-842
- [4] L. Zhao, Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to hydrogen by *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* W16: Characteristics and kinetics, *Int J Hydrog. Energy*, 44 (18) (2019) 9248-9255
- [5] K.S. Lee, Y.F. Hsu, Y.C. Lo, P.J. Lin, C.Y. Lin, J.S. Chang, Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora, *Int J Hydrog. Energy*, 33 (5) (2008) 1565-1572
- [6] I. Ntaikou, H.N. Gavala, M. Kornaros, G. Lyberatos, Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*, *Int J Hydrog. Energy*, 33 (4) (2008) 1153-1163.
- [7] J.L. Wang, W. Wei, The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models, *Sci China Ser B-Chem* 51 (11) (2008) 1110-1117
- [8] R. Singh, R. Tevatia, D. White, Y. Demirel, P. Blum, Comparative kinetic modeling of growth and molecular hydrogen overproduction by engineered strains of *Thermotoga maritima*, *Int J Hydrog. Energy*, 44 (14) (2019) 7125-7136
- [9] M.D. Putra, A.E. Abasaeed, A more generalized kinetic model for binary substrates fermentations, *Process Biochemistry* 75 (2018) 31-38
- [10] D. Zhang, N. Xiao, K.T. Mahubani, E.A. del Rio-Chanona, N.K.H. Slater, V.S. Vassiliadis, Bioprocess modelling of biohydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris*: Model development and effects of operating conditions on hydrogen yield and glycerol conversion efficiency, *Chemical Engineering Science*, 130 (2015) 68-78
- [11] A. Gadhe, S.S. Sonawane, M.N. Varma, Kinetic analysis of biohydrogen production from complex dairy wastewater under optimized condition, *Int J Hydrog. Energy*, 39 (3) (2014) 1306-1314
- [12] C.Y. Chu, L. Tung, C.Y. Lin, Effect of substrate concentration and pH on biohydrogen production kinetics from food industry wastewater by mixed culture, *Int J Hydrog. Energy*, 38 (35) (2013) 15849-15855
- [13] R. Albanez, G. Lovato, M. Zaiat, S. M. Ratusznei, J. A.D. Rodrigues, Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses, *Int J Hydrog. Energy*, 41 (45) (2016) 20473-20484
- [14] E. Chorukova, I. Simeonov, Mathematical modeling of the anaerobic digestion in two-stage system with production of hydrogen and methane including three intermediate products, *Int J Hydrog. Energy*, févr. 2019 (sous presse)
- [15] J. Monod, The Growth of Bacterial Cultures, *Rev. Microbiol.* 3 (1949) 371-394
- [16] M. Poliafico, Anaerobic digestion: decision support software. MEng. Thesis. Ireland: Department of Civil, Structural and Environmental Engineering. Cork Institute of technology (2007)

- [17] D.E. Contois, Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures, *J. Gen. Microbiol.* 21 (1959) 40-50
- [18] J.F. Andrews, A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol Bioeng*, 10 (1968) 707-723
- [19] F. Bergter, *Wachstum von Mikroorganismen: Experimente und Modelle*. 2. Jena: Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag; 1983 [Growth of microorganisms: experiments and models. Second Edition].
- [20] J.H.T. Luong, Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition, *Biotechnol. Bioeng.* 29 (1987) 242-251
- [21] R. Moletta, D. Verrier, G. Albagnac, Dynamic modelling of anaerobic digestion, *Water Res.* 20 (4) (1986) 427-434
- [22] W.W. Birjukow, W.M. Kantere, *Optimising periodical processes of microbiological synthesis (russ.)*. Moskau: Nauka; 1985
- [23] R. Luedeking, E.L. Piret, A kinetic study of the lactic acid fermentation, *J Biochem Microbiol Technol Eng.*, 1 (1959) 457-461
- [24] Y. Mu, G. Wang, H.Q. Yu, Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures *Bioresour. Technol.*, 97 (2006) 1302-1307
- [25] Y. Mu, H.Q. Yu, G. Wang, A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process, *Water Res.*, 41 (5) (2007) 1152-1160
- [26] J. Obeid, J.P. Magnin, J.M. Flaus, O. Adrot, J.C. Willison, R. Zlatev, Modeling of hydrogen production in batch cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Int. J. Hydrog Energy*, 34 (2009)180-185
- [27] C. Paulo, J. Maggio, M. Soledad, B. Ruggeri, Modeling and Parameter Estimation in Biofuel Discontinuous Production by Hydrogen Forming Bacteria (HFB), *International Conference on Chemical and Process Engineering*, S. Pierucci, Associazione Italiana di Ingegneria Chimica ICheaP-11 - special issue 11th International Conference on Chemical and Process Engineering ; 2-5 June 2013, Milan, Italy. AIDIC, 2013
- [28] J.B.S. Haldane, *Enzymes* (Longmans, Green, New York, 1930 and MIT Press, Cambridge, MA, 1965)
- [29] S. Aiba, M. Shoda, M. Nagatani, Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation, *Biotechnol Bioeng*, 10 (1968) 845-864
- [30] C. Clion, C. Dumas, S. Collin, B. Ernst, Key factors for biohydrogen production by dark fermentation, *The Can. J. Chem. Eng.*, 93 (2) (2015) 309-316
- [31] N. Pradhan, Kinetic modeling of fermentative hydrogen production by *Thermotoga neapolitana*, *Int J Hydrog Energy*, 41 (9) (2016) 4931-4940
- [32] D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin, *Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1)*, IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes, IWA Publishing, London, UK. (2002)
- [33] V. Gadhamshetty, Y. Arudchelvam, N. Nirmalakhandan, D.C. Johnson, Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model, *Int. J. Hydrog. Energy*, 35 (2010) 479-490
- [34] V.H. Edwards, The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 12 (1970) 679-712

- [35] G. Gottschalk Bacterial metabolism (2nd ed.), Springer, New York Inc. (1986)
- [36] W.H. Chen, S.Y. Chen, S. Kumar Khanal, S. Sung, Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation, *Int J Hydrog. Energy.*, 31 (15) (2006) 2170-2178
- [37] C.C. Chen, C.Y. Lin, J.S. Chang Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57 (2001) 56-64
- [38] I. Monroy I, E. Guevara-Lopez, G. Buitron, A mechanistic model supported by data-based classification models for batch hydrogen production with an immobilized photo-bacteria consortium. *Int J Hydrog. Energy*, 41(48) (2016) 22802-22811
- [39] L. Akbari, B.M. Vaziri, Comprehensive modeling of photo-fermentation process for prediction of hydrogen production. *Int J Hydrog. Energy*, 42(21) (2017) 14449-14457
- [40] W.H. Chen, S.Y. Chen, S.K. Khanal, S.W. Sung, Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *Int J Hydrog. Energy*, 31 (15) (2016) 2170-2178
- [41] Y. Sun, G. Yang, J. Zhang, C. Wen, et Z. Sun, Optimization and kinetic modeling of an enhanced bio-hydrogen fermentation with the addition of synergistic biochar and nickel nanoparticle, *Int J Energy Research*, 43 (2) (2019) 983-999
- [42] M.R. Boni, S. Scaffoni, L. Tuccinardi, P. Viotti, Development and calibration of a model for biohydrogen production from organic waste, *Waste Management*, 33 (5) (2013) 1128-1135
- [43] M. Elsamadony, A. Tawfik, A. Danial, M. Suzuki, Optimization of hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) dry anaerobic digestion with analysis of microbial community: Optimization of H₂ production from OFMSW via dry anaerobic digestion, *Int J Energy Research*, 39 (7) (2015) 929-940
- [44] P. Mullai, E. R. Rene, K. Sridevi, Biohydrogen Production and Kinetic Modeling Using Sediment Microorganisms of Pichavaram Mangroves, India, *BioMed Research International*, 2013 (2013) 1-9
- [45] V.H. Edwards, The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics, *Biotechnol. Bioeng.*, 12 (1970) 679-712
- [46] M. Gerber, R. Span (2008), An Analysis of Available Mathematical Models for Anaerobic Digestion of Organic Substances for Production of Biogas. IGRC2008, Paris
- [47] I. Angelidaki, L. Ellegaard, B.K. Ahring, A Mathematical Model for Dynamic Simulation of Anaerobic Digestion of Complex Substrates: Focusing on Ammonia Inhibition, *Biotechnology and Bioengineering*, 42 (1993) 159 - 166
- [48] S. Eker, M. Sarp, Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations, *Int. J. Hydrog. Energy*, 42 (2017) 2562-2568
- [49] H. Argun, F. Kargi, I.K. Kapdan, R. Oztekin, Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: effects of the initial substrate and biomass concentrations, *Int. J. Hydrog. Energy*, 33 (2008) 6109-6115
- [50] W. Han, D.N. Liu, Y.F. Li, H.T. Zhao, N.Q. Ren, Utilization of wheat for biohydrogen production by a combination of solid-state fermentation and batch fermentation, *Int J Hydrog. Energy*, 40 (17) (2015) 5849-5855
- [51] Z. Guellout, V. Clion, Y. Benguerba, C. Dumas, B. Ernst, Study of the dark fermentative hydrogen production using modified ADM1 models, *Biochemical Engineering Journal*, 132 (2018) 9-19

Chapitre 4

Modélisation des cinétiques réactionnelles
du procédé de production d'hydrogène par
fermentation endogène : effet de la teneur
initiale en biomasse

1- Introduction

Plusieurs études sur la production d'hydrogène par fermentation obscure ont été réalisées en utilisant un substrat modèle (glucose ou saccharose) comme source de carbone et des cultures pures comme *inoculum*, telles que les *Clostridies* pour produire de l'hydrogène [1,2]. Cependant, les coûts de production engendrés par l'utilisation de glucides simples et de cultures pures peuvent être problématiques pour les applications industrielles, en plus du risque de contamination.

Ainsi, d'autres études utilisent des déchets alimentaires, des résidus de récoltes agricoles ou des déchets agro-industriels comme sources de substrat [3], avec souvent des boues de station d'épuration (boues anaérobies prétraitées) comme *inoculum* biologique produisant de l'hydrogène [4-6]. Cependant, ces sources de substrat (déchets alimentaires, déchets agro-industriels, etc.) peuvent contenir des microorganismes ; or, si l'on souhaite mener une fermentation grâce à l'*inoculum* ajouté (fermentation exogène), cela peut nécessiter une étape supplémentaire coûteuse de stérilisation du substrat [7,8]. De plus, il est difficile d'appliquer ces méthodes de stérilisation à l'échelle industrielle.

Selon la littérature, la production biologique d'hydrogène par auto-fermentation (fermentation anaérobie de déchets sans addition d'*inoculum*) est plus pratique et moins coûteuse que les procédés précédents. Malgré ces atouts, peu d'études [9-12] ont rapporté la production d'hydrogène par fermentation obscure à partir de déchets provenant de la microflore naturelle de la biomasse utilisée.

Pour transférer le procédé de fermentation obscure de l'échelle laboratoire à une application industrielle, il est nécessaire de modéliser et d'optimiser le processus fermentaire. Malgré la multitude d'études sur la production d'hydrogène par fermentation utilisant les modèles mathématiques, ces derniers restent limités [13]. De plus, la production d'hydrogène par fermentation obscure endogène à la biomasse étant récemment privilégiée, un modèle cinétique décrivant ce processus n'a pas encore été proposé ; de plus, les paramètres cinétiques biologiques ne sont pas toujours bien exploités et compris dans la littérature.

L'objectif de ce chapitre est donc de développer un modèle mathématique décrivant le procédé de production d'hydrogène par un consortium bactérien endogène à la biomasse sélectionnée. Une optimisation de la charge initiale de la biomasse utilisée est également réalisée dans le cadre de cette étude. Ce chapitre est composé de deux parties. Dans un premier temps, différents schémas de voies métaboliques sont proposés pour trouver le modèle le plus approprié pour décrire toutes les voies métaboliques des bactéries présentes dans le milieu réactionnel. Le modèle est créé en se référant aux modèles mathématiques développés par Buehler *et al.* (2016) [13] pour la fermentation ABE (acétone-butanol-éthanol) par *Clostridium acetobutylicum*, en utilisant les réactions partielles des métabolites générés dans le milieu réactionnel, et en utilisant

les travaux de Whang *et al.* (2006) [14], qui décrivent la production d'hydrogène par fermentation en utilisant deux types de substrats (glucose et peptone).

Dans un second temps, une optimisation du rendement de production d'hydrogène est réalisée par le test de différentes charges initiales de biomasses.

2- Mise en œuvre des expériences de fermentation

Dans ce chapitre, une biomasse vitivinicole, issu du débouillage des moûts de raisin, appelée bourbes, a été utilisée. Cette biomasse est considérée comme à double fonction car elle contient une source microbienne endogène ainsi que la source de substrats nécessaire à la production d'hydrogène par fermentation obscure.

Les conditions de fonctionnement du bioréacteur optimisé précédemment sont utilisées dans cette étude. Dans un premier temps, la charge initiale de biomasse est prise égale à 14 g DCO/L. Le pH (> 5,7) du milieu ainsi que la température (37°C) sont régulés. Plusieurs charges de biomasse ont été testées pour optimiser la production d'hydrogène endogène à la biomasse : 28, 60 et 95 g DCO/L. Les données obtenues au cours des études expérimentales en laboratoire ont été utilisées pour calibrer les paramètres cinétiques du modèle.

2.1- Métabolites produits

La figure 19 représente les gaz et les métabolites produits dans le milieu réactionnel, ainsi que la dégradation des substrats durant la fermentation de la biomasse avec une charge égale à 14 g DCO/L.

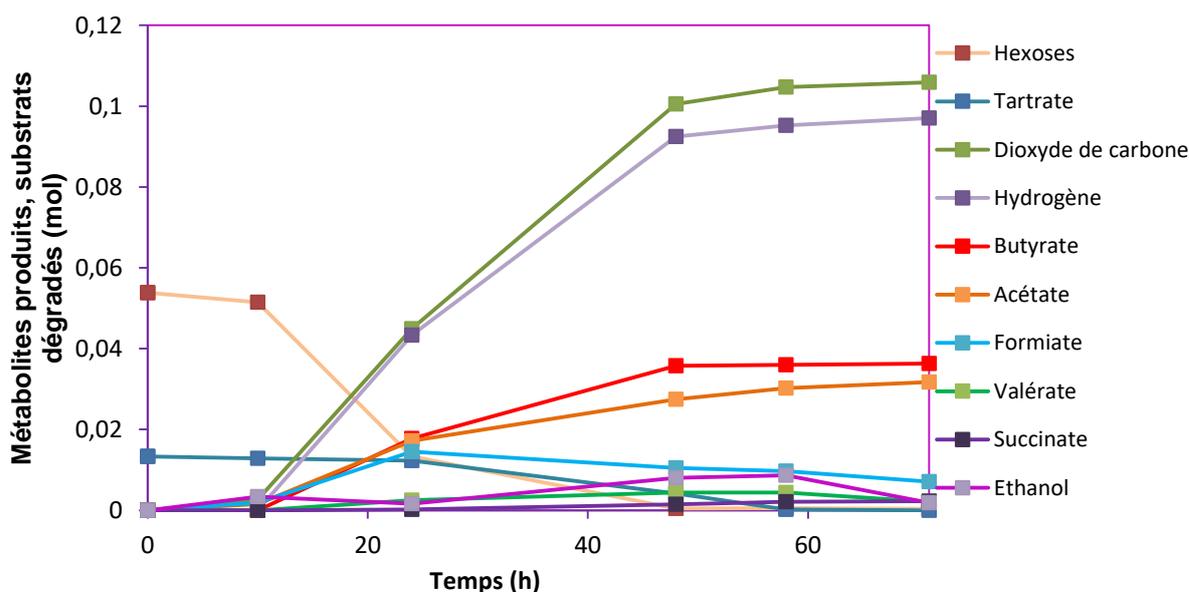


Figure 19 : Variation de la consommation des substrats (hexoses et tartrate) et de la formation des métabolites (éthanol, acétate, butyrate, formiate, valérate et succinate) et des gaz (hydrogène et dioxyde de carbone) au cours du temps

La figure 19 montre que les productions d'hydrogène, de dioxyde de carbone, de butyrate et d'acétate sont majoritaires par rapport aux autres produits. De plus, la production de la plupart des métabolites est simultanée et commence après 10 heures de fermentation. D'autre part, la biomasse est constituée de deux types de substrats qui sont dégradés en fonction du temps. Les hexoses (glucose et fructose) se trouvent à des quantités initiales relativement élevées (54 mmol en cumulé) et à 13 mmol pour le tartrate.

2.2- Analyse des microorganismes

Le tableau 11 résume les pourcentages d'abondance des microorganismes majoritaires présents dans le milieu réactionnel après 24 heures de fermentation pour les différentes charges de biomasse.

Tableau 11 : Espèces bactériennes présentes dans le milieu réactionnel pour différentes charges de biomasse

Teneur de la charge en DCO	14g DCO/L	28 g DCO/L	60 g DCO/L	95 g DCO/L
<i>Clostridium</i> sp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i> , <i>bifementans</i>)	89,8%	87,4%	71,6%	59,3%
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0,1%	0,1%	0,1%	5,6%
<i>Enterococcus villorum</i>	0,8%	2,8%	5,2%	31,2%
<i>Enterobacter/Klebsiella/Proteus</i>	0,1%	5,2%	1,2%	0,5%
Quantité de biomasse bactérienne à 24 heures établie par qPCR (copies de gènes/ μ l d'ADN)	$7,27.10^8$	$2,54.10^8$	$1,65.10^9$	$2,96.10^9$

Le tableau 11 montre que la biomasse est composée d'un consortium bactérien. Les *clostridies* sont les espèces bactériennes majoritairement présentes quelle que soit la charge de biomasse. Cependant, le pourcentage de ces bactéries diminue avec l'augmentation de la charge de biomasse. A forte teneur en DCO, le consortium est également composé d'*Enterococcus villorum* (31,2%) et de *Lactobacillus johnsonii* (5,6%). On remarque, spécifiquement pour *Enterococcus villorum* que le pourcentage de ces bactéries augmente avec l'augmentation de la charge de biomasse. Les *Enterobacter* sont présentes à de faibles pourcentages dans des charges de DCO intermédiaires (28 et 60 g DCO/L) avec un maximum de 5,2% à 28 g DCO/L.

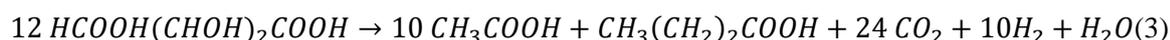
Les *clostridies* sont les bactéries majoritaires responsables de la dégradation des hexoses pour produire l'hydrogène par les voies de production d'acide acétique et d'acide butyrique [15] selon les équations (1) et (2) :



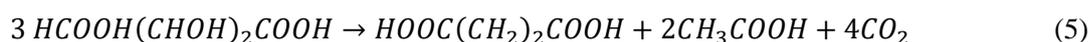
Certaines espèces du genre *Clostridium* (*Clostridium butyricum* par exemple) sont également capables de produire l'hydrogène à partir de glucose en produisant du formiate comme intermédiaire [16]. D'autre part, ces bactéries peuvent également produire d'autres métabolites par

des voies concurrentes à la production d'hydrogène vis-à-vis du substrat (comme l'éthanol et le lactate) ou des voies consommatrices d'hydrogène (comme le propionate, le succinate et le valérate). D'autres genres de bactéries sont également capables de dégrader les sucres par fermentation comme *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Enterobacter* et *Escherichia* pour produire respectivement le lactate, le propionate ainsi que l'hydrogène [15].

D'autre part, le tartrate, présent dans la biomasse sélectionnée, peut être également dégradé par *Clostridium butyricum* [17] selon l'équation 3 :



Lactobacillus plantarum et *Lactobacillus brevis* sont les bactéries responsables à la dégradation du tartrate, où l'acétate et le dioxyde de carbone sont les deux produits résultants lors de la fermentation [18]. *Lactobacillus plantarum* produit du lactate, de l'acétate et du dioxyde de carbone (4) alors que *Lactobacillus brevis* produit du succinate et de l'acétate (5).



D'après les travaux de thèse d'Emilie François-Lopez (2016) [19], *Enterococcus villorum* peut également dégrader le tartrate pour produire de l'acétate ainsi que du succinate.

3- Voies métaboliques empruntées

D'après les sections 2.1 et 2.2, donnant la description des métabolites présents dans le milieu réactionnel et les microorganismes responsables de la dégradation des deux substrats composant la biomasse initialement, plusieurs schémas peuvent décrire les voies métaboliques proposées pour identifier le rôle de chaque espèce bactérienne, ainsi que l'effet de la culture mixte sur le processus de production de l'hydrogène :

- (i) D'après la littérature, les clostridies sont les bactéries responsables de la dégradation des hexoses ; d'autre part, les lactobacilles sont les bactéries responsables de la dégradation du tartrate. Ainsi, le premier schéma consiste à considérer les voies métaboliques empruntées par ces deux genres bactériens (modèle 1).
- (ii) Le deuxième schéma (modèle 2) consiste à considérer les voies de dégradation des hexoses et du tartrate par plusieurs genres de bactéries respectivement : *Clostridium*, *Enterobacter*, *Propionibacterium* et *Escherichia*, et *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Clostridium butyricum*.
- (iii) D'après les résultats d'analyse bactérienne, les clostridies sont les bactéries majoritaires. Ainsi, le troisième schéma (modèle 3) consiste en la dégradation des hexoses et du tartrate par des clostridies uniquement.

- (iv) Le quatrième schéma (modèle 4) consiste en la dégradation des substrats par les genres bactériens trouvés expérimentalement dans le milieu réactionnel.

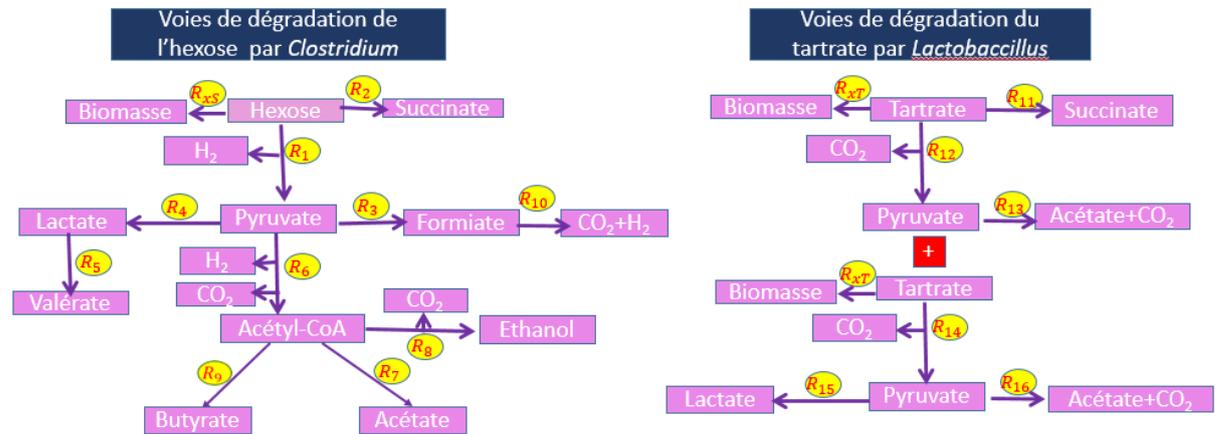


Figure 20 : Schéma n°1 (modèle 1) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par, respectivement, les espèces des genres *Clostridium* et *Lactobacillus*

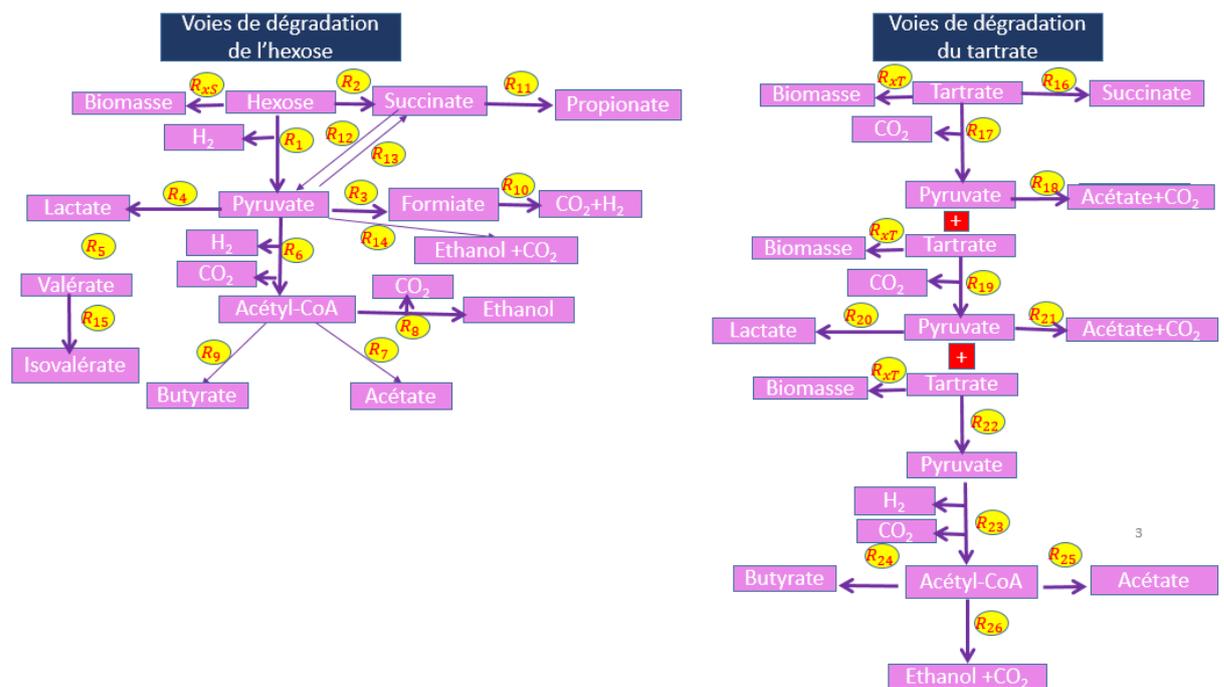


Figure 21 : Schéma n°2 (modèle 2) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par les microorganismes issus de la littérature

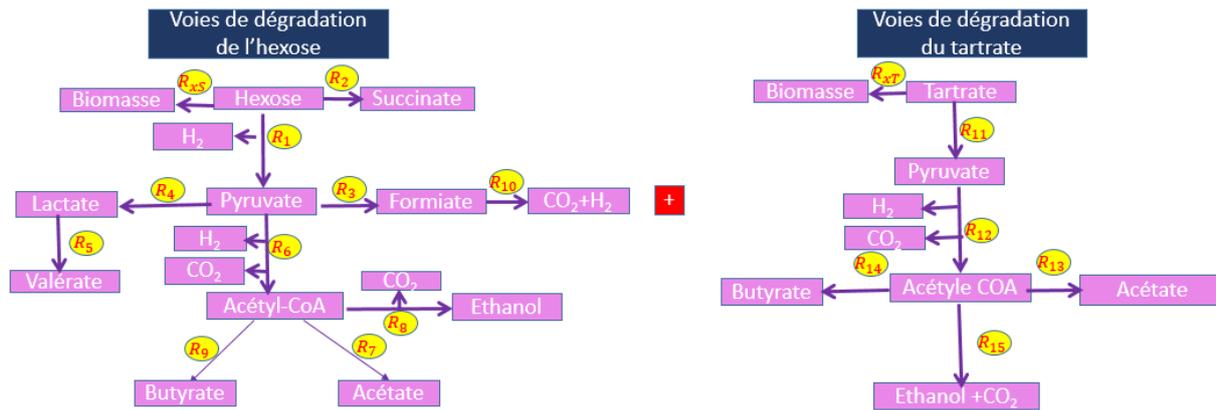


Figure 22 : Schéma n°3 (modèle 3) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par les espèces du genre *Clostridium*

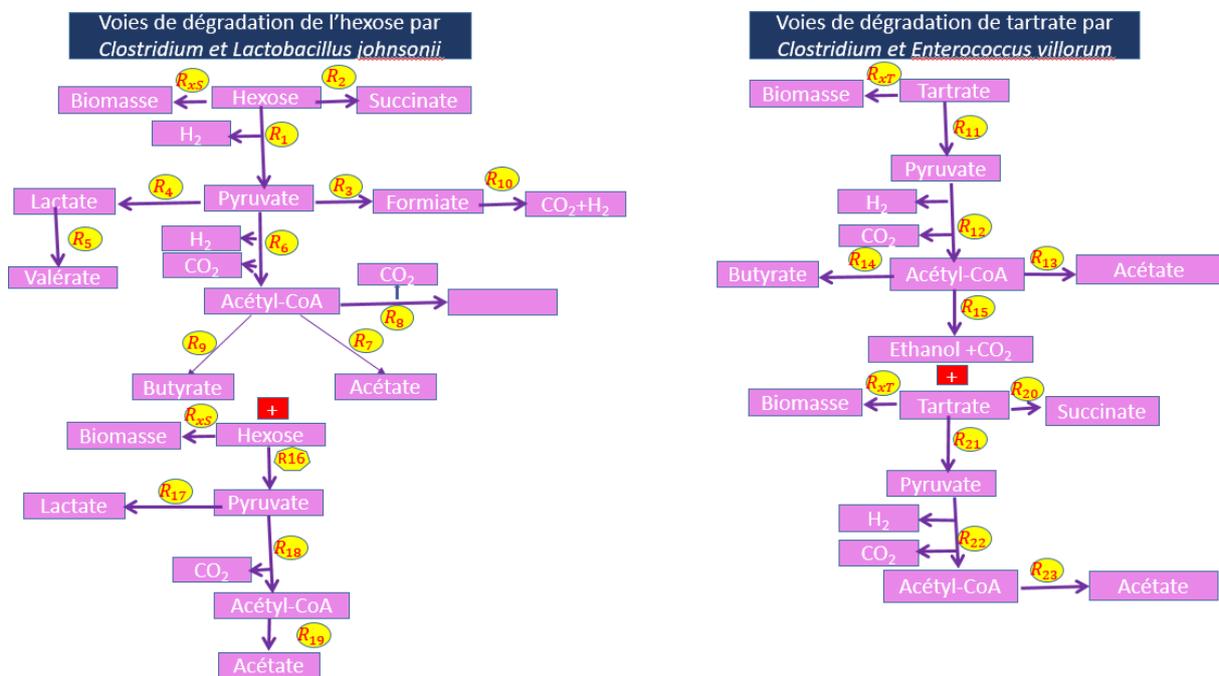


Figure 23 : Schéma n°4 (modèle 4) : Voies de dégradation de l'hexose et du tartrate par les microorganismes présents dans le milieu réactionnel expérimental et analysés par séquençage de l'ARN 16S

A partir des schémas présentés dans les figures ci-dessus, des modèles mathématiques ont été proposés en se basant sur les réactions partielles qui décrivent la conversion des substrats et la formation des divers métabolites.

4- Développement d'un modèle mathématique

A partir des résultats expérimentaux, il est possible de tracer les vitesses de croissance des bactéries, de consommation des substrats et de formation de l'hydrogène. Ceci est présenté sur la figure 24.

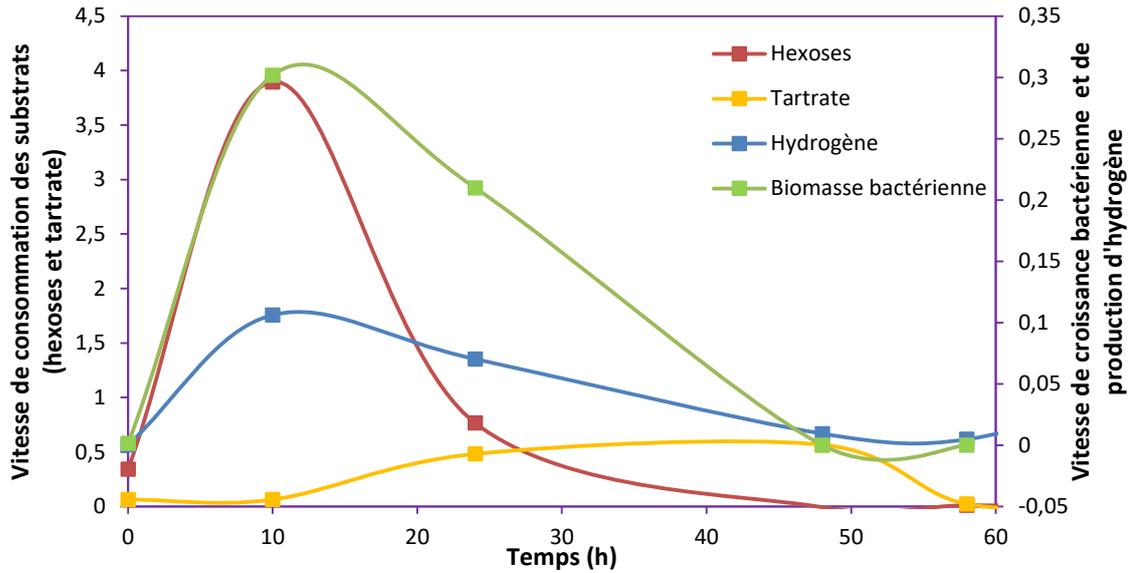


Figure 24 : Vitesse de consommation des substrats (hexoses et tartrate), croissance bactérienne (biomasse) et production d'hydrogène en fonction du temps

Selon la figure 24, on observe que les profils de vitesse sont différents. En effet, la vitesse de consommation des hexoses est plus élevée que celle du tartrate. Ce dernier commence à être consommé après 10 heures de fermentation alors que les hexoses sont consommés dès le début de la fermentation. Pour cela, il est recommandé d'étudier la consommation de chacun des substrats indépendamment.

La forme générale des équations différentielles descriptives de la croissance des bactéries, de la consommation des substrats et de la formation des produits sont les suivantes :

$$\frac{dX}{dt} = R_{XS} + R_{XT} - R_d \quad \text{Croissance bactérienne} \quad (6)$$

$$\frac{dS}{dt} = -1/Y_{SP} * \sum(R_i) - Y_S * R_{XS} \quad \text{Consommation des hexoses} \quad (7)$$

$$\frac{dT}{dt} = -1/Y_{TP} * \sum(R_j) - Y_T * R_{XT} \quad \text{Consommation de tartrate} \quad (8)$$

$$\frac{dP}{dt} = [Y_{P-S} * \sum R_k + Y_{P-T} * \sum R_l - \sum R_m]FC \quad \text{Formation des produits} \quad (9)$$

où X, S, T et P sont respectivement les quantités de biomasse bactérienne, d'hexoses, de tartrate et des produits ; R_{XS} et R_{XT} relèvent des cinétiques de croissance bactérienne relatives respectivement aux hexoses et au tartrate.

Dans notre cas, il existe deux substrats et donc, selon Yoon *et al.* (1977) [20] et Segel *et al.* (1975) [21], des interactions entre ces deux produits peuvent exister ; par conséquent, le modèle d'Andrews modifié [22] a été utilisé selon les équations (10) et (11).

$$R_{XS} = \mu_{maxS} \frac{S * X}{K_S + S + K_{IT} * T} \quad (10)$$

$$R_{XT} = \mu_{maxT} \frac{T \cdot X}{K_T + T + K_{IS} \cdot S} \quad (11)$$

Dans ces équations, K_{IT} et K_{IS} sont respectivement le coefficient d'inhibition de dégradation des hexoses par le tartrate et le coefficient d'inhibition de dégradation du tartrate par les hexoses. Cependant, dans notre cas, le tartrate n'inhibe pas la consommation des hexoses ; par conséquent, $K_{IT} = 0$.

R_d correspond à la cinétique de mortalité des bactéries ($R_d = K_d X$) ; R_i et R_j sont les cinétiques de réactions numérotées i ou j de premier ordre de dégradation des substrats (hexoses (S) et tartrate (T)) en d'autres produits $R_{i,j} = v_{max i,j} \frac{(S,T) \cdot X}{K_{i,j} + (S,T)}$; R_k est la cinétique de formation du produit (P) à partir des hexoses $R_k = v_{max k} \frac{S \cdot X}{K_k + S}$ avec k le numéro de réaction; R_l est la cinétique de formation du produit (P) à partir de tartrate $R_l = v_{max l} \frac{T \cdot X}{K_l + T}$ avec l le numéro de réaction; R_m est la cinétique de transformation du produit (P) en d'autres produits $R_m = v_{max m} \frac{P \cdot X}{K_m + P}$ avec m le numéro de réaction; Y_S et Y_T sont les rendements de consommation des substrats par les bactéries ; Y_{SP} et Y_{TP} sont les rendements de dégradation des substrats en d'autres produits ; Y_{P-S} et Y_{P-T} les rendements instantanés des métabolites par rapport aux hexoses et au tartrate et FC est le facteur de correction, définie par l'équation (12), avec K_{IP} le coefficient du facteur de correction.

$$FC = 1 - \exp\left(-\frac{(S+T)}{K_{IP}}\right) \quad (12)$$

Le tableau 12 résume les équations différentielles ainsi que les cinétiques utilisées pour les quatre schémas proposés.

Tableau 12 : Equations différentielles et cinétiques utilisées pour les 4 schémas réactionnels proposés.

Schéma n°1 (modèle 1)	Equations différentielles	Cinétiques
	$\frac{dX}{dt} = R_{XS} + R_{XT} - R_d$	$R_1 = CS * \frac{v_{max1} \cdot S}{K_1 + S} \cdot X$
	$\frac{dS}{dt} = -1/Y_{SP} * (R_1 + R_2) - Y_S * R_{XS}$	$R_2 = CS * \frac{v_{max2} \cdot S}{K_2 + S} \cdot X$
	$\frac{dT}{dt} = -1/Y_{TP} * (R_{11} + R_{12} + R_{14}) - Y_T * R_{XT}$	$R_3 = \frac{v_{max3} \cdot PYR}{K_3 + PYR} \cdot X$
	$\frac{dSC}{dt} = (Y_{SC-S} * R_2 + Y_{SC-T} * R_{11})FC$	$R_4 = \frac{v_{max4} \cdot PYR}{K_4 + PYR} \cdot X$
	$\frac{dPYR}{dt} = (Y_{PYR-S} * (R_1) + Y_{PYR-T} * (R_{12} + R_{14}) - (R_3 + R_4 + R_6 + R_{13} + R_{15} + R_{16}))FC$	$R_5 = \frac{v_{max5} \cdot LAC}{K_5 + LAC} \cdot X$
	$\frac{dLAC}{dt} = (Y_{LAC-S} * (R_4) + Y_{LAC-T} * (R_{15}) - R_5)FC$	$R_6 = \frac{v_{max6} \cdot PY}{K_6 + PY} \cdot X$
	$\frac{dVAR}{dt} = (R_5)FC$	$R_7 = \frac{v_{max7} \cdot ACO}{K_7 + ACO} \cdot X$
	$\frac{dACO}{dt} = (R_6 - (R_7 + R_8 + R_9))FC$	$R_8 = \frac{v_{max8} \cdot ACO}{K_8 + ACO} \cdot X$
	$\frac{dAC}{dt} = (Y_{AC-S} * (R_7) + Y_{AC-T} * (R_{13} + R_{16}))FC$	$R_9 = \frac{v_{max9} \cdot ACO}{K_9 + ACO} \cdot X$
	$\frac{dETH}{dt} = (R_8)FC$	$R_{10} = \frac{v_{max10} \cdot FORM}{K_{10} + FORM} \cdot X$
	$\frac{dBUT}{dt} = (R_9)FC$	$R_{11} = CT * \frac{v_{max11} \cdot T}{K_{11} + T} \cdot X$
	$\frac{dFOR}{dt} = (R_3 - R_{10})FC$	$R_{12} = CT * \frac{v_{max12} \cdot T}{K_{12} + T} \cdot X$
	$\frac{dCO2}{dt} = (Y_{CO2-S} * (R_6 + R_8 + R_{10}) + Y_{CO2-T} * (R_{12} + R_{14}) - R_2)FC$	$R_{13} = \frac{v_{max13} \cdot PYR}{K_{13} + PYR} \cdot X$
		$R_{14} = CT * \frac{v_{max14} \cdot T}{K_{14} + T} \cdot X$
		$R_{15} = \frac{v_{max15} \cdot PYR}{K_{15} + PYR} \cdot X$

<p>Schéma n°2 (modèle 2)</p>	$\frac{dH_2}{dt} = (R_1 + R_6 + R_{10})FC$ $\frac{dX}{dt} = R_{XS} + R_{XT} - R_d$ $\frac{dS}{dt} = -1/Y_{SP} * (R_1 + R_2) - Y_S * R_{XS}$ $\frac{dT}{dt} = -1/Y_{TP} * (R_{16} + R_{17} + R_{19} + R_{22}) - Y_T * R_{XT}$ $\frac{dSC}{dt} = (Y_{SC-S} * (R_2 + R_{13}) + Y_{SC-T} * R_{16} - (R_{12} + R_{11}))FC$ $\frac{dPYR}{dt} = (Y_{PYR-S} * (R_1 + R_{12}) + Y_{PYR-T} * (R_{17} + R_{19} + R_{22}) - (R_3 + R_4 + R_6 + R_{13} + R_{14} + R_{18} + R_{20} + R_{21} + R_{23}))FC$ $\frac{dLAC}{dt} = ((Y_{LAC-S} * (R_4) + Y_{LAC-T} * (R_{20}) - R_5)FC$ $\frac{dVAR}{dt} = (R_5 - R_{15})FC$ $\frac{dACO}{dt} = (Y_{ACO-S} * (R_6) + Y_{ACO-T} * (R_{23}) - (R_7 + R_8 + R_9 + R_{24} + R_{25} + R_{26}))CF$ $\frac{dAC}{dt} = (Y_{AC-S} * (R_7) + Y_{AC-T} * (R_{18} + R_{21} + R_{25}))FC$ $\frac{dETH}{dt} = (Y_{ETH-S} * (R_8 + R_{14}) + Y_{ETH-T} * (R_{26}))FC$ $\frac{dBUT}{dt} = (Y_{BUT-S} * (R_9) + Y_{BUT-T} * (R_{24}))FC$ $\frac{dFOR}{dt} = (R_3 - R_{10})FC$ $\frac{dCO_2}{dt} = (Y_{CO_2-S} * (R_6 + R_8 + R_{10} + R_{14}) + Y_{CO_2-T} * (R_{17} + R_{18} + R_{19} + R_{21} + R_{23} + R_{26}) - R_2)FC$ $\frac{dH_2}{dt} = (Y_{H_2-S} * (R_1 + R_6 + R_{10}) + Y_{CO_2-T} * (R_{23}) - R_{11})FC$	$R_{16} = \frac{v_{max16} * PYR}{K_{16} + PYR} * X$ $R_1 = CS * \frac{v_{max1} * S}{K_1 + S} * X$ $R_2 = CS * \frac{v_{max2} * S}{K_2 + S} * X$ $R_3 = \frac{v_{max3} * PYR}{K_3 + PYR} * X$ $R_4 = \frac{v_{max4} * PYR}{K_4 + PYR} * X$ $R_5 = \frac{v_{max5} * LAC}{K_5 + LAC} * X$ $R_6 = \frac{v_{max6} * PYR}{K_6 + PYR} * X$ $R_7 = \frac{v_{max7} * ACO}{K_7 + ACO} * X$ $R_8 = \frac{v_{max8} * ACO}{K_8 + ACO} * X$ $R_9 = \frac{v_{max9} * ACO}{K_9 + ACO} * X$ $R_{10} = \frac{v_{max10} * FORM}{K_{10} + FORM} * X$ $R_{11} = \frac{v_{max11} * SC}{K_{11} + SC} * X$ $R_{12} = \frac{v_{max12} * SC}{K_{12} + SC} * X$ $R_{13} = \frac{v_{max13} * PYR}{K_{13} + PYR} * X$ $R_{14} = \frac{v_{max14} * PYR}{K_{14} + PYR} * X$ $R_{15} = \frac{v_{max15} * VAR}{K_{15} + VAR} * X$ $R_{16} = CT * \frac{v_{max16} * T}{K_{16} + T} * X$ $R_{17} = CT * \frac{v_{max17} * T}{K_{17} + T} * X$ $R_{18} = \frac{v_{max18} * PYR}{K_{18} + PYR} * X$ $R_{19} = CT * \frac{v_{max19} * T}{K_{19} + T} * X$ $R_{20} = \frac{v_{max20} * PYR}{K_{20} + PYR} * X$ $R_{21} = \frac{v_{max21} * PYR}{K_{21} + PYR} * X$ $R_{22} = CT * \frac{v_{max22} * T}{K_{22} + T} * X$ $R_{23} = \frac{v_{max23} * PYR}{K_{23} + PYR} * X$ $R_{24} = \frac{v_{max24} * ACO}{K_{24} + ACO} * X$ $R_{25} = \frac{v_{max25} * ACO}{K_{25} + ACO} * X$ $R_{26} = \frac{v_{max26} * ACO}{K_{26} + ACO} * X$
<p>Schéma n°3 (modèle 3)</p>	$\frac{dX}{dt} = R_{XS} + R_{XT} - R_d$ $\frac{dS}{dt} = -1/Y_{SP} * (R_1 + R_2) - Y_S * R_{XS}$ $\frac{dT}{dt} = -1/Y_{TP} * (R_{11}) - Y_T * R_{XT}$ $\frac{dSC}{dt} = (R_2)FC$ $\frac{dPYR}{dt} = (Y_{PYR-S} * (R_1) + Y_{PYR-T} * (R_{11}) - (R_3 + R_4 + R_6 + R_{12})) * FC$ $\frac{dLAC}{dt} = (R_4 - R_5) * FC$ $\frac{dVAR}{dt} = (R_5) * FC$ $\frac{dACO}{dt} = (Y_{ACO-S} * (R_6) + Y_{ACO-T} * (R_{12}) - (R_7 + R_8 + R_9 + R_{13} + R_{14} + R_{15})) * FC$ $\frac{dAC}{dt} = (Y_{AC-S} * (R_7) + Y_{AC-T} * (R_{13})) * FC$ $\frac{dETH}{dt} = (Y_{ETH-S} * (R_8) + Y_{ETH-T} * (R_{15})) * FC$ $\frac{dBUT}{dt} = (Y_{BUT-S} * (R_9) + Y_{BUT-T} * (R_{14})) * FC$ $\frac{dFOR}{dt} = (R_3 - R_{10}) * FC$ $\frac{dCO_2}{dt} = (Y_{CO_2-S} * (R_6 + R_8 + R_{10}) + Y_{CO_2-T} * (R_{12} + R_{15}) - R_2) * FC$ $\frac{dH_2}{dt} = (Y_{H_2-S} * (R_1 + R_6 + R_{10}) + Y_{CO_2-T} * (R_{12})) * FC$	$R_1 = CS * \frac{v_{max1} * S}{K_1 + S} * X$ $R_2 = CS * \frac{v_{max2} * S}{K_2 + S} * X$ $R_3 = \frac{v_{max3} * PYR}{K_3 + PYR} * X$ $R_4 = \frac{v_{max4} * PYR}{K_4 + PYR} * X$ $R_5 = \frac{v_{max5} * LAC}{K_5 + LAC} * X$ $R_6 = \frac{v_{max6} * PYR}{K_6 + PYR} * X$ $R_7 = \frac{v_{max7} * ACO}{K_7 + ACO} * X$ $R_8 = \frac{v_{max8} * ACO}{K_8 + ACO} * X$ $R_9 = \frac{v_{max9} * ACO}{K_9 + ACO} * X$ $R_{10} = \frac{v_{max10} * FORM}{K_{10} + FORM} * X$ $R_{11} = CT * \frac{v_{max11} * T}{K_{11} + T} * X$ $R_{12} = \frac{v_{max12} * PYR}{K_{12} + PYR} * X$ $R_{13} = \frac{v_{max13} * ACO}{K_{13} + ACO} * X$ $R_{14} = \frac{v_{max14} * ACO}{K_{14} + ACO} * X$ $R_{15} = \frac{v_{max15} * ACO}{K_{15} + ACO} * X$
<p>Schéma n°4 (modèle 4)</p>	$\frac{dX}{dt} = R_{XS} + R_{XT} - R_d$ $\frac{dS}{dt} = -1/Y_{SP} * (R_1 + R_2 + R_{16}) - Y_S * R_{XS}$ $\frac{dT}{dt} = -1/Y_{TP} * (R_{11} + R_{20} + R_{21}) - Y_T * R_{XT}$ $\frac{dSC}{dt} = (Y_{SC-S} * R_2 + Y_{SC-T} * R_{20}) * FC$	$R_1 = CS * \frac{v_{max1} * S}{K_1 + S} * X$ $R_2 = CS * \frac{v_{max2} * S}{K_2 + S} * X$ $R_3 = \frac{v_{max3} * PYR}{K_3 + PYR} * X$ $R_4 = \frac{v_{max4} * PYR}{K_4 + PYR} * X$

$\frac{dPYR}{dt} = (Y_{PYR-S} * (R_1 + R_{16}) + Y_{PYR-T} * (R_{11} + R_{21}) - (R_3 + R_4 + R_6 + R_{12} + R_{17} + R_{18} + R_{22})) * FC$ $\frac{dLAC}{dt} = (R_4 + R_{17} - R_5) * FC$ $\frac{dVAR}{dt} = (R_5) * FC$ $\frac{dACO}{dt} = (Y_{ACO-S} * (R_6 + R_{18}) + Y_{ACO-T} * (R_{12} + R_{22}) - (R_7 + R_8 + R_9 + R_{13} + R_{14} + R_{15} + R_{19} + R_{23})) * FC$ $\frac{dAC}{dt} = (Y_{AC-S} * (R_7 + R_{19}) + Y_{AC-T} * (R_{13} + R_{23})) * FC$ $\frac{dETH}{dt} = (Y_{ETH-S} * (R_8) + Y_{ETH-T} * (R_{15})) * FC$ $\frac{dBUT}{dt} = (Y_{BUT-S} * (R_9) + Y_{BUT-T} * (R_{14})) * FC$ $\frac{dFOR}{dt} = (R_3 - R_{10}) * FC$ $\frac{dCO_2}{dt} = (Y_{CO_2-S} * (R_6 + R_8 + R_{10} + R_{18}) + Y_{CO_2-T} * (R_{12} + R_{15} + R_{22}) - R_2) * FC$ $\frac{dH_2}{dt} = (Y_{H_2-S} * (R_1 + R_6 + R_{10}) + Y_{CO_2-T} * (R_{12} + R_{22})) * FC$	$R_5 = \frac{v_{max5} * LAC}{K_5 + LAC} * X$ $R_6 = \frac{v_{max6} * PYR}{K_6 + PYR} * X$ $R_7 = \frac{v_{max7} * ACO}{K_7 + ACO} * X$ $R_8 = \frac{v_{max8} * ACO}{K_8 + ACO} * X$ $R_9 = \frac{v_{max9} * ACO}{K_9 + ACO} * X$ $R_{10} = \frac{v_{max10} * FORM}{K_{10} + FORM} * X$ $R_{11} = CT * \frac{v_{max11} * T}{K_{11} + T} * X$ $R_{12} = \frac{v_{max12} * PYR}{K_{12} + PYR} * X$ $R_{13} = \frac{v_{max13} * ACO}{K_{13} + ACO} * X$ $R_{14} = \frac{v_{max14} * ACO}{K_{14} + ACO} * X$ $R_{15} = \frac{v_{max15} * ACO}{K_{15} + ACO} * X$ $R_{16} = CS * \frac{v_{max16} * S}{K_{16} + S} * X$ $R_{17} = \frac{v_{max17} * PYR}{K_{17} + PYR} * X$ $R_{18} = \frac{v_{max18} * PYR}{K_{18} + PYR} * X$ $R_{19} = \frac{v_{max19} * ACO}{K_{19} + ACO} * X$ $R_{20} = CT * \frac{v_{max20} * T}{K_{20} + T} * X$ $R_{21} = CT * \frac{v_{max21} * T}{K_{21} + T} * X$ $R_{22} = \frac{v_{max22} * PYR}{K_{22} + PYR} * X$ $R_{23} = \frac{v_{max23} * ACO}{K_{23} + ACO} * X$
--	--

X : quantité de la biomasse bactérienne, S : quantité de substrat (hexoses), T : quantité de substrat (tartrate), SC : quantité de succinate produit, PYR : quantité de pyruvate produit, LAC : quantité de lactate produit, VAR : quantité de valérate produit, ACO : quantité d'acétyl-CoA produit, AC : quantité d'acétate produit, ETH : quantité d'éthanol produit, BUT : quantité de butyrate produit, FOR : quantité de formiate produit, CO₂ : quantité de dioxyde de carbone produit, H₂ : quantité d'hydrogène produit ; CS et CT sont les coefficients de condition temporelle CS=0 à temps ≤ 10 h et CS=1 à temps ≥ 10 h ; CT=0 à temps ≤ 20 h et CT=1 à temps ≥ 20 h.

Selon le tableau 2, plusieurs paramètres ont besoin d'être estimé. D'un point de vue mathématique, l'estimation de plusieurs paramètres simultanément peut conduire à une incertitude du modèle proposé. Pour cela, deux stratégies ont été utilisées pour réduire le nombre de paramètre à estimer.

Dans un premier temps, une analyse de sensibilité paramétrique a été réalisée pour identifier les paramètres qui impactent les variables du modèle proposé. Les dérivées partielles des équations différentielles présentées dans le tableau 12 par rapport à chaque paramètre selon l'équation (12) sont utilisées :

$$S(\phi) = \frac{\partial y'}{\partial \phi} \quad \text{où } y' = f(y, t, \phi) \quad (12)$$

avec ϕ le paramètre étudié, y la variable, comme par exemple, la quantité de biomasse bactérienne ou la quantité d'hydrogène produit, y' la dérivée de y et t le temps.

Les résultats de l'étude de sensibilité sont présentés sur la figure 25 et dans l'annexe 3.

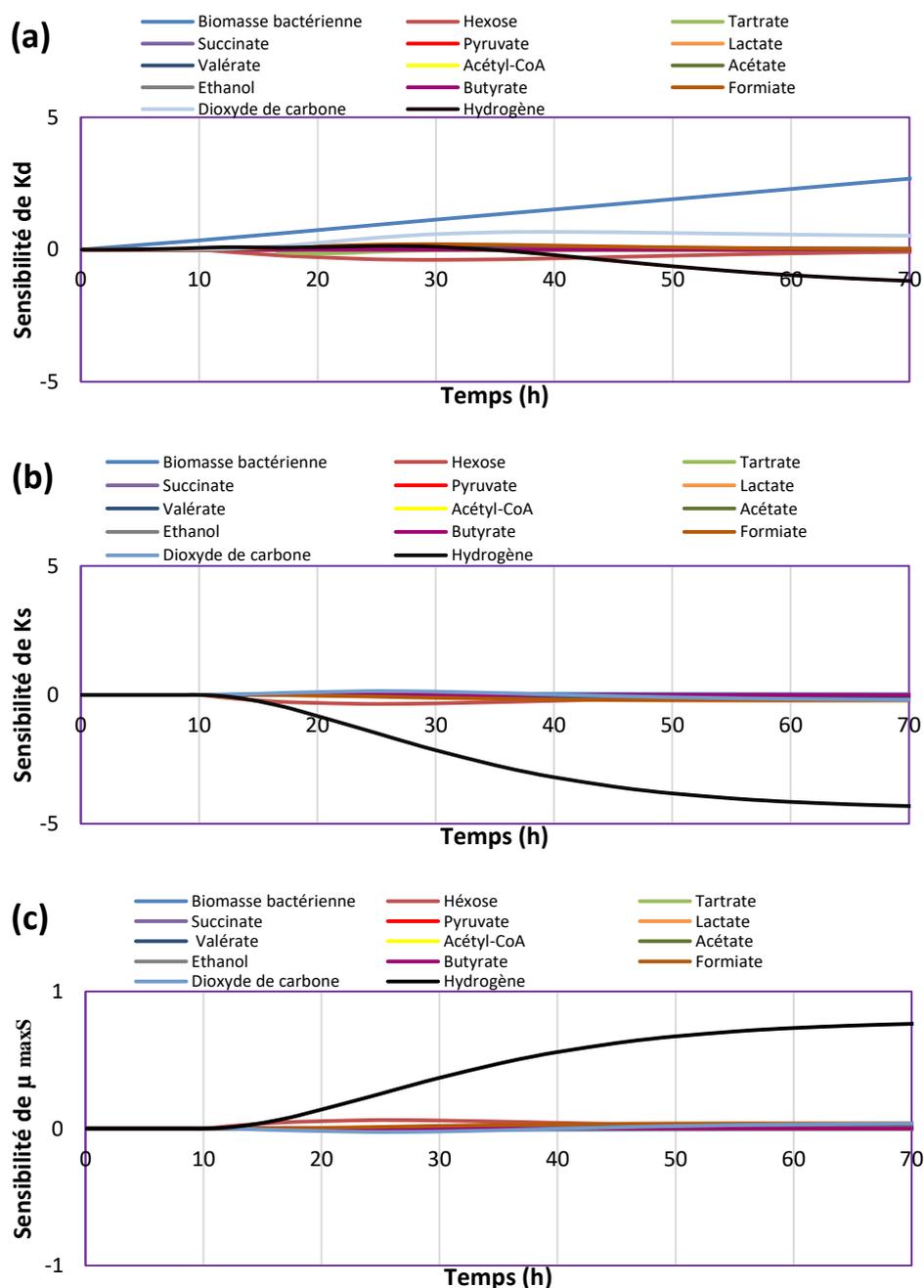


Figure 25 : Variation de sensibilité du coefficient de mortalité bactérienne (K_d) (a), du coefficient de demi-saturation (K_s) (b) et de la vitesse spécifique maximale de Monod μ_{maxS} (c) sur les variables d'état

Les figures montrent les sensibilités absolues des paramètres de cinétique, ainsi que les rendements sur les variables d'entrée. La vitesse spécifique maximale de Monod, qui décrit la croissance bactérienne par la consommation d'hexoses μ_{maxS} et le coefficient de demi-saturation K_s , ainsi que le coefficient de mortalité K_d , ont l'impact le plus important sur les variables du modèle. μ_{maxS} et K_s impactent la variation de la production d'hydrogène et atteignent leur valeur maximale absolue en fin de fermentation. K_d impacte la variation de la croissance bactérienne, où la sensibilité absolue commence à augmenter en début de fermentation et atteint sa valeur maximale à la fin de la fermentation. K_d impacte également la variation de la production

d'hydrogène et du dioxyde de carbone, où la sensibilité absolue commence à augmenter respectivement après 30 heures et 15 heures de fermentation. A partir des résultats de la figure 25 et de l'annexe 1, on remarque que la prédiction du modèle est critique à partir de 20 heures de fermentation et jusqu'à la fin de la fermentation à cause de la haute sensibilité de certains paramètres du modèle dans cet intervalle. $\mu_{\max S}$, K_S , et K_d sont les paramètres cinétiques les plus sensibles. Ainsi, dans une première étape, une estimation de ces trois paramètres a été réalisée.

Malgré la réduction du nombre de paramètres réalisée, ces derniers sont encore très nombreux pour faire un ajustement du modèle. Ainsi, dans un second temps, une estimation partielle des paramètres a été réalisée, en optimisant les paramètres de même catégorie et en fixant les autres paramètres.

5- Résultats et discussion

5.1- Validation numérique et paramétrique

La figure 26 présente l'adaptation aux données expérimentales des quatre modèles proposés pour la croissance de la biomasse bactérienne, la consommation des deux substrats, la production cumulée des métabolites et des gaz en fonction du temps. Les valeurs de la racine de l'erreur quadratique moyenne (REQM) sont résumées dans le tableau 13 pour donner une évaluation de la précision de chaque modèle. Les résultats de l'estimation des paramètres sont présentés dans le tableau 14.

Selon la figure 26 et le tableau 13, d'un point de vue général, le modèle 4 présente le meilleur ajustement par rapport aux autres modèles avec un REQM égale à 0,031. Des différences significatives entre les données expérimentales et les données du troisième modèle sont observées sur les profils de croissance bactérienne (figure 26 (a)), la consommation d'hexoses (figure 26 (b)) et de tartrate (figure 26 (c)) et la formation de formiate (figure 26 (f)) et d'hydrogène (figure 26 (h)). De plus, ces profils ne prennent pas la forme exponentielle attendue.

Tableau 13 : Valeurs des racines des erreurs quadratiques moyennes pour chaque modèle

Modèle	REQM
1	0,145
2	0,061
3	0,097
4	0,031

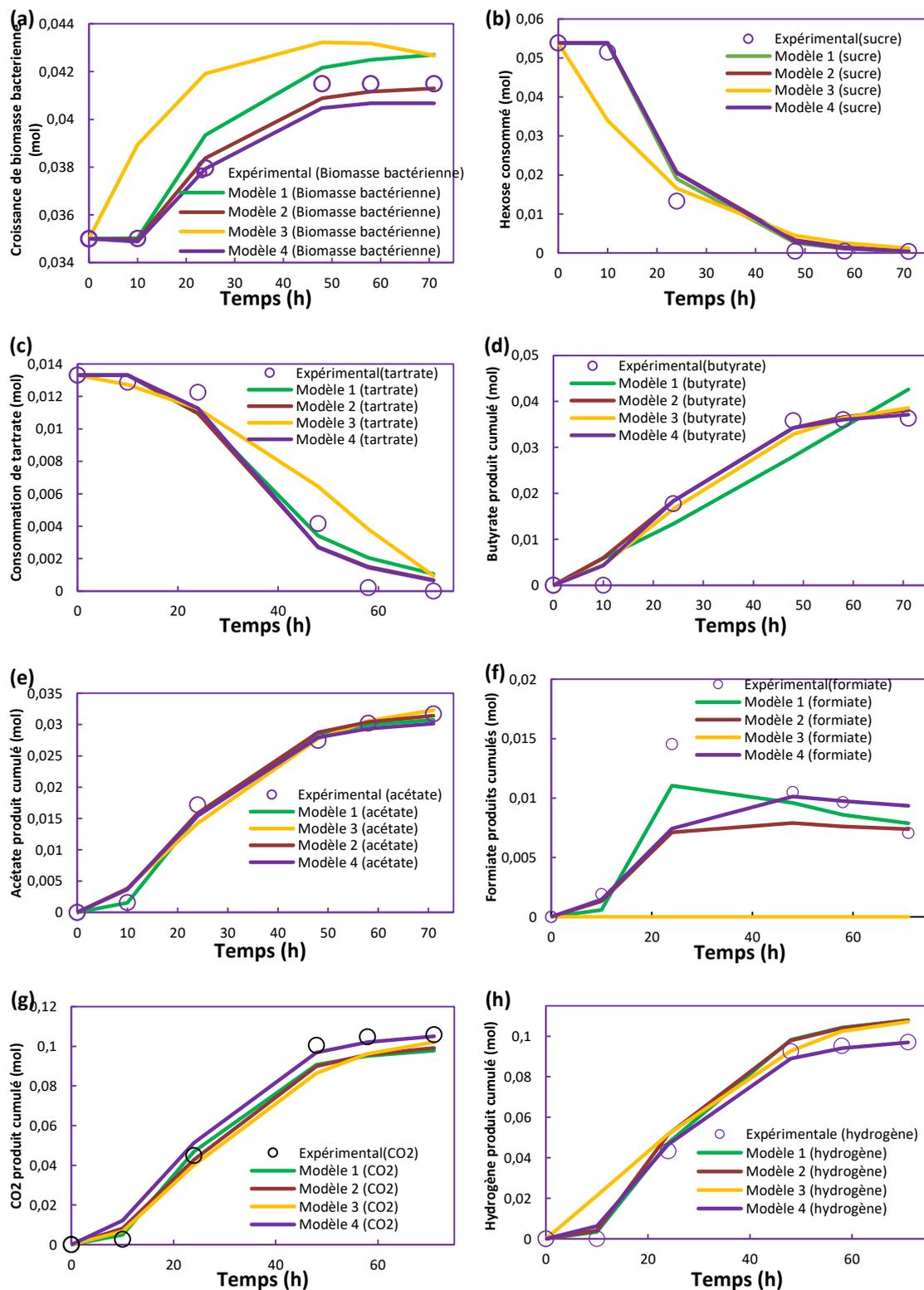


Figure 26 : Représentation des variations de croissance bactérienne (a), consommation d'hexose (b), consommation de tartrate (c) et formation des produits : butyrate (d), acétate (e), formiate (f), dioxyde de carbone (g) et hydrogène (h) par les quatre modèles proposés et pour les points expérimentaux

De façon spécifique, le premier et le troisième modèle surestiment la croissance des bactéries, cela explique la valeur élevée du coefficient de mortalité ($0,0013$ et $0,0035 \text{ h}^{-1}$) par rapport aux autres modèles (tableau 14). D'autre part, la vitesse spécifique de croissance bactérienne par l'hexose μ_{maxS} ($0,9535$ et $1,1157 \text{ h}^{-1}$) et le coefficient de demi-saturation K_S ($0,284$ et $0,581 \text{ mol}$) sont plus élevés dans le premier et le troisième modèle ; notons que selon les schémas proposés pour ces deux modèles, il est considéré que les clostridies sont les seules bactéries responsables de la consommation des hexoses. Ceci explique les valeurs élevées du paramètre μ_{maxS} et la surestimation du profil de consommation des hexoses. Donc, à partir de ces observations, on peut conclure que, dans ce consortium bactérien endogène à la biomasse, les clostridies ne sont pas les seules bactéries responsables de la dégradation des hexoses.

Tableau 14: Paramètres cinétiques (K), rendements (Y) et coefficients de facteur de correction (K_{Ip}) optimisés selon les quatre modèles

	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4		Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4
Paramètres cinétiques					Coefficient de facteur de correction				
K_D	0,0013	0,0004	0,0035	0,0004	K_{I-SC}	1,1172	0,9784	1,4045	1,2298
K_{IS}	4,0133	3,2648	3,7589	4,0084	K_{I-PYR}	2,0399	6,0346	7,6997	7,6802
K_S	0,2384	0,0651	0,3581	0,0517	K_{I-LAC}	$7,3 \cdot 10^{-11}$	$7,3 \cdot 10^{-11}$	$5,1 \cdot 10^{-12}$	$7,8 \cdot 10^{-11}$
K_T	0,2637	0,1364	0,0068	0,2748	K_{I-VAR}	$4,4 \cdot 10^{-14}$	0,0560	0,0847	0,1012
Y_S	7,3803	7,3156	7,5258	8,4876	K_{I-ACO}	5,5635	2,6201	0,0914	0,0757
Y_T	1,0938	0,9537	2,0671	1,3047	K_{I-AC}	0,1028	0,1095	0,2265	1,0341
Y_{SP}	4,4126	4,3674	3,1258	4,1972	K_{I-ETH}	1,0449	0,8777	0,7416	1,1046
Y_{TP}	3,7035	4,5392	3,2497	1,8801	K_{I-BUT}	$4,4 \cdot 10^{-14}$	0,1733	0,1142	0,1853
μ_{maxS}	0,9535	0,2649	1,1157	0,2522	K_{I-FOR}	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$3,1 \cdot 10^{-11}$	$3,1 \cdot 10^{-11}$
μ_{maxT}	1,1740	1,3156	$1,2 \cdot 10^{-11}$	1,1434	K_{I-CO2}	0,2670	0,0985	0,1001	0,2422
					K_{I-H2}	0,0309	0,0197	0,0047	0,0906

Selon la figure 26 (c), on observe que le troisième modèle sous-estime la consommation du tartrate en l'absence de voies de conversion du tartrate en pyruvate ou en succinate. D'autre part, la vitesse spécifique de croissance bactérienne par le tartrate ($\mu_{maxT} = 1,2 \cdot 10^{-11} \text{ h}^{-1}$) est plus faible par rapport aux autres modèles, ce qui explique une consommation plus lente du tartrate pour ce modèle. Notons que, selon le schéma proposé pour ce modèle, il est considéré que les clostridies sont les seules bactéries existantes dans le milieu. Ainsi, la présence des clostridies seules dans le milieu réactionnel conduit à une faible consommation du tartrate, certainement liée à la présence d'autres substrats (hexoses), plus facilement métabolisables, et qui peuvent jouer potentiellement le rôle d'inhibiteurs de la consommation du tartrate. Ce phénomène est moins évident dans le cas des autres schémas proposés où plusieurs genres bactériens peuvent consommer les hexoses et le tartrate.

Selon la figure 26 (h), on observe que le troisième modèle surestime la première phase de production d'hydrogène (de 0 à 24 heures), cela peut être dû à la faible valeur de K_{I-H2} , présentée dans le tableau 14, par rapport aux autres modèles et lié à une surestimation de la consommation

d'hexoses pour cette période. Ceci conduit à une valeur du facteur de correction (FC) égale à 1 et par conséquent, à l'absence de correction.

Selon la figure 26 (d), on observe une sous-estimation du premier modèle pour le profil de production du butyrate. Le coefficient K_{I-BUT} ($4,4 \cdot 10^{-14}$ mol) est très faible par rapport aux autres modèles et par conséquent, une valeur du facteur de correction par rapport au butyrate égale à 1 conduit à l'absence de correction du profil de production du butyrate ; il est à noter que selon le schéma proposé par ce modèle, il est considéré que le butyrate n'est produit qu'à partir d'hexose contrairement aux autres schémas qui présentent la production de butyrate à partir des deux substrats en utilisant les clostridies. Ceci explique que les clostridies sont également capables de consommer le tartrate pour produire de l'hydrogène et d'autres métabolites.

De plus, il est à noter que les quatre modèles ne permettent pas de modéliser correctement les profils des métabolites minoritaires (valérate, succinate, éthanol et lactate) (présentés en annexe 4) à cause des faibles quantités analysées de ces métabolites.

Le tableau 15 présente les rendements instantanés optimisés dans chaque cas. A partir de ce tableau, on observe que les rendements instantanés sont variables en fonction du modèle proposé. D'un point de vue général, dans le quatrième modèle, les rendements instantanés liés à la consommation des hexoses sont supérieures à ceux liés à la consommation du tartrate.

Tableau 15 : Rendements instantanés (mol/mol) des métabolites optimisés selon les quatre modèles

	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4
Y_{SC-S}	1,18	1,29	/*	2,20
Y_{SC-T}	1,05	1,04	/*	1,29
Y_{PYR-S}	6,24	4,16	1,39	5,05
Y_{PYR-T}	2,93	0,63	1,15	0,91
Y_{LAC-S}	0,82	1,06	/*	/*
Y_{LAC-T}	0,30	1,06	/*	/*
Y_{ACO-S}	/*	1,91	7,73	7,37
Y_{ACO-T}	/*	3,62	0,99	1,36
Y_{AC-S}	1,77	1,49	1,01	1,88
Y_{AC-T}	6,28	5,28	3,81	1,49
Y_{ETH-S}	/*	/*	1,32	1,54
Y_{ETH-T}	/*	/*	1,01	1,11
Y_{BUT-S}	/*	4,60	2,84	1,93
Y_{BUT-T}	/*	6,90	1,01	1,93
Y_{CO2-S}	6,24	5,84	3,58	6,28
Y_{CO2-T}	0,77	0,74	1,60	0,53
Y_{H2-S}	/*	0,93	9,74	10,7
Y_{H2-T}	/*	0,89	1,82	0,25

* La production de ces métabolites n'est générée qu'à partir des hexoses

Dans le modèle 1, où il est considéré que les clostridies sont les bactéries responsables de la consommation des hexoses et les bactéries du genre *Lactobacillus* responsables de la consommation du tartrate, le rendement instantané d'acétate lié au tartrate est supérieur à celui lié

à la dégradation des hexoses. Cela peut être expliqué par la production d'acétate à partir de tartrate par deux voies différentes en utilisant les bactéries du genre *Lactobacillus*.

Dans le modèle 2, pour lequel il est considéré que plusieurs bactéries sont responsables de la production de chaque métabolite, on observe que les rendements instantanés de production d'acétate et de butyrate liés à la consommation du tartrate sont supérieurs à ceux des hexoses contrairement aux autres rendements de production (pyruvate, succinate). On note un rendement instantané en butyrate particulièrement élevé pour ce modèle quel que soit le substrat (4,6 et 6,9 mol/mol). Le rendement instantané en CO₂ a des valeurs du même ordre de grandeur que pour le modèle 1, avec une valeur de 5,8 mol/mol lié à la consommation des hexoses contre 0,7 mol/mol lié à la consommation du tartrate. Il est à noter que le rendement en hydrogène de l'ordre de 1 est faible, quel que soit le substrat, pour ce modèle comparativement aux autres modèles.

Dans le modèle 3, où il est considéré que les clostridies sont les seules bactéries présentes dans le milieu, on observe que le rendement instantané en acétate lié au tartrate est supérieur à celui de l'hexose contrairement aux autres rendements (butyrate, pyruvate, éthanol, acétyl-CoA). Le rendement en hydrogène lié à la consommation des hexoses est élevée (9,7 mol/mol) alors que le rendement en CO₂ affiche la plus faible valeur (3,6 mol/mol) comparativement aux autres modèles.

Dans le modèle 4, où l'on considère le consortium bactérien expérimental, analysé par séquençage de l'ARN16S, le rendement instantané en hydrogène lié aux hexoses est le plus élevé.

En comparant les quatre modèles, on remarque que les rendements instantanés de succinate, lactate, éthanol, dioxyde de carbone et hydrogène liés à la dégradation de l'hexose sont toujours supérieurs à ceux du tartrate dans tous les cas, contrairement à celui de l'acétate, qui est toujours inférieur, hormis pour le quatrième modèle. Selon les rendements instantanés de dioxyde de carbone, on observe que les valeurs de ces derniers pour les modèles 1, 2 et 4 sont relativement similaires, ce qui peut être expliqué par la production de dioxyde de carbone par plusieurs genres bactériens. La similarité des rendements instantanés d'hydrogène dans le troisième et le quatrième modèle explique la capacité des clostridies de l'hydrogène avec plus d'efficacité que les autres bactéries.

A partir des résultats présentés précédemment, on peut conclure que les clostridies sont les bactéries majoritaires qui conduisent aux voies de production d'hydrogène dans le milieu réactionnel. Cependant, la présence des autres genres de bactéries permet de modifier les voies de production des autres métabolites comme l'acétate et le butyrate. Elle permet également de changer les voies de consommation des substrats, ainsi que les vitesses de consommation et de croissance des bactéries dans leur globalité. Le quatrième modèle, qui regroupe les voies métaboliques des bactéries présentes dans le milieu réactionnel, est le plus adéquat pour modéliser les résultats

expérimentaux. Des tests avec différentes charges initiales de biomasse vont être utilisés pour valider ce modèle.

5.2- Effet de la charge de la biomasse sur la production d'hydrogène

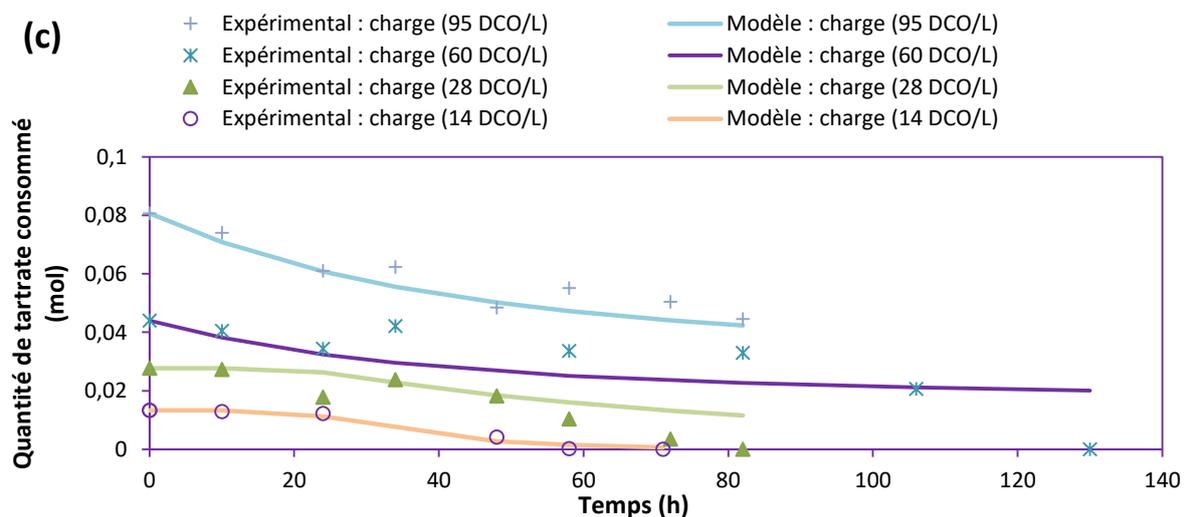
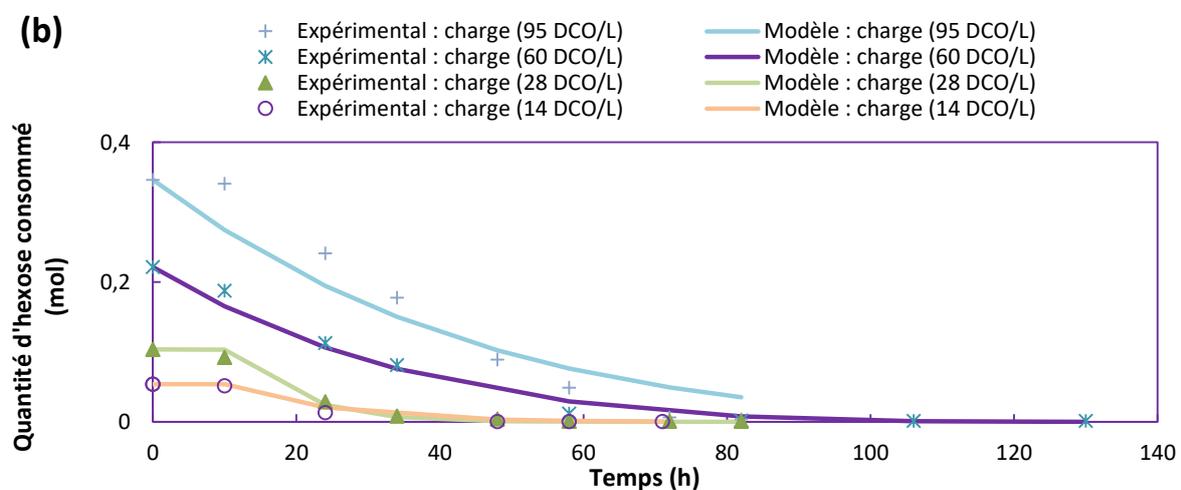
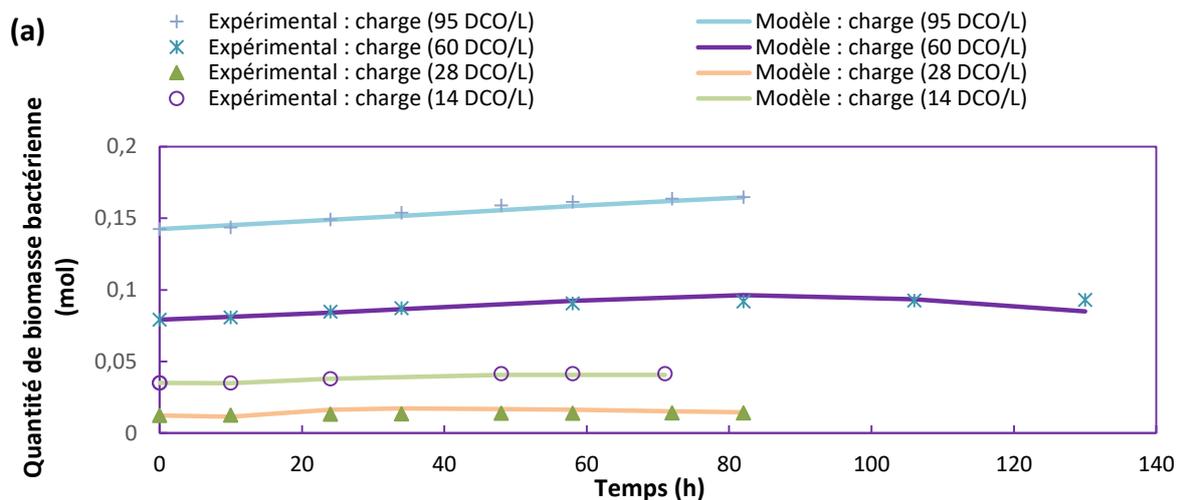
Après le développement du modèle descriptif des voies de production d'hydrogène par plusieurs bactéries, il est maintenant nécessaire de le valider en utilisant d'autres données expérimentales en modifiant la charge initiale en DCO dans le bioréacteur. De plus, il est intéressant d'étudier le comportement du modèle retenu pour des charges initiales de biomasse plus élevées afin d'étudier la performance des bactéries productrices d'hydrogène.

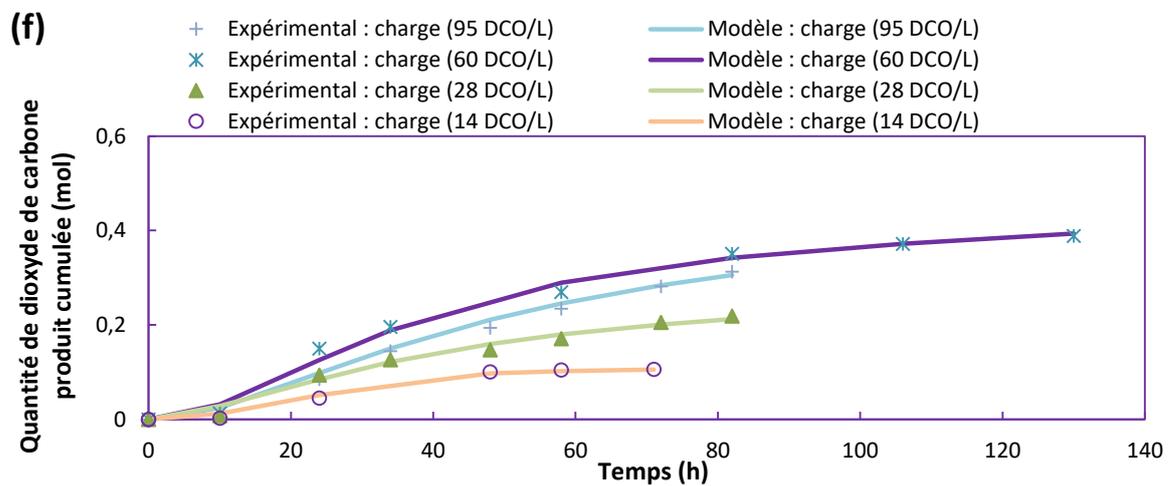
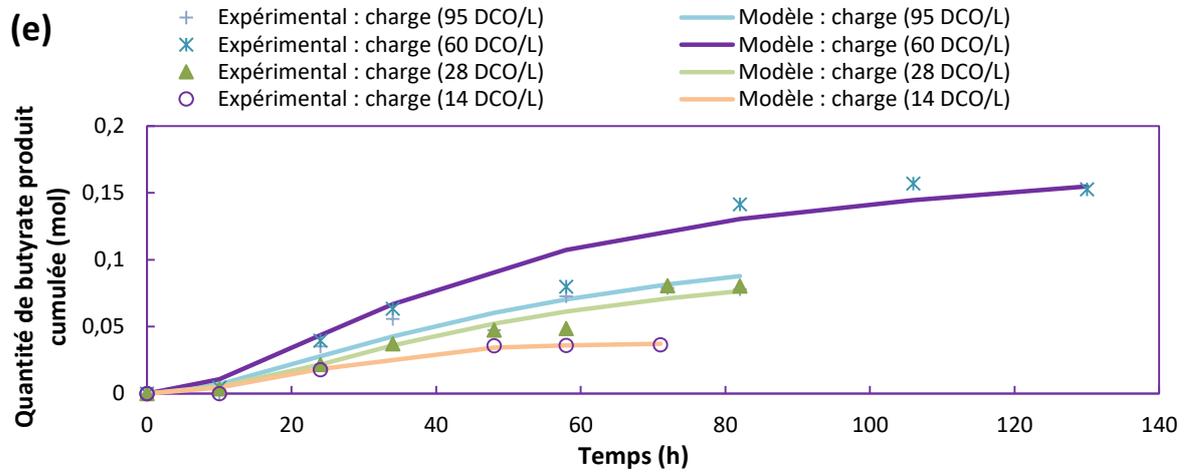
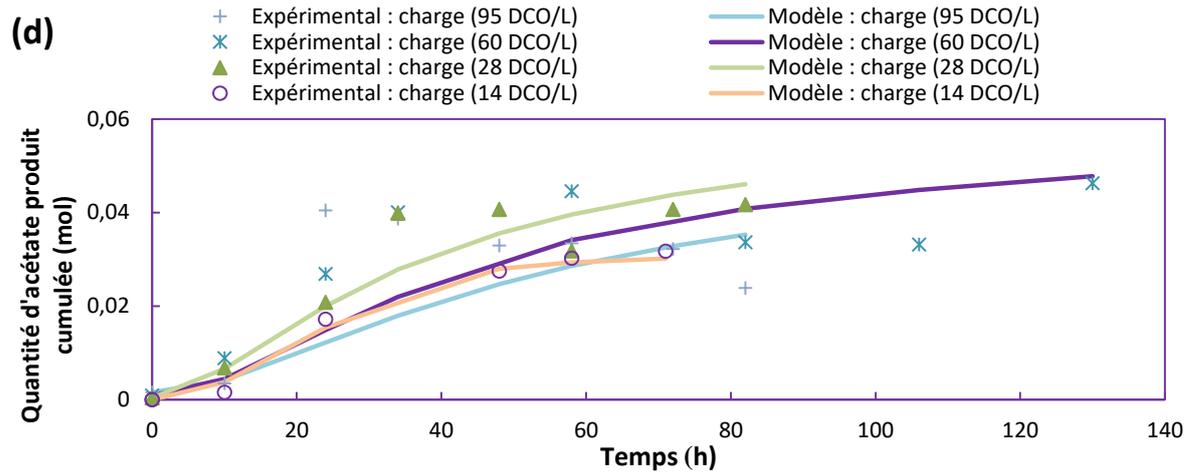
Pour valider le modèle proposé, trois charges initiales de biomasse ont été testées : 28, 60 et 95 g DCO/L. Le tableau 16 regroupe les valeurs de la REQM pour chaque test. La croissance bactérienne, la consommation des substrats et la formation des gaz et des métabolites en fonction du temps, calculées et expérimentales pour différentes charges de biomasse sont donnés dans la figure 27. Le tableau 17 présente les paramètres cinétiques, les rendements et les rendements instantanés estimés.

Tableau 16 : Valeurs des racines des erreurs quadratiques moyennes pour chaque modèle

Charge de la biomasse (g DCO/L)	REQM
14	0,031
28	0063
60	0,078
95	0,071

Les résultats du modèle s'ajustent globalement bien aux données expérimentales pour les différentes charges de biomasse, avec des REQM relativement faibles (tableau 16). Cependant, comme pour l'étude précédente, un mauvais ajustement est observé pour les métabolites, qui ont de faibles teneurs dans le milieu réactionnel (succinate, éthanol, valérate, formiate et lactate) (présentés dans l'annexe 5).





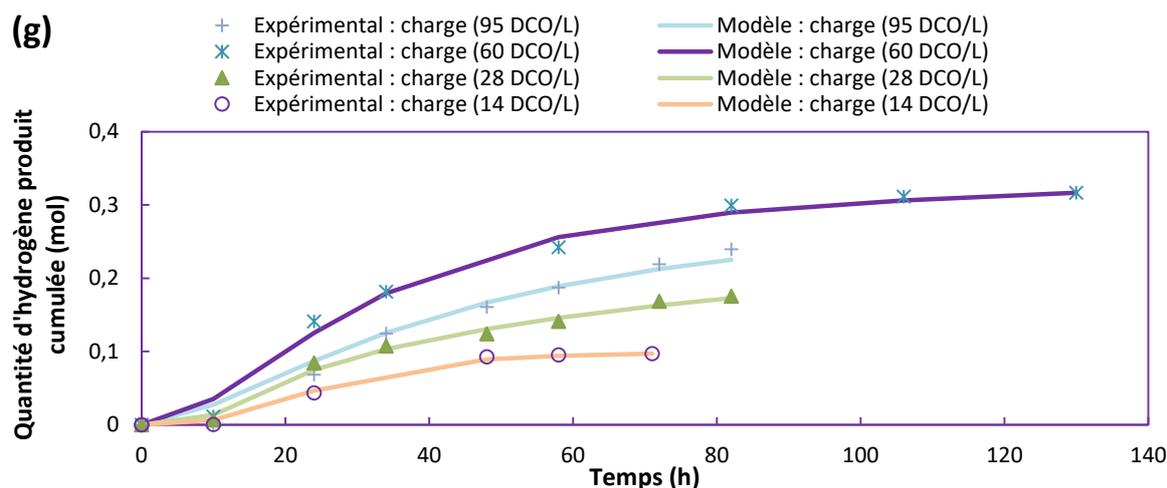


Figure 27 : Quantité de biomasse bactérienne (a), consommation d'hexose (b), consommation de tartrate (c) et formation d'acétate (d), butyrate (e), dioxyde de carbone (f) et hydrogène (g) en fonction de la charge initiale en biomasse dans le bioréacteur

A partir de la figure 27 (a), qui présente la quantité de biomasse bactérienne en fonction du temps pour différentes charges initiales en biomasse, on observe que la quantité initiale de la biomasse bactérienne diminue avec l'augmentation de la charge initiale en biomasse respectivement de 35,0 à 12,2 mmol pour les charges 14 g DCO/L et 28 g DCO/L. A partir de la charge de 28 g DCO/L, la quantité initiale de biomasse augmente avec l'augmentation de la charge initiale de biomasse. D'autre part, le coefficient de mortalité des bactéries augmente fortement avec l'augmentation de la charge de 14 à 28 g DCO/L puis diminue avec l'augmentation de la charge jusqu'à $0,00068 \text{ h}^{-1}$ (tableau 17).

Selon la figure 27 (b), qui présente la variation de la quantité d'hexoses avec le temps en fonction de la charge initiale en biomasse, on observe que le modèle surestime légèrement la consommation d'hexoses pour les charges de 60 et 95 g DCO/L dans la première phase de fermentation ($\leq 35 \text{ h}$). D'autre part, on observe que les valeurs du coefficient de demi-saturation K_S diminuent pour les deux teneurs en DCO les plus élevées (60 et 95 g DCO/L). Ceci peut expliquer la surestimation du modèle en termes de quantités d'hexoses consommés. En outre, les valeurs des paramètres de cinétique μ_{maxS} , K_S et Y_S prennent leurs valeurs maximales pour la charge 28 g DCO/L, ceci est en adéquation avec la rapidité de consommation des hexoses pour cette charge lors de la première phase de fermentation.

Selon la figure 27 (c), qui présente la consommation du tartrate avec le temps en fonction de la charge initiale en biomasse, on observe que le modèle, tour à tour, sous-estime pour la charge à 28 g DCO/L ou sur-estime la consommation du tartrate pour les charges de 60 g et 95 g DCO/L après 24 heures de fermentation. D'autre part, on observe que μ_{maxT} prend sa valeur maximale à 14 g DCO/L. En comparant les vitesses spécifiques maximales de croissance bactérienne liées à la

consommation des hexoses et du tartrate μ_{maxS} et μ_{maxT} , on observe que μ_{maxS} est supérieur à μ_{maxT} pour les deux charges de 28 et 60 g DCO/L. Ceci peut être expliqué par la présence d'*Enterobacter* à 5,2 et 1,2 % (tableau 11), qui peut également jouer un rôle dans la consommation des hexoses et par conséquent augmenter la vitesse spécifique de croissance bactérienne par les hexoses. D'autre part μ_{maxT} est supérieur à μ_{maxS} dans le cas de la charge à 95 g DCO/L, où le pourcentage d'*Enterococcus villorum* est égal à 31,2 % ; ceci peut confirmer l'hypothèse de la consommation du tartrate par cette espèce bactérienne. Pour la charge de 14 g DCO/L, pour laquelle le milieu fermentaire contient majoritairement des clostridies, μ_{maxT} est également plus élevé que μ_{maxS} , cela peut être expliqué par le fait que la présence d'*Enterobacter* avec les clostridies, comme observée pour les charges de 28 et 60 g DCO/L, peut inhiber la consommation du tartrate.

On observe que les valeurs du coefficient d'inhibition du tartrate par l'hexose K_{IS} sont relativement similaires pour les différentes charges de biomasses (tableau 17). Cela est dû à la conservation du rapport quantité d'hexose initiale/quantité du tartrate initiale, qui est en moyenne égale à 4,3 malgré les différentes charges initiales de la biomasse testées. Ceci explique que la teneur en hexoses inhibe la consommation du tartrate liée au rapport des quantités initiales des deux substrats.

Tableau 17 : Paramètres cinétiques, rendements et coefficients de facteur de correction optimisés pour les quatre charges de biomasse

	14 DCO/L	28 DCO/L	60 DCO/L	95 DCO/L	Charge	14 g DCO/L	28 g DCO/L	60 g DCO/L	95 g DCO/L
K_D	0,0004	0,0075	0,0049	0,00068	K_{I-SC}	1,2298	0,2709	1,4859	2,1809
K_{IS}	4,0084	4,0566	4,0887	4,0485	K_{I-PYR}	7,6802	7,687	7,9788	8,9836
K_S	0,0517	0,7864	0,0053	0,0194	K_{I-LAC}	7,88E-11	3,83E-10	1,01E-09	7,35E-09
K_T	0,2748	0,9585	0,3867	1,1256	K_{I-VAR}	0,1012	0,0714	1,8128	3,977
Y_S	8,4876	11,6038	1,5393	7,7102	K_{I-ACO}	0,0757	0,0001	0,2668	0,8249
Y_T	1,3047	1,0319	2,8354	1,4054	K_{I-AC}	1,0341	1,0506	2,6677	8,093
Y_{SP}	4,1972	3,4179	4,2543	4,2318	K_{I-ETH}	1,1046	1,212	2,2909	3,2276
Y_{TP}	1,8801	3,5271	2,0918	3,0458	K_{I-BUT}	0,1853	0,0398	0,5405	2,998
μ_S	0,2522	0,4793	0,4028	0,0431	K_{I-FOR}	3,16E-11	3,36E-10	2,60E-10	2,63E-10
μ_T	1,1434	0,1879	0,1419	0,1872	K_{I-CO2}	0,2422	0,2248	1,1586	5,2641
					K_{I-H2}	0,0906	0,0255	0,7528	2,0989

Enfin, selon les valeurs des coefficients de facteur de correction présentés dans le tableau 17, on observe que la plupart des coefficients augmentent avec l'augmentation de la charge initiale en biomasse avec toutefois des valeurs systématiquement plus faibles pour une charge DCO de 28 g/L par rapport à celle à une teneur en DCO deux fois plus faible.

Les figures 26 (e, f et g) présentent respectivement la variation des quantités de butyrate, dioxyde de carbone et hydrogène en fonction de temps. On observe que les quantités de ces derniers augmentent avec l'augmentation de la charge jusqu'à 60 g DCO/L ; une diminution de la production de ces gaz et métabolites est observée pour le test avec une teneur en DCO de 95 g DCO/L. D'autre part, les quantités d'acétate produit (figure 26 (d)) varient peu avec la variation de la charge initiale en biomasse et de plus, le modèle s'ajuste difficilement notamment sur la première phase de fermentation ($t < 50$ h). Cela peut être lié à la présence des trois genres/espèces de bactéries (*Clostridium*, *Lactobacillus johnsonii* et *Enterococcus villorum*), qui peuvent constituer un consortium bactérien concurrent vis-à-vis du substrat en favorisant la production d'acétate par homoacétogénèse.

A partir du tableau 18, qui présente les rendements instantanés, on observe que les valeurs pour chaque métabolite sont relativement similaires avec cependant des variations sensibles. En outre, les rendements instantanés de conversion des hexoses en métabolites sont toujours supérieurs à ceux du tartrate. Une diminution des rendements instantanés de conversion de l'hexose est observée avec l'augmentation de la charge pour l'acétate (Y_{AC-S}), le butyrate (Y_{BUT-S}) et l'éthanol (Y_{ETH-S}). Alors que le rendement de conversion des hexoses en hydrogène est relativement stable. D'autre part, l'ensemble des rendements instantanés des hexoses et du tartrate convertis en hydrogène, dioxyde de carbone et succinate sont relativement élevés pour la charge de 28 g DCO/L.

Tableau 18 : Rendements instantanés des métabolites optimisés pour les quatre charges de biomasse

	14 DCO/L	28 DCO/L	60 DCO/L	95 DCO/L
Y_{SC-S}	2,20	2,28	1,69	1,71
Y_{SC-T}	1,29	1,56	1,31	1,06
Y_{PYR-S}	5,05	3,86	4,30	3,92
Y_{PYR-T}	0,91	2,30	0,99	1,94
Y_{ACO-S}	7,37	11,21	6,89	9,12
Y_{ACO-T}	1,36	1,36	1,33	1,40
Y_{AC-S}	1,88	1,90	0,82	0,37
Y_{AC-T}	1,49	1,51	0,48	0,20
Y_{ETH-S}	1,54	1,45	0,49	0,10
Y_{ETH-T}	1,11	1,07	0,40	0,68
Y_{BUT-S}	1,93	1,68	1,52	0,75
Y_{BUT-T}	1,93	1,68	1,52	0,76
Y_{CO2-S}	6,28	6,70	5,93	5,41
Y_{CO2-T}	0,53	1,08	0,10	0,0002
Y_{H2-S}	10,7	11,8	10,58	11,05
Y_{H2-T}	0,25	1,24	0,49	0,49

Selon le tableau 11, qui présente les pourcentages des bactéries et la figure 19, qui présente les voies métaboliques, on observe une diminution du pourcentage de *Clostridium* en fonction de la charge et d'autre part, les métabolites principaux produits par les clostridies en utilisant l'hexose et le tartrate sont l'acétate et le butyrate. Cela explique la diminution des rendements instantanés de

l'acétate, du butyrate et de l'éthanol, qui sont produits essentiellement à partir de *Clostridium*. D'autre part, la valeur élevée du rendement instantané du succinate à partir de l'hexose pour la charge 28 g DCO/L peut être expliquée par le pourcentage élevé d'*Enterobacter* pour cette charge. Les valeurs élevées des rendements instantanés de l'hydrogène et du dioxyde de carbone pour la charge 28 g DCO/L peuvent être expliquées par la capacité des clostridies, *Enterococcus villorum* et *Enterobacter* à produire de l'hydrogène en culture mixte. Cependant, la présence d'*Enterococcus villorum* avec *Clostridium* inhibe la production de l'hydrogène.

6- Conclusion

Pour étudier les performances des microorganismes dans un réacteur semi-batch en utilisant une biomasse à fermentation endogène, quatre modèles mathématiques ont été développés en se basant sur les voies métaboliques proposées par quatre schémas différents. Dans chaque schéma, une ou plusieurs bactéries ont été prises en compte en se basant sur les analyses microbiologiques réalisées et sur les données de la littérature. Sans surprise, le modèle qui regroupe les bactéries présentes dans le milieu réactionnel s'est révélé être le meilleur modèle avec une bonne fiabilité, grâce à la compatibilité entre les données expérimentales et le modèle proposé. Cependant, à partir de ces quatre modèles proposés, on a pu émettre des conclusions sur les performances des microorganismes. Les clostridies sont les bactéries majoritaires qui conduisent les voies de production d'hydrogène dans le milieu réactionnel. En outre, la présence de ces clostridies dans une culture mixte, où d'autres genres bactériens se développent, conduit à un changement des voies de production des métabolites comme l'acétate et le butyrate, et même à un changement des voies de consommation des substrats ainsi que des vitesses de consommation et de croissance des bactéries.

Dans un deuxième temps, le modèle proposé a été validé en utilisant des charges de biomasse différentes de celles du développement du modèle avec un calage nécessaire pour chaque charge de biomasse initiale. Il a été constaté que le test avec une charge de 60 g DCO/L permet de donner le meilleur rendement d'hydrogène. L'augmentation de la charge à plus de 60 g DCO/L conduit à l'émergence d'autres microorganismes (comme *Enterococcus villorum*,) qui peuvent être concurrents des clostridies et les bactéries productrices d'hydrogène en consommant les substrats. Cependant, la présence de ces bactéries en faibles proportions permet d'améliorer le rendement de la production d'hydrogène donnant lieu à un effet de synergie.

Bibliographie

- [1] N. Kumar, A. Ghosh, D. Das, Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H₂ production by *Enterobacter cloacae*, *Biotechnol Lett*, 23 (7) (2004) 537-541.
- [2] O. Elsharnouby, H. Hafez, G. Nakhla, M.H. El Naggar, A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures, *Int. J. Hydrog. Energy*, 38 (2013) 4945-4966.
- [3] W. Jianlong, Y. Yanan, Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock, *Renew Sust Energ Rev*, 92 (2018) 284–306.
- [4] A.K. Patel, N. Vaisnav, A. Mathur, R. Gupta, D.K. Tuli, Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production, *Renew. Energy*, 98 (2016) 221-225.
- [5] G. Kumar, C.-Y. Lin, Biogenic hydrogen conversion of de-oiled jatropha waste via anaerobic sequencing batch reactor operation: process performance, microbial insights, and reduction efficiency, *Sci. World J.*, 2014 (2014) 9 -15.
- [6] B. Si, Z. Liu, Y. Zhang, J. Li, X.-H. Xing, B. Li, N. Duan, H. Lu, Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity, *Int. J. Hydrog. Energy*, 40 (2015) 3191-3200.
- [7] M.A. Khan, H.H. Ngo, W.S. Guo, Y.W. Liu, J.L. Zhou, J. Zhang, S. Liang, B.J. Ni, X.B. Zhang, J. Wang, Comparing the value of bioproducts from different stages of anaerobic membrane bioreactors, *Bioresour. Technol.*, 214 (2016) 816-825.
- [8] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee, Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review, *Int. J. Hydrog. Energy*, 41 (2016) 6713-6733.
- [9] H. Argun, S. Dao, Hydrogen Gas Production from Waste Peach Pulp by Natural Microflora, *Waste and Biomass Valorization*, 9 (2018) 2117–2124.
- [10] H. Argun, S. Dao, Hydrogen gas production from waste peach pulp by dark fermentation and electrohydrolysis. *Int. J. Hydrog. Energy*, 41 (2016) 11568–11576.
- [11] L.T. Fuess, L.S. Mazine Kiyuna, M.L. Garcia, M. Zaiat, Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor, *Int. J. Hydrog. Energy*, 41 (2015) 8132–8145.
- [12] A. Marone, G. Massini, C. Patriarca, A. Signorini, C. Varrone, G. Izzo, Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities, *Int. J. Hydrog. Energy*, 37 (2012) 5612–5622.
- [13] E.A. Buehler, A. Mesbah, Kinetic study of acetone-butanol-ethanol fermentation in continuous culture, *PLoS One* 11 (2016) 1-21.
- [14] L.-M. Whang, C.-J. Hsiao, S.-S. Cheng, A dual-substrate steady-state model for biological hydrogen production in an anaerobic hydrogen fermentation process, *Biotechnol Bioeng*, 95 (3), (2006) 492-500.
- [15] V. Müller, *Bacterial Fermentation. Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
- [16] G. Vardar-Schara, T. Maeda, T. K. Wood, Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation, *Microbial Biotechnology*, 1 (2) (2008) 107-125.
- [17] J. Tabachnick, R.H. Vaughn, Characteristics of Tartrate-fermenting Species of *Clostridium*, *J. Bacteriol.* 56 (1948) 435–443.
- [18] F. Radler, C. Yannissis, Weinsäureabbau bei milchsäurebakterien. *Archives of Microbiology* 82 (1972) 2 19-239.

- [19] E. Francois-Lopez, Production de biohydrogène par fermentation obscure : potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne, Thèse en Chimie/Bioprocédés, Strasbourg 2016
- [20] H. Yoon, G. Klinzing, H.W. Blanch, Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnology and bioengineering*, 19 (8) (1977) 1193-1210.
- [21] I. H. Segel, (1975), *Enzyme kinetics* (Vol. 360). Wiley, New York.
- [22] S.M. Seyedi, H. Hazrati, J. Shayegan, Biokinetic coefficients determination of a MBR for Styrene and Ethylbenzene as substrate based on the Andrews model, *Adv Mater Res-Switz*, 4 (2016) 207-214.

Chapitre 5

Optimisation du procédé de production d'hydrogène par un plan d'expériences

1-Introduction

Après avoir utilisé les modèles mathématiques à boîte blanche pour étudier l'effet de la concentration initiale du substrat sur la production d'hydrogène par des cultures mixtes, ainsi que l'effet de la charge de la biomasse sur la production d'hydrogène à partir d'une biomasse bactérienne endogène à un sous-produit vitivinicole, une étude d'optimisation paramétrique d'une nouvelle biomasse à fermentation endogène a été réalisée en utilisant un modèle mathématique à boîte noire dans l'objectif d'améliorer la production d'hydrogène.

Le plan d'expériences revêt une grande importance pour le processus de production d'hydrogène par fermentation [1]. En effet, ce processus, très complexe, peut être affecté par de multiples facteurs tels que la diversité et la densité des bactéries présentes dans le milieu, la nature et la concentration en substrats, les prétraitements de la biomasse, aussi bien que les conditions de fonctionnement du bioréacteur [2]. Pour optimiser les performances du processus biologique, un plan d'expériences approprié peut donc être mis au point. Certains facteurs sont sélectionnés et délibérément modifiés de manière contrôlée pour obtenir les effets optimaux sur la réponse d'intérêt [3].

Selon le premier chapitre de l'étude bibliographique, les prétraitements de la biomasse présentent un intérêt important pour améliorer la production d'hydrogène [4], car ces prétraitements permettent de favoriser l'émergence de bactéries productrices d'hydrogène et d'inhiber les voies concurrentes vis-à-vis du substrat, ainsi que les voies consommatrices d'hydrogène [5]. De plus, l'hydrolyse et la dégradation des substrats complexes peuvent avoir lieu grâce à l'utilisation des prétraitements [6].

Les prétraitements thermiques sont considérés parmi les méthodes les plus efficaces permettant la limitation de la consommation d'hydrogène par les microorganismes hydrogénotrophes et améliorant sa production en activant le consortium bactérien par la température (sélection des microorganismes résistants) [7]. D'autres prétraitements comme l'ajout d'acides ou de bases peuvent également avoir une influence sur les microorganismes induite par les changements de pH [8]. Par ailleurs, les prétraitements thermiques, ainsi que les traitements enzymatiques, peuvent être utilisés pour dégrader la matière complexe en matières plus facilement métabolisables, qui vont par la suite être consommées par les microorganismes [9,10]. Cependant, l'effet d'un prétraitement peut changer ou inhiber la production d'hydrogène selon la biomasse utilisée, ainsi que selon la présence d'un autre prétraitement conjugué au premier [8,11]. A notre connaissance, peu d'auteurs [12,13] ont appliqué le plan d'expériences pour étudier l'influence de ces prétraitements sur la production d'hydrogène ainsi que leurs interactions. Il est également important de prendre en compte la dépendance énergétique ainsi que le coût du procédé lors du choix du prétraitement.

Le pH, la vitesse d'agitation et le débit de gaz de balayage utilisé pour extraire l'hydrogène produit sont des paramètres clés du fonctionnement du bioréacteur car ils impactent de manière importante la production d'hydrogène par fermentation [14]. Plusieurs études [15-21] ont permis d'optimiser les paramètres de concentration en substrat, en additifs nutritionnels ou de régulation de pH, en utilisant des méthodes classiques (test de l'effet d'un seul facteur à la fois) ou en utilisant un plan d'expériences (voir Tableau 19). Il est à noter que l'application stricte du plan d'expériences à l'échelle industrielle peut engendrer des dépenses supplémentaires, notamment par l'ajout d'intrants chimiques ou biochimiques.

Tableau 19 : Etudes utilisant le plan d'expériences Plackett-Burman pour optimiser la performance de production d'hydrogène par fermentation

Inoculum	Substrat	Paramètres étudiés	Référence
<i>Clostridium sp. Fanp2</i>	Glucose	Concentration initiale en substrat Concentration en phosphate Concentration en vitamines pH initial	Pan <i>et al.</i> (2008) [15]
Culture mixte (extraits à partir d'un digesteur)	Glucose	Concentration en glucose Concentration en peptone Concentration de FeSO ₄ Concentration de NaHCO ₃ pH initial	Chenxi Zhao <i>et al.</i> (2009) [16]
Culture mixte à partir de boues d'épuration	Sirop de sorgho	Concentration des sucres totaux pH initial Concentration de FeSO ₄	Saraphirom <i>et al.</i> (2010) [17]
<i>Enterobacter sp. CNI</i>	Xylose	Concentration de xylose Concentration de FeSO ₄	Long <i>et al.</i> (2010) [18]
<i>Escherichia coli</i> (XL1-BLUE)	Formiate de sodium Tryptone	Concentration de formiate Densité cellulaire Concentration d'extrait de levure Concentration de NaCl Concentration de tryptone Vitesse d'agitation	Bakonyi <i>et al.</i> (2011) [19]
Boues activées	Glycérol	pH Température Concentration en glycérol	Marone <i>et al.</i> (2012) [20]
Culture mixte à partir de boues	Fécule de patate douce	pH initial Concentration en Aji-L (source d'azote) extrait à partir des déchets issus du processus de cristallisation des sources de glutamate de sodium. Concentration de NaHCO ₃ Concentration de FeSO ₄ Concentration en additifs nutritionnels	Thao Vi <i>et al.</i> (2017) [21]

L'objectif de ce chapitre est d'améliorer la production d'hydrogène à partir d'une nouvelle biomasse par fermentation endogène en utilisant un plan d'expériences Plackett-Burman pour étudier l'effet des paramètres ainsi que leur optimisation.

Cette biomasse est issue d'une filière agroindustrielle et correspond à des pellicules argentées issues de la torréfaction du café. Elle a été testée dans un bioréacteur semi batch à une

température de 37°C sous deux formes : à l'état frais et à l'état congelé. Les tests d'optimisation ont été réalisés sur la biomasse congelée afin d'éviter des biais potentiellement liés à la dégradation de la matière et afin de limiter l'activité des microorganismes.

Notre travail consiste à faire une étude de sélection des paramètres affectant la production d'hydrogène pour ensuite réaliser une étude d'optimisation. Les paramètres sélectionnés sont les paramètres de fonctionnement du bioréacteur : pH en cours de fermentation, débit de gaz de balayage pour l'extraction des gaz du bioréacteur et vitesse d'agitation du milieu réactionnel. Ces paramètres ont été choisis car ils peuvent, dans certains cas, inhiber la production d'hydrogène par un changement d'acidité du milieu réactionnel (baisse du pH), ou par une pression partielle en hydrogène trop élevée (contrée par l'utilisation d'un gaz de balayage). La vitesse d'agitation du bioréacteur peut améliorer la performance du procédé par une meilleure distribution (homogénéité) du milieu. D'autres paramètres pouvant améliorer la production d'hydrogène ont été également testés tels que les prétraitements enzymatique, thermique et ceux avec ajout d'acide ou de base.

2- Mise en œuvre du procédé

2.1- Bioréacteur et biomasse

Cette étude s'appuie sur les résultats de l'optimisation réalisée dans un bioréacteur semi batch [22] et avec une biomasse endogène. La fermentation est réalisée à une température de 37°C et avec une quantité de biomasse égale à 7% en volume du milieu réactionnel.

Les pellicules argentées, constituant la biomasse, sont obtenues durant la torréfaction des grains de café. Lors de ce processus, les grains de café subissent un gonflement dû à des dégagements gazeux entraînant le détachement des pellicules du grain de café. Le rendement est évalué à 1 tonne de pellicules argentées pour 120 tonnes de grains de café [23] ; la production mondiale étant de 9,2 millions de tonnes de café vert. La caractérisation des pellicules argentées issue de la littérature donne une composition de 40 à 90% de masse sèche, dont 5% de cendres. La teneur en sucres totaux s'élève en moyenne à 44 g pour 100 g de masse sèche [24,25].

2.2- Plan d'expériences

D'un point de vue général, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer une relation entre deux types de grandeurs : *la réponse*, qui correspond à l'objectif souhaité et *les facteurs*, qui correspondent aux grandeurs physiques, chimiques ou biologiques modifiables par l'expérimentateur et censés affecter les variations de la réponse.

Dans cette étude, les objectifs souhaités sont : un volume d'hydrogène élevé, un temps de latence court, un rapport du rendement d'hydrogène sur le rendement de dioxyde de carbone élevé

(rapport molaire H_2/CO_2) et une vitesse de production (productivité) d'hydrogène élevée. Ces réponses seront testées séparément et de façon globale.

Après avoir précisé les objectifs des réponses de l'étude, il est nécessaire de définir les facteurs affectant les réponses.

3- Choix des facteurs affectant la production d'hydrogène

Dans un premier temps, une étude de comparaison a été réalisée entre une biomasse « fraîche », après récupération de la matière et conservée à 4°C et une biomasse congelée à une température de -20 °C dans le but d'évaluer la stabilité de la biomasse avant et après conservation à froid. Les fermentations sont réalisées en triplicats avec une régulation du pH à une valeur supérieure ou égale à 5,7, un débit de gaz de balayage de 50 mL/min et une vitesse d'agitation de 220 tr/min. La figure 28 présente les profils d'hydrogène cumulé en fonction du temps, en utilisant les biomasses fraîche et congelée.

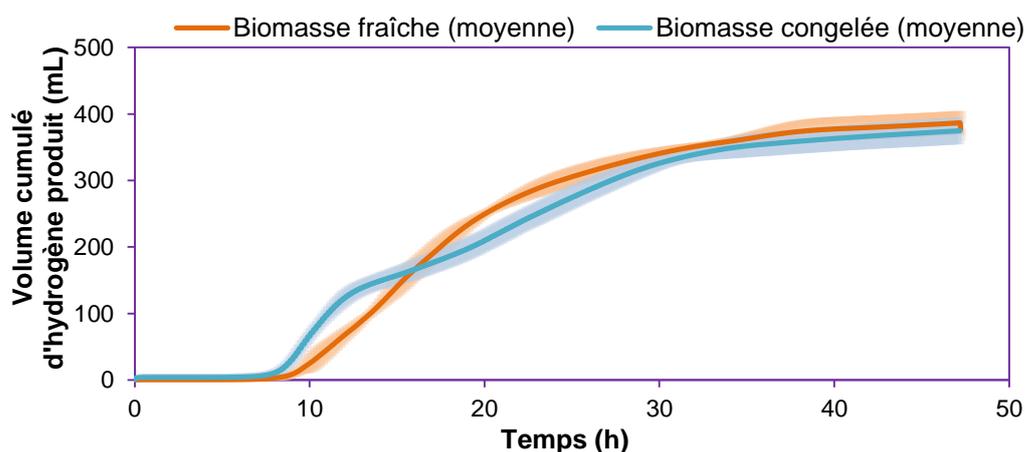


Figure 28 : Production d'hydrogène cumulée en fonction du temps et selon le mode de conservation de la biomasse pellicules argentées (expériences réalisées en triplicat)

La figure 28 montre que les profils de production d'hydrogène sont globalement similaires. Notons également que les résultats des triplicats symbolisés par l'enveloppe colorée sont proches de la valeur moyenne (trait continu) mettant en évidence une bonne reproductibilité des résultats et une bonne robustesse de la mise en œuvre du procédé. Les volumes d'hydrogène produit sont du même ordre de grandeur et en moyenne respectivement égales à 373 mL et 376 mL pour la biomasse fraîche et la biomasse congelée. Le temps de latence lors de l'utilisation de la biomasse congelée est légèrement plus court par rapport à la biomasse fraîche ; aussi, une variation entre les deux profils est observée à partir de 10 heures et s'étend jusqu'à 30 heures de fermentation.

Les valeurs de performance de production des gaz, ainsi que les valeurs de cinétique (déduites de la modélisation de Gompertz) sont présentées dans le tableau 20.

Tableau 20 : Volume de gaz produits, rapport molaire H₂/CO₂, rendement en hydrogène, production maximale (H_{max}), productivité maximale (R_{max}) et temps de latence (λ) en fonction l'état de conservation de la biomasse de pellicules argentées

	Biomasse fraîche	Biomasse congelée
	Résultats de production des gaz	
Volume de H₂ produit (mL)	373 ± 28	376 ± 24
Volume de CO₂ produit (mL)	713 ± 18	721 ± 25
Rapport molaire H₂/CO₂	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,01
Rendement H₂ (L H₂/kg_{biomasse})	14,9 ± 1,2	15,0 ± 0,9
	Résultats de la modélisation Gompertz	
Production maximale H_{max} (L H₂/L_{milieu})	0,532 ± 0,04	0,537 ± 0,03
Productivité R_{max} (mL H₂/L_{milieu}/h)	34,1 ± 11,9	36,6 ± 0,9
Temps de latence λ (h)	10,0 ± 0,5	8,6 ± 0,6

Les résultats présentés dans le tableau 20 montrent que les volumes de production d'hydrogène ainsi que les productivités et les paramètres H_{max} et R_{max} sont relativement proches pour les deux biomasses, à l'exception d'une légère variation observée au niveau des temps de latence. Ceci permet de conclure que la congélation de la biomasse n'affecte pas de manière significative la production d'hydrogène. Par conséquent, les tests, qui étudient les effets des paramètres et les tests utilisés dans le plan d'expériences pour l'optimisation des paramètres, ont été appliqués sur la biomasse congelée, prise comme milieu de référence.

3.1- Effet du prétraitement thermique sur la performance de la production d'hydrogène

La figure 29 représente la production d'hydrogène cumulée au cours du temps, avec et sans prétraitement thermique. Le prétraitement thermique consiste à placer la biomasse initialement à une température de 70°C pendant 75 minutes avant la fermentation dans les conditions identiques à celles réalisées sans prétraitement thermique.

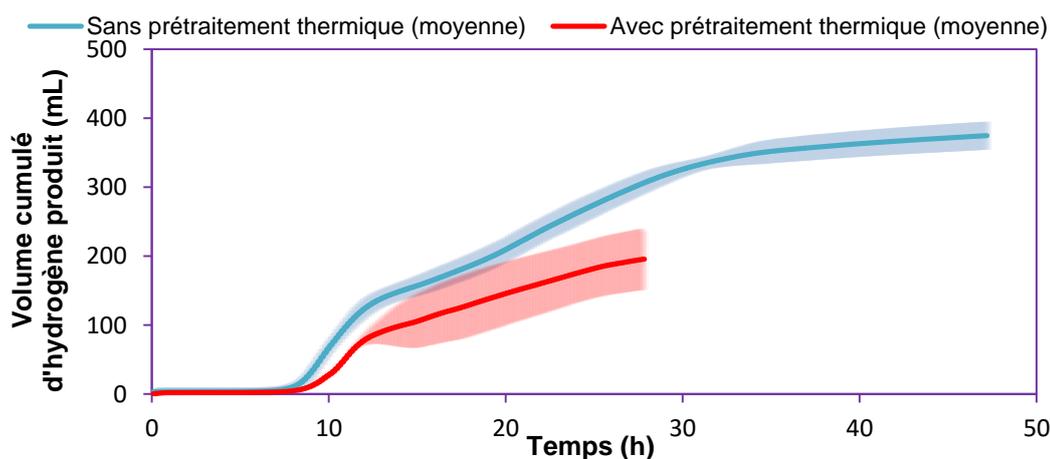


Figure 29 : Production d'hydrogène cumulée en fonction du temps avec et sans prétraitement thermique (expériences réalisées en triplicat)

La figure 29 montre que le volume d'hydrogène produit à partir de la biomasse, qui n'est pas soumise à un prétraitement thermique, est le plus élevé. De plus, le temps de latence de la production d'hydrogène avec le prétraitement thermique est plus long. Enfin, alors que la production d'hydrogène se poursuit jusqu'à 47 heures dans le cas de l'utilisation de la biomasse sans prétraitement thermique, la production d'hydrogène pour la biomasse prétraitée thermiquement, s'arrête à 27 heures.

Le tableau 21 présente les valeurs de performance de production des gaz, ainsi que les valeurs des cinétiques.

Tableau 21 : Volume de gaz produits, rapport molaire H₂/CO₂, rendement en hydrogène, production maximale (H_{max}), productivité maximale (R_{max}) et temps de latence (λ) pour la biomasse traitée et non traitée thermiquement

	Avec Pt. thermique	Sans Pt. thermique (Test de référence)
Résultats de production des gaz		
Volume de H₂ produit (mL)	197 ± 16	376 ± 24
Volume de CO₂ produit (mL)	393 ± 2	721 ± 25
Rapport molaire H₂/CO₂	0,50 ± 0,05	0,52 ± 0,01
Rendement H₂ (L H₂/kg_{biomasse})	7,9 ± 0,7	15,0 ± 0,9
Résultats de la modélisation Gompertz		
Production H_{max} (L H₂/L_{milieu})	0,281 ± 0,03	0,537 ± 0,03
Productivité R_{max} (mL H₂/L_{milieu}/h)	35,7 ± 0,4	36,6 ± 0,9
Temps de latence λ (h)	9,0 ± 1	8,6 ± 0,6

Le plus faible volume d'hydrogène produit avec prétraitement thermique, la valeur du rendement en hydrogène diminuée de moitié, ainsi que la production maximale d'hydrogène, présentés dans le tableau 20, confirment l'effet négatif du prétraitement thermique sur la production d'hydrogène. Par contre, la vitesse de production d'hydrogène et le temps de latence ne varient pas de manière significative.

D'après les résultats de la figure 29 et du tableau 21, on peut conclure que le traitement thermique de la biomasse influe négativement sur la production d'hydrogène. Ceci est en accord avec les résultats des travaux cités dans le premier chapitre, qui rapportent l'effet négatif du prétraitement thermique parfois observé sur les bactéries productrices d'hydrogène, qui n'ont pas la capacité de sporuler et qui sont dans notre cas présentes initialement dans la biomasse non traitée. Par conséquent, dans un objectif d'amélioration de la production en hydrogène, d'autres types de prétraitements ont été testés dans ce travail.

3.2- Effet du prétraitement enzymatique et des prétraitements avec acide et base

La figure 30 représente la quantité d'hydrogène cumulée au cours du temps en fonction du type de prétraitements utilisés.

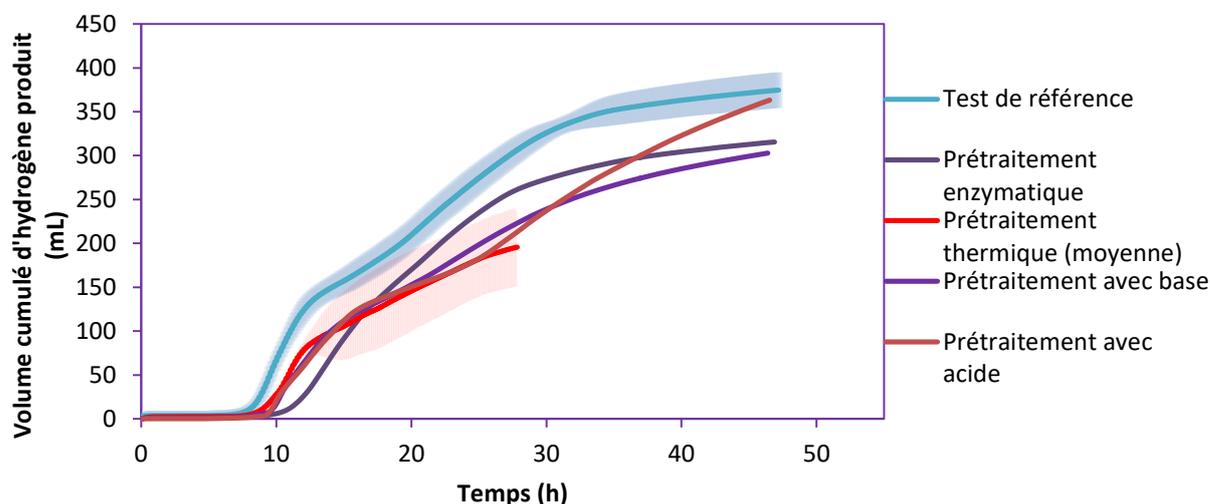


Figure 30 : Production d'hydrogène cumulée au cours du temps en fonction du prétraitement utilisé (prétraitements enzymatique, thermique et avec acide et base) et test de référence (sans prétraitement)

Les résultats présentés dans la figure 30 montrent que les profils de production d'hydrogène durant les premières heures jusqu'à 27 heures sont relativement similaires, hormis le profil correspondant au cas du prétraitement enzymatique, qui présente un temps de latence de 11 heures, contrairement aux autres profils dont la production d'hydrogène démarre dès 9 heures. La durée de production d'hydrogène, ainsi que le volume produit pour les biomasses traitées par l'enzyme, par acide (HCl) et par base (NaOH) sont plus élevées par rapport à ceux correspondant aux biomasses traitées thermiquement. Les tests effectués pour la biomasse traitée par un acide ont donné le volume d'hydrogène produit le plus élevé avec une valeur de 393 mL ; cette valeur étant également légèrement plus élevée que pour le test de référence.

Les valeurs de performance en production de gaz et les paramètres cinétiques de chaque prétraitement sont présentées dans le tableau 22.

Tableau 22 : Volume de gaz produits, rapport molaire H₂/CO₂, rendement en hydrogène, production maximale (H_{max}), productivité maximale (R_{max}) et temps de latence (λ) en fonction des prétraitements utilisés.

	Pt. Thermique	Pt. Enzymatique	Pt. Acide	Pt. Base	Test de référence
Résultats de production des gaz					
Volume de H₂ produit (mL)	197 ± 16	315	393	303	375,6 ± 23,8
Volume de CO₂ produit (mL)	393 ± 2	588	871	551	720,6 ± 25,3
Rapport molaire H₂/CO₂	0,50 ± 0,05	0,54	0,45	0,55	0,52 ± 0,01
Rendement H₂ (L H₂/kg_{biomasse})	7,9 ± 0,7	12,6	15,7	12,1	15,0 ± 0,9
Résultats de la modélisation Gompertz					
H_{max} (L H₂/L_{milieu})	0,281 ± 0,03	0,451	0,562	0,433	0,537 ± 0,03
R_{max} (mL H₂/L_{milieu}/h)	35,7 ± 0,4	25,4	41,8	50,6	36,6 ± 0,9
Temps de latence λ (h)	9,0 ± 1	10,9	10,1	10,2	8,6 ± 0,6

Les résultats du tableau 22 confirment que le prétraitement thermique affecte négativement la productivité d'hydrogène d'une manière significative, la valeur du rendement en hydrogène (7,9 LH₂/kg) est la plus faible et de 50% inférieure à celle par obtenue par prétraitement par acide. Par ailleurs, on observe que les vitesses maximales de production d'hydrogène sont variables ; celle correspondant au prétraitement enzymatique (25,4 mL d'hydrogène/L_{milieu}/h) est égale à la moitié de celle trouvée par prétraitement avec base (50,6 mL d'hydrogène/L_{milieu}/h). Le temps de latence le plus court a été obtenu pour l'essai avec prétraitement thermique de la biomasse avec une valeur de 9h. D'autre part, le rapport H₂/CO₂ le plus élevé a été obtenu pour le cas du prétraitement avec base, suivi de très près pour le cas du prétraitement enzymatique avec des valeurs de 0,55 et 0,54 respectivement.

D'après les résultats présentés dans la figure 30 et le tableau 22, on peut conclure à différents impacts selon la nature du prétraitement. Le prétraitement thermique accélère le début de production d'hydrogène, alors que le traitement par acide affecte positivement la productivité d'hydrogène jusqu'à 50 % de plus. Les prétraitements par les enzymes et la base permettent d'avoir un rapport de H₂/CO₂ plus important. Le prétraitement avec base permet également d'augmenter la vitesse de production d'hydrogène jusqu'à 50%. Cependant, il est à noter que le test sans aucun prétraitement a montré plus d'efficacité en production d'hydrogène que le prétraitement enzymatique et ajout de base.

Par conséquent, ces prétraitements ont été choisis pour étudier leurs effets sur la production d'hydrogène, ainsi que leurs couplages en appliquant le plan d'expériences.

3.3- Effet des paramètres de fonctionnement du bioréacteur

La figure 31 montre les profils de production d'hydrogène cumulée en fonction du temps pour différents paramètres de fonctionnement du bioréacteur, telles que l'augmentation de l'agitation du milieu réactionnel, la diminution du débit de gaz de balayage et l'absence de la régulation du pH en cours de fermentation.

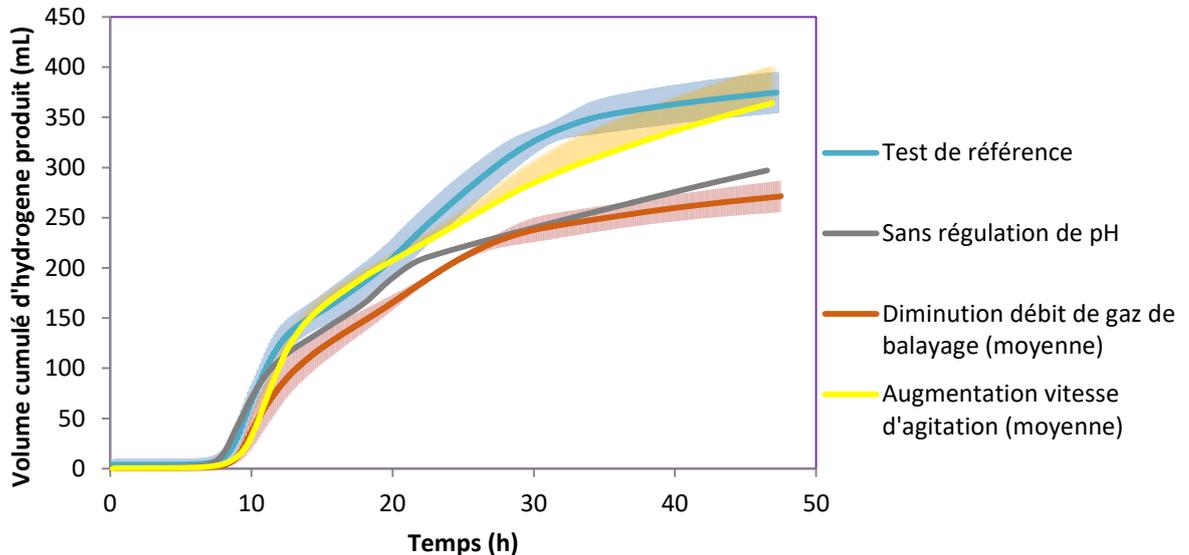


Figure 31 : Production d'hydrogène cumulée au cours du temps en fonction des paramètres de fonctionnement du bioréacteur

La figure 31 montre que tous les profils de l'hydrogène cumulé commencent quasiment simultanément, vers 9h après de fermentation. Cependant, l'allure globale des profils de production d'hydrogène n'est pas la même.

Le volume d'hydrogène produit lors de l'augmentation de la vitesse d'agitation jusqu'à 420 tr/min est similaire à celle obtenue avec une vitesse d'agitation de 220 tr/min. Cependant, les deux profils possèdent des allures légèrement différentes. D'autre part, les profils de production d'hydrogène cumulée pour un débit de gaz de balayage diminué à 25 L/min et pour l'essai sans régulation du pH, sont proches avec un volume d'hydrogène produit moins élevé que celui avec une vitesse de gaz de balayage de 50 L/min et une régulation du pH en cours de fermentation.

Le tableau 23 donne les valeurs de performance de production des gaz et celles des cinétiques de chaque changement de paramètres du bioréacteur.

Tableau 23 : Variation des volumes des gaz produits, productivité, H_{max}, R_{max} et temps de latence en fonction des paramètres de configuration.

	Test de référence	Sans régulation de pH	Diminution du débit de gaz de balayage	Augmentation de la vitesse d'agitation
Résultats de production des gaz				
Volume de H₂ produit (mL)	376 ± 24	297	276 ± 26	386 ± 55
Volume de CO₂ produit (mL)	721 ± 25	552	666 ± 74	649 ± 42
Rapport molaire H₂/CO₂	0,52 ± 0,01	0,54	0,41 ± 0,05	0,59 ± 0,05
Rendement H₂ (L H₂/kg biomasse)	15,0±0,9	11,9	7,4 ± 2,1	15,4 ± 2,2
Résultats de la modélisation Gompertz				
H_{max} (L H₂/L_{milieu})	0,54 ± 0,03	0,424	0,39 ± 0,03	0,55 ± 0,08
R_{max} (mL H₂/L_{milieu}/h)	36,6 ± 0,9	46,7	49,1 ± 3,4	50,5 ± 2,3
Temps de latence λ (h)	8,6 ± 0,6	8,0	9,3 ± 0,2	9,5 ± 0,5

Le tableau 23 montre que le volume et la productivité d'hydrogène diminuent lorsque le pH n'est pas régulé et également dans le cas de la diminution du débit du gaz de balayage. Une légère augmentation du volume de H₂ produit est observée lorsque la vitesse d'agitation du milieu est augmentée. Par ailleurs, la vitesse de production d'hydrogène et le temps de latence sont dans les mêmes ordres de grandeur pour tous les cas.

Selon la figure 31 et le tableau 23, on peut conclure que, malgré la variation des résultats obtenus pour chaque paramètre, aucune augmentation remarquable ni forte diminution de la performance de la production d'hydrogène ont été observées comparativement à l'expérience de référence. Ainsi, ces paramètres ont été choisis dans un objectif d'optimisation conjugués au paramètre de prétraitement de la biomasse.

4- Optimisation de la production d'hydrogène en appliquant le plan d'expériences

Comme il a été reporté dans la première section de ce chapitre, de nombreux facteurs influent sur la production d'hydrogène par fermentation. Néanmoins, peu d'études [12, 13] ont été réalisées sur l'interaction entre ces différents paramètres. De plus, il est très difficile de conclure sur la contribution majeure d'un facteur par rapport à un autre.

L'objectif de cette partie est d'apporter des solutions à ces problématiques. Pour cela, un plan d'expériences est développé en tant que méthode facile à mettre en œuvre, permettant de tester efficacement plusieurs paramètres. Cette méthode, permettra de déterminer les facteurs prédominants et de vérifier l'existence d'éventuelles interactions entre les différents facteurs.

4.1- Définition des réponses, objectifs et facteurs sélectionnés

Comme nous l'avons précisé dans la première partie, les réponses observées dans ce travail sont :

- le volume d'hydrogène produit (V_{H_2}) dont l'objectif est d'en maximiser la valeur,
- le temps de latence (λ), dont l'objectif est d'en minimiser la valeur,
- le rapport molaire H₂/CO₂, dont l'objectif est d'en maximiser la valeur,

- la vitesse de production d'hydrogène R_{\max} , dont l'objectif est d'en maximiser la valeur.

Les facteurs affectant ces réponses se divisent en deux catégories : facteurs continus et facteurs quantitatifs, où chaque facteur est représenté par deux niveaux. Le tableau 24 représente les indices de chaque facteur, ainsi que pour certains les valeurs testées.

Tableau 24 : Liste des facteurs codés, testés dans le plan d'expériences

	Code	-1	1
Facteurs qualitatifs			
Traitement enzymatique	X1	Sans	Avec
Traitement thermique	X2	Sans	Avec
Traitement avec acide	X3	Sans	Avec
Traitement avec base	X4	Sans	Avec
Régulation du pH	X5	Sans	Avec
Facteurs continus			
Vitesse d'agitation	X6	220	420
Débit du gaz de balayage	X7	25	50

4.2- Construction de la matrice du plan d'expériences

Avec 7 facteurs sélectionnés et en utilisant le plan de Plackett-Burman, le plan d'expériences devra être constituée d'une matrice de 12 expériences, selon le tableau suivant :

Tableau 25 : Liste des essais proposés par le plan d'expériences

Essai	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
2	1	-1	1	1	1	-1	-1
3	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
4	-1	1	1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	1	1	-1	-1	-1	1
7	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
8	-1	1	-1	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1

Cette matrice comporte 12 lignes, chaque ligne résume les conditions appliquées pour chaque manipulation. Ces essais ont été réalisés avec une quantité de biomasse égale à 7% de la masse du milieu réactionnel, à une température de 37°C.

Les modèles mathématiques de chaque réponse résultant de la formalisation du plan d'expériences sont des polynômes d'ordre 1 tels que celui de l'équation (1), où les différentes valeurs des réponses sont assimilées à ce modèle.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 \quad (1)$$

où Y est la réponse, β_0 correspond à la valeur moyenne théorique de la réponse, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$ et β_7 sont respectivement les effets principaux des facteurs $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$ et X_7 .

Le logiciel statistique JMP® a été utilisé pour analyser les résultats du modèle et pour déterminer les différents coefficients β_i du modèle polynomial, en utilisant la méthode des moindres carrés pour calculer le meilleur ajustement aux données.

Il est à noter que l'analyse des résultats est fondée sur les points suivants :

- la validation des modèles est vérifiée par les coefficients de régression R^2 et R^2 ajusté. Le coefficient de régression R^2 mesure la proportion de la variation totale de la réponse moyenne calculée par la régression, qui est la corrélation en pourcentage entre la réponse observée et celle prédite. R^2 ajusté est une modification de R^2 qui ajuste le nombre de termes explicatifs dans un modèle.
- le diagramme de Pareto est un diagramme à barres avec la réponse étudiée sur l'axe vertical et les facteurs sur l'axe horizontal, classés par ordre décroissant d'importance sur la réponse. Ce graphique est un moyen rapide pour déterminer les facteurs les plus influents sur une réponse spécifique.
- le test d'analyse de variable de Fisher a été réalisé sur des données expérimentales afin d'évaluer la signification statistique de chaque facteur. La valeur du rapport de Fisher, F , est calculée pour déterminer la valeur de probabilité, P , afin d'analyser la signification statistique des facteurs. La valeur P est une mesure de la quantité d'éléments probants dont on dispose contre l'hypothèse nulle (H_0), les éléments probants contre l'hypothèse nulle sont plus probables pour une valeur P plus petite [26-27]. Il faut noter que :
 - lorsque la probabilité P d'un facteur est inférieure à 5% et si son effet est positif, le facteur mérite une optimisation, sinon il sera utilisé à sa valeur maximale,
 - lorsque la probabilité P d'un facteur est inférieure à 5% et si son effet est négatif, le facteur mérite une optimisation, sinon il sera utilisé à sa valeur minimale,
 - lorsque la probabilité P d'un facteur est supérieure à 5% et si son effet est positif, le facteur sera utilisé à sa valeur maximale,
 - lorsque la probabilité P d'un facteur est supérieure à 5% et si son effet est négatif, le facteur n'affecte pas la réponse.

4.3- Analyse globale des résultats des essais

Les résultats des essais réalisés pour optimiser le volume d'hydrogène, le temps de latence, le rapport molaire H_2/CO_2 et la vitesse de production d'hydrogène sont présentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Résultats des tests du plan d'expériences

	V _{H2} (mL)	H ₂ /CO ₂	Temps de latence (h)	R _{max} (mL/L/h)
1	197	0,53	9,3	35,7
2	440	0,66	14,0	34,7
3	303	0,55	10,2	44,9
4	314	0,61	10,0	38,2
5	393	0,45	10,5	43,9
6	262	0,72	9,5	33,4
7	292	0,58	11,2	33,8
8	434	0,61	10,5	44,3
9	403	0,63	14,6	33,0
10	228	0,67	10,5	23,2
11	556	0,77	12,0	33,6
12	287	0,67	19,5	24,4

Les données du tableau 26 montrent une grande variation pour les quatre réponses. En effet, le volume d'hydrogène varie de 197 à 556 mL, le rapport H₂/CO₂ varie de 0,45 à 0,77, le temps de latence varie de 9,3 à 19,5 h et la vitesse de production d'hydrogène varie de 23,2 à 44,9 (mL/L/h). On observe que l'essai 11, correspondant au code 1 pour l'ensemble des facteurs, présente le meilleur résultat avec le volume d'hydrogène produit le plus élevé, conjugué au meilleur rapport molaire H₂/CO₂. Le gain de production par rapport au test de référence est de 48% et met en évidence un effet synergique entre les différentes conditions mises en œuvre. Ceci démontre la nécessité d'une optimisation afin d'atteindre une production en hydrogène maximale.

4.4. Analyse statistique des modèles

4.4.1- Analyse globale des modèles

L'ajustement du modèle de régression aux données expérimentales des variables de réponses (volume d'hydrogène produit, temps de latence, vitesse de production d'hydrogène et rapport H₂/CO₂), en utilisant les valeurs codées des facteurs listés dans le tableau 25, a donné lieu aux équations présentées dans le tableau 27.

Tableau 27 : Modèles mathématiques proposés pour chaque réponse

Modèle	Réponse	Modèle
Modèle 1	Volume de H ₂	$Y_1 = 342,46 + 20,242X_1 - 0,687X_2 + 33,867X_3 + 36,608X_4 - 61,383X_5 + 22,537X_6 - 19,180X_7$
Modèle 2	Vitesse de production de H ₂	$Y_2 = 35,262 - 4,864X_1 - 0,314X_2 + 1,014X_3 + 1,217X_4 + 2,264X_5 - 1,397X_6 + 0,519X_7$
Modèle 3	Rapport H ₂ /CO ₂	$Y_3 = 0,621 + 0,066X_1 + 0,031X_2 + 0,011X_3 + 0,024X_4 - 0,012X_5 + 0,004X_6 - 0,006X_7$
Modèle 4	Temps de latence	$Y_4 = 11,819 + 1,530X_1 + 0,014X_2 - 0,620X_3 - 0,620X_4 + 0,002X_5 + 0,547X_6 - 1,480X_7$

Pour valider les modèles présentés dans le tableau 27, les profils des valeurs expérimentales par rapport aux valeurs prédites pour le volume d'hydrogène produit, la vitesse de production d'hydrogène, le rapport H_2/CO_2 ainsi que le temps de latence sont présentés sur la figure 32. On donne ainsi, les valeurs des racines de l'erreur quadratique moyenne, les R^2 et R^2 ajustés.

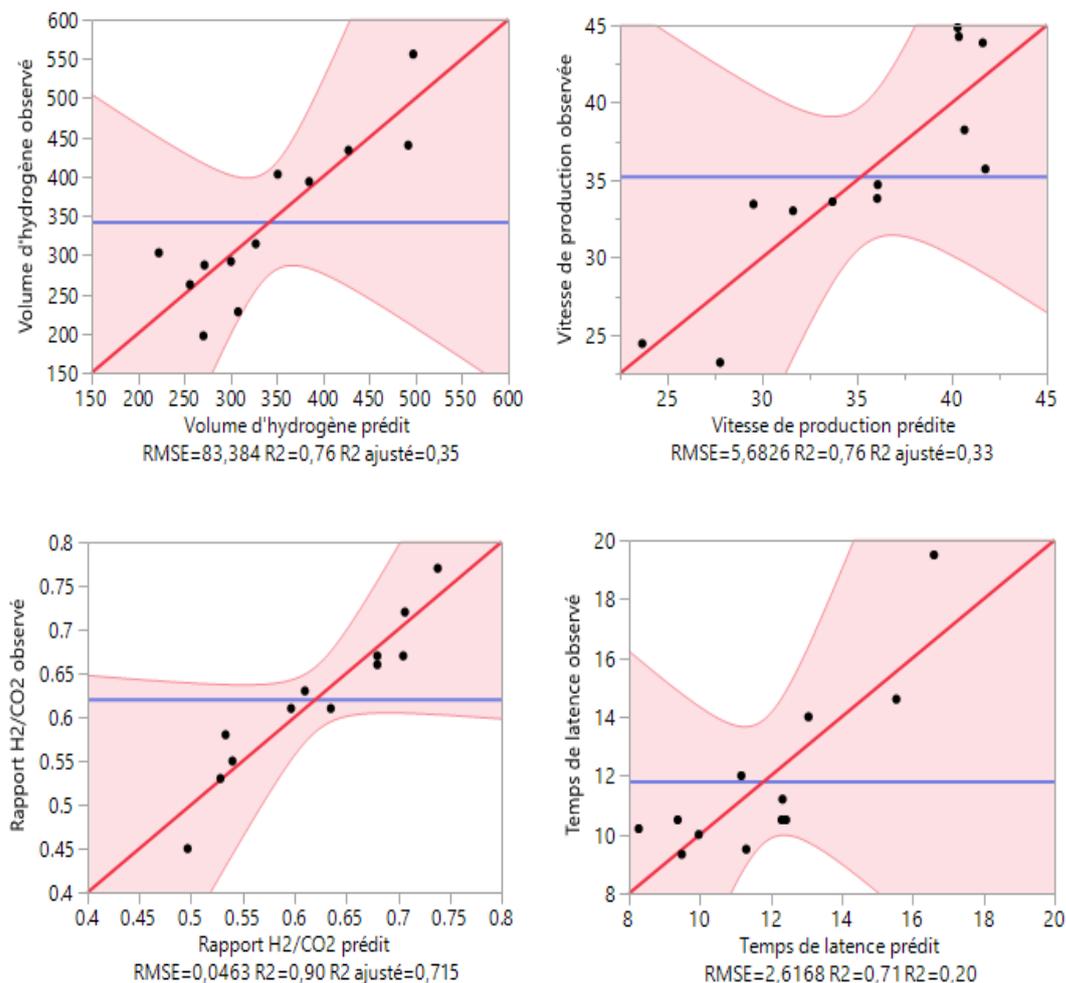


Figure 32 : Comparaison des valeurs expérimentales avec les valeurs des modèles du volume d'hydrogène produit, de la vitesse de production d'hydrogène, du rapport H_2/CO_2 et du temps de latence

La figure 32 montre une variation de corrélation entre les réponses. La variation du rapport H_2/CO_2 observé en fonction du rapport H_2/CO_2 prévu présente la meilleure corrélation sur une gamme de 0,5 à 0,75. Il est montré clairement que les valeurs expérimentales sont bien réparties près des valeurs prédites et qu'il existe par conséquent, une corrélation notable entre ces valeurs. De plus, les valeurs de R^2 (0,90) et R^2 ajusté (0,715) sont les plus élevées. Cependant, de plus faibles corrélations sont observées pour les profils du volume d'hydrogène, de la vitesse de production d'hydrogène et du temps de latence. Les valeurs de R^2 carré sont malgré tout acceptables car les valeurs de R^2 ajusté dépassent les 0,20. Si les valeurs de R^2 et R^2 ajusté sont respectivement supérieures à 0,70 et 0,20, on peut considérer que le modèle est valable et acceptable [28]. Cela

signifie que les modèles des réponses sont efficaces pour optimiser les conditions des prétraitements et les conditions de fonctionnement du bioréacteur.

4.4.2- Analyse statistique des facteurs

Pour identifier l'effet des facteurs testés sur le volume d'hydrogène, la vitesse de production d'hydrogène, le rapport H_2/CO_2 et le temps de latence, deux méthodes d'analyse ont été utilisées :

- Les analyses statistiques donnent la signification de chaque facteur en utilisant les termes du modèle explicité par les valeurs de P. Les valeurs de P inférieures à 0,05 indiquent que les termes du modèle sont significatifs et par conséquent que les facteurs relatifs à ces termes ont un effet sur la réponse.
- Le diagramme de Pareto a également été utilisé pour déterminer l'influence des paramètres les plus importants. Il est constitué de barres qui sont affichées dans l'ordre d'importance des facteurs ; les effets les plus importants étant situés en haut du diagramme. Les valeurs de t (test Student) sont utilisées pour identifier la signification des facteurs [29].

Le tableau 28 résume les résultats des analyses statistiques réalisées par le logiciel JMP®. Les termes de chaque modèle, donnés dans les équations présentées dans le tableau 27, ainsi que leurs valeurs p et t sont présentées dans ce tableau.

Tableau 28 : Résultats des analyses statistiques de Plackett-Burman

Facteur	Modèle 1 (V_{H_2})		Modèle 2 (R_{max})		Modèle 3 (H_2/CO_2)		Modèle 4 (λ)	
	t	p	t	p	t	p	t	p
T.E.	0,84	0,4477	-2,97	0,0413	4,93	0,0079	2,03	0,1127
T.T.	-0,03	0,9786	-0,19	0,8575	2,31	0,0822	-0,02	0,9859
T.A.	1,41	0,2322	0,62	0,5699	0,81	0,4629	-0,82	0,4584
T.B.	1,52	0,2029	0,74	0,4992	1,81	0,1447	-0,82	0,4584
R.pH.	2,55	0,0633	1,38	0,2396	-0,94	0,4024	0,00	0,9975
Agit.	0,94	0,4021	-0,85	0,4423	0,31	0,7707	0,72	0,5087
D.G.	-0,80	0,4702	0,32	0,7675	-0,44	0,6849	-1,96	0,1215

T.E. = Prétraitement enzymatique, T.T. = Prétraitement thermique, T.A. = Prétraitement avec acide ; T.B. = Prétraitement avec base,

R.pH = Régulation du pH, Agit. = Vitesse d'agitation du milieu réactionnel, D.G. = Débit de gaz de balayage

L'analyse des valeurs de P reportées dans le tableau 28 montre que parmi les facteurs testés, le prétraitement enzymatique est le seul facteur qui a un effet significatif sur la vitesse de production d'hydrogène (modèle 2) et sur le rapport H_2/CO_2 (modèle 3). Cependant, le signe (-) de la valeur du facteur explique l'effet négatif du prétraitement enzymatique sur la vitesse de production d'hydrogène. Ceci signifie que l'élimination du prétraitement enzymatique augmente la vitesse de production d'hydrogène mais diminue le rapport H_2/CO_2 .

Dans le modèle 1, associé au volume d'hydrogène produit, la régulation du pH correspond à la plus faible valeur de P (0,0633). De plus, parmi les facteurs examinés, les prétraitements avec acide et bases sont des facteurs à considérer ($P < 0,3$) [26,30]. L'ordre de signification positif est le

suivant : régulation du pH >> prétraitement avec base > prétraitement avec acide. D'autre part, on remarque que la vitesse d'agitation et le prétraitement enzymatique présentent une faible influence dans la plage considérée ($P > 0,3$). Le prétraitement thermique et le débit de gaz de balayage ne présentent aucun effet sur le volume d'hydrogène produit.

Pour le modèle 2 représentant la vitesse de production, en plus du prétraitement enzymatique, qui a un effet négatif considérable, la régulation du pH a une valeur relativement faible de P (0,23). Ce dernier facteur peut être également considéré comme facteur significatif avec un effet positif. Les autres facteurs ne présentent pas d'influence dans la plage considérée ($P > 0,3$).

Pour le modèle 3 représentant le rapport H_2/CO_2 , en plus du prétraitement enzymatique, qui a un effet significatif positif, le prétraitement thermique et le prétraitement avec base correspondent à des faibles valeurs de P , respectivement de 0,082 et 0,145. Ces facteurs sont de ce fait considérés comme significatifs avec un effet positif. Les autres facteurs ne présentent pas d'influence dans la plage considérée ($P > 0,3$).

Pour le modèle 4, associé au temps de latence, le prétraitement enzymatique correspond également à la plus faible valeur de P (0,1127). Les autres facteurs ne présentent pas d'influence dans la plage considérée ($P > 0,3$), hormis le débit du gaz de balayage.

La figure 33 donne les diagrammes de Pareto pour chaque réponse, qui représentent les effets estimés des facteurs sur les réponses. Certaines études ont montré que des niveaux de confiance supérieurs à 70% ($P < 0,3$) sont acceptables [26,30].

Les diagrammes se composent de barres de longueurs proportionnelles aux valeurs absolues des effets estimés divisées par l'erreur type qui correspondent aux valeurs t . Les graphiques incluent aussi une ligne verticale à la valeur t critique absolu (1,083) pour un P égal à 0,30.

D'un point de vue global, on peut dire que tous les facteurs, pour les quatre modèles, à l'exception de la vitesse d'agitation, ont une influence remarquable sur les paramètres de performance d'au moins un des modèles. De façon plus détaillée, on remarque que la régulation du pH, le prétraitement avec la base et l'acide ont une influence significative sur le volume d'hydrogène produit (figure 33 (a)). Cela signifie que le pH initial du milieu contenant la biomasse influe sur la quantité d'hydrogène produit. D'autre part, selon la figure 33 (b), on confirme que le prétraitement enzymatique a un effet négatif important sur la vitesse de production d'hydrogène. La régulation du pH a, par contre, un effet positif. Cela signifie qu'une vitesse optimale de production d'hydrogène peut être obtenue par régulation du pH, mais sans prétraitement enzymatique. Cependant, selon la figure 6 (c), on remarque que le prétraitement enzymatique a un effet positif remarquable sur le rapport H_2/CO_2 , ainsi que le prétraitement thermique et le

prétraitement avec base. Le prétraitement enzymatique a également un effet positif sur le temps de latence (figure 33 (d)).

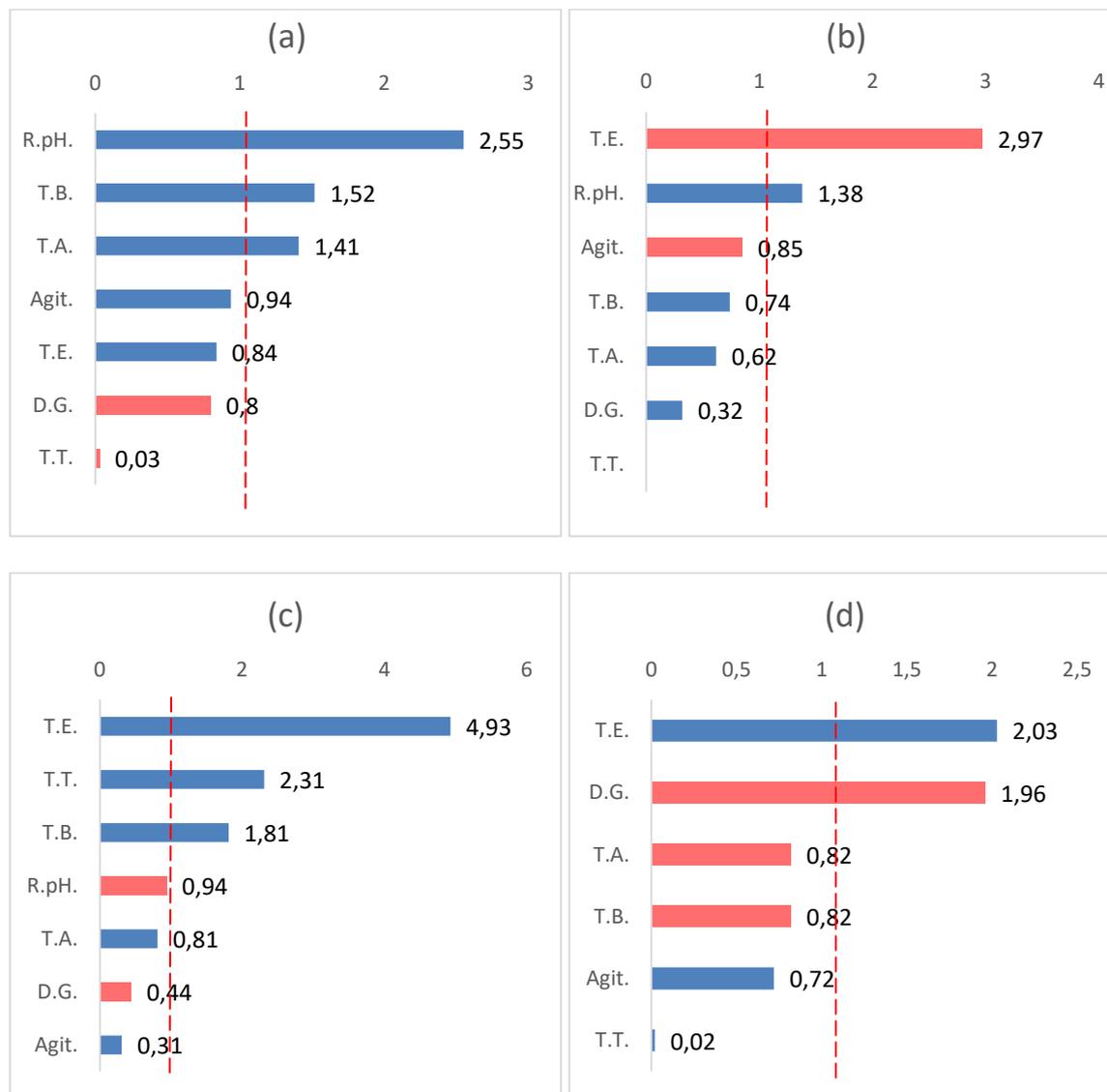


Figure 33 : Résultats des diagrammes de Pareto des modèles du volume d'hydrogène produit (a), la vitesse de production d'hydrogène (b), le rapport H_2/CO_2 (c) et le temps de latence (d). Code couleur : bleu : effet positif, rouge : effet négatif

Selon les résultats présentés plus haut, on peut conclure que le pH du milieu ainsi que le prétraitement enzymatique sont des facteurs qui ont des effets positifs ou négatifs importants sur la globalité du procédé de production d'hydrogène. Afin d'approfondir ce résultat, une étude d'interaction 2 à 2 entre ces facteurs est nécessaire.

4.5- Etude de l'interaction entre les facteurs

Les tracés de surface de réponse 3D sont utiles pour comprendre les effets principaux et d'interaction des facteurs indépendants les plus significatifs [31]. Pour visualiser l'effet des facteurs indépendants sur chaque réponse, des tracés de surface de réponse 3D sont présentés sur la figure 34 ainsi que dans l'annexe 6.

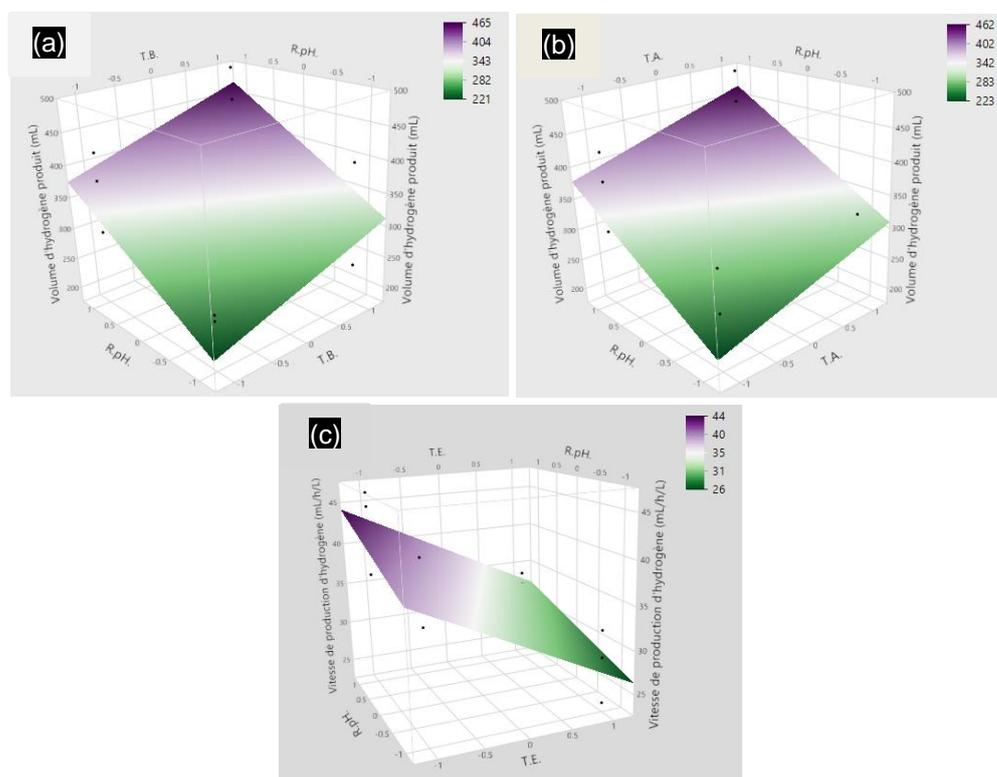


Figure 34 : Résultats d'interaction et d'effet de la régulation du pH et du prétraitement avec base (a), de la régulation de pH et du prétraitement avec acide (b) sur le volume d'hydrogène produit et résultats d'interaction et d'effet de la régulation du pH et du prétraitement enzymatique sur la vitesse de production d'hydrogène (les résultats expérimentaux sont symbolisés par les points)

Les figures 34 (a) et (b) présentent respectivement, les effets d'interaction de la régulation du pH avec le prétraitement de la biomasse avec base et la régulation de pH avec le prétraitement avec acide sur le volume d'hydrogène produit. Précisons que, quel que soit le prétraitement, un ajustement à $\text{pH} = 6$ est réalisé avant le démarrage de la fermentation. On observe que le volume d'hydrogène produit augmente avec la régulation de pH et l'application des deux prétraitements. D'autre part, la figure 34 (c), qui présente l'interaction de la régulation du pH avec le prétraitement enzymatique sur la vitesse de production d'hydrogène, montre que cette dernière augmente légèrement avec la régulation du pH et plus fortement en l'absence de prétraitement enzymatique.

D'un point de vue général, le pH du milieu est le facteur essentiel qui gère la performance de la production d'hydrogène dans cette étude. La régulation de pH du milieu réactionnel en cours de fermentation, ainsi que les prétraitements avec acide et base, permettent d'augmenter l'efficacité

de la production d'hydrogène à partir de la biomasse de pellicules argentées en fermentation endogène. Comme il est noté dans le premier chapitre de recherche bibliographique, en l'absence de régulation, le pH du milieu réactionnel varie avec l'évolution de la concentration des acides formés durant la fermentation. C'est pourquoi, une étude sur les métabolites produits dans le milieu réactionnel, co-produits ou non de l'hydrogène, est à réaliser.

4.6- Production des métabolites

La production d'hydrogène par fermentation obscure s'accompagne de la production de métabolites dans le milieu réactionnel liquide. En effet, l'acide acétique et l'acide butyrique sont les principaux métabolites formés et co-produits de l'hydrogène. Les quantités produites de ces deux métabolites, le rapport entre ces derniers ainsi que leur rapport avec l'hydrogène produit permet de donner des indications sur les voies métaboliques empruntées par les bactéries et ainsi de mieux comprendre le procédé.

Le tableau 29 présente les quantités d'acide acétique et d'acide butyrique produits à l'issue des 12 expériences réalisées pour le plan d'expériences.

Tableau 29 : Quantités finales d'acétate, de butyrate et d'hydrogène produits pour les essais proposés par le plan d'expériences

Essais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Acétate (mmol)	15,8	7,8	14,3	14,7	18,9	16,0	14,8	30,0	11,3	13,9	30,9	12,6
Butyrate (B) (mmol)	3,7	3,5	4,9	5,1	3,9	4,8	5,5	4,3	4,8	5,3	4,6	5,3
Hydrogène (mmol)	8,2	18,3	12,6	13,1	16,3	10,9	12,1	18,0	16,7	9,4	23,1	11,9
Hydrogène (mL)	197	439	302	314	393	262	291	433	402	227	556	287
2 * B (mmol) (P _{H2/B} (%)*)	7,4 (90)	7,0 (38)	9,8 (78)	10,2 (78)	7,8 (48)	9,6 (88)	11,0 (91)	8,6 (48)	9,6 (57)	10,6 (113)	9,2 (40)	10,6 (89)

*P_{H2/B} : pourcentage d'hydrogène produit par la voie butyrate

Le tableau 29 montre que la quantité d'acide acétique produit varie avec les conditions des essais entre 7,8 et 30,9 mmol. On remarque que la quantité d'acide butyrique varie dans un intervalle plus restreint de 3,5 à 5,5 mmol. Si l'on tient compte de la stœchiométrie de la réaction de production d'hydrogène via la voie butyrate et si l'on retient le postulat selon lequel seule cette réaction mène à la production de butyrate, on observe qu'une part importante de l'hydrogène produit (2 * B) provient de la voie butyrate, supérieure à 78% pour les essais selon l'ordre suivant : 3~4<6~12~7~1<10 et comprise entre 38% et 57 % pour les essais selon l'ordre suivant : 2~11<5~8<9). La quantité d'acide acétique la plus élevée (30,9 mmol) obtenue lors de l'essai 11, correspond au plus grand volume d'hydrogène produit (556 mL). Cet essai correspond à l'utilisation de tous les prétraitements et avec régulation du pH. Par ailleurs, on note de faibles quantités d'acide

acétique produit égales à 7,8 et 11,3 mmol conjuguées à des quantités d'hydrogène produit relativement élevées, respectivement de 439 et 402 mL pour les essais 2 et 9.

La figure 35 présente l'interaction entre la quantité d'hydrogène produit, l'acide acétique et l'acide butyrique pour les 12 essais. Le volume des sphères est proportionnel à la quantité d'hydrogène produit.

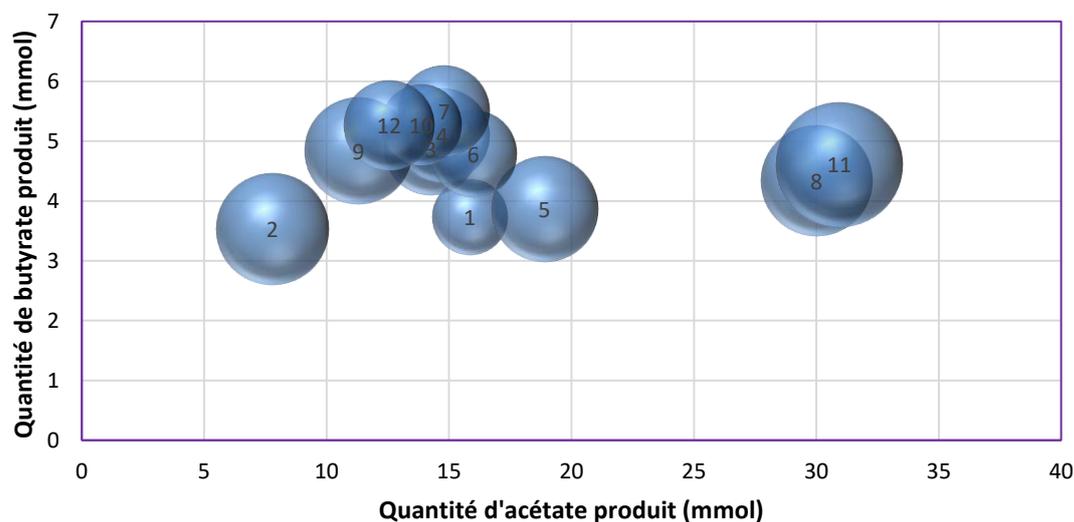


Figure 35 : Variation des quantités d'acide acétique, d'acide butyrique et d'hydrogène (taille des bulles) en fonction des essais du plan d'expériences

La figure 35 montre qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'augmentation de la quantité d'hydrogène produit et la quantité d'acétate produit. De même, la quantité de butyrate produit est décorrélée de la quantité d'hydrogène produit.

La figure 36 présente la variation de l'hydrogène produit en fonction du rapport molaire butyrate/acétate.

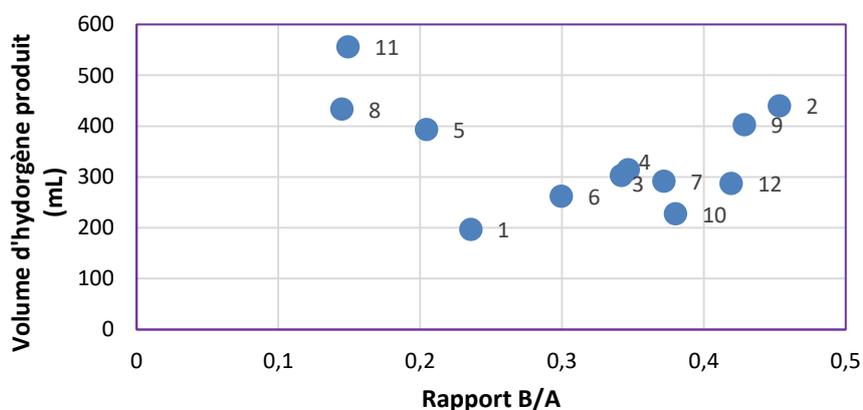


Figure 36 : Variation des volumes d'hydrogène produit en fonction des rapports B/A

La figure 36 met en évidence un profil en forme de parabole. Aux faibles rapports B/A ($0,21 < B/A$) correspondent les teneurs les plus élevées en acétate (essais 8 et 11 et dans une moindre mesure essai 5) ; la contribution à la production d'hydrogène par la voie acétate permet donc d'obtenir de bonnes productions d'hydrogène. Pour des valeurs B/A intermédiaires ($0,23 < B/A < 0,42$), on observe que le volume d'hydrogène produit est plus faible et compris entre 197 mL et 317 mL ; ces valeurs correspondant à une part de l'hydrogène produit par la voie butyrate élevée. Pour les valeurs B/A supérieures à 0,42 (essais 2 et 9), les quantités d'hydrogène produit se trouvent dans la même gamme de production d'hydrogène que pour $B/A < 0,21$ pour des teneurs relativement faibles en acétate et une contribution de l'hydrogène produit par la voie butyrate moindre par rapport aux valeurs de B/A intermédiaires (0,38 pour l'essai 2 et 0,57 pour l'essai 9). Ainsi, dans ce cas de figure, les quantités d'acétate seraient co-produites avec l'hydrogène en plus grande proportion. Ainsi, l'ensemble de ces observations entre la quantité d'hydrogène produit et le rapport B/A confirment l'hypothèse de la présence des bactéries productrices d'hydrogène par les voies acétate et butyrate mais aussi à la présence, dans certains cas, d'autres genres bactériens homoacétogènes et donc consommateurs d'hydrogène en produisant de l'acétate. Pour expliquer l'augmentation de la production d'hydrogène malgré la diminution de la quantité acide acétique dans le milieu réactionnel, il est intéressant de calculer les quantités d'hydrogène produit à partir de l'acétate, déduites de celles produites à partir du butyrate. La figure 37 (a et b) représente respectivement les pourcentages d'hydrogène co-produit avec le butyrate et l'acétate en fonction de la quantité globale d'hydrogène produit dans l'hypothèse où ces 2 métabolites sont les seuls co-produits de l'hydrogène.

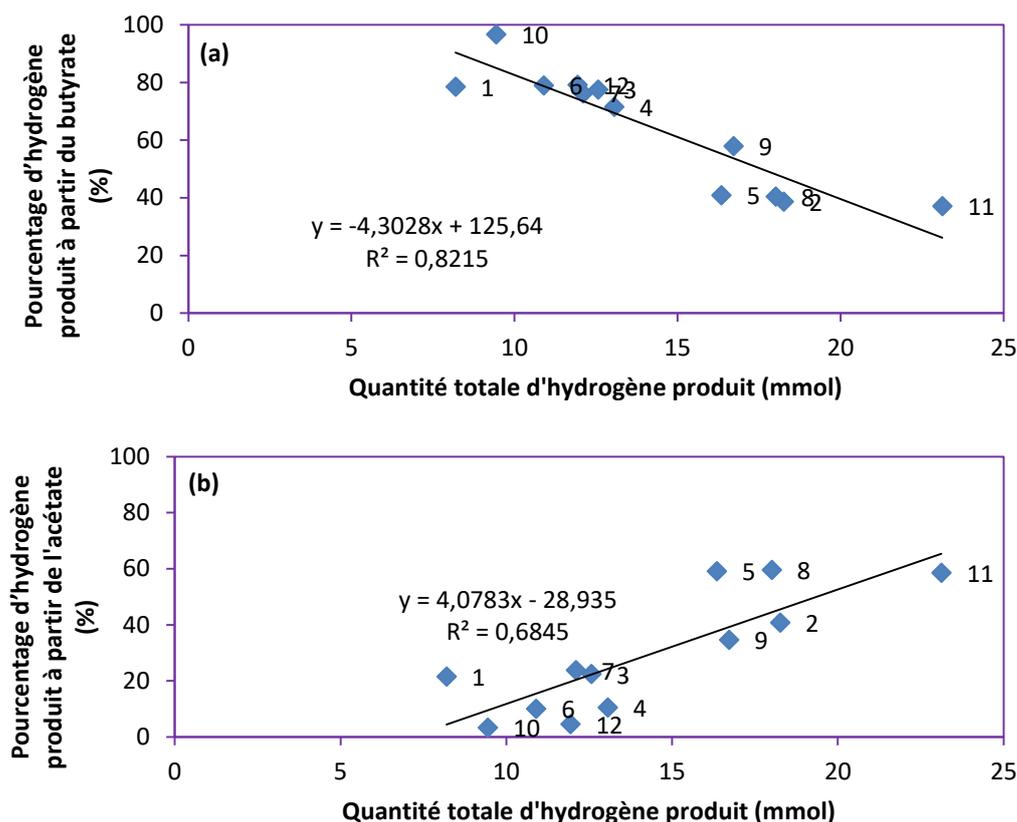


Figure 37 : Pourcentages molaires d'hydrogène produit à partir du butyrate (a) et de l'acétate (b) calculées en fonction de la quantité totale d'hydrogène produit expérimentalement

Les pourcentages d'hydrogène produit à partir des deux métabolites sont relativement bien corrélés avec la quantité d'hydrogène produit. On observe que plus la contribution en hydrogène produit par la voie butyrate est importante moins la quantité d'hydrogène produit est élevée. Cependant, le pourcentage d'hydrogène produit par la voie acétate montre une tendance inverse : une contribution en hydrogène produit par la voie acétate croissante donne lieu à une quantité plus importante d'hydrogène produit. Globalement, ceci confirme une capacité de production de l'hydrogène avec des quantités plus importantes par la voie acétate contrairement à la voie butyrate pour cette biomasse caféicole.

La figure 38 représente la variation du volume de production d'hydrogène en fonction du rapport $H_2/(2*(A+B))$. Ce rapport a été utilisé dans plusieurs études [32-34] pour identifier les voies empruntées par les microorganismes durant la production d'hydrogène par fermentation obscure. Des valeurs proches à 1 de ce rapport signifient que le $NADH^+$ produit par la glycolyse est utilisé uniquement pour les voies productrices d'hydrogène c'est-à-dire par les voies acétate et butyrate. Alors que les faibles valeurs de ce rapport signifient qu'il existe une production d'autres métabolites concurrents à la production d'hydrogène et issus de la consommation d'hydrogène comme la production d'acétate par la voie d'homoacétogénèse et par la production de propionate, de lactate ou d'éthanol.

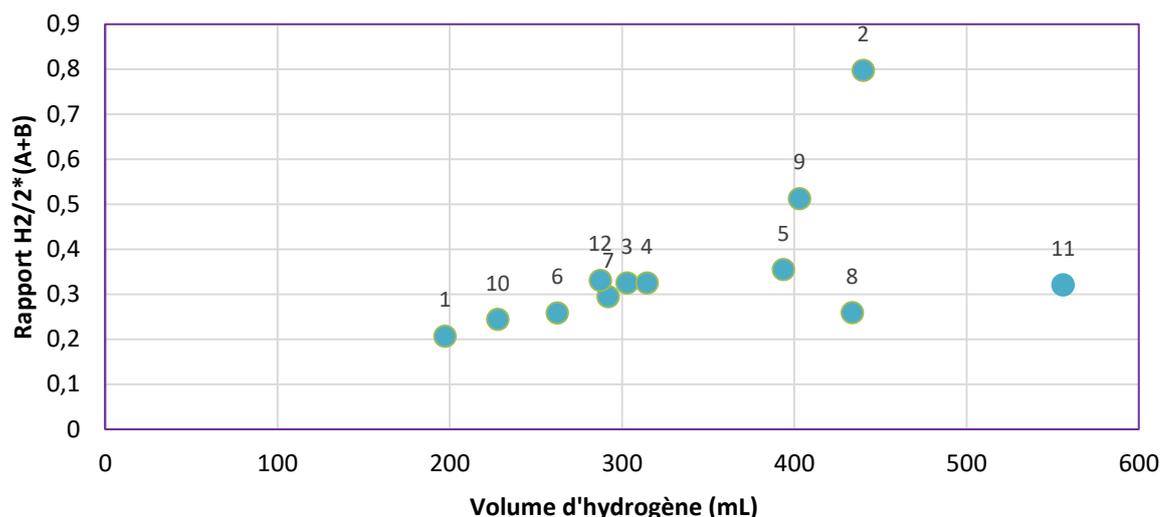


Figure 38 : Variation de rapport $H_2/(2 \times (A+B))$ en fonction de volume d'hydrogène produit

La figure 38 montre que le volume d' H_2 produit augmente significativement avec le rapport $H_2/(2 \times (A+B))$ entre 0,2 et 0,4. Les essais 8 et 11, qui produisent de fortes quantités d'hydrogène présente un rapport $H_2/(2 \times (A+B))$ relativement faible (0,3). Deux valeurs élevées du rapport sont observées (0,5 et 0,8), correspondantes aux essais 9 et 2 qui ne diffère que par l'usage ou le non usage du prétraitement avec base. Ces deux valeurs correspondent aux faibles valeurs d'acétate produit, ce qui peut signifier que les volumes d'hydrogène produits élevés malgré de faibles quantités d'acétate produit et les valeurs de rapport B/A les plus élevées sont dus à l'absence de la production d'autres métabolites concurrents à la production d'hydrogène.

La figure 39 recense les quantités des autres métabolites produits ou consommés lors des 12 essais.

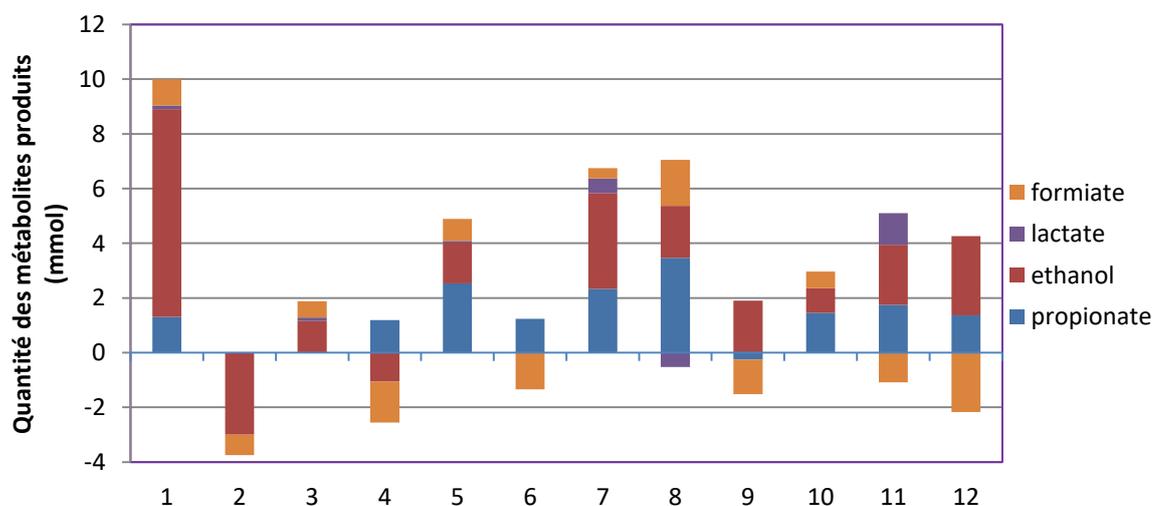


Figure 39 : Quantités des métabolites (formiate, lactate, propionate, éthanol) produits ou consommés pour les différents essais du plan d'expériences

La figure 39 montre que de l'éthanol, du propionate, du formiate et du lactate sont également produits durant la fermentation. Cependant, ces métabolites sont produits avec des quantités plus faibles par rapport à celles de l'acétate et dans certains cas à celles du butyrate. Le propionate est produit à différentes teneurs pour 9 des 12 essais et absent des tests 2 et 3. Des traces de propionate sont observées pour l'essai 9.

Le formiate est consommé à l'issue des essais 2, 4, 6, 9, 11 et 12, qui donnent des quantités d'hydrogène produites élevées sauf pour les essais 6 et 12. Ceci peut en partie expliquer l'augmentation de l'hydrogène produit par la dégradation du formiate en dioxyde de carbone et en hydrogène (2). Cependant, le formiate est produit sans être consommé pour les essais 5 et 8 malgré une production élevée en hydrogène. Cette diversité de production est sans doute due à la variation des consortia microbiens présents pour chaque essai.



On remarquera que les essais 2 et 9 sont les seuls pour lesquels on observe une consommation du formiate et l'absence de production de propionate. La consommation de formiate produit uniquement le couple H_2 et CO_2 sans autres acides et l'absence de production de propionate ne consomme pas d'hydrogène ; ainsi, les deux phénomènes s'additionnent et peuvent expliquer le rapport $H_2/(2 \times (A+B))$ le plus élevé pour ces 2 essais.

D'autre part, l'éthanol est produit durant tous les essais hormis pour les essais 2 et 4, réalisés avec des prétraitements avec acide et base et pour lesquels une consommation d'éthanol est observée. Ceci peut être expliqué par le fait que les prétraitements chimiques inhibent la voie de production classique d'éthanol, considérée comme une voie concurrente à la production d'hydrogène vis-à-vis du substrat, bien que ces deux traitements soient aussi appliqués pour l'essai 11, qui donne lieu à une production d'éthanol. Oh *et al.* (2003) [35] expliquent la consommation de l'éthanol par la réversibilité de l'équation de production d'éthanol liée à l'augmentation de la quantité d'hydrogène produit. Par conséquent, la diminution de la pression partielle d'hydrogène rend l'équation (3) inverse thermodynamiquement possible.



D'autre part, une quantité d'éthanol importante est produite lors de l'essai 1, qui donne la plus faible production d'hydrogène. Maojin *et al.* (2009) [36] ont expliqué que l'augmentation de l'éthanol conduisant à la diminution de l'hydrogène produit est due à la consommation de celui-ci pour produire l'éthanol selon l'équation (3). On notera que le pourcentage d'acétate estimé ayant conduit à la production d'hydrogène est pour cet essai très faible (6,5%).

Selon les résultats du plan d'expériences et de l'analyse des métabolites, on peut constater que le changement des prétraitements conduit vraisemblablement au changement des voies

métaboliques empruntées. Les prétraitements avec acide et base appliqués consécutivement permettent de générer des quantités d'hydrogène produites élevées. Ces prétraitements semblent inhiber la voie de production de l'éthanol, considérée comme une voie concurrente à la production d'hydrogène, hormis pour l'essai 11.

D'autre part, la consommation du formiate est liée à la présence du prétraitement enzymatique (sauf pour l'essai 4). Cependant, le prétraitement avec base sans prétraiter la biomasse avec un prétraitement à l'acide change la voie de consommation du formiate et par conséquent inhibe la production d'hydrogène comme cela est montré pour l'essai 10. D'autre part, selon les essais 2, 9 et 11, l'utilisation du prétraitement enzymatique avec ou sans prétraiter la biomasse avec un acide et une base en même temps ou avec d'autres prétraitements favorise la production d'hydrogène. Mais les voies empruntées par les microorganismes, lors des essais 2 et 11, correspondants aux prétraitements avec acide et base en même temps, ne sont visiblement pas les mêmes et par conséquent, cela peut être dû à la variation des consortia bactériens liée à l'usage du prétraitement thermique dans l'essai 11 et à l'absence de ce facteur dans l'essai 2.

La grande quantité d'éthanol produite lors de l'essai 1 avec une faible production d'hydrogène est liée au prétraitement thermique sans aucun autre prétraitement. Cela explique que le prétraitement thermique seul n'est pas suffisant pour inhiber les microorganismes responsables des voies concurrentes et consommatrices d'hydrogène. Au contraire, ce prétraitement semble avoir une action inhibitrice des microorganismes producteurs d'hydrogène endogènes à la biomasse et semble favoriser la solvantogénèse.

La présence du prétraitement avec uniquement une base n'est pas favorable à la production d'hydrogène comme cela est montré sur l'essai 3. En même temps, il ne favorise pas spécifiquement la production de propionate ni même de l'éthanol. Pour cet essai, l'absence de régulation du pH lors de la fermentation a pour conséquence de générer un environnement acide défavorable à la croissance des microorganismes. La production d'hydrogène est encore plus faible pour l'essai 10 correspondant au cas où le prétraitement avec base et le prétraitement enzymatique sont réalisés en même temps, avec une production relativement élevée de propionate. Ceci peut être expliqué par l'émergence de microorganismes consommateurs d'hydrogène par la voie propionate, favorisée par le prétraitement enzymatique et/ou l'inhibition des microorganismes hydrogénéogènes.

La présence de prétraitement avec un acide sans régulation de pH et sans aucun autre prétraitement inhibe également la production d'hydrogène comme cela est montré dans l'essai 7. Cependant, les voies empruntées par le consortium bactérien dans ce cas sont différentes de celles suivies dans le cas d'un prétraitement avec base lors de l'essai 3. La faible production d'hydrogène dans ce cas peut être expliquée par la consommation d'hydrogène pour la production de propionate et les productions d'éthanol et de lactate. D'autre part, la régulation de pH durant l'essai 5 montre

une production élevée d'hydrogène avec une production moins importante des autres métabolites concurrents à la production d'hydrogène. En outre, une production d'hydrogène élevée est le résultat de la présence d'autres prétraitements pour les essais 2 et 11.

Enfin, l'essai 11, proposé par le plan d'expériences, est considéré comme la meilleure configuration pour obtenir la performance la plus efficace en production d'hydrogène. Notons que cet essai consiste à conjuguer tous les prétraitements avec la régulation du pH en cours de fermentation, une vitesse élevée d'agitation du bioréacteur et un débit de gaz de balayage élevé.

5- Conclusion

Une biomasse composée de pellicules argentées issues de l'industrie caféicole, a été testée dans cette étude par fermentation obscure endogène à celle-ci et une optimisation de plusieurs paramètres a été appliquée sur cette biomasse pour améliorer les performances de production en hydrogène. La conception statistique des expériences offre une méthodologie efficace pour identifier l'impact de chaque facteur avec un nombre minimum d'expériences en production d'hydrogène à partir de cette biomasse. Les facteurs clés sont identifiés par la conception de Plackett-Burman.

Le plan d'expériences montre que le prétraitement enzymatique, la régulation du pH, le prétraitement avec base et le prétraitement avec acide sont les facteurs les plus importants et impactant positivement la production d'hydrogène. Alors que la diminution du débit du gaz de balayage et le prétraitement thermique sont des facteurs qui inhibent l'activité bactérienne pour la production d'hydrogène. En outre, la vitesse d'agitation n'a aucun effet sur le procédé.

L'application de chaque prétraitement seul ne permet pas d'obtenir une bonne performance de production d'hydrogène, cependant, la conjugaison de plusieurs prétraitements permet de changer les voies empruntées par les microorganismes et par conséquent de faire varier la quantité d'hydrogène produit. Les analyses des métabolites effectués à l'issue de chaque essai ont montré que la variation des facteurs conduit à une variation complète des métabolites produits et par conséquent, sans doute, à une variation des communautés bactériennes.

Le prétraitement thermique est un facteur non favorable à la production d'hydrogène pour la biomasse de pellicules argentées, alors que la présence des autres prétraitements permet d'améliorer les performances des bactéries productrices de l'hydrogène. D'autre part, la régulation du pH au cours de la fermentation est un facteur essentiel dans cette étude. Tandis que le plan d'expériences utilisé dans cette étude a proposé des essais qui ne nécessitent pas de régulation du pH mais donne malgré tout des performances de production d'hydrogène relativement élevés. Enfin, le plan d'expériences de Plackett-Burman a permis d'augmenter la performance d'hydrogène

produit par cette biomasse jusqu'à 48 % de plus en utilisant tous les prétraitements (enzymatique, thermique, avec base et acide) et avec une régulation de pH.

Bibliographie

- [1] J. Wang, W. Wan, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *Int J Hydrog. Energy*, 34 (1) (2009) 235-244.
- [2] E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H.-S. Lee, A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation, *Renew Sust Energ Rev*, 79 (2017) 656-668.
- [3] S. Xie, F. Hai, X. Zhan, W. Guo, H. Ngo, E. Price, D. Nghiem, Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization, *Bioresour Technol*, 222, (2016) 498-512.
- [4] A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, N.L. Lens, G. Esposito, A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products, *Appl Energ*, 144 (2015) 73-95.
- [5] J. Wang, W. Wan, Factors influencing fermentative hydrogen production: a review, *Int J Hydrog. Energy*, 34 (2009) 799-811.
- [6] G.D. Saratale, S. Chen, Y. Lo, R.G. Saratale, J. Chang, Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation – a review, *J Sci Ind Res*, 67 (2008) 962-979.
- [7] C. Li, H.H.P. Fang, Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures, *Crit Rev Environ Sci Technol*, 37 (2007) 1-39.
- [8] S. O-Thong, P. Prasertsan, N.-K. Birkeland, Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis, *Bioresour Technol*, 100 (2009) 909-918.
- [9] P. Kongjan, I. Angelidaki, Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: effect of reactor configuration, *Bioresour Technol*, 101 (2010) 7789-7796.
- [10] M. Saritha, A. Arora, Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility, *Indian J Microbiol*, 52 (2012) 122-130.
- [11] H. Zhu, M. Beland, Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge, *Int J Hydrog. Energy*, 31 (2006) 1980-1988.
- [12] M.S. Stanislaus, N. Zhang, Y. Yuan, H. Zheng, C. Zhao, X. Hu, Q. Zhu, Y. Yang, Improvement of biohydrogen production by optimization of pretreatment method and substrate to inoculum ratio from microalgal biomass and digested sludge, *Renewable Energy*, 127 (2018) 670-677.
- [13] K.-W. Jung, D.-H. Kim, H.-W. Kim, H.-S. Shin, Optimization of combined (acid + thermal) pretreatment for fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* using response surface methodology (RSM), *Int J Hydrog. Energy*, 36 (16) (2011) 9626-9631.
- [14] R. Łukajtis, I. Hołowacz, K. Kucharska, M. Glinkaa, P. Rybarczyk, A. Przyjazny, M. Kamiński, Hydrogen production from biomass using dark fermentation, *Renew Sust Energ Rev*, 91 (2018) 665-694.
- [15] C.M. Pan, Y.T. Fan, Y. Xing, H.W. Hou, M.L. Zhang, Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fnp2, *Bioresour Technol*, 99 (8) (2008) 3146-3154.
- [16] C. Zhao, S. O-Thong, D. Karakashev, I. Angelidaki, W. Lu, H. Wang, High yield simultaneous hydrogen and ethanol production under extreme-thermophilic (70°C) mixed culture environment, *Int J Hydrog. Energy*, 34 (14) (2009) 5657-5665.

- [17] P. Saraphirom, A. Reungsang, Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods, *Int J Hydrog. Energy*, 35 (4) (2010) 13435-13444.
- [18] C. Long, J. Cui, Z. Liu, Y. Liu, M. Long, Z. Hu, Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1, *Int J Hydrog. Energy*, 35 (13) (2010) 6657-6664.
- [19] P. Bakonyi, N. Nemestóthy, É. Lövitusz, K. Bélafi-Bakó, Application of Plackett–Burman experimental design to optimize biohydrogen fermentation by *E. coli* (XL1-BLUE), *Int J Hydrog. Energy*, Volume 36 (2011) 13949-13954.
- [20] A. Marone, G. Massini, C. Patriarca, A. Signorini, C. Varrone, G. Izzo, Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. *Int. J. Hydrog. Energy*. 37 (2012) 5612–5622.
- [21] L. Thao Vi, A. Salakkam, A. Reungsang, Optimization of key factors affecting bio-hydrogen production from sweet potato starch, *Energy Procedia*, 138 (2017) 973-978.
- [22] V. Clion, C. Dumas, S. Collin, B. Ernst, Key factors for biohydrogen production by dark fermentation, *The Can. J. Chem. Eng.* 93 (2) (2015) 309-316.
- [23] C. Galanakis (2017). *Handbook of Coffee Processing By-Products*. Elsevier.
- [24] F. Lina, A. José, I. Solange, Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee. *Food, Bioprocess Eng*, 7(12) (2014) 3493-3503.
- [25] B. Janissen, T.T. Huynh, Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review, *Resour Conserv Recy*, 128 (2018) 110-117.
- [26] R.S. Liu, Y.J. Tang, Tuber melanosporem fermentation medium optimization by Plackett–Burman design coupled with Draper–Lin small composite design and desirability function, *Bioresource Technol*, 101 (9) (2010) 3139-3146.
- [27] Tableau d'analyse de la variance pour la fonction Analyser un plan factoriel, [En ligne]. Disponible sur : <https://support.minitab.com/fr-fr/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/analysis-of-variance-table/>. [Consulté le: 26-avr-2019].
- [28] Y. Sewsynker, E.B. Gueguim Kana, Intelligent models to predict hydrogen yield in dark microbial fermentations using existing knowledge, *Int J Hydrog. Energy*, 41 (30) (2016) 12929-12940.
- [29] U. Hemant, *Six Sigma for Business Excellence: Approach, Tools and Applications*. Pearson Education India, 2011.
- [30] R.A. Stowe, R.P. Mayer, Efficient screening of process variables, *Ind. Eng. Chem.*, 58 (1966), 36-40.
- [31] A.K. Nayak, D. Pal, J. Pradhan, M.S. Hasnain, Fenugreek seed mucilage-alginate mucoadhesive beads of metformin HCl: Design, optimization and evaluation, *Int. J. Biol. Micromol.*, 54 (2013), 144-154.
- [32] A. Gadhe, S.S. Sonawane, M.N. Varma, Kinetic analysis of biohydrogen production from complex dairy wastewater under optimized condition, *Int J Hydrog. Energy*, 39 (3) (2014) 1306-1314.
- [33] G. Luo, L. Xie, Z. Zou, Q. Zhou, J.-Y. Wang, Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH, *Applied Energy*, 87(12) (2010) 3710-7.
- [34] Y. Mu, X.-J. Zheng, H.-Q. Yu, R.-F. Zhu, Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *Int. J. Hydrog. Energy*, 31(6) (2006) 780-785.

[35] S.-E. Oh, S. Van Ginkel, B.E. Logan, The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production, *Environ Sci Technol*, 37 (22) (2003) 5186-5190.

[36] M. Cui, Z. Yuan, X. Zhi, J. Shen, Optimization of biohydrogen production from beer lees using anaerobic mixed bacteria, *Int J Hydrog. Energy*, 34 (19) (2009) 7971-7978.

Conclusion générale et perspectives

Dans le but de développer le procédé de bioproduction d'hydrogène par fermentation, ce manuscrit s'appuie sur les méthodes numériques de modélisation utilisant différents types de modèles mathématiques. En se basant sur les principaux objectifs fixés, trois types de modèles mathématiques ont été utilisés.

Dans un premier temps, des modèles de boîte blanche ont été développés pour optimiser le rendement en hydrogène produit et pour comprendre le procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure sous plusieurs conditions, ainsi que pour étudier les cinétiques microbiennes, la performance des bactéries dans le milieu réactionnel et leurs interactions, l'interdépendance entre les métabolites, l'effet de la teneur initiale en substrat ou de la charge initiale de biomasse. Dans un second temps, les modèles à boîte grise, comme le modèle de Gompertz et le modèle logistique, ont été utilisés pour extraire des informations clés (production maximale et productivité en hydrogène, temps de latence pour le premier et profil de croissance bactérienne pour le second) à partir des données expérimentales et ainsi adapter les données de modélisation aux données expérimentales. Dans un troisième temps, un modèle à boîte noire a été utilisé dans l'objectif d'optimiser le procédé de bioproduction d'hydrogène par fermentation endogène d'une biomasse et en étudiant l'effet de facteurs clés sur plusieurs réponses liées à la performance du procédé de production d'hydrogène.

Le premier chapitre de ce manuscrit a permis d'établir, dans un premier temps, les voies possibles de production d'hydrogène par fermentation ainsi que les voies concurrentes à la consommation du substrat et les voies consommatrices d'hydrogène par une étude générale sur la production d'hydrogène par fermentation obscure, afin de pouvoir les implémenter dans un modèle de type boîte blanche. Plusieurs facteurs physiques (par ex. pression partielle en hydrogène), chimiques (par ex. régulation du pH et traitements de la biomasse) et biologiques (nature de l'*inoculum*, traitement enzymatique) affectant la production d'hydrogène par fermentation ont également été introduits en s'appuyant sur les études trouvées dans la littérature pour améliorer la performance du procédé. Cette partie nous a guidée sur les paramètres à tester dans la dynamique d'un modèle de type plan d'expériences. Dans un second temps, les concepts généraux des modèles mathématiques du procédé de production d'hydrogène par fermentation ont également été étudiés : classification des modèles mathématiques, leurs utilisations et leurs développements actuels dans le domaine de la production d'hydrogène par fermentation. Cette étude bibliographique nous a permis de regrouper les informations sur le processus biologique et le traitement mathématique dans le but de les appliquer dans le domaine de la modélisation du procédé de production d'hydrogène par fermentation, qui contient, jusqu'à aujourd'hui, des zones d'ombre ou non étudiées.

Le troisième chapitre de ce travail a porté sur l'étude d'un modèle mathématique à boîte blanche pour déterminer l'influence de la teneur initiale en substrat sur le procédé de production d'hydrogène par fermentation dans un réacteur semi-batch en utilisant une culture mixte extraite

des boues de station d'épuration de l'Eurométropole de Strasbourg traitées thermiquement. La sélection du modèle utilisé pour cette étude a été faite après tests de plusieurs cinétiques et modèles. Le modèle mathématique de cinétique de Aiba avec facteur de correction (MMCA-FC) s'est révélé être le meilleur modèle par rapport aux autres testés (Monod, Contois, sans et avec facteur de correction) et avec une très bonne fiabilité. Une validation du modèle proposé en utilisant d'autres conditions expérimentales (concentration initiale en substrat) a été réalisée avec succès. Le comportement des microorganismes présents dans le milieu réactionnel à différentes concentrations initiales de substrat a été étudié en se basant sur les paramètres cinétiques estimés du modèle développé dans ce travail. Il a été constaté que travailler à une concentration en substrat élevée réduit l'activité des bactéries, inhibée par l'augmentation de la concentration des acides organiques générés par la fermentation ; ce qui a pour conséquence d'inhiber la production d'hydrogène. Il a été confirmé que la modélisation permet d'établir un optimum de concentration initiale en substrat pour le système donné. Des performances de production d'hydrogène accrue ont été observées à des conditions de concentration en substrat moins élevée, qui se sont révélées plus favorables à l'amélioration de la vitesse et du rendement de production en hydrogène. La vitesse maximale de production d'hydrogène de 7 mmol.h^{-1} (168 mL/h) a été obtenue pour une concentration initiale en substrat de 22 mmol/L (13 g/L). La force de ce modèle modifié est de pouvoir modéliser fidèlement les différentes périodes : phase de latence, croissance bactérienne exponentielle et stationnaire pour la production d'hydrogène ainsi que plusieurs métabolites coproduits ou non de l'hydrogène, en ajoutant un facteur de correction à un modèle de cinétique bien adapté aux conditions du procédé.

L'étude du procédé de production d'hydrogène par fermentation endogène d'une biomasse viticole, ayant la double fonction de substrat et de culture mixte, en utilisant un modèle mathématique à boîte blanche a fait l'objet du quatrième chapitre de ce travail. Les modèles mathématiques développés dans cette étude, en se basant sur les voies métaboliques proposées par plusieurs schémas réactionnels, ont permis d'étudier l'interaction entre les bactéries de différents genres présentes dans le milieu, ainsi que leur effet sur les voies métaboliques empruntées pour la dégradation des substrats. Il a été constaté que les clostridies sont les bactéries majoritaires qui conduisent aux voies de production d'hydrogène dans le milieu réactionnel. Cependant, la présence d'autres bactéries de genres différents (*lactobacillus*, *enterococcus*) modifie les voies de production des métabolites comme l'acétate et le butyrate et change également les voies de consommation des substrats (hexoses et tartrate), ainsi que les vitesses de consommation et de croissance des bactéries. Le modèle développé dans cette étude a été appliqué pour différentes charges initiales de biomasse ; il a donné lieu à de bons résultats de calibrage avec les données expérimentales. Il a été constaté que la variation de la charge de biomasse conduit à la variation de la performance des bactéries, de la consommation des substrats et même des voies empruntées ainsi que leurs vitesses spécifiques.

Les rendements instantanés du modèle, estimés pour les différentes charges de biomasse, ont permis de comprendre les voies empruntées par les bactéries. L'étude des cinétiques spécifiques de consommation d'hexoses et de tartrate confirme la capacité d'*Enterococcus villorum* à consommer le tartrate. Il a été constaté qu'une charge initiale en biomasse de 60 g DCO/L permet d'obtenir les meilleurs rendements d'hydrogène. L'augmentation de la charge au-delà de 60 g DCO/L conduit à une diminution de la vitesse spécifique de la consommation d'hexose liée à l'émergence d'autres microorganismes (comme *Enterococcus villorum*) qui entrent en concurrence avec les clostridies et les bactéries productrices d'hydrogène en consommant les hexoses. Comparativement à la littérature, notre approche consistant à développer un nouveau modèle à boîte blanche sur la production d'hydrogène par fermentation d'une biomasse à double fonction (fermentation endogène) est innovante et nous a permis d'accéder à des informations sur les cinétiques de réaction ainsi que sur les interactions entre les bactéries. De plus, l'application de ce modèle sur différentes charges de biomasse nous a permis de le valider et d'avoir par la suite, la possibilité de le transposer à d'autres études.

Le cinquième chapitre de ce travail a été consacré à la mise en place d'un plan d'expériences pour optimiser le procédé de production d'hydrogène par fermentation endogène d'une biomasse caféicole (pellicules argentées). Le modèle de Plackett-Burman a été utilisé pour étudier l'influence de plusieurs paramètres : prétraitements enzymatique, thermique et chimiques (base, acide), régulation de pH, débit de gaz de balayage (pour extraire en continu les gaz produits) et vitesse d'agitation, dans le but d'augmenter le volume d'hydrogène produit, la vitesse de production d'hydrogène et le rapport H_2/CO_2 , ainsi que pour minimiser le temps de latence. Contrairement à la diminution du débit du gaz de balayage, le prétraitement thermique inhibe l'activité bactérienne pour la production d'hydrogène. Cependant, la vitesse d'agitation n'a aucun effet significatif sur le procédé. Alors qu'il a été constaté que la régulation du pH en cours de fermentation est un facteur essentiel dans la littérature, le plan d'expériences utilisé dans cette étude a proposé des essais qui ne nécessitent pas de régulation du pH et qui donne lieu à des performances de production d'hydrogène relativement élevées. L'utilisation de plusieurs prétraitements simultanément permet de changer les voies empruntées par les microorganismes et par conséquent d'avoir une quantité d'hydrogène produit plus importante. Enfin, le plan d'expériences de Plackett-Burman a permis d'augmenter la production d'hydrogène par cette biomasse jusqu'à 48 %, en cumulant tous les prétraitements (enzymatique, thermique, avec bases et acides) et avec une régulation de pH. La force de ce modèle à boîte noire est d'offrir la capacité d'appliquer un plan d'expériences sur la production d'hydrogène par fermentation (endogène) d'une nouvelle biomasse originale en testant de nouveaux facteurs, notamment les prétraitements de la biomasse, dont peuvent résulter des rendements en hydrogène produit plus intéressants.

Conclusion générale et perspectives

En conclusion de ce travail, les objectifs principaux étaient de répondre aux lacunes rencontrées liées aux phénomènes physico-chimiques et biologiques du procédé de production d'hydrogène par fermentation. Un autre objectif était également d'optimiser ce procédé. Plusieurs études ont pu être réalisées dans cette thèse, par le développement de modèles mathématiques, qui nous a permis de mieux comprendre plusieurs phénomènes biologiques et physiques et d'optimiser plusieurs facteurs affectant le procédé. Ces résultats nous ont permis d'entrevoir d'autres pistes d'amélioration du procédé et donc plusieurs perspectives à ces travaux sont envisagées.

Tout d'abord, une étude de performance des bactéries en utilisant une biomasse endogène a, en effet, été réalisée avec succès ; cependant, une étude plus approfondie sur la variation de croissance et de production indépendamment pour chaque bactérie n'a pas été développée. Le but de cette étude serait tout d'abord de comprendre la cinétique et les performances de production de chaque genre bactérien dans les conditions de fonctionnement du bioréacteur, ainsi que leur interaction avec d'autres genres de bactéries. Par conséquent, les bactéries de différents genres, pouvant être en synergie, pourraient être sélectionnées pour atteindre des performances plus élevées en production d'hydrogène. Une autre perspective est l'application des paramètres optimisés de notre modèle pour faire une simulation sur d'autres conditions opératoires dans le but d'améliorer le rendement de l'hydrogène produit et par la suite de les tester expérimentalement. La réussite du développement des modèles mathématiques sur le procédé de la production d'hydrogène par fermentation en réacteur semi-batch nous permet d'ouvrir un champ d'application de ces modèles sur d'autres designs de réacteurs (réacteurs en fonctionnement continu à lit fluidisé ou membranaires) en ajoutant d'autres améliorations possibles sur d'autres axes d'études (transfert de matière, hydrodynamique, ...).

D'autres perspectives peuvent être appliquées en se basant sur les informations physico-chimiques extraites de ce travail pour développer une étude globale en 3D sur différents designs de bioréacteurs. Une simulation globale sur le réacteur par le code CFD (*Computational Fluid Dynamics*) en utilisant le logiciel Fluent pourra être appliqué en optimisant les différents paramètres ayant un impact sur les rendements en hydrogène par l'étude de l'hydrodynamique d'écoulement à l'intérieur des différents réacteurs et des cinétiques réactionnelles et en mettant en évidence certains phénomènes de transfert de matière. L'intégration des modèles développés dans cette étude et également des paramètres optimisés permettront de faciliter la tâche pour développer cet axe. De plus, cette étude permettra un passage plus aisé vers une unité de production d'hydrogène par fermentation à plus grande échelle.

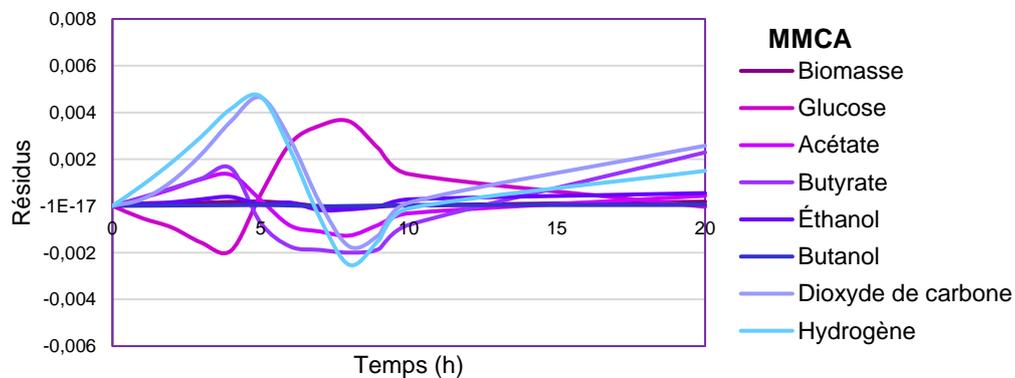
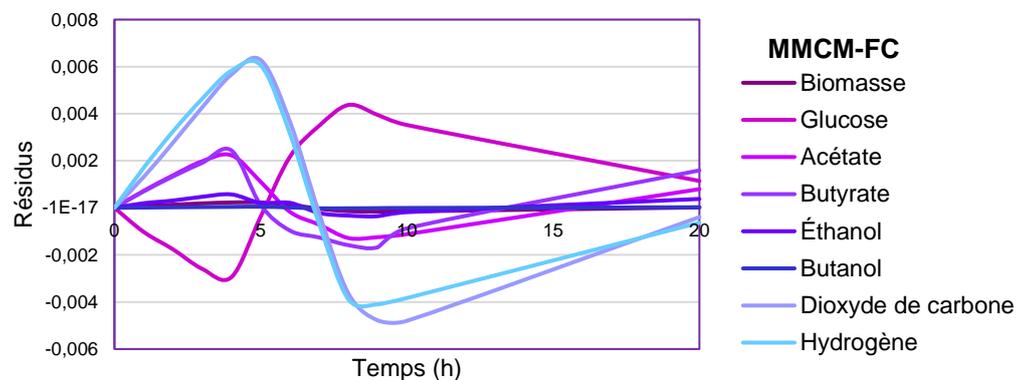
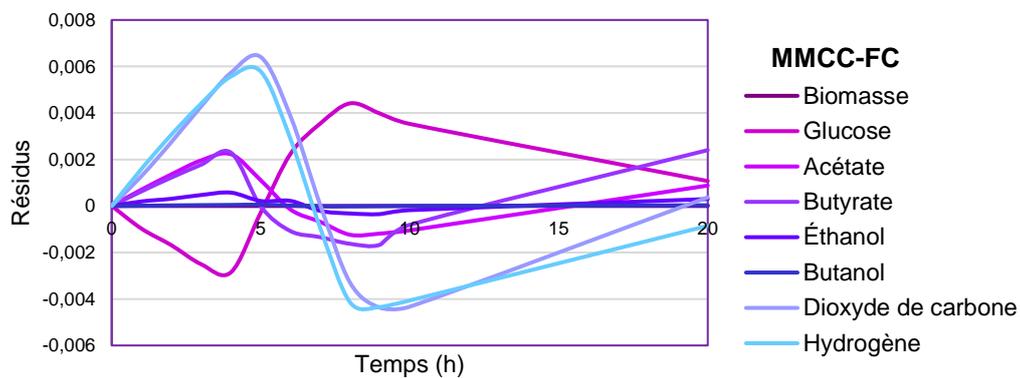
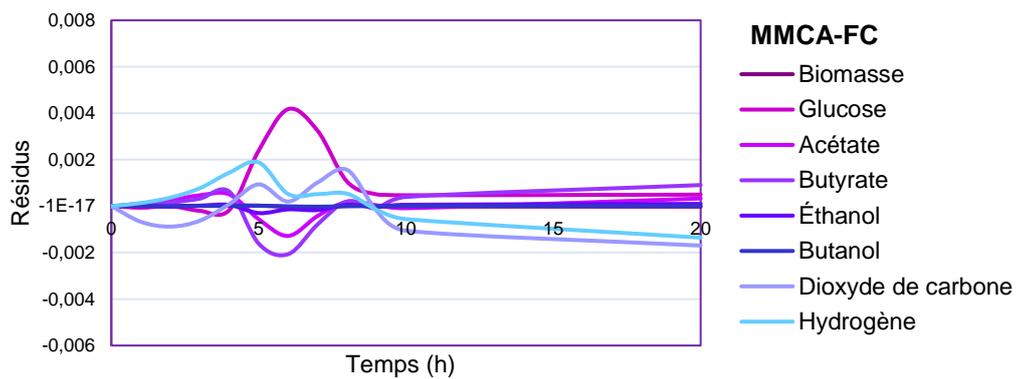
Le plan d'expériences utilisé dans cette étude nous permet d'envisager d'appliquer cette approche à une nouvelle biomasse endogène, qui devra avoir un potentiel de production d'hydrogène plus important que celui de la biomasse caféicole testée. Cette biomasse, potentiellement commune ou non aux deux pays ayant soutenu ces travaux (Algérie et France)

Conclusion générale et perspectives

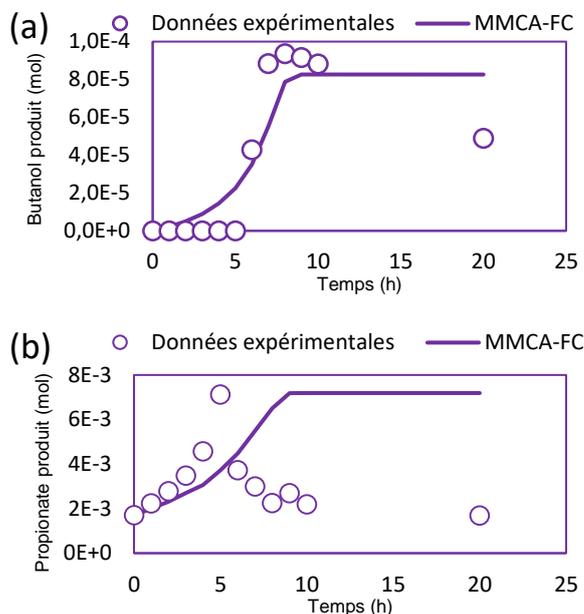
pourra être choisie pour son abondance et dans un objectif de valorisation énergétique par un procédé vert et économe en énergie tel que le bioprocédé de production d'hydrogène par fermentation obscure.

Annexes

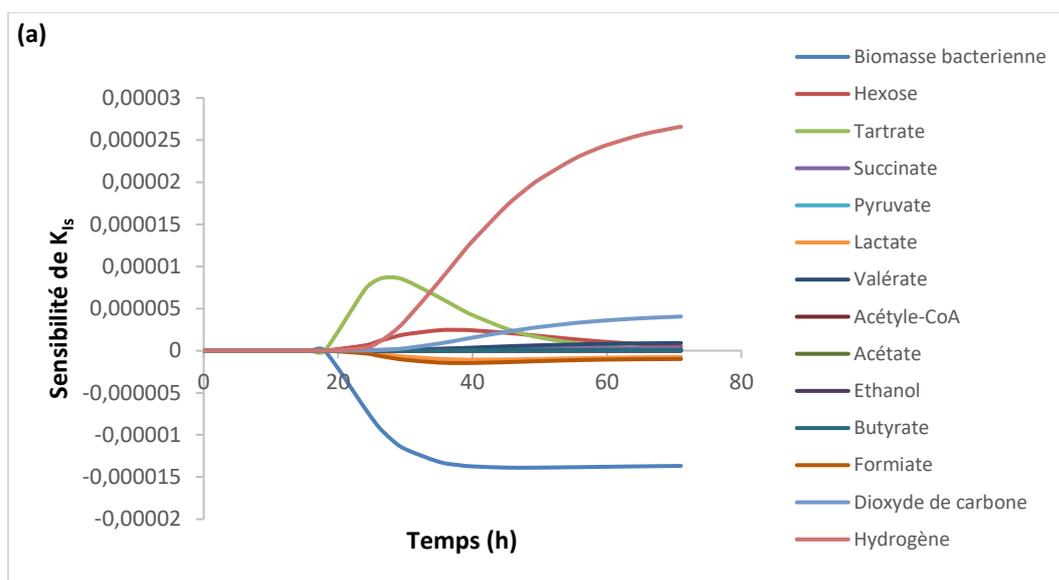
Annexe 1 : Représentation des variations des résidus des modèles proposés

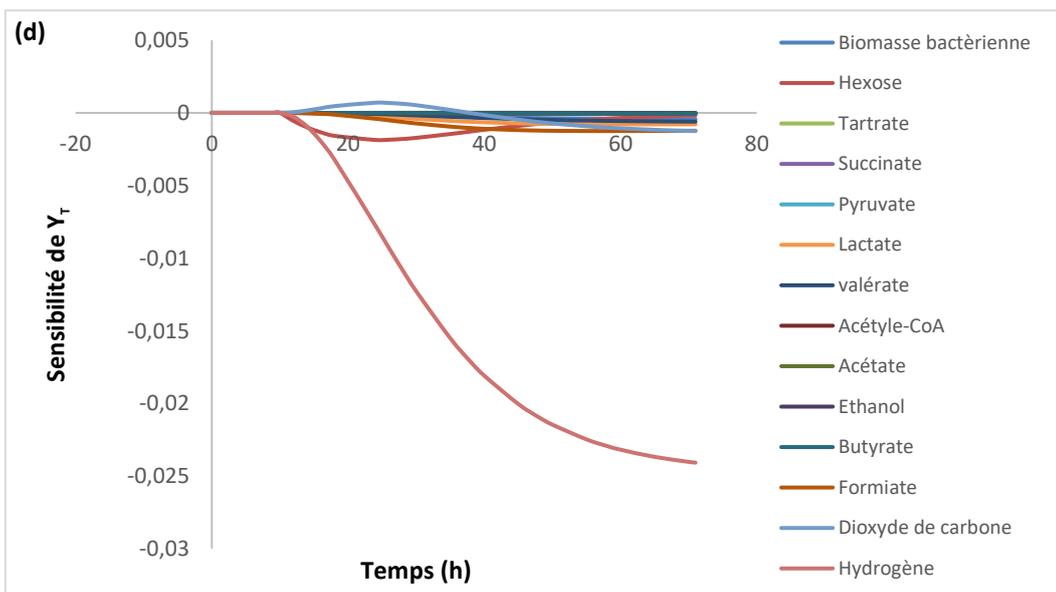
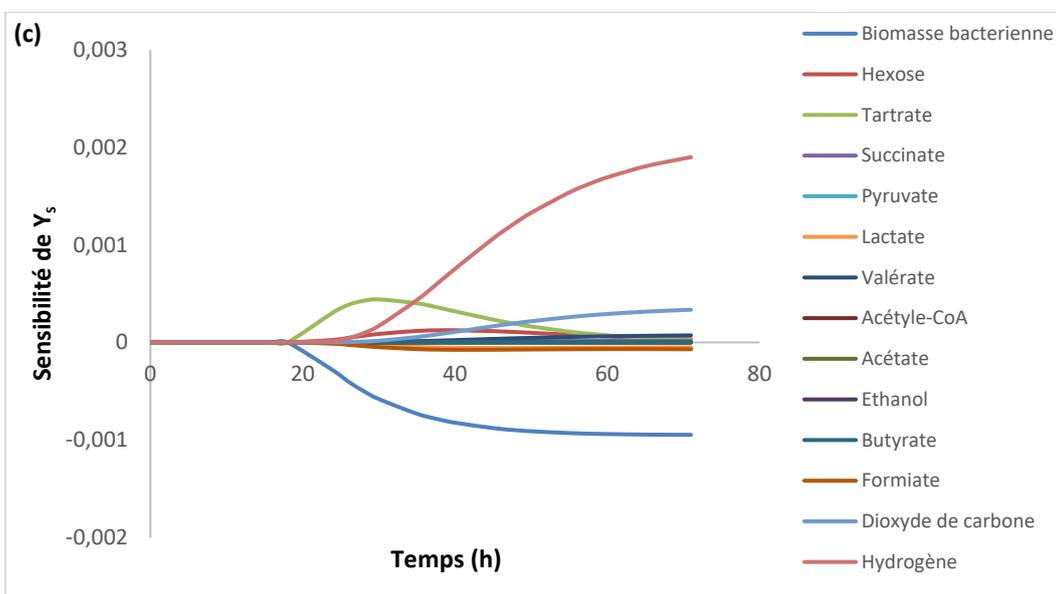
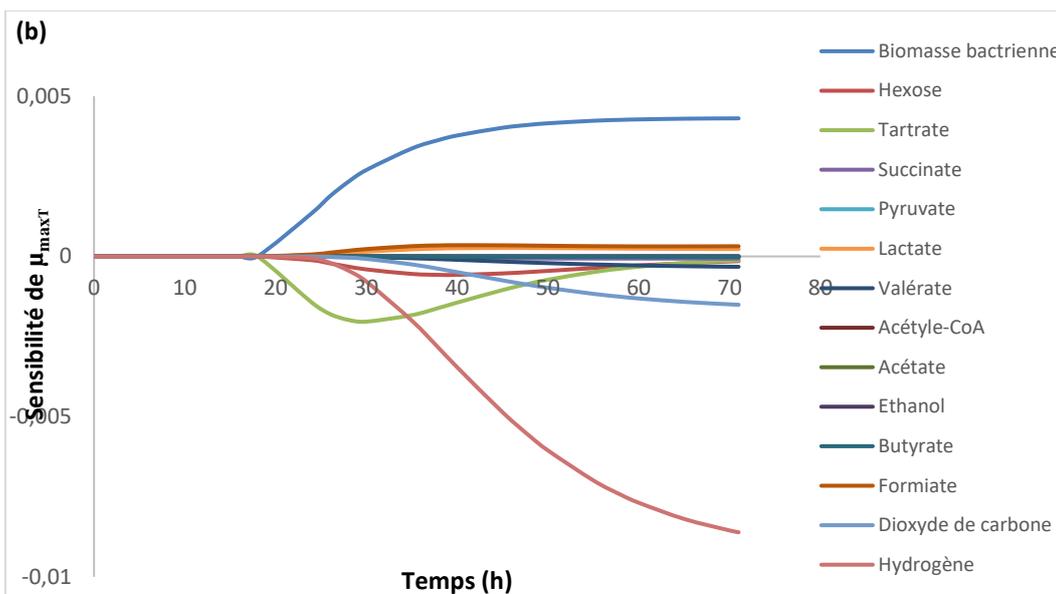


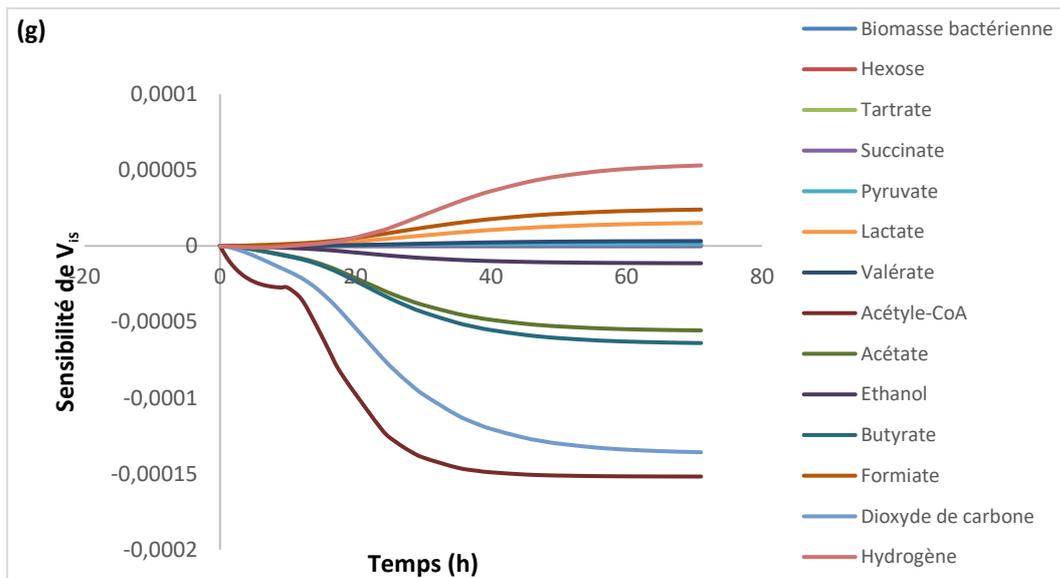
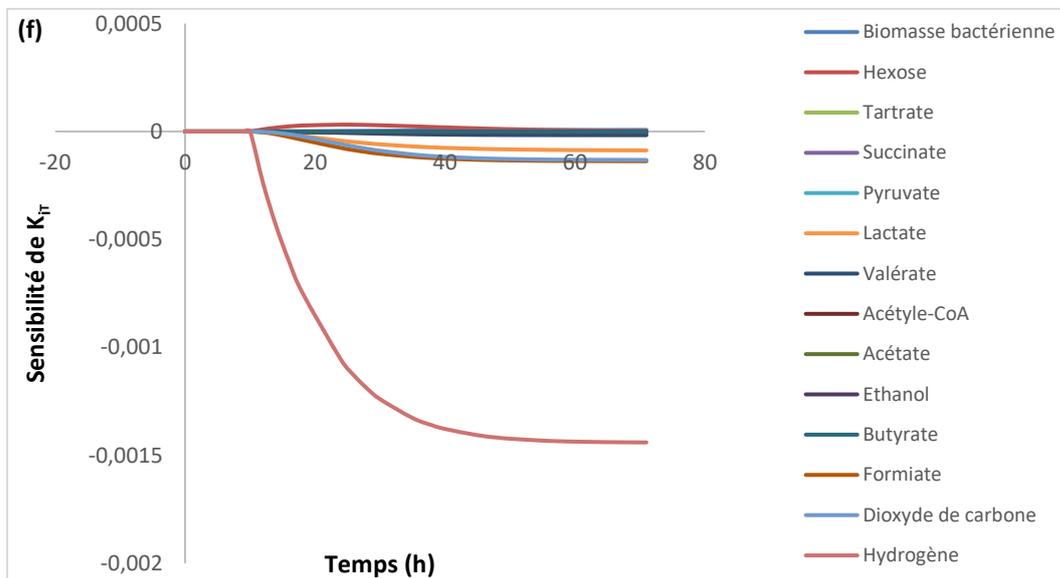
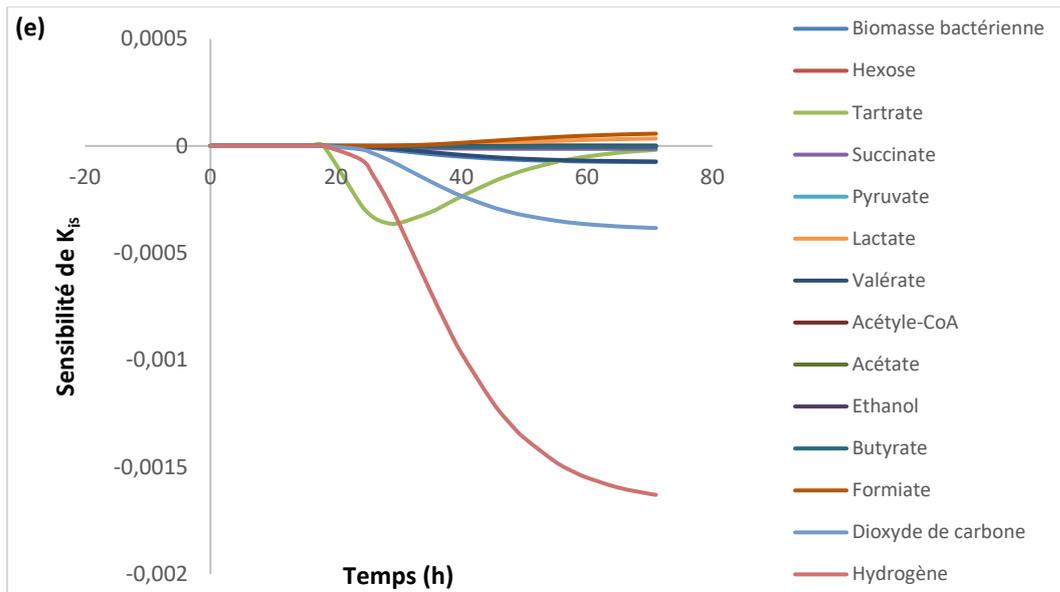
Annexe 2 : Représentation des variations de formation du butanol (a) et du propionate (b) par la cinétique de Aiba (MMCA) avec facteur de correction (FC)

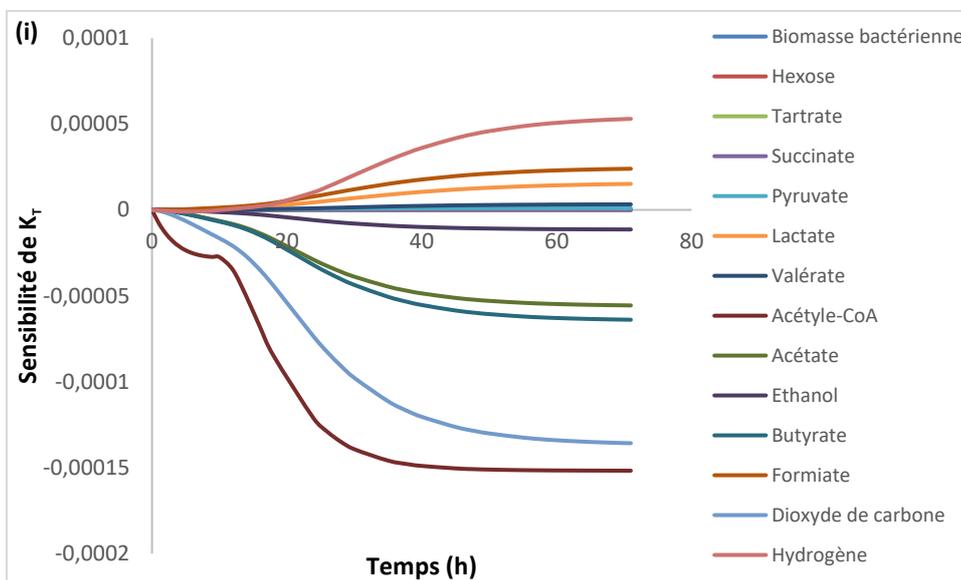
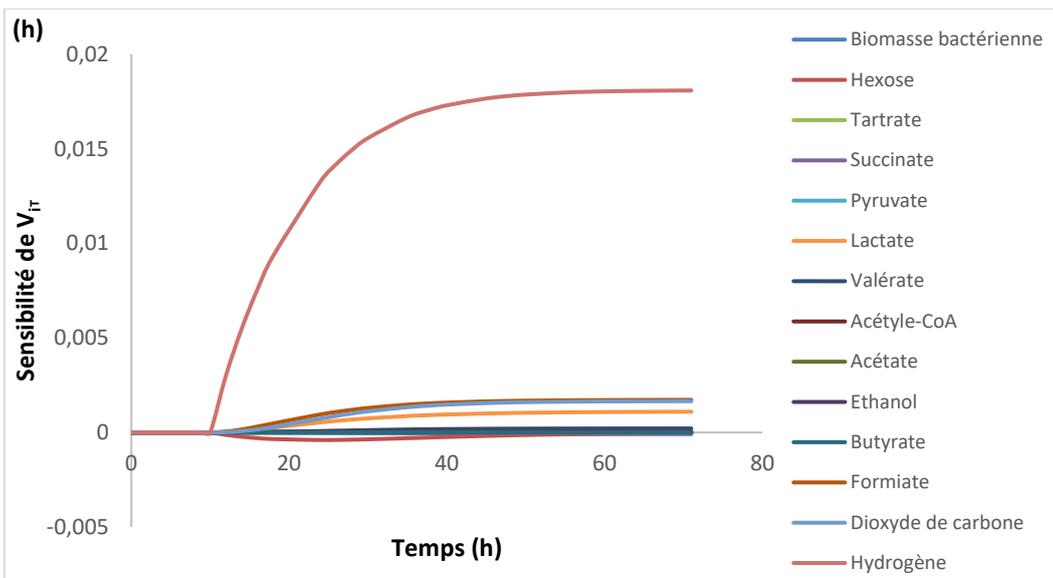


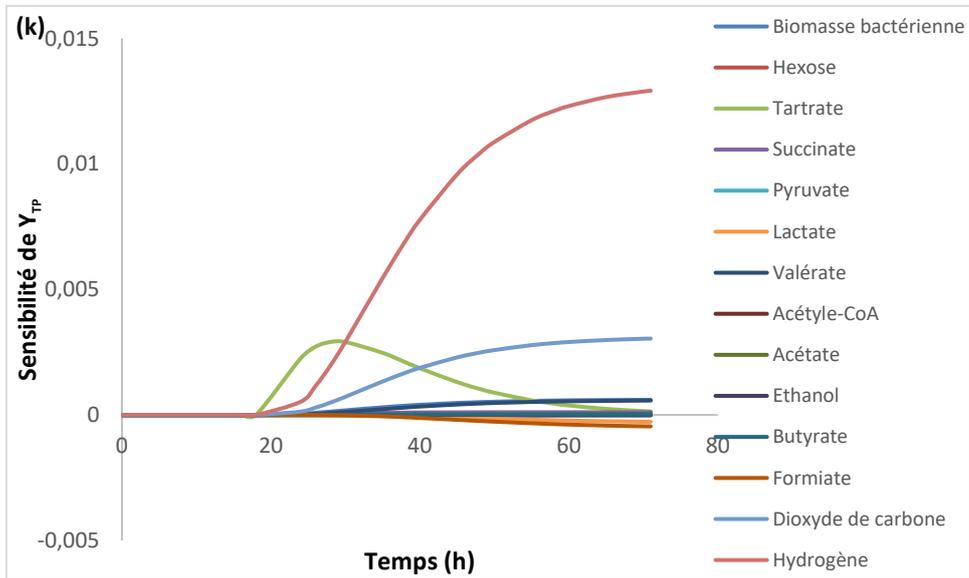
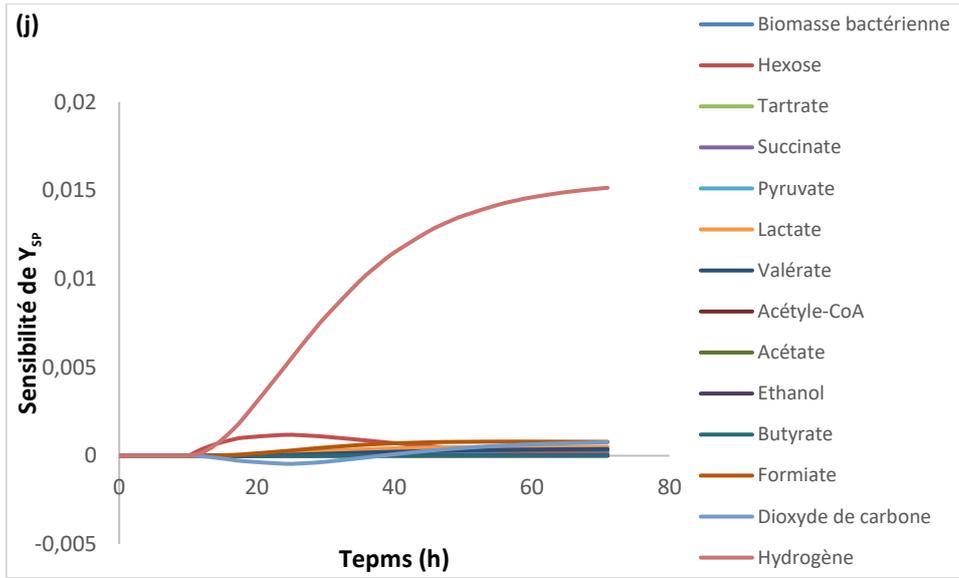
Annexe 3 : Variation de sensibilité de K_{Is} (a), μ_{maxT} (b), Y_s (c), Y_T (d), K_{is} (e), K_{iT} (f), V_{is} (g), V_{iT} (h), K_T (i), Y_{SP} (j), Y_{TP} (k) sur les variables d'état



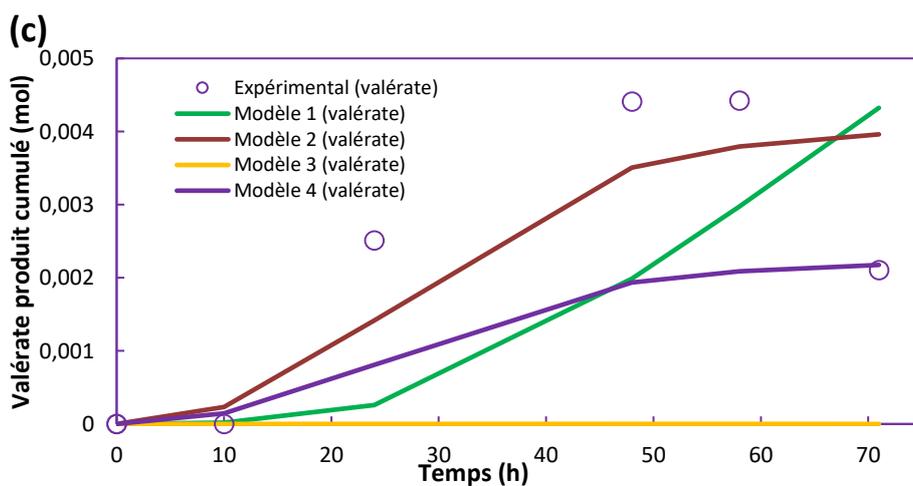
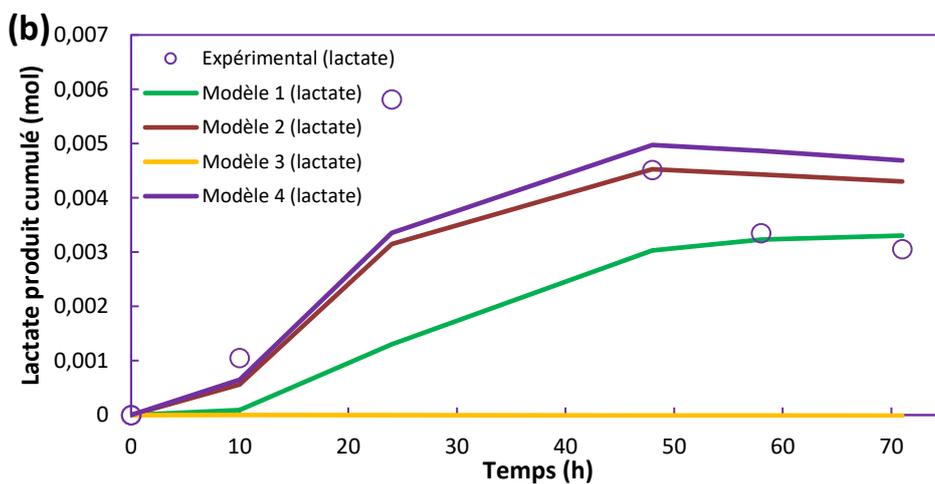
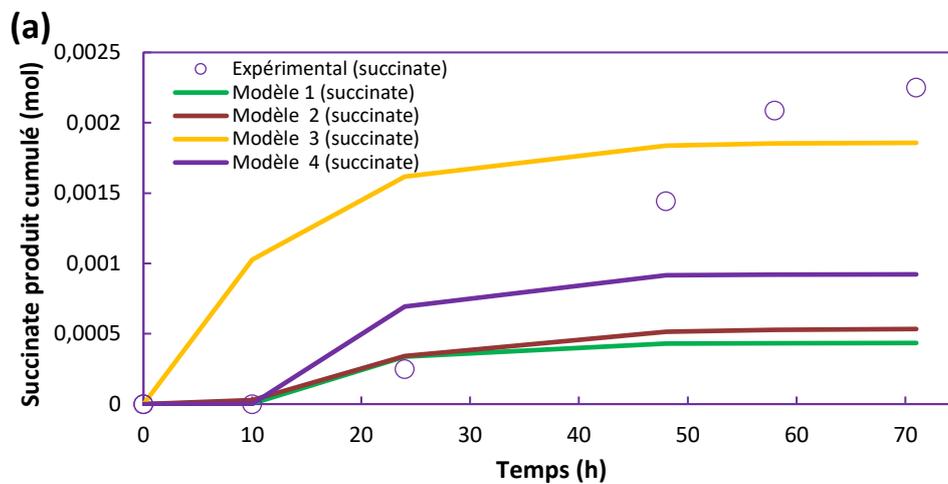


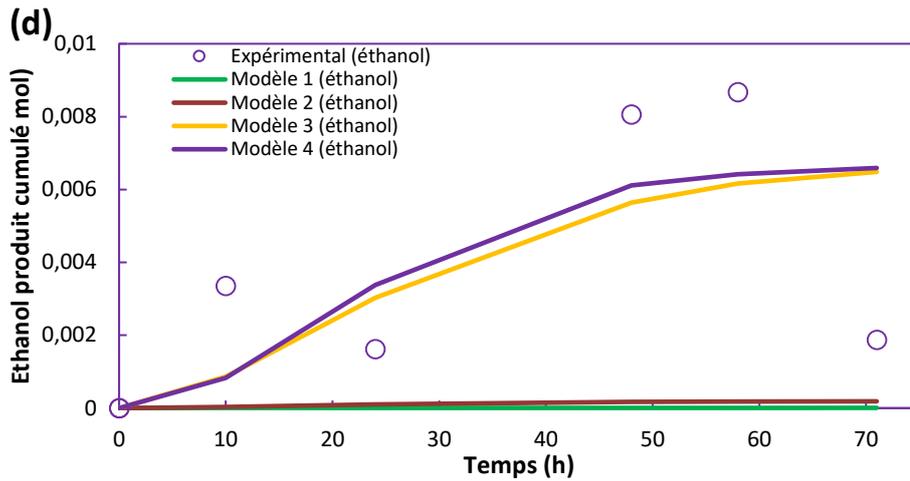




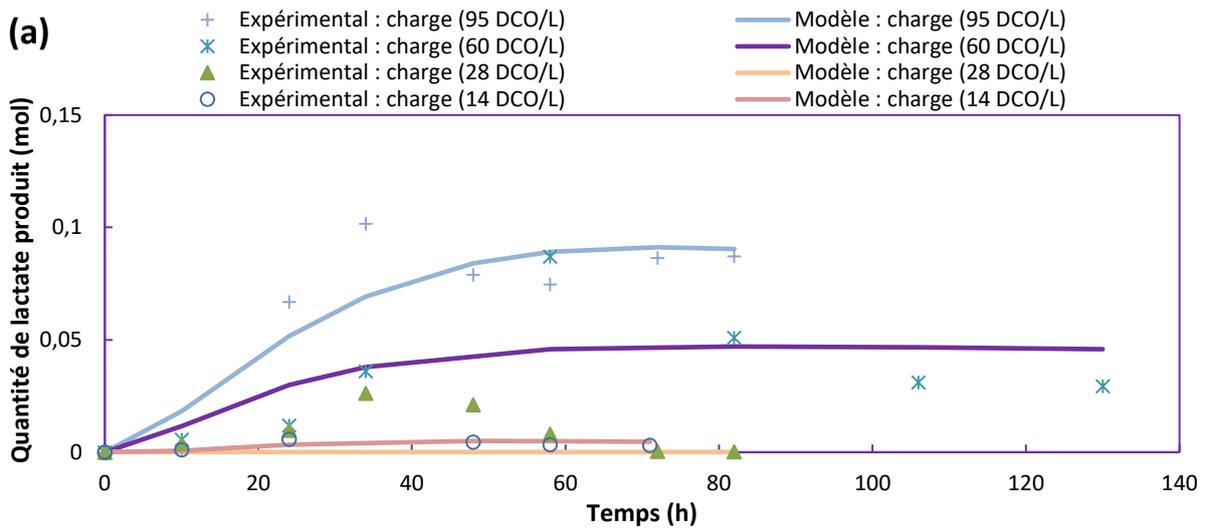


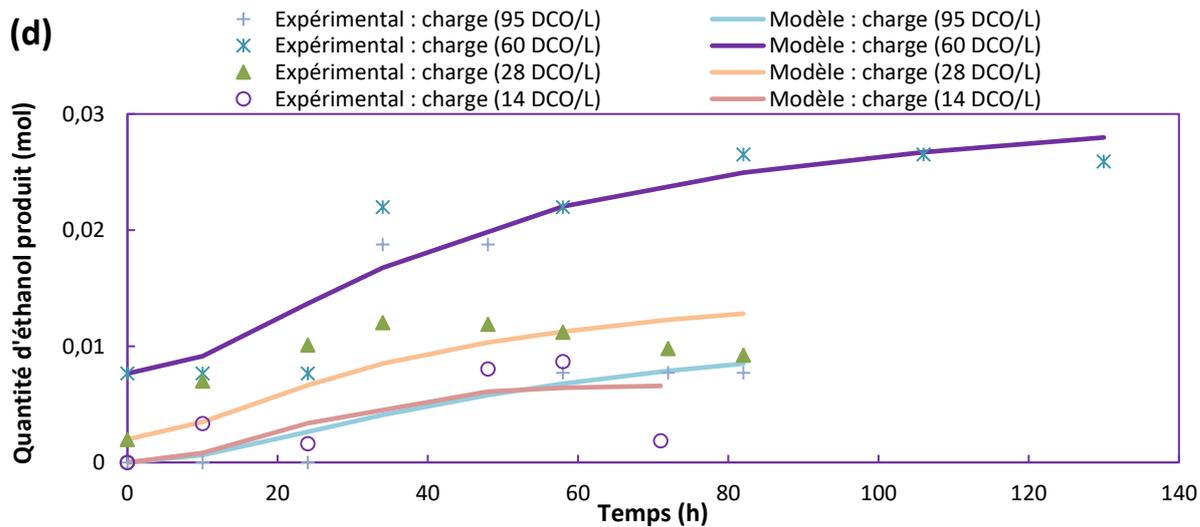
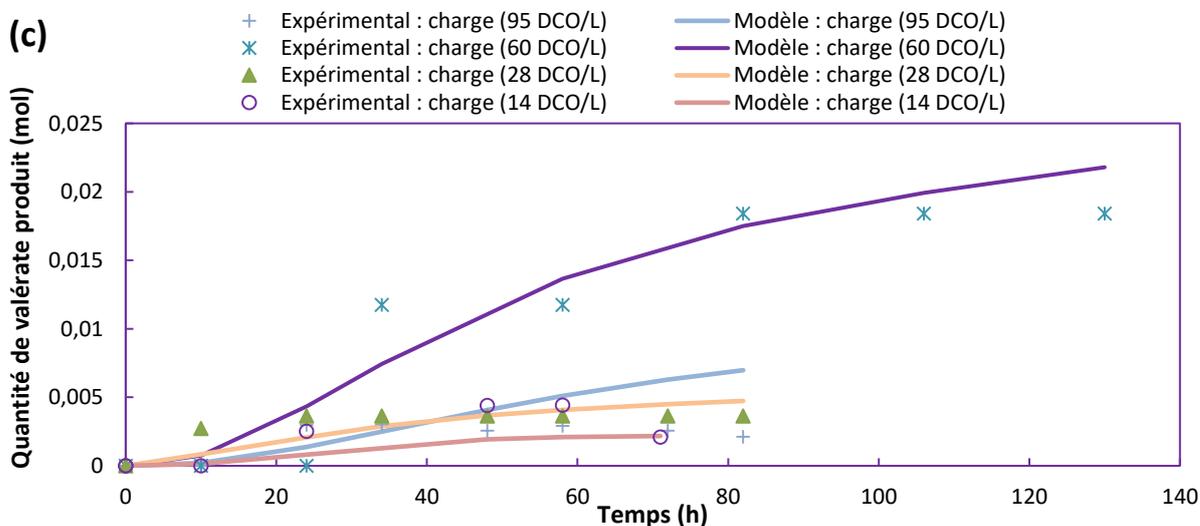
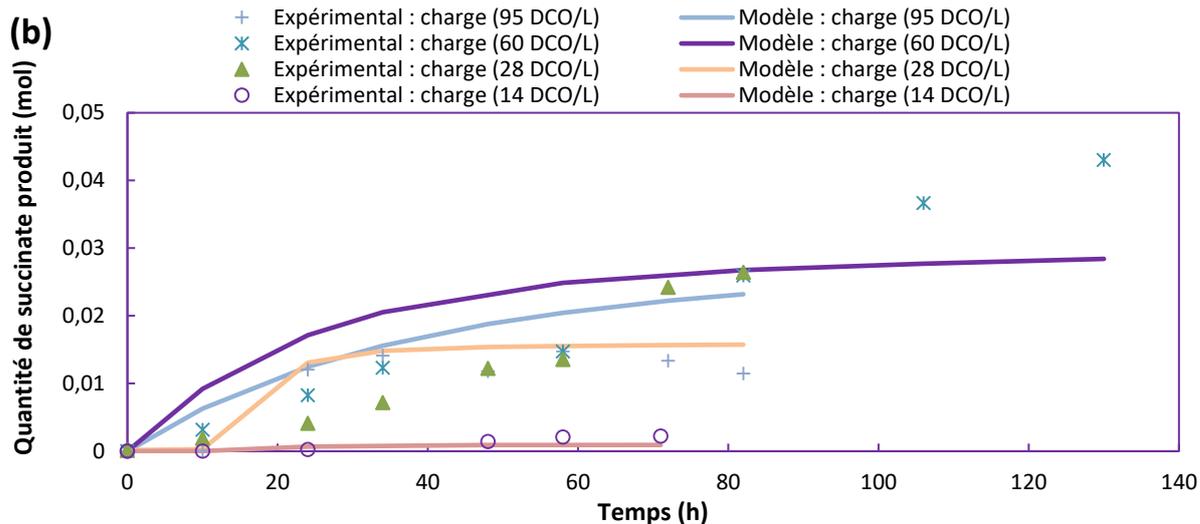
Annexe 4 : Représentation des variations de formation du succinate (a), lactate (b), valérate (c) et éthanol (d) par les quatre modèles proposés

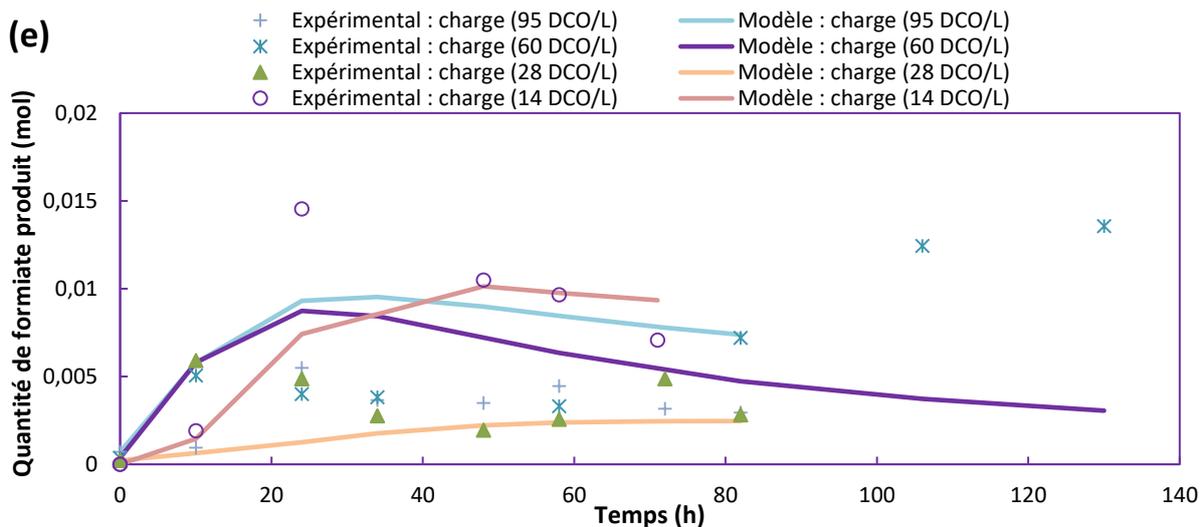




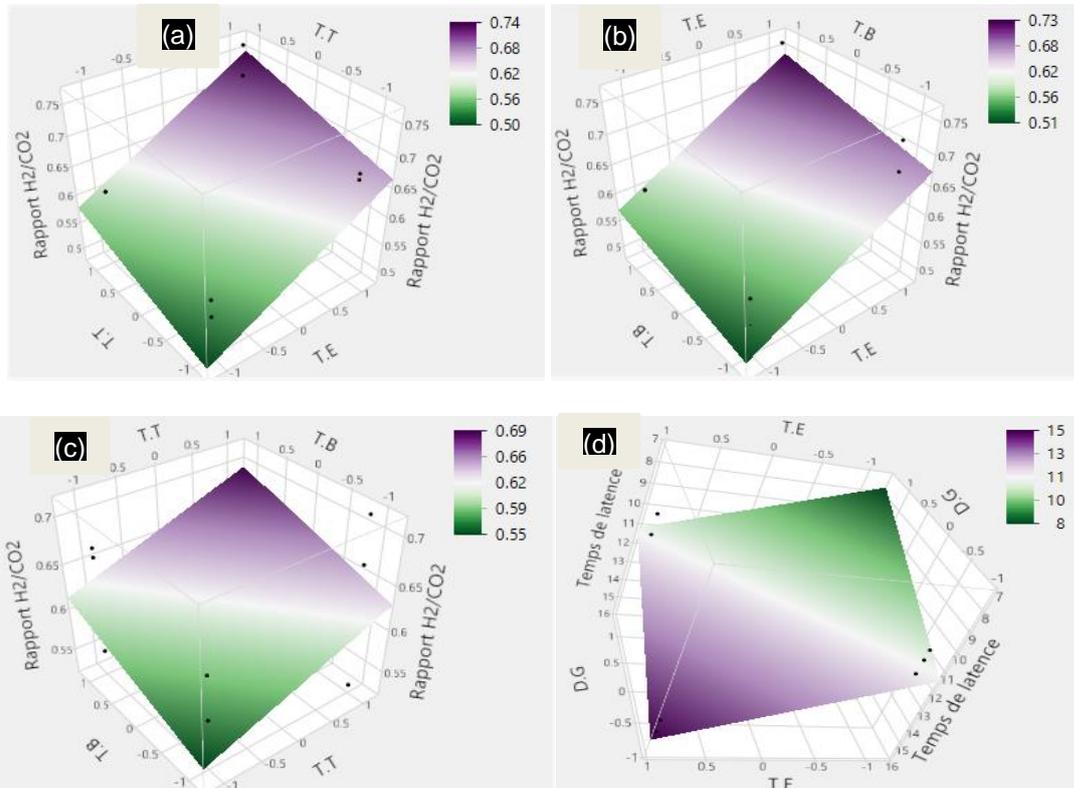
Annexe 5 : Variation de formation de lactate (a), succinate (b), valérate (c) éthanol (d) et formiate (e) en fonction de la charge initiale de biomasse







Annexe 6 : Résultats d'interaction d'effet du prétraitement enzymatique et prétraitement thermique (a), prétraitement enzymatique et prétraitement avec base (b), prétraitement thermique et prétraitement avec base (c) sur le rapport H₂/CO₂ et l'interaction d'effet de prétraitement enzymatique et débit de gaz de balayage sur le temps de latence (d) (les résultats expérimentaux sont symbolisés par les points)



Développement de modèles cinétiques et optimisation paramétrique pour la bioproduction d'hydrogène par fermentation obscure

Résumé

Dans le contexte actuel de transition énergétique, la perspective de production d'un vecteur énergétique comme l'hydrogène via un procédé biologique (fermentation obscure) présente un intérêt majeur. Dans cette thèse, des modèles mathématiques ont été développés pour modéliser et optimiser le procédé de production d'hydrogène par fermentation, dans l'objectif de transférer ce processus de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote. Une optimisation de la teneur initiale en substrat modèle pour obtenir un rendement d'hydrogène élevé a été réalisée en se basant sur un modèle mathématique modifié, intégrant un facteur de correction permettant de modéliser toutes les phases de fermentation. Une vitesse de production d'hydrogène de $5 \text{ L/L}_{\text{bioreacteur}}/\text{j}$ a été obtenue à une concentration en substrat de 13 g/L . Une étude des cinétiques microbiennes lors la production d'hydrogène par fermentation endogène d'une biomasse viticole a été réalisée en identifiant les interactions ayant lieu entre les bactéries de différents genres ainsi qu'en optimisant la charge initiale de biomasse. Enfin, l'application du plan d'expériences de Plackett-Burman a permis d'augmenter la performance de production d'hydrogène par fermentation d'une biomasse caféicole jusqu'à 48% en conjuguant les prétraitements enzymatique, thermique et chimique.

Mots-clés : hydrogène, bioprocédé, fermentation obscure, biomasse, modélisation, optimisation, cinétique

Abstract

In the current context of energy transition, the prospect of producing an energy vector such as hydrogen via a biological process (dark fermentation) is of major interest. In this thesis, mathematical models have been developed to model and optimize the hydrogen production process by fermentation, with the aim of transferring this process from a laboratory scale to a pilot scale. An optimization of the initial substrate content to obtain a higher hydrogen yield was made based on a modified mathematical model incorporating a correction factor allowing to model all phases of fermentation. A hydrogen production rate of $5 \text{ L/L}_{\text{bioreactor}}/\text{d}$ was obtained at a substrate concentration of 13 g/L . A study of microbial kinetics during the production of hydrogen by an endogenous fermentation of a viticultural biomass has been done by identifying interactions between the bacteria of different genera as well as by optimizing the initial biomass load. Finally, the application of Plackett-Burman's experimental design allowed to increase the hydrogen yield produced by silver skin biomass fermentation up to 48% combining enzymatic, thermal and chemical pretreatments.

Keywords: hydrogen, bioprocess, dark fermentation, biomass, modelling, optimization, kinetics