

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien

Département des Sciences Analytiques - CNRS UMR 7178

Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire

**THÈSE** présentée par :

**Marie RENAUDIE**

Soutenance prévue le : **27 septembre 2019**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie/Bioprocédés

***Intensification du procédé de production  
d'hydrogène par fermentation obscure  
en bioréacteur membranaire :  
valorisation énergétique de biomasses***

**THÈSE dirigée par :**

**Mme ERNST Barbara**

Professeur, IPHC, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. GUEDON Emmanuel**

Directeur de recherche, LRGP, Université de Lorraine

**M. TRABLY Eric**

Directeur de recherche, LBE, INRA

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. PHALIP Vincent**

Professeur, ProBioGEM, Université de Lille 1

**M. VUILLEUMIER Stéphane**

Professeur, GMGM, Université de Strasbourg

**M. LESAGE François**

Maître de conférences, Université de Lorraine

**Mme DUMAS Christine**

Maître de conférences, IPHC, Université de Strasbourg

**INVITE :**

**M. THEOBALD Olivier**

Ingénieur, ADEME



*A mes parents, Julien, et un futur vert*

*On trouve le chaos en plus grande abondance partout où l'on recherche l'ordre.*

*Le chaos l'emporte toujours sur l'ordre, parce qu'il est mieux organisé.*

*Terry Pratchett, 2001.*



# Remerciements

Certes, une thèse est le fruit de longues heures de travail individuel, mais je suis convaincue que cette expérience n'aurait pu être aussi riche sans le soutien et la générosité de bon nombre de personnes. Je souhaite ainsi adresser mes remerciements à tous celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin, à cette aventure.

Je voudrais tout d'abord adresser mes sincères remerciements aux rapporteurs de ce document, Dr. Emmanuel Guedon et Dr. Eric Trably, ainsi que les membres de mon jury pour le temps et l'énergie à l'évaluation de cette thèse. Merci à Olivier Théobald, ingénieur ADEME, pour son regard pratique sur mes travaux.

Un grand merci à ma directrice de thèse Pr. Barbara Ernst et ma co-encadrante Dr. Christine Dumas qui m'ont fait confiance pour participer à ce projet au long cours au laboratoire, pour le temps qu'elles m'ont consacré et tout ce que j'ai pu apprendre à leur côté. Merci de m'avoir laissé autant de liberté, de m'avoir permis de prendre le temps de choisir mon chemin et de me tromper, merci pour votre patience. Merci pour m'avoir conduite dans toute l'Alsace pour la collecte des biomasses et les entretiens avec les industriels. Merci à Barbara pour toutes les conversations sur l'énergie, les projets, l'eau, les insectes, la musique, l'enseignement, la recherche de la vérité scientifique et d'un emploi, la vie, comment on est. Merci à Christine pour sa rigueur scientifique, sa générosité et pour m'avoir montré qu'aucune machine n'est réellement irréparable.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers ceux dont les travaux ont rendu accessible le procédé et les techniques que j'ai exploités à mon tour. Merci à Valentin et Emilie, d'avoir posé les bases solides d'une vision originale du procédé de fermentation obscure. Merci à Paul de prendre le relai.

Merci aussi au Pr. Vincent Phalip, pour son accueil à ProBioGEM à Lille, pour m'avoir fait découvrir la fermentation fongique et pour m'avoir gracieusement prêté son armoire. Merci à Roxane pour son aide pour les manip.

Un grand merci au Dr. Gwenaël Imfeld, du LHYGES, pour le temps consacré au traitement statistique de mes données. Ca fait plaisir de voir toutes les tendances qu'on a pu mettre en évidence avec les stats, sur des données dont on discute depuis pas mal de temps.

Merci au Dr. François Lesage pour le temps passé sur la modélisation des données. Les résultats n'apparaissent pas dans la thèse, mais je suis sûre que c'est le début d'une belle collaboration avec le laboratoire.

Merci à Nadia Messaddeq et Jean-Luc Weickert, de l'IGBMC, pour les analyses MEB de mes échantillons.

Merci au Pr. Stéphane Vuilleumier pour m'avoir accueillie au GMGM pour les extractions d'ADN, et à Christelle Gruffaz pour son aide pour les manips.

Merci au Dr. Mélanie Legros, de l'ICS, pour avoir essayé plusieurs techniques pour m'aider à comprendre ce qui passe lors du traitement enzymatique des radicelles.

Je remercie également les différentes équipes du DSA pour leur accueil et leur aide dans ce projet : Dr. Anne Boos, à Pascale Ronot et à Islah El Masoudi au RePSeM pour l'analyse élémentaire des biomasses de ce travail, Dr. Véronique Delval, au LSMBO, pour les dosages de protéines et le temps passé pour qu'on essaye d'autres analyses.

Merci au Pr Hervé Alexandre, du VALMIS, pour nous avoir gracieusement envoyé des souches de champignons.

Merci à Mélanie Pfister, du Domaine Pfister de Dalenheim, pour fournir au laboratoire des marcs et des bourbes, chaque année. Merci à tous les industriels qui m'ont fourni des échantillons et m'ont accordé du temps pour échanger sur la thématique. J'ai toujours été impressionnée par ce qui existait déjà en termes de valorisation des déchets. Un merci spécial à Laurent et Michel, brasseurs au grand cœur, pour cette matinée passée à partager leur passion.

Je remercie Catherine Jeunesse pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner pendant trois années en travaux pratiques de licence professionnelle « Industrie chimique et pharmaceutique » ainsi qu'aux élèves parfois enthousiastes qui m'ont fait découvrir le plaisir d'enseigner.

Merci à mes deux stagiaires, Julie et Tiphaine, pour leur implication et leur aide pour les études de prétraitement des biomasses. Merci aussi à Clémence, pour toute ton aide pour les manips.

Je voudrais remercier les personnes de l'équipe du RePSeM, de passage ou de toujours, de m'avoir permis de travailler dans la meilleure ambiance possible. Merci à Barbara, Bernadette, Camila, Caroline, Christine, Clémence, Dominique, Evolène, Guillaume, Jérémy, Maud, Matthieu, Paul, Rawa, Valentin, Virginie, Sylvie, Sylvia, Zineb d'avoir partagé des repas le midi, des gâteaux, des cafés, d'innombrables grilles de mots fléchés, des balades à IKEA, des midis Mõlki, des sorties en canoë, des repas de Noël et des soirées bières et tartes flambées et pour les prêts de matériel pour ma cuisine. Merci Valentin pour m'avoir présenté le BRM, merci Matthieu le siroi, merci Zineb pour ta gentillesse, merci Virginie pour les dimanches matin parfaits à la plage du Wacken, merci Guillaume pour ne pas s'être assis à côté de moi dans le train, merci Paul pour la balade au musée. Merci pour les soirées musicales/au musée/bières & bredele, les journées au ski.

Merci Audrey pour les pauses café.

Merci à tous ceux avec qui j'ai passé des bons moments lors des conférences et écoles d'été, notamment la team France au Japon. Merci au Pr Vincent Robert, pour nous avoir permis de vivre cette belle aventure.

Merci aux collègues rencontrés au cours de mon passage dans l'industrie pendant la rédaction. Vous m'avez permis de sortir de ma bulle.

Merci aux amis, ici et expatriés, qui m'ont accompagnée dans cette aventure.

Merci à toute ma famille, bien sûr, pour leur soutien de toujours, les limousins, les cortenais, les grenoblois, merci pour votre présence dans les moments importants. Merci maman, sans toi je ne serais pas moi. Merci papa, pour ne m'avoir jamais laissée tomber.

Enfin, merci à Julien, pour être mon refuge. Je te dois bien un élastique.





# Sommaire

Remerciements .....	5
Sommaire.....	9
Liste des abréviations .....	13
Introduction .....	15
Synthèse Bibliographique.....	17
1 De l'hydrogène renouvelable à l'intégration de la fermentation obscure dans une bioraffinerie .....	17
1.1 Rôles et marché de l'hydrogène dans un mix énergétique durable .....	18
1.2 Purification et stockage de l'hydrogène .....	20
1.3 Procédés de production d'hydrogène : intérêt des procédés biologique et de la fermentation obscure.....	21
1.4 Intégration de la fermentation obscure dans une bioraffinerie .....	28
2 Biochimie et microbiologie de la fermentation obscure.....	37
2.1 Les microorganismes de la fermentation obscure .....	37
2.2 Métabolisme énergétique, fermentations et production d'hydrogène .....	41
3 Conduite des procédés de fermentation obscure et voies d'intensification des performances de production d'hydrogène .....	49
3.1 Critères de performance du procédé.....	49
3.2 La biomasse bactérienne.....	51
3.3 Le substrat de fermentation .....	53
3.4 Les bioréacteurs.....	59
4 Conclusion et objectifs de la thèse .....	76
Matériels et Méthodes .....	79
1 Substrats de fermentation et prétraitement des biomasses.....	79
1.1 Substrat modèle .....	79
1.2 Biomasses .....	79
1.3 Prétraitements des biomasses pour les tests en bioréacteur semibatch.....	80
1.4 Prétraitements des biomasses pour les tests en BRM.....	82
2 Procédés de fermentation.....	82
2.1 Fermentation en mode semibatch.....	82
2.2 Fermentation continue en bioréacteur membranaire avec extraction liquide/gaz (BRM L/G) .....	84
3 Méthodes d'analyse des fermentations.....	88
3.1 Caractérisation des biomasses .....	88

3.2	Analyse des gaz produits en bioréacteur.....	89
3.3	Analyse des acides gras volatils (AGV) produits en bioréacteur par HPLC-UV et des glucides solubles par HPLC-RI.....	90
3.4	Analyse des alcools produits en bioréacteur par GC-FID.....	90
3.5	Bilan de matière.....	91
3.6	Analyses microbiologiques.....	91
3.7	Analyse statistique multivariée des tests réalisés en bioréacteur semibatch.....	92
4	Critères de performances.....	94
4.1	Paramètres issus de la modélisation selon l'équation de Gompertz modifiée.....	94
4.2	Paramètres de production et de rendement.....	94
	Robustesse et limites du procédé en BRM L/G sans ensemencement initial.....	95
1	Introduction.....	95
2	Robustesse de la production sans ensemencement initial du module membranaire.....	98
2.1	Production d'hydrogène.....	99
2.2	Production de métabolites.....	101
2.3	Analyse microbiologique : comparaison des <i>consortia</i> bactérien des tests BRM-E* et BRM-418j.....	103
2.4	Discussion.....	106
3	Amélioration du procédé : mode d'extraction des gaz produits.....	109
3.1	Effet du débit de gaz de balayage sur la production d'hydrogène.....	109
3.2	Effets de la nature du gaz de balayage (N <sub>2</sub> ou CO <sub>2</sub> ) et de l'extraction libre des gaz produits.....	111
3.3	Discussion.....	119
4	Etude des communautés bactériennes du module membranaire.....	120
4.1	Production de gaz.....	121
4.2	Analyse des métabolites.....	122
4.3	Analyse microbiologique.....	123
4.4	Discussion.....	131
5	Effet du TSH et du DAS sur la production d'hydrogène, le métabolisme et la microbiologie du milieu fermentaire.....	132
5.1	Productions d'hydrogène et de dioxyde de carbone.....	133
5.2	Production de métabolites.....	137
5.3	Analyse microbiologique.....	140
5.4	Discussion.....	144
6	Conclusion.....	146
	Production d'hydrogène à partir de déchets organiques agricoles et agroalimentaires. Prétraitements physiques et enzymatiques.....	147
1	Introduction.....	147
1.1	Choix des biomasses et de la fermentation endogène.....	147
1.2	Possibilité d'un prétraitement des biomasses.....	149

1.3	Objectifs de l'étude et conditions de mise en œuvre des tests.....	149
2	Potentiel de production d'hydrogène par fermentation endogène de déchets organiques agricoles et agroalimentaires.....	150
2.1	Potentiel de productions d'hydrogène des biomasses collectées.....	151
2.2	Discussion.....	152
3	Effets des caractéristiques des biomasses, du métabolisme et de la microbiologie du milieu réactionnel sur la production d'hydrogène en bioréacteur semibatch.....	155
3.1	Production d'hydrogène et de métabolites .....	155
3.2	Caractérisation et classification des biomasses. ....	165
3.3	Analyse microbiologique.....	175
3.4	Discussion.....	185
4	Impact de prétraitements sur la production d'hydrogène par fermentation obscure .....	191
4.1	Effet de prétraitements physiques et enzymatiques sur la production d'hydrogène à partir de marcs de raisin .....	191
4.2	Production et mise en œuvre d'un cocktail enzymatique substrat spécifique. ....	196
5	Conclusion.....	206
	Mise en œuvre du BRM L/G avec des biomasses vitivinicoles et caféicole .....	209
1	Introduction .....	209
2	Ensemencement du module membranaire avec du digestat de fermentation de bourbes viticoles.....	210
2.1	Analyse des gaz .....	211
2.2	Analyse des métabolites .....	212
2.3	Analyse microbiologique.....	214
2.4	Discussion.....	223
3	Fonctionnement sans réensemencement. Comparaison du fonctionnement du bioréacteur membranaire : <i>inoculum</i> « bourbes » et <i>inoculum</i> « boues de STEP ».....	226
3.1	Production des gaz.....	226
3.2	Production de métabolites .....	228
3.3	Discussion.....	229
4	Fonctionnement du BRM avec différentes biomasses.....	230
4.1	Caractérisation des matières des substrats : extrait de marcs broyés (EMB), extrait de pellicules argentées (EPA) et bourbes (B) .....	231
4.2	Analyse des gaz extraits .....	233
4.3	Analyse des métabolites .....	234
4.4	Analyse microbiologique.....	236
4.5	Discussion.....	240
5	Conclusion.....	242
	Conclusion et perspectives .....	243
	Annexe.....	246

Liste des figures .....	248
Liste des tableaux.....	252
Bibliographie.....	254

# Liste des abréviations

ACE	Abundance-based Coverage Estimator
ACP	Analyse des Composantes Principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFBR	Anaerobic Fluidized Bed Reactor
AGV	Acides gras volatils
ARN	Acide ribonucléique
ASBR	Anaerobic Sequenced Batch Reactor
ATP	Adénosine triphosphate
AZCL	Azurine crosslinked
B/A	Ratio butyrate/acétate
BRM	Bioréacteur membranaire
BRM B	BRM Bourbes
BRM EL	BRM Extraction Libre
BRM EMB	BRM Extraits de Marcs Broyés
BRM EPA	BRM Extraits de Pellicules Argentées
BRM L/G	BRM à extraction Liquide/Gaz
BRM L/L	BRM à extraction L/L
BRM S/L	BRM à extraction Solide/Liquide
CHN	(Analyse) Carbone Hydrogène Azote
C/N	Rapport carbone/azote
CP	Composante principale
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
CTMSS	Carbon Template Molecular Sieve Silica
DA	Digestion Anaérobie
DAS	Débit d'Alimentation en Substrat
DCO	Demande Chimique en Oxygène
ED	Entner-Douderoff
EL	Extraction Libre
EMB	Extraits de Marcs Broyés
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
EPA	Extraits de Pellicules Argentées
FAD	Flavine Adénine
Fd	Ferrédoxine
FMS	Fermentation en Milieu Solide
FO	Fermentation Obscure
G/G	Gaz/Gaz
GC	Gas Chromatography
GC TCD	GC Thermal Conductivity Detector
GC FID	GC Flame Ionization Detector
HMF	Hydroxyméthylfurfural
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography

HPLC UV	HPLC Ultraviolet
HPLC RID	HPLC Refractive Index Detector
L/G	Liquide/Gaz
L/L	Liquide/Liquide
MEB	Microscope Electronique à Balayage
Mi	Matières minérales
MS	Matières Sèches
MV	Matières Volatiles
NAD+	(coenzyme) Nicotinamide Adénine Dinucléotide (oxydée)
NADH	(coenzyme) Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène (réduite)
NADP+	(coenzyme) Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (oxydée)
NADPH	(coenzyme) Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène (réduite)
NMDS	Non metric Multidimensional Scaling
OTU	Operational Taxonomic Unit
PAC	Pile à Combustible
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDHc	Complexe Pyruvate Ferrédoxine Oxydoréductase
PF	Photofermentation
PFL	Pyruvate Formiate Lyase
PFOR	Pyruvate Ferrédoxine Oxydoréductase
pH	Potentiel Hydrogène
P <sub>H<sub>2</sub></sub>	Production d'hydrogène
PTFE	PolyTetraFluoroEthylène
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RASB	Réacteur Agité Semi Batch
R <sub>H<sub>2</sub></sub>	Rendement en hydrogène
RID	Refractive Index Detector
S/L	Solide/Liquide
STEP	Station d'Épuration
TCD	Thermal Conductivity Detector
TSH	Temps de Séjour Hydraulique
TSS	Temps de Séjour des Solides
UASB	Up Flow Anaerobic Sludge Blanket

# Introduction

Energie propre, universellement disponible, stockable et transportable, issue de ressources renouvelables : ce sont les promesses de l'hydrogène énergie, dont l'utilisation via les piles à combustible pour les transports est en plein essor. La production d'hydrogène actuelle est essentiellement réalisée par vaporeformage d'hydrocarbures, procédé émetteur de CO<sub>2</sub> fossile, par et pour les industries chimiques et pétrochimiques. La production d'hydrogène par voie renouvelable (électrolyse de l'eau), pour une application énergie, reste minoritaire (Demirci et Miele, 2010). Le développement de procédés de production d'hydrogène « vert » est donc essentiel.

Dans le monde du vivant, l'hydrogène est un intermédiaire biochimique essentiel, vecteur d'électrons entre espèces microbiennes, contribuant à la production d'énergie cellulaire. Le procédé de fermentation obscure met à profit cette propriété bactérienne et génère de très bonnes productivités en hydrogène dans des conditions opératoires douces, sans contrainte d'apport de lumière ou d'oxygène (Trably *et al.*, 2018). En outre, l'utilisation de biomasses comme matière première offre la possibilité de valoriser une gamme étendue de déchets organiques en ressource énergétique propre. Le procédé de fermentation obscure n'a pas encore connu un réel essor et reste au stade de l'échelle pilote. Des limitations du rendement de production d'hydrogène sont en cause, notamment dus à l'augmentation de la pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel au cours de sa production. Ainsi, l'extraction continue de l'hydrogène produit est essentielle. A notre connaissance, une telle extraction *in situ* au moyen de membranes n'est mentionnée que dans deux études n'améliorant que peu la production d'hydrogène (Liang *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2010) et un brevet (Tippmer et Tippmer, 1994). Notons également que lors de la mise en œuvre en réacteur agité continu, afin de limiter le lessivage des bactéries productrices d'hydrogène du milieu réactionnel, un *inoculum* externe est ajouté au début et/ou au cours du process, ce qui implique souvent un prétraitement thermique, dépense énergétique supplémentaire, afin d'inhiber la croissance de bactéries non productrices d'hydrogène. Les configurations de réacteurs à lits fixes ou lits fluidisés peuvent limiter le lessivage bactérien *via* le développement d'un biofilm sur un support physique (Jung *et al.*, 2011), mais nécessitent une manutention plus importante lors de leur mise en œuvre.

Afin de répondre à ces contraintes dans une seule unité, un procédé de fermentation obscure a été développé par l'Equipe de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (UMR 7178), dans un bioréacteur membranaire (BRM) à fibres creuses, permettant une extraction *in situ* des gaz produits (extraction L/G) et offrant une surface solide pour le développement d'un biofilm bactérien.

Les productivités en hydrogène obtenues sont triplées par rapport à un réacteur agité continu, avec une solution modèle (glucose et nutriments) et un ensemencement bactérien avec des boues de station d'épuration (Ernst *et al.*, 2015). D'autres travaux de l'équipe ont également démontré le potentiel de sous-produits vitivinicoles en tant que substrat et *inoculum* (fermentation endogène à la biomasse) pour la production d'hydrogène (Ernst *et al.*, 2014).

L'approche double de ce projet de thèse vise à améliorer conceptuellement et quantitativement le procédé de production par fermentation obscure en BRM L/G en fonctionnement continu et à étudier sa faisabilité en utilisant des déchets organiques variés en tant que substrats et sources de bactéries productrices d'hydrogène. Deux réacteurs sont ainsi mis en œuvre : le BRM L/G, ainsi qu'un réacteur agité semibatch (RASB) pour évaluer le potentiel de production d'hydrogène de différentes biomasses avec un contrôle facilité des paramètres opératoires (pH, température). Des entretiens avec des industriels de différents secteurs du Bas-Rhin ont été menées afin d'identifier des déchets organiques disponibles pour une valorisation énergétique déclinable à différentes échelles et ont permis la collecte d'échantillons. Ce manuscrit est divisé en cinq chapitres, dont trois chapitres de résultats.

Le chapitre I propose un état des lieux du contexte de production de l'hydrogène, de son utilisation et des possibilités de l'intégration du procédé de fermentation obscure dans une bioraffinerie. Les notions microbiologiques et biochimiques de la production d'hydrogène par fermentation obscure seront également présentées. Enfin, l'étude des modes de mise en œuvre du procédé permettra de situer l'utilisation du BRM L/G.

Le chapitre II présente l'ensemble des matériels et des méthodes de bioproduction et d'analyse utilisées dans le cadre de cette étude.

Le chapitre III porte sur la robustesse et les limites du procédé. Les résultats de la mise en œuvre du bioréacteur sans nouvel ensemencement bactérien pendant plus d'une année, alimenté uniquement d'une solution modèle, seront présentés. L'amélioration du mode d'extraction des gaz produits, une étude d'optimisation du temps de séjour hydraulique et du débit d'alimentation en substrat, ainsi que l'analyse des communautés bactériennes du module membranaire seront détaillées.

Le chapitre IV présente les résultats de production d'hydrogène par fermentation obscure par les bactéries indigènes de déchets organiques variés en RASB. Les corrélations entre performances de production d'hydrogène générées et le métabolisme et de la microbiologie d'un panel de tests seront présentées. Deux études exploratoires visant à améliorer les performances de production par hydrolyse des biomasses seront également abordées.

Le chapitre V présente la mise en œuvre de la fermentation endogène dans le BRM L/G avec différentes biomasses.

La conclusion de ces travaux permettra d'ouvrir sur des perspectives d'études et d'améliorations du procédé pour sa mise en œuvre future à l'échelle industrielle.



# Chapitre I

## Synthèse Bibliographique

Ce chapitre présente les atouts de l'hydrogène comme vecteur énergétique et permet de situer le procédé de fermentation obscure dans une production renouvelable. Les verrous à lever pour l'industrialisation du procédé et les stratégies mises en œuvre dans les différentes études de fermentation obscure seront également identifiés.

### 1 De l'hydrogène renouvelable à l'intégration de la fermentation obscure dans une bioraffinerie

L'hydrogène est un gaz non carboné ayant un pouvoir calorifique inférieur de 119,9 MJ/kg, soit plus du double de celui du gaz naturel (50,0 MJ/kg) et presque trois fois celui de l'essence (43,1 MJ/kg) ou du diesel (42,8 MJ/kg) (CEA, 2016). Son énergie est mobilisable par combustion, produisant uniquement de la chaleur et de l'eau, ou via une pile à combustible (PAC) produisant de l'électricité. Une PAC est un module composé de plusieurs cellules où la réaction électrochimique entre l'hydrogène injecté à l'anode et l'oxygène à la cathode, séparées par un électrolyte (figure 1) conduit à la production d'électricité, de chaleur et d'eau (AFHYPAC, 2018).

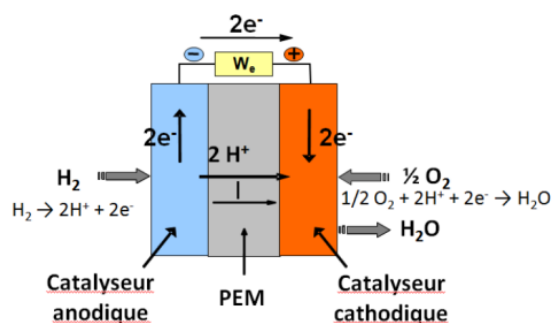


Figure 1: Schéma de principe d'une pile à combustible à membrane échangeuse de protons (AFHYPAC, 2018)

L'utilisation de l'hydrogène pour répondre à différents besoins énergétiques tout en atténuant les émissions de gaz à effet de serre liées à l'activité humaine est en plein développement.

## 1.1 Rôles et marché de l'hydrogène dans un mix énergétique durable

### 1.1.1 L'hydrogène, vecteur d'intégration d'électricité renouvelable

L'hydrogène peut servir d'intermédiaire pour lisser les productions intermittentes des énergies éolienne, hydrolienne et photovoltaïque. Lorsque la production électrique excède la demande, de l'hydrogène peut être produit par électrolyse de l'eau (1) et stocké. L'hydrogène peut alors être mobilisé lors des périodes creuses de production d'électricité (absence de vent, de lumière).



Un tel système peut représenter une solution d'autonomie énergétique pour des secteurs isolés, en remplacement de groupes électrogènes bruyants et émetteurs de CO<sub>2</sub> (Bernier, 2014) ou contribuer à l'alimentation des réseaux existants de gaz naturel (power-to-gas), directement sous forme d'hythane® (jusqu'à 20% d'hydrogène en mélange avec du méthane) ou après une étape de méthanation (2) par voie catalytique ou biologique (ADEME, 2016a).



Le tableau 1 présente quelques exemples des projets d'utilisation de l'hydrogène pour des usages publics et industriels sur l'ensemble du territoire français, dont un rapport de l'AFHYPC (2017) fait un état des lieux exhaustif.

**Tableau 1: Exemples de projets hydrogène en France**

Projet	Lieu, début	Source d'électricité ou d' H <sub>2</sub>	Stockage H <sub>2</sub>	Conversion H <sub>2</sub>	Utilisation
MYRTE	Ajaccio, 2012	Panneaux solaires	gaz (35 bar)	Electricité (PAC)	Réseau électrique
FLOTTE HYDROGENE	Nantes, 2018	Energies fossiles	gaz (200-420 bar)	Electricité (PAC)	Flotte de navettes maritimes à PAC
GRHYD	Dunkerque, 2014	Eoliennes	solide (hydrures)	Hythane®	Quartier résidentiel (200 logements)
FAHYENCE	Sarreguemine, 2017	Electricité « verte » (EDF)	gaz (350 bar)	Electricité (PAC)	Flotte captive de Kangoo (300 km autonomie)
VAHY	Bayonne, 2015	n. d.*	gaz (200 bar)	Electricité (PAC) <sup>o</sup>	Flotte de vélos à assistance électrique pour La Poste

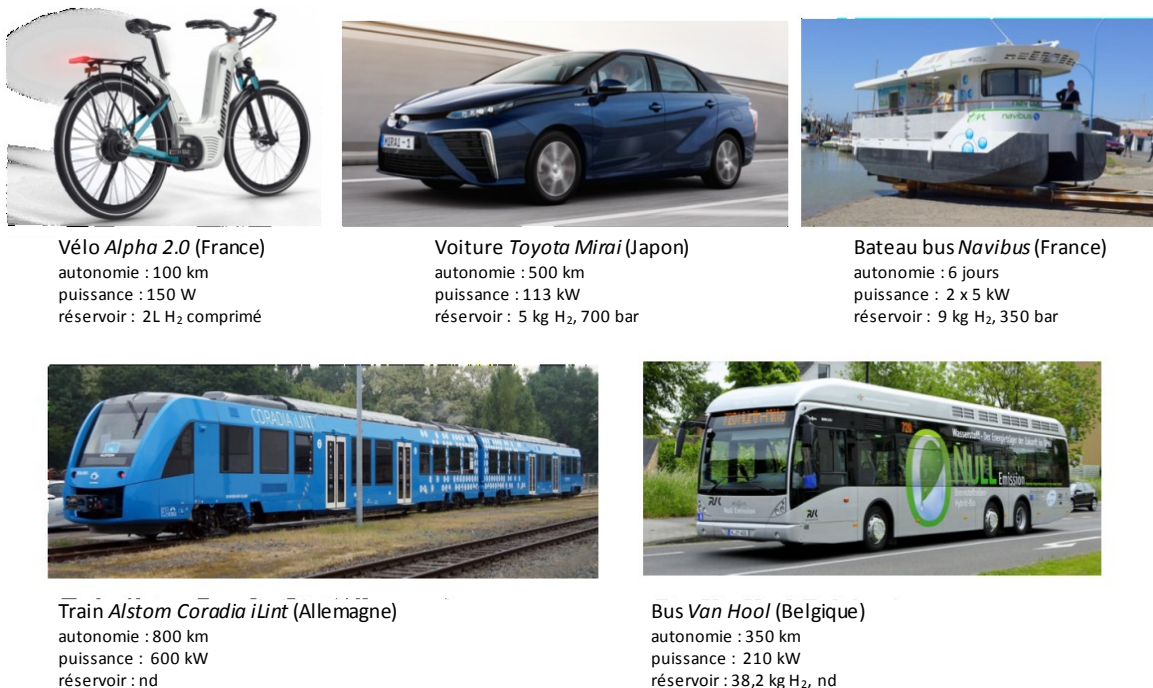
\*non disponible

Les projets d'utilisation de l'hydrogène ont des applications variées (alimentation du réseau électrique, flottes captives non émettrices de CO<sub>2</sub>, etc). De nombreux projets sont en cours dans toutes les régions de France, et plusieurs écosystèmes hydrogène structurés émergent dans les régions Auvergne-Rhône-Alpes, Nouvelle Aquitaine, Normandie, Bourgogne-Franche-Comté, et dans le Grand Est (AFHYPC, 2017).

### 1.1.2 L'hydrogène, carburant propre

L'utilisation de l'hydrogène en combinaison avec de l'oxygène, sous forme liquide, pour la propulsion de fusées est considéré comme l'une des principales avancées de la NASA dans la conquête spatiale, avec le premier essai réussi d'utilisation de l'étage Centaur dès 1963 (NASA, 2017) et pour propulser les fusées Ariane dès les années 1970 (Buffet, 2001).

Les développements actuels portent sur l'utilisation de l'hydrogène dans des moteurs à combustion interne ou dans des véhicules à PAC (Abdalla *et al.*, 2018). Le remplissage en hydrogène des réservoirs des voitures à PAC est nettement plus court que le temps de charge des voitures électriques (3 à 5 minutes contre quelques heures) ; elles ont une grande autonomie (600 km). Les véhicules à PAC n'émettent pas polluants, à l'inverse des véhicules à moteurs thermiques ; leur utilisation répondrait aux problématiques de qualité de l'air et de nuisances sonores des zones urbaines (Bettayeb, 2017). Différents modèles de véhicules ont été commercialisés depuis 2015 et de nombreux développements sont en cours (figure 2) pour accompagner l'électrification des modes de transports routier, ferroviaire, fluvial et maritime (ADEME, 2016).



nd : non disponible

**Figure 2 : Exemples de véhicules utilisant l'hydrogène comme carburant**

Les coûts élevés de production durable d'hydrogène, des dispositifs de conversion énergétique et des véhicules utilisant les piles à combustible (Bettayeb *et al.*, 2017) et le faible nombre de stations en service (actuellement 11 publiques et 12 privées, (AFHYAC, 2018)) sont les principaux verrous restant à lever.

### 1.1.3 Scénarii d'évolution du marché de l'hydrogène-énergie

Plusieurs *scénarii* ont été proposés pour l'évolution du marché de l'hydrogène.

L'association négaWatt propose une analyse année par année de toutes les chaînes énergétiques, en partant des usages (énergie finale) jusqu'aux ressources (énergie primaire) avec deux niveaux de vecteurs énergétiques. Sa modélisation permet d'établir une feuille de route optimale jusqu'à 2050 en fonction d'hypothèses et de choix réglementaires et économiques. Selon ce modèle, en 2050, plus de 50 TWh devraient être injectés directement dans le réseau sous forme de méthane produit par méthanation de l'hydrogène (Association négaWatt, 2017).

Selon le scénario d'évolution du mix énergétique de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) à l'horizon 2035-2050, l'hydrogène ne jouerait qu'un rôle mineur du fait des verrous technologiques actuels. L'emploi des piles à combustibles interviendrait ainsi surtout dans la décentralisation de la production d'électricité (ADEME, 2017).

L'Alliance Nationale de Coordination de la Recherche pour l'Energie (ANCRE) propose trois *scénarii* dans lesquels l'hydrogène occupe une place centrale dans la diminution des émissions de CO<sub>2</sub> et la production d'électricité. L'hydrogène serait directement injecté dans les réseaux de gaz et l'utilisation des véhicules à PAC serait généralisé. Ces développements nécessiteraient tout de même d'importants investissements (ANCRE, 2013).

Pour l'Hydrogen Council regroupant de grands groupes industriels (dont Airbus, Air Liquide, ENGIE, Total, Shell, Toyota, *etc.*), l'hydrogène est un pilier central de la transition énergétique nécessaire pour limiter le réchauffement climatique à 2°C. Leur feuille de route pour l'économie de l'hydrogène concerne le secteur du transport via les piles à combustibles, le secteur industriel via l'alimentation des hauts fourneaux, le secteur du chauffage urbain pour la production de gaz de ville, et l'amélioration de la résilience des énergies renouvelables (Hydrogen Council, 2017).

## 1.2 Purification et stockage de l'hydrogène

Quel que soit son mode de production, l'hydrogène contient des impuretés (eau, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, *etc.*). Pour une utilisation *via* une pile à combustible, la pureté requise est de 99,99% vol. (Abdalla *et al.*, 2018). Ainsi, une étape de purification de l'hydrogène produit est indispensable, et présente l'intérêt de capter le CO<sub>2</sub> coproduit avant son émission par un véhicule.

Différentes techniques de séparation du CO<sub>2</sub> sont disponibles. L'absorption de CO<sub>2</sub> en phase liquide par des amines et la distillation cryogénique engendrent respectivement des surcoûts liés à la consommation de solvants et l'énergie nécessaire pour la réfrigération. Le procédé d'adsorption PSA (*Pressure Swing Adsorption*) de composés, dont le CO<sub>2</sub>, est mis en oeuvre sur des lits d'adsorbants moléculaires par une série de cycles d'adsorption/désorption sélective, selon la pression des gaz. Le procédé TSA (*Temperature Swing Adsorption*) est similaire au procédé

PSA, la séparation est basée sur l'effet de la température sur l'adsorption des différentes espèces gazeuses (Dumergues *et al.*, 2014). Les technologies de séparation membranaire présentent des atouts d'efficacité énergétique, de coût et de faible impact environnemental en comparaison avec des techniques de séparation conventionnelles. De plus, elles peuvent être couplées à d'autres techniques de séparation (cryogénie, PSA) pour améliorer l'efficacité et l'économie des procédés de séparation (Modigell *et al.*, 2008). La séparation membranaire met en œuvre des membranes métalliques composées de palladium ou d'alliages de palladium, fonctionnant à haute température/pression, très peu développées industriellement, ou des membranes polymères à pressions et températures faibles, avec cependant des facteurs de séparation moins élevés (Li *et al.*, 2015).

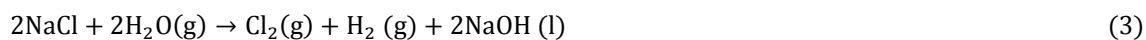
Le stockage de l'hydrogène est un défi économique et technologique, du fait de sa très faible masse molaire, de sa très basse température de liquéfaction et sa très faible densité volumique dans les conditions normales de température et de pression ( $0,09 \text{ kg}_{\text{H}_2}/\text{m}^3$ ). Il est possible de stocker l'hydrogène sous forme gazeuse, sous forme liquide, ou par physisorption dans des hydrures métalliques permettant d'absorber l'hydrogène à température ambiante et de le désorber par chauffage du réservoir (Abdalla *et al.*, 2018). Les réservoirs en métal peuvent supporter une pression de l'ordre de 20-30 MPa, les réservoirs en matériaux composites peuvent supporter des pressions plus importantes et sont plus résistants aux phénomènes de fragilisation par l'hydrogène mais sont plus coûteux. Ainsi, le stockage sous forme comprimée est pertinent pour une utilisation de l'ordre de quelques kilogrammes à dizaines de kilogrammes, ce qui est le cas de véhicules routiers électriques à piles à combustibles, les PAC nécessitant  $1 \text{ kg}_{\text{H}_2}/100 \text{ km}$ . Pour des volumes plus importants (tonnes ou en dizaines de tonnes), le stockage sous forme liquide serait préférable, mais les pertes énergétiques sont importantes (40% contre 10% pour un stockage comprimé). Les hydrures permettent un stockage à densité élevée d'hydrogène, ils apportent par ailleurs une excellente sécurité, une bonne réversibilité et de faibles coûts d'opérations et de maintenance (AFHYPAC, 2016).

*L'hydrogène est appelé à jouer un rôle essentiel dans le mix énergétique de demain ; il est donc nécessaire que l'impact environnemental de la filière hydrogène soit réduit, ce qui implique d'innover à différents niveaux, notamment celui de la production.*

### 1.3 Procédés de production d'hydrogène : intérêt des procédés biologique et de la fermentation obscure

Dès les années 1970, des émanations d'hydrogène naturel ont été détectées dans les océans, mais avec des flux modestes et situées à plus de 4000 mètres de profondeur. De telles "fuites" d'hydrogène du sol seraient également détectables dans plusieurs régions du monde mais à l'heure actuelle, ces flux extrêmement diffus ne sont pas récupérables à l'échelle industrielle (Delville et Prinzhofer, 2015 ; Passebon, 2016).

L'hydrogène fatal, coproduit de procédés électrochimiques de production du chlore est encore peu valorisé. Par exemple, 10 000 t<sub>H<sub>2</sub></sub>/250 000 t<sub>PVC</sub>/an (3) sont produites par Solvay (Tavaux, 39) et seule une petite partie est récupérée et utilisée en interne (Thiery, 2016).



A terme, si la totalité de cet hydrogène est valorisé, il se peut que son utilisation ne couvre que les besoins industriels et non les applications pour le développement d'une mobilité peu émettrice de CO<sub>2</sub> précitées. Ainsi, l'extraction et la conversion de diverses matières premières est actuellement nécessaire pour produire de l'hydrogène.

Alors que 96% des 60 millions de tonnes d'hydrogène produites annuellement sont produites par vaporeformage d'hydrocarbures (Boyer, 2012), de nombreuses études sont en cours pour le développement de procédés alternatifs.

### 1.3.1 Bilan et comparaison des procédés de production d'hydrogène

Les différents procédés font appel à des méthodes thermiques, électrochimiques, bio-électrochimiques ou biologiques et sont caractérisés par différentes matières premières, besoins énergétiques et sous-produits émis (tableau 2). Ces éléments impactent la durabilité globale du procédé. Cette analyse est basée sur le travail de Demirci et Miele (2010).

**Tableau 2 : Modes de production d'hydrogène (adapté de Demirci et Miele, 2010)**

Méthode	Procédé	Matière première	Contraintes chimiques et énergétiques	Emissions secondaires
Thermique	Vaporeformage	Méthane	HT, P	CO <sub>2</sub> , CO
	Réaction du gaz à l'eau	Eau, CO	HT	CO <sub>2</sub>
	Oxydation partielle	Hydrocarbures	HT, P	CO <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub>
	Reformage autotherme	Méthane	HT, P	CO, CO <sub>2</sub>
	Thermolyse et gazéification	Biomasse, charbon	HT et P	CO <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub> , C
	Dissociation de l'eau	Eau	HT, auxiliaires chimiques	-
Electrochimique	Electrolyse	Eau	Electricité	-
	Electrolyse HT associée à un réacteur nucléaire	Eau	HT et électricité	-
	Photolyse	Eau	Energie solaire	-
Bioélectrochimique	Electrolyse microbienne	Eau	Electricité	-
Biologique	Biophotolyse directe	Eau	Energie lumineuse	-
	Biophotolyse indirecte	Eau, CO <sub>2</sub>	Energie lumineuse	-
	Réaction du gaz à l'eau	Eau, CO		CO <sub>2</sub>
	Photo-fermentation	Biomasse	Energie lumineuse	CO <sub>2</sub>
	Fermentation obscure	Biomasse		CO <sub>2</sub>

*HT = hautes températures, P = pression*

*NB : les émissions non toxiques et non polluantes ne sont pas indiquées*

#### 1.3.1.1 Les matières premières

Pour une production d'hydrogène pérenne, le substrat de production se doit d'être renouvelable, abondant et ne doit pas faire l'objet de conflits d'usages (figure 3). Les émissions

de gaz à effet de serre doivent être maîtrisées au cours de la production, du transport et du stockage de l'hydrogène.

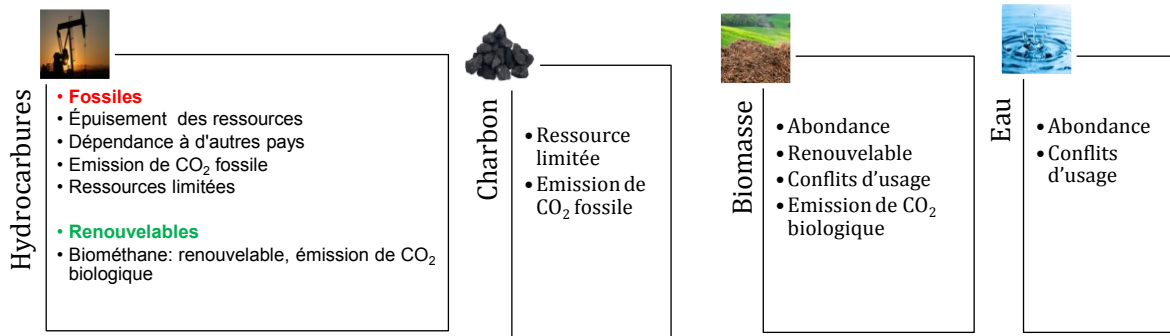


Figure 3 : Comparaison des matières premières de production d'hydrogène

Ainsi, l'utilisation de ressources fossiles non renouvelables à l'échelle du temps de leur consommation, au prix fluctuant et à l'accès incertain, est pour l'avenir défavorable à une production d'hydrogène énergie. De plus, bien que tous les substrats carbonés soient émetteurs de CO<sub>2</sub> lors de leur conversion en hydrogène, la production de ressources fossiles a lieu sur une échelle de temps trop longue pour compenser les émissions de CO<sub>2</sub> liées à son utilisation, contrairement à la biomasse produite par photosynthèse ou d'autres processus biologiques. Ainsi, l'eau (ressource non carbonée), la biomasse ainsi que le biométhane peuvent répondre de façon satisfaisante aux critères de renouvellement des stocks au rythme de la production d'hydrogène et de non émission de CO<sub>2</sub> fossile (Demirci et Miele, 2010).

Une utilisation durable de la biomasse à usage énergétique ne doit pas faire appel au stock de biomasse (2000 Gt sur terre et 4 Gt dans les océans), mais au flux annuel de sa production (Megret *et al.*, 2015). Le Grenelle de l'environnement de 2007 définit une hiérarchie des usages de la biomasse, qui donne priorité à l'usage alimentaire (humain et animal), puis aux usages industriels (y compris matériaux) et en dernier lieu aux usages énergétiques. Notons que la production industrielle des biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération a créé une pression sur l'utilisation des terres arables et n'est donc plus souhaitable. Les cultures énergétiques sur des terres contaminées (bioremédiation d'anciennes friches industrielles) ou l'utilisation de végétaux non alimentaires (déchets agricoles, résidus forestiers, *etc.*) limiteraient les conflits d'usage, même si ces ressources de 2<sup>nd</sup>e génération sont parfois utilisées en alimentation animale. Dans ce cas, l'utilisation de la ressource en eau doit rester minimale. Une 3<sup>ème</sup> génération de biocarburants produits à partir d'algues est également envisagée ; les algues présentant l'avantage d'être cultivées à bas coût, de produire de l'énergie via la production de biodiesel par transestérification des lipides et d'être entièrement renouvelables (IFPEN, 2015). Une autre problématique est celle du retour au sol de la biomasse (ADEME, 2016) En effet, les biomasses utilisées généralement pour l'épandage peuvent voir leur teneur en DCO réduite après leur valorisation pour la production d'énergie.

L'évaluation des ressources en biomasses est donc nécessaire pour une production d'hydrogène biosourcée. Sur les 220 Gt de biomasse disponible annuellement dans le monde, 13 Gt pourraient être utilisables pour la production d'énergie. Le plan d'action national français

pour atteindre les objectifs fixés par la directive 2009/28/CE du 23 avril 2009, imposant aux États membres de l'UE de disposer dans leur bouquet de consommation énergétique d'au moins 20 % d'énergies renouvelables à l'horizon 2020, prévoit que la biomasse doit fournir l'énergie nécessaire à la réalisation de plus de la moitié de cet objectif (Megret *et al*, 2015).

#### 1.3.1.2 Contraintes énergétiques/chimiques et efficacité du procédé

Les procédés thermiques ont un rendement fortement affecté par les températures de travail nécessaires (800-1000°C). Concernant les procédés électrochimique, l'hydrolyse basée sur l'électricité nucléaire exploite une ressource elle aussi limitée dans un procédé aux problématiques croissantes (sécurité, gestion des déchets...). En revanche, les sources primaires d'énergie comme le solaire, l'éolien, le géothermique ou l'hydraulique permettent de produire une électricité renouvelable durable. Cependant, la production d'électricité des éoliennes, panneaux photovoltaïques n'est pas toujours excédentaire (Bernier, 2014) et les procédés d'électrolyse de l'eau restent coûteux. La recherche sur les procédés biologiques est très active car ils sont majoritairement effectués à des températures basses et à pression ambiante, nécessitant moins d'énergie que les processus thermochimiques, même si l'utilisation d'énergie lumineuse et les faibles rendements actuels limitent leur développement à grande échelle (Demirci et Miele, 2010).

#### 1.3.1.3 Maîtrise des émissions secondaires

L'utilisation énergétique de l'hydrogène n'émet localement que de l'eau ou de la vapeur d'eau et le CO<sub>2</sub> émis lors de sa production peut être capté et valorisé (AFHYPAC, 2018). Néanmoins, l'émission de gaz à effet de serre est une réalité dans toutes les étapes du schéma de production d'hydrogène, de la collecte des matières premières à la distribution de l'hydrogène en passant par les différentes étapes de traitements, de production et d'acheminement. Le développement de filières de production décentralisées est donc préconisé (ADEME, 2016).

*En complément aux procédés d'électrolyse de l'eau, l'utilisation de la biomasse est pertinente pour une production durable d'hydrogène. L'implication de la biomasse dans le domaine de l'énergie devra se faire de façon raisonnée pour ne pas, dans le cas d'une transition accélérée au « tout biomasse », ruiner les bénéfices environnementaux en termes de durabilité et du caractère renouvelable de son utilisation. Ainsi, les procédés biologiques, moins énergivores et plus durables que les procédés thermochimiques, représentent une piste de production intéressante.*

#### 1.3.2 Procédés biologiques de production d'hydrogène.

De nombreux développements restent à effectuer pour l'industrialisation de ces procédés. Certains processus nécessitent un apport d'énergie lumineuse (biophotolyse directe et indirecte, photo-fermentation), d'autres des conditions anaérobies strictes (réaction du gaz à l'eau, fermentation obscure). Ils exploitent l'aptitude de micro-organismes (bactéries et microalgues) à produire de l'hydrogène au cours de divers processus métaboliques de formation d'énergie et de



pouvoir réducteur, indispensables à la biosynthèse de leurs différents constituants, reposant sur l'utilisation des électrons générés lors de l'oxydation de diverses molécules organiques ou d'eau, ou captés de l'énergie solaire. Les processus de production diffèrent selon les organismes, mais deux enzymes ont un rôle clé dans la formation de l'hydrogène : les hydrogénases et les nitrogénases (Ni *et al.*, 2006).

La formation de l'hydrogène moléculaire catalysé par une hydrogénase permet le recyclage des équivalents réducteurs produits en excès lors du métabolisme fermentaire lors du processus de digestion anaérobie ou associé à une activité photosynthétique dans des conditions anoxies. L'enzyme catalyse la réduction de deux protons en hydrogène moléculaire (4).



Très diverses en termes de taille, structure, localisation cellulaire et rôles biologiques, les hydrogénases peuvent être classées selon la nature des ions métalliques présents dans leur site actif [FeFe], [Fe] ou [NiFe]. Leur action catalytique est influencée par l'état d'oxydoréduction des cellules et par les conditions du milieu (pH, température) (Vignais et Colbeau, 2004). Le CO, l'O<sub>2</sub> et une pression partielle trop élevée en H<sub>2</sub> ont un effet inhibiteur sur les hydrogénases (Kim *et al.*, 2011). L'hydrogène peut également être un coproduit de l'action d'une nitrogénase, enzyme réalisant la réduction du N<sub>2</sub> conduisant à la formation de NH<sub>3</sub> sous des conditions photo-hétérotrophes (McKinlay et Harwood, 2010).

### 1.3.2.1 Biophotolyse

La biophotolyse exploite la capacité du système photosynthétique des microalgues à convertir de l'énergie lumineuse en énergie chimique avec de l'eau (5) (Ni *et al.*, 2006). Les électrons générés lors de l'absorption de l'énergie lumineuse sont utilisés pour réduire le cluster Fe-S de la ferrédoxine (Fd), petite protéine ubiquitaire (Zanetti et Pandini, 2013). L'oxydation de la ferrédoxine, catalysée par une hydrogénase ou une nitrogénase, est couplée à la réduction de deux protons en hydrogène (6) (Hallenbeck *et al.*, 2002).



Par biophotolyse directe, la production d'hydrogène ne peut être continue, à cause de l'inhibition des hydrogénases par une pression partielle d'oxygène dépassant 0,1%. La biophotolyse indirecte permet de lever ce verrou en séparant temporellement la production d'hydrogène de la photosynthèse (Eroglu et Melis, 2011). Ce processus est fondé sur l'adaptation du métabolisme de micro-algues ou de cyanobactéries à la variation journalière d'intensité lumineuse. Lors de la phase lumineuse, le métabolisme de l'algue est photosynthétique et aboutit à la production d'oxygène et à l'assimilation du carbone du dioxyde de carbone (7).



Durant les périodes sombres, une chaîne de transfert d'électrons alternative est mise en œuvre et fonctionne jusqu'à ce que l'oxygène présent dans le milieu soit épuisé. Les métabolites cellulaires formés lors de la première étape sont fermentés et complètement oxydés avec une coproduction d'hydrogène et de dioxyde de carbone (8).



Malgré les avancées, le processus global n'est toujours pas continu, en effet, lorsqu'il y a réapparition de lumière, la croissance redevient photosynthétique et l'hydrogénase est à nouveau inhibée (Ni *et al.*, 2006).

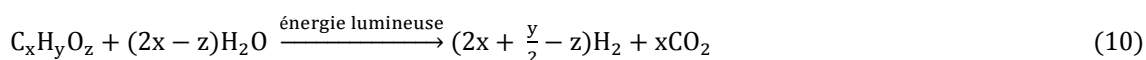
### 1.3.2.2 Conversion du gaz à l'eau

Une bactérie photohétérotrophe pourpre (*Rubrivivax gelatinosus* CBS) a la capacité de survivre en l'absence de lumière en couplant l'oxydation de monoxyde de carbone à la réduction de protons en hydrogène (9), à pression atmosphérique ou jusqu'à  $P = 4$  atm, à  $25^\circ\text{C}$  et en anaérobiose (Amos *et al.*, 2004).

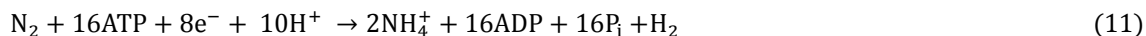


### 1.3.2.3 Photo-fermentation

L'utilisation d'énergie lumineuse permet à des bactéries pourpres non sulfato-réductrice photosynthétiques d'exploiter la totalité des électrons d'un substrat organique (glucides, acides organiques, *etc*) pour produire de l'énergie cellulaire, avec une coproduction d'hydrogène (10) (Hallenbeck *et al.*, 2002).



L'oxydation du substrat est couplée à la réduction de la ferrédoxine et la production d'ATP. L'hydrogène est produit via la conversion de l'azote en ammonium couplée à l'oxydation de la ferrédoxine et la consommation d'ATP, catalysée par une nitrogénase (11).



### 1.3.2.4 L'électrolyse microbienne

L'électrolyse microbienne est réalisée par des bactéries anaérobies capables de réaliser des transferts d'électrons au cours de leur métabolisme. L'électrolyse microbienne nécessite deux électrodes : l'anode sur laquelle des molécules organiques sont oxydées par les bactéries avec formation de  $\text{CO}_2$  et d'électrons et la cathode, où l'hydrogène est produit à partir de protons et des électrons produits à l'anode. Une membrane peut être utilisée pour séparer les compartiments de la cathode et de l'anode, permettant la production séparée du  $\text{CO}_2$  et de l'hydrogène (Pierra, 2013).

### 1.3.2.5 Fermentation obscure

La fermentation obscure est le résultat de l'action d'un *consortium* bactérien en conditions anaérobies mettant en œuvre plusieurs étapes de dégradation de molécules organiques (typiquement des glucides) avec une coproduction d'acides gras volatils et de CO<sub>2</sub>. Une grande variété de microorganismes est adaptée à ce processus, les plus étudiées étant des bactéries des genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Bacillus*. De l'hydrogène est coproduit avec la formation d'acide acétique (12) et/ou d'acide butyrique (13). L'hydrogène est issu de la catalyse enzymatique par une hydrogénase [FeFe] ou [NiFe] de la réduction de deux protons via la ferrédoxine (Latrille *et al.*, 2011).



### 1.3.2.6 Choix de la fermentation obscure pour notre étude

Les paramètres à considérer pour envisager la mise en œuvre d'un procédé de production biologique d'hydrogène à grande échelle sont multiples et interconnectés : rentabilité énergétique, durabilité, contraintes opératoires et insertion dans le paysage énergétique existant. Les atouts du procédé de fermentation obscure sont multiples. Il présente de bonnes productivités en hydrogène. C'est également le plus modulable par rapport aux autres bioprocédés : il offre possibilité de valoriser des déchets organiques de natures très variées (contrairement à l'électrolyse), il ne nécessite pas d'apport d'énergie lumineuse (contrairement aux photo-procédés), il peut être mis en œuvre dans des conditions non stériles (contrairement au procédé de conversion de gaz à l'eau). De plus, le procédé de conversion du gaz à l'eau, bien que similaire, est applicable spécifiquement à un procédé industriel producteur de CO pour une capture et une valorisation de ce gaz.

L'inconvénient majeur du procédé de fermentation obscure est la formation de nombreux coproduits (acides organiques et alcools), limitant le rendement de fermentation. Thauer (1976) démontre que théoriquement, le rendement maximal de dégradation de glucose en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> est de 12 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub> selon l'équation (14).



S'il était possible de catalyser ce processus, plus de 99% de l'énergie de combustion du glucose pourrait être conservée sous forme d'H<sub>2</sub> selon les équations (15) et (16).



Cependant, le rendement de dégradation de la biomasse par fermentation obscure est limité par diverses contraintes métaboliques bactériennes compétitrices ou diminuant le potentiel de production d'hydrogène. Le rendement maximal théorique de dégradation est alors de

4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub>. Des rendements proches ont été rapportés dans plusieurs travaux dès les années 1970 (Hungate, 1974) et de nombreuses fois depuis, par des souches en cultures pures ou en co-cultures, comme décrit dans la revue exhaustive d'Elsharnouby *et al.* (2013). Le digestat peut néanmoins être utilisé comme substrat, en couplage avec d'autres bioprocédés (*cf.* 1.4.2) pour exploiter au maximum le potentiel des biomasses. De plus, il est nécessaire de faire appel à l'utilisation de biomasses non alimentaires et dont les autres modes de valorisation (alimentation, chimie) sont limités.

*La suite de ce chapitre porte sur les possibilités d'insertion du procédé de fermentation obscure dans une chaîne de bioraffinerie. Le choix des substrats de fermentation et la valorisation des coproduits de fermentation (couplage avec d'autres bioprocédés, valorisation chimique des coproduits de fermentation) seront discutés.*

## 1.4 Intégration de la fermentation obscure dans une bioraffinerie

Inspirée des raffineries conventionnelles de produits pétroliers, une bioraffinerie est un réseau industriel intégrant des procédés de conversion de biomasses pour obtenir des matériaux, des composés chimiques, de l'énergie, de la chaleur, et fournir dans certains cas une alimentation humaine et animale. Chaque composant de la ressource est extrait et valorisé par des procédés thermiques, physiques, chimiques ou biologiques. Ces systèmes visent à maximiser la valeur des produits obtenus, valoriser intégralement différentes biomasses, réduire les émissions de gaz à effet de serre et stimuler le développement régional et rural (Moncada *et al.*, 2016 ; Bauer *et al.*, 2017). Le substrat représenterait, selon son origine, entre 40 et 60% du coût opératoire total (Parajuli *et al.*, 2015).

### 1.4.1 Utilisation de déchets organiques comme substrat

#### 1.4.1.1 Méthodes de traitement conventionnelles et développements en cours

On observe des inégalités de gestion des déchets organiques selon le développement des différentes régions mondiales. Dans les pays de l'Union Européenne, les pratiques actuelles incluent l'épandage, le compostage et des procédés de traitements biologiques, dont la digestion anaérobie. Le développement de chaînes de bioraffineries utilisant les déchets comme substrats est en cours pour la production de bioproduits à haute valeur ajoutée (molécules plateformes biosourcées, polymères) et par conséquent, les substrats potentiels de production d'hydrogène par fermentation obscure seraient des ressources peu ou non valorisées (Maina *et al.*, 2017). Dans les pays en voie de développement, la gestion des déchets est limitée par de faibles budgets pour la mise en place d'infrastructures adaptées et l'entretien des installations existantes.

L'introduction de bioraffineries de déchets organiques, notamment de production d'hydrogène par fermentation obscure, permettrait d'alléger la surcharge sociétale, économique et

environnementale causée par les pratiques actuelles de gestion des déchets, et de proposer une solution durable à la demande énergétique croissante, avec la création de nouveaux emplois, et en limitant l'impact environnemental des activités humaines (Nizami *et al.*, 2018).

En France, une étude de l'ADEME (2016b) énonce plusieurs principes de valorisation des déchets organiques. La prévention de la production du déchet reste prioritaire. Si la production du déchet ne peut être évitée, les principes suivants sont préconisés :

- proximité du lieu de stockage et du lieu de traitement du déchet avec l'implication des producteurs, valorisation avec des débouchés locaux ;
- complémentarité à la fois des déchets produits sur le territoire en termes de traitement (vis-à-vis de l'aptitude au compostage et/ou à la méthanisation) et des différentes solutions de gestion (autonome, semi-collective, centralisée), avec la concertation des multiples acteurs concernés.

#### 1.4.1.2 Ressources potentielles pour le procédé de fermentation obscure

Une classification des gisements de déchets organiques potentiels en France pour la fermentation obscure en fonction de leur origine est présentée dans le tableau 3.

**Tableau 3: Classification des gisements de biomasses en fonction de leur provenance (adapté de Megret *et al.*, 2015)**

Filière	Gisements de biomasse
Agriculture	- résidus secs de culture (pailles et tiges de céréales, tourteaux) - résidus humides agricoles et d'élevage (fumier, lisier, ensilage d'herbe)
Sylviculture	- résidus de première et deuxième transformation (écorces, chutes, rebus, copeaux, etc.) - branchages
Cultures énergétiques	- taillis à courte ou très courte rotation - herbacées - autres cultures agricoles (maïs, etc.)
Déchets industriels et urbains	- industrie agroalimentaire (résidus de production, déchets restauration, effluents, déchets de grandes et moyennes surfaces) - autres industries (papier, textile, boues de stations d'épuration (STEP)) - urbains (biodéchets (de déchets ménagers triés), combustibles solides de récupération de déchets ménagers triés)
Aquatique	- micro et macro algues
Déchets issus d'autres bioprocédés	- déchets issus de la production de biocarburants (glycérol, tourteaux d'algues déshuilés, de coton)

De nombreuses biomasses ont été testées et recensées de manière exhaustive par Ghimire *et al.* (2015) pour la production d'hydrogène par fermentation obscure : résidus d'agriculture (déchets lignocellulosiques, lisiers d'élevage), déchets organiques industriels (notamment issus de l'industrie agroalimentaire), fraction organique des déchets municipaux.

*Pour leur abondance et leur richesse en matières métabolisables, nous nous intéresserons par la suite aux déchets agricoles et issus d'industries agroalimentaires.*

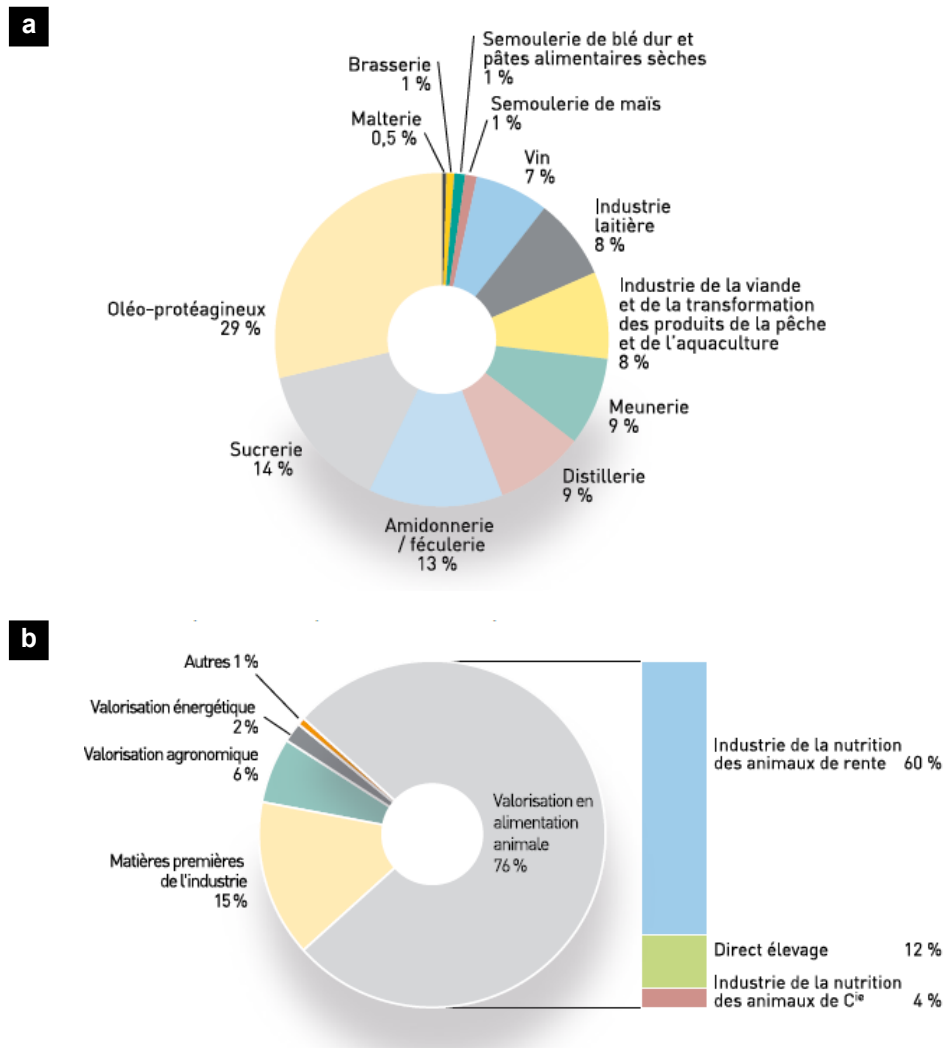
❖ Potentiel d'utilisation des déchets issus des industries agroalimentaires

○ *Les gisements*

Les données de cette partie sont issues du rapport RESEDA (2017).

L'ensemble des flux des industries agroalimentaires autres que ceux destinés à l'alimentation humaine en première intention sont des substrats potentiels pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. Il s'agit de denrées alimentaires produites pour l'alimentation humaine mais écartées pour des raisons pratiques ou logistiques, des coproduits végétaux et animaux, d'écarts de tri, de fabrication et de transformation et des eaux résiduaires. L'intérêt de ces ressources est qu'elles sont complémentaires plutôt que concurrentes de la production alimentaire. De plus, elles ne nécessitent pas d'apports en eau et produits phytosanitaires supplémentaires aux apports nécessaires à la culture principale.

En 2016, 12,1 millions de tonnes de matières sèches de déchets et coproduits agroalimentaires ont été produites, réparties selon les différents secteurs de l'industrie (figure 4). Les productions majoritaires sont celles des secteurs des oléo-protéagineux (29%), de la sucrerie (14%) et de l'amidonnerie/féculerie (13%). 9,3 millions de tonnes de matières sèches ont été valorisées, dont 76 % en alimentation animale, majoritairement d'animaux de rentes, 15% en matières premières de l'industrie et seulement 2% pour la production d'énergie (figure 4b). Pour la majorité des secteurs, le volume de coproduits est resté globalement stable depuis 2007 ; les évolutions observées sont principalement dues à des variations de marché, c'est-à-dire liées à une variation du volume de matières premières mises en œuvre. Trois secteurs ont vu leurs volumes de coproduits augmenter de manière significative depuis 2007 : la brasserie (+80% entre 2007 et 2016), la distillerie (+2991 %) et la filière oléagineux (+88%). Ceci s'explique par une augmentation significative du nombre de microbrasseries pour le secteur de la brasserie. Pour les filières de la distillerie et des oléo-protéagineux, l'augmentation est liée au fait que les produits peuvent être incorporés dans la fabrication de biocarburants, ce qui est encouragé par les politiques publiques. Ceci a entraîné une augmentation des matières mises en œuvre et de plus grands volumes disponibles pour l'alimentation animale.



**Figure 4 : Répartition des déchets et coproduits agroalimentaires (a) et voies de valorisation (b) (en % de tonne de matières sèches) en 2016 (RESEDA, 2017)**

Autrement dit, 2,8 millions de tonnes de matières sèches seraient disponibles pour la fermentation obscure sans entrer en compétition avec une filière de valorisation existante. Néanmoins, le prélèvement de ces résidus pour une production énergétique ne serait pas neutre d'un point de vue environnemental, il pourrait empêcher le retour au sol des composés organiques qui les constituent, essentiels au maintien de la qualité et de la viabilité des sols. De façon générale, un équilibre doit être trouvé entre le prélèvement de la biomasse et sa restitution aux sols.

*Notre étude porte sur l'évaluation du potentiel de déchets agroalimentaires. Des entretiens avec des industriels de différents secteurs du Bas-Rhin ont été menés afin d'identifier des déchets organiques disponibles pour une valorisation énergétique déclinable à différentes échelles. Ces différentes biomasses sont présentées ci-après.*

○ *Les déchets organiques de la filière vitivinicole*

En 2015, la filière vitivinicole a produit en France 46,8 millions d’hectolitres de vin. Cette production se répartit de la manière suivante : 40 % de vins rouges, 15 % de vins rosés, 25 % de vins blancs et 20 % de Cognac-Armagnac (Ministère de l'Action et des Comptes publics, 2017).

La figure 5 présente le procédé de production du vin blanc. Après leur récolte à maturation, les grappes de raisin sont pressées, ce qui permet de séparer les marcs du moût trouble. Une étape de décantation, ou débourbage, permet de séparer par gravité les particules en suspension du moût, les bourbes, pouvant être éventuellement pressées par un système de filtre presse afin d’en extraire un maximum de moût clair. Le moût clair est ensuite fermenté, ce qui permet de produire le vin blanc qui sera ensuite clarifié, stabilisé, filtré et mis en bouteille. Les marcs de raisin représentent 27% du rendement moyen du vignoble français de 7000 kg/ha environ. Environ 850 000 tonnes de marcs de raisin et 1,4 millions d’hectolitres de lies de vin et de bourbes sont collectés dans les 50 distilleries françaises (IFV, 2013).

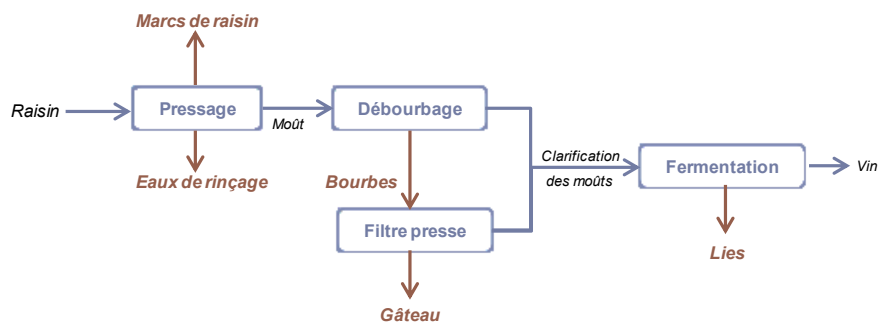


Figure 5 : Procédé de production du vin blanc (adapté de François-Lopez, 2016)

La distillerie est la voie de valorisation actuellement majoritaire des marcs de raisin. Les autres possibilités sont le traitement dans des unités de méthanisation ou par compostage, l’acide tartrique étant récupéré dans les distilleries produisant de l’eau de vie de marcs et du bioéthanol (IFV, 2013). Cependant, de nombreuses pistes de valorisation sont étudiées : utilisation comme substrat de fermentation pour la production de bioéthanol, extraction de composés chimiques (composés phénoliques, antioxydants, acides organiques, etc.) (Muhlack *et al.*, 2018).

○ *Les déchets organiques issus de malteries*

Le volume d’exportation du malt français était de 1,2 millions de tonnes en 2013, ce qui représente 30% des volumes mondiaux d’exportation (FAOSTAT, 2017). La bière est produite à partir d’eau, de malt d’orge, de houblon et de levures. Le maltage de l’orge, réalisé en malterie, a pour but d’augmenter la friabilité du grain d’orge, permettant une meilleure hydratation au moment du brassage, la synthèse d’enzymes nécessaires au brassage ( $\alpha$  amylases), l’aromatisation et la coloration des grains d’orge lors du touraillage (Faiveley, 2010). Le procédé de production du malt est présenté sur la figure 6.



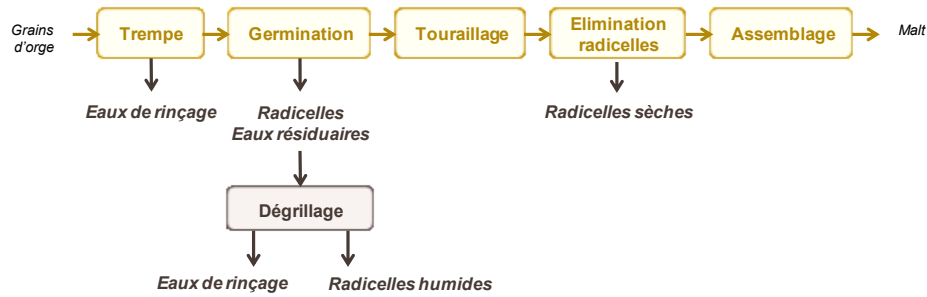


Figure 6 : Procédé de production du malt (d'après Société MALTEUROP (2000) et une source industrielle)

Les radicelles d’orge sont un coproduit important de cette filière, dont une partie est valorisée en alimentation animale mais une autre partie, humide, ne peut être valorisée pour cette voie (source industrielle). A notre connaissance, aucune étude ne concerne la valorisation de ce co-produit, hors alimentation animale pour les radicelles d’orge sèches.

o Les déchets organiques issus de brasseries

La France est le 8<sup>ème</sup> pays producteur de bière en Europe, avec 16 413 hectolitres produits en moyenne entre 2010 et 2014 (The Brewers of Europe, 2016). Le procédé de fabrication de la bière (figure 7), ou brassage, est dépendant de la taille de l’entreprise. Le malt d’orge est broyé grossièrement puis mélangé avec de l’eau chaude pour produire le moût. Après refroidissement, les particules solides sont séparées par filtration du moût, qui est porté à ébullition puis fermenté par des levures. Après décantation, les levures épuisées sont séparées de la bière qui subit une seconde fermentation lors du stockage ou garde. Certains brasseurs filtrent la bière à nouveau après l’étape de garde. Différents éléments de filtration peuvent être utilisés (membranes de cellulose, terres de diatomées, perlite, charbon actif) (Dos Santos Mathias, 2014). Le produit fini est ensuite mis en bouteille et éventuellement pasteurisé, afin d’éliminer les levures restantes ainsi que d’autres microorganismes de dégradation (Olajire *et al.*, 2012) .

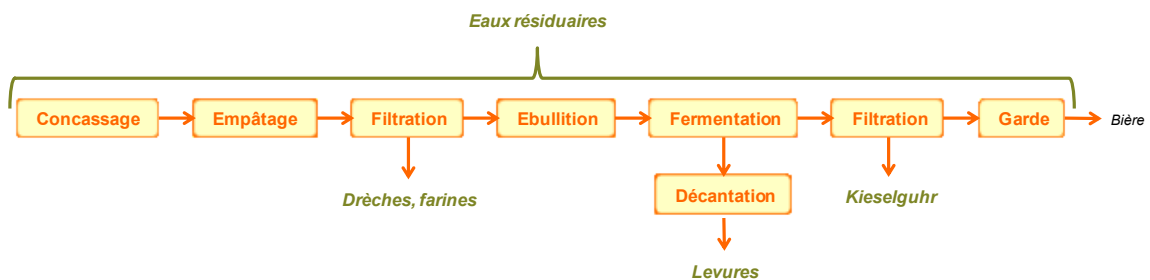


Figure 7 : Procédé de production de bière (adapté de Faiveley, 2010)

Les déchets comprennent les drèches, le moût trouble, les levures épuisées, le mélange de terre de diatomées et de résidus de filtration. Les drèches (14 à 20 kg/hL<sub>bière</sub>) correspondent à l'ensemble des éléments non solubles qui restent après fermentation et transformation de l'amidon des grains en alcool. Lors de l'ébullition, la perte d'azote du moût est à l'origine de la formation d'un précipité, le trouble (0,2 à 0,4 kg/hL<sub>bière</sub>). Lors du brassage, les levures (1,5 à 3 kg/hL<sub>bière</sub>) sont récoltées par décantation à la fin de la fermentation et de la mise en bouteille. Les terres de

diatomées (0,1 à 0,2 kg/L<sub>bière</sub>) ayant servi à filtrer la bière et non régénérées constituent également une catégorie riche en solides et DCO. Les drèches peuvent être vendues en tant que coproduits pour l'alimentation animale. Seule une partie des levures peut être réutilisée pour une nouvelle fermentation ; l'excédent peut être utilisé en alimentation animale en tant que complément nutritionnel. Différentes méthodes de régénération des terres de diatomées ont été développées (traitement chimique, calcination), mais actuellement, aucune n'est capable de remplacer totalement leur renouvellement (Dos Santos Mathias, 2014 ; Goldammer, 2008). Les eaux de rinçage, récoltées à différentes étapes du procédé, sont mélangées avant d'être traitées par digestion aérobie en station d'épuration, parfois installée sur le site de l'usine (source industrielle).

De nombreuses pistes de valorisation sont envisagées pour les drèches : production d'ingrédients fonctionnels riches en acide hydroxycinnamique (Mc Carthy *et al.*, 2013) ou protéines et arabinoxylanes (Viera *et al.*, 2014) et matériaux biosourcés (additifs à des panneaux d'isolation en bois) (Klimek *et al.*, 2017). L'étude de Bando *et al.* (2013) montre la faisabilité de production d'hydrogène en utilisant des drèches comme substrat avec un rendement maximal en hydrogène obtenu de 29,3 mL<sub>H2</sub>/g<sub>matière sèche</sub>. L'étude de Chen *et al.* (2016) rapporte le traitement en digestion anaérobie des eaux résiduaires, avec un rendement en biogaz 530 ± 15 L/kg<sub>DCO</sub> à 35°C. Cui *et al.* (2009) montrent que cette biomasse est utilisée pour la production d'hydrogène avec un rendement de 53L/kg<sub>matière sèche</sub>.

○ *Les déchets organiques issus de la torréfaction du café vert*

En 2016, la production mondiale de café vert marchand était de 9,2 millions de tonnes, avec une production majoritaire en Amérique (56 %), Asie (31 %) et Afrique (12 %). Entre 2009 et 2013, la France importait en moyenne 251631 t de café vert (FAOSTAT, 2018), ce qui la place dans le top 10 des pays importateurs de café vert dans le monde. Le café est produit à partir de la cerise de café, fruit du caféier. Après récolte, les premières transformations sur la cerise de café visent à la sécher pour sa conservation. Le grain de café est ensuite extrait de ses dernières enveloppes (coques, parche) et les grains de mauvaise qualité sont éliminés. Le café vert marchand obtenu, entouré d'une fine enveloppe extérieure (la pellicule argentée) n'est quasiment jamais torréfié dans les pays de production (Barrel, 2008). La torréfaction (figure 8) vise à former et à révéler les arômes du café. La pellicule argentée représente environ 4,2% du poids du grain de café (Ballesteros *et al.*, 2014), 1 t de pellicule argentée est produite pour 100-120 t de café torréfié (Alves *et al.*, 2017 ; source industrielle).

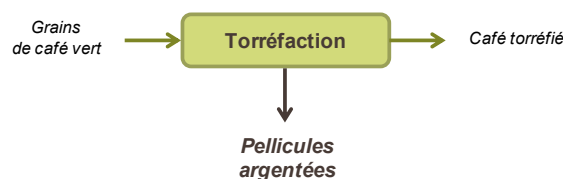


Figure 8 : Schéma simplifié de la torréfaction du café vert (d'après Barrel, 2008)

Réalisée dans des appareils à tambour rotatif horizontaux ou, dans l'industrie, dans des systèmes en continu sous air chaud pulsé, la torréfaction est à l'origine du brunissement des grains, dû aux réactions de Maillard, de leur gonflement de 60 à 80 % par création de pores et de cavités résultant des phénomènes de dégazage, et d'une perte de poids de 15 à 20 % causée par le départ de l'eau et du CO<sub>2</sub> (Barrel, 2008). Ainsi, lors de cette étape, la pellicule argentée se détache du grain. Il s'agit du coproduit principal de la torréfaction, qui doit obligatoirement être collecté. Les pellicules argentées sont relativement stables grâce à leur faible taux d'humidité (Costa *et al.*, 2017).

Actuellement utilisées comme combustible, ingrédient de compost, fertilisant du sol, divers travaux récents ont envisagé son potentiel comme ingrédient fonctionnel pour l'industrie agroalimentaire (Ates *et al.*, 2018), source de composés bioactifs (Fernandez-Gomez *et al.*, 2016 ; Iriondo Dehond *et al.*, 2017), pour la production de bioéthanol (Mussatto *et al.*, 2012), de matériaux (Sung *et al.*, 2017), de substrat de production de biohuile par pyrolyse (Dos Santos Polidoro *et al.*, 2018).

*Il existe suivant les coproduits identifiés dans cette étude des voies de valorisation diversifiées. Parmi ces déchets, certains sont déjà connus pour leur potentiel en valorisation énergétique (biomasses vitivinicoles) pour le reste, cette approche est innovante et leur intérêt est encore à démontrer.*

#### 1.4.2 Couplages de la fermentation obscure avec d'autres procédés et valorisation des coproduits de fermentation

Le digestat d'un bioréacteur de production d'hydrogène par fermentation obscure est riche en acides organiques ainsi qu'en particules solides (selon la nature de la biomasse de départ), qui peuvent servir de substrat pour d'autres procédés (figure 9), permettant de convertir les produits finaux de fermentation en hydrogène ou d'autres formes d'énergie (CH<sub>4</sub>, électricité) (Hawkes *et al.*, 2007). Il s'agit d'une piste à privilégier pour le développement de pilotes de fermentation (*cf* 3.4.4).

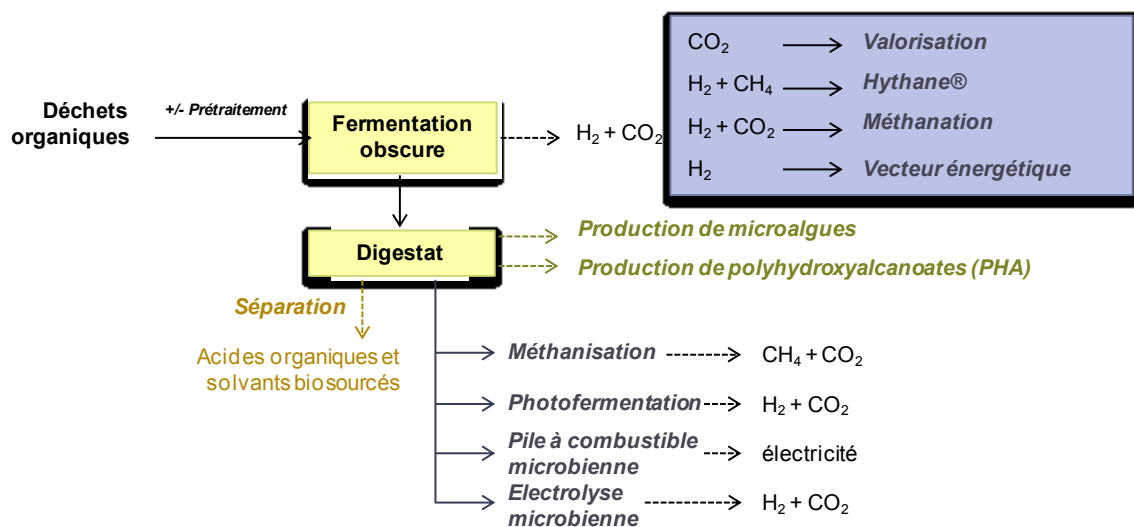


Figure 9 : Possibilités de couplage du procédé de fermentation obscure avec divers procédés

Le couplage de la fermentation obscure (FO) avec les procédés de méthanisation ou digestion anaérobie (DA), de photofermentation (PF) et d'électrolyse microbienne sont les plus étudiés (Guwy *et al.*, 2011). Le couplage de trois procédés FO/PF/DA a été également étudié (Ding *et al.*, 2017). Notons qu'il est possible d'optimiser les différentes étapes séparément. L'intérêt du couplage est d'améliorer le rendement de conversion du substrat et d'abaisser la DCO de la biomasse. Cependant, les différences de pH opératoires, l'accumulation d'inhibiteurs de la PF ou de la DA lors de la fermentation obscure ( $\text{NH}_4^+$  notamment) représentent des verrous au couplage (Bundhoo *et al.*, 2015 ; Ghimire *et al.*, 2015, Guwy *et al.*, 2011). L'utilisation du digestat présente également du potentiel pour la production de microalgues (Turon *et al.*, 2016). Des brevets pour la production de molécules à hautes valeurs ajoutée (polyhydroxyalcanoates, hydrocarbures) à partir de précurseurs obtenus par fermentation anaérobie ont été déposés (Nouaille *et al.*, 2015 ; Dupré et Rodriguez, 2013). Il est également possible d'utiliser l'hydrogène comme substrat de biométhanation. De façon plus anecdotique, Spasiano *et al.* (2018) ont proposé d'utiliser la fermentation obscure comme prétraitement de déchets amiantés.

Les diverses molécules solubles coproduites lors du procédé de fermentation obscure : acides gras volatils (acétate, butyrate, succinate, *etc*) et solvants (éthanol principalement) sont aujourd'hui produites essentiellement par voie chimique, pour de nombreuses applications (molécules plateformes de l'industrie pharmaceutique, cosmétique, additifs de l'industrie agro-alimentaire). Leur production par une voie biologique valorisant des déchets organiques serait plus durable (Luo *et al.*, 2018, Zhou *et al.*, 2018), mais l'absence de procédés matures de séparation des mélanges d'acides développés à grande échelle est un frein majeur. Les pistes envisagées concernent l'utilisation de procédés d'adsorption (Rebecchi *et al.*, 2016) ou d'électrodialyse (Jones *et al.*, 2015). L'utilisation de configurations de réacteurs de séparation membranaire liquide/liquide permettant leur préconcentration est également une voie envisagée (cf 3.3.2.3) (Trad *et al.*, 2015).

Le  $\text{CO}_2$  est un coproduit important du procédé de fermentation obscure qu'il est nécessaire de capter pour limiter l'effet de serre. Ses propriétés intrinsèques (gaz dense, liquéfaction au delà de 55 bar à 25°C) rendent son transport aisé dans des pipelines. Il peut être stocké par injection dans le sous-sol géologique pendant des durées importantes, dans l'océan à plus de 3000 m de profondeur sous forme de nappes liquides, dans des gisements de pétrole et de gaz épuisé ou en exploitation, dans des veines de houille non exploitées et dans des aquifères salins profonds (AFHYPAC, 2016). En outre, la valorisation du  $\text{CO}_2$  est envisagée dans plusieurs domaines : chimie (synthèse de molécules plateformes), énergie (synthèse de molécules à valeur énergétique), pharmacie et agroalimentaire (Dumergues *et al.*, 2014).

*Les possibilités de couplage du procédé de fermentation obscure avec d'autres procédés sont multiples. Ainsi, la fermentation obscure pourrait s'insérer en amont de divers procédés de bioraffineries, permettant un premier traitement de déchets organiques variés industriels et municipaux, de façon localisée. La suite de ce chapitre présente les notions de biochimie et de microbiologie du processus de fermentation*

obscur, puis les modes de mise en œuvre du procédé (verrous et voies d'amélioration).

## 2 Biochimie et microbiologie de la fermentation obscure

Au cours de la fermentation bactérienne, deux protons peuvent être réduits pour former de l'hydrogène moléculaire. Les microorganismes actifs en fermentation obscure et les voies métaboliques de formation d'hydrogène (de l'assimilation du substrat à l'excrétion des produits finaux de fermentation) seront présentés, ainsi que les processus concurrents à la formation d'hydrogène et non souhaitables dans un bioréacteur de fermentation obscure.

### 2.1 Les microorganismes de la fermentation obscure

#### 2.1.1 Les acteurs microbiens de la fermentation obscure

##### 2.1.1.1 La fermentation obscure, une étape de la digestion microbienne anaérobie de la matière organique

La production d'hydrogène par fermentation obscure fait partie de la digestion anaérobie, processus microbien symbiotique de dégradation de la matière organique aboutissant à la production de biogaz en quatre étapes : hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse (figure 10).

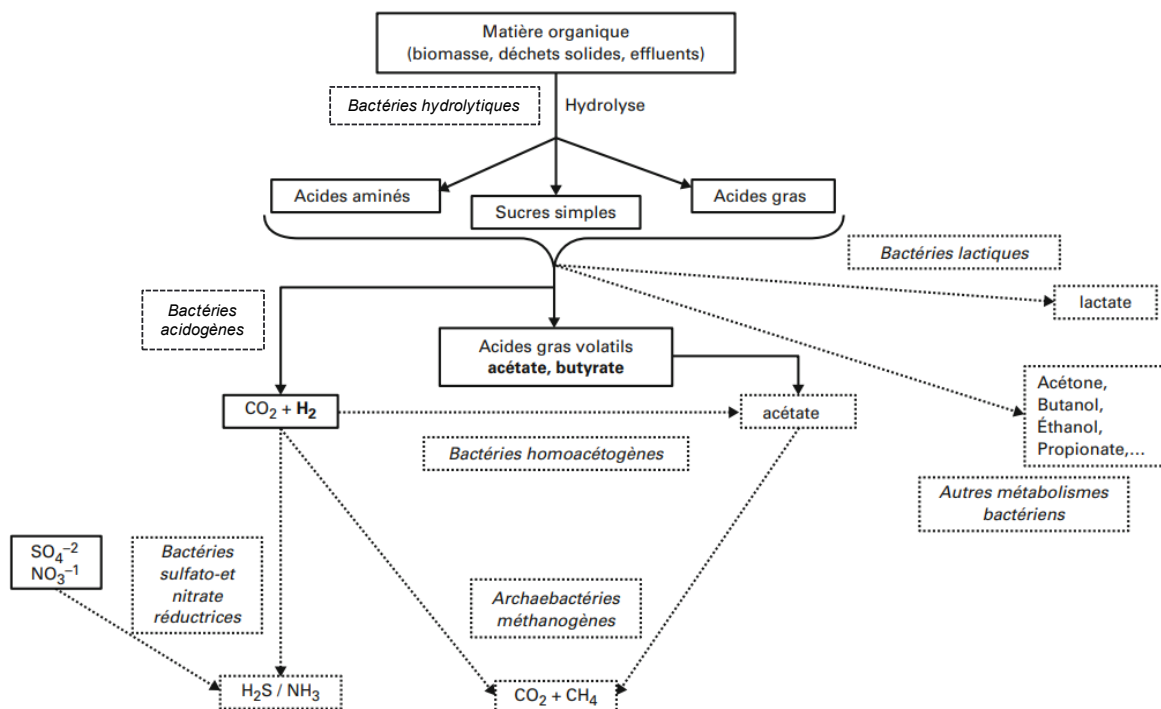


Figure 10 : Voies générales de dégradation de la matière organique en conditions anaérobies (d'après Trably *et al.*, 2018)

Les macromolécules complexes (polysaccharides, protéines et lipides), non assimilables sous cette forme par les microorganismes, sont tout d'abord hydrolysés en monomères solubles (monosaccharides, acides aminés, bases azotées, acides gras) par des enzymes extracellulaires sécrétées par des bactéries hydrolytiques ou des champignons. Plus la matière est complexe, plus cette étape est longue et limitante. Ensuite, les monomères obtenus sont transportés à l'intérieur des cellules microbiennes et oxydés en divers produits métaboliques (acides organiques, alcools) et dioxyde de carbone par des microorganismes fermentaires, avec une coproduction d'hydrogène sous certaines conditions. Ensuite, tous les composés des étapes précédentes sont oxydés pour former de l'acétate et du CO<sub>2</sub>. Ces réactions, endergoniques, sont réalisées grâce la consommation de l'hydrogène par des microorganismes syntrophes (homoacétogènes, méthanogènes, bactéries sulfato- et nitrato-réductrices). L'acétate, l'hydrogène et le CO<sub>2</sub> sont ensuite transformés en méthane par des archées (Latrille *et al.*, 2011 ; Trably *et al.*, 2018).

#### 2.1.1.2 Ecosystèmes microbiens de la fermentation obscure

Elsharnouby *et al.* (2013) ont compulsé les résultats de 195 études évaluant le potentiel de production d'hydrogène de différentes souches en culture pure. Les espèces productrices d'hydrogène incluent des bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives. Elles sont mésophiles ou thermophiles et se développent à pH neutres ou acides. Les organismes étudiés appartiennent majoritairement aux *phyla Firmicutes* (*Caldocellulosiruptor saccharolyticus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Ethanoligenens harbinense*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobacterium saccharobutylicum*) et *Proteobacteria* (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*) et *Thermotagae* (*Thermotaga neapolitana*). Les rendements de production d'hydrogène sont variables selon les conditions de culture, mais plusieurs études font état de rendements supérieurs à 3,5 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>hexose</sub>, en utilisant des souches de *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* et de *Thermotaga neapolitana*. Pour les *Firmicutes*, les rendements varient généralement entre 1,5 et 2,8 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>hexose</sub>.

D'autres espèces, productrices ou non d'hydrogène, ont une action synergique avec les principaux producteurs d'hydrogène. Les bactéries anaérobies facultatives (*Enterobacter sp.*) épuisent l'O<sub>2</sub> du milieu réactionnel et favorisant le développement des anaérobies stricts (*Clostridium sp.*). Certaines bactéries anaérobies hydrolytiques (*Bacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Ruminococcus sp.*) produisent des enzymes extracellulaires dégradant la biomasse. D'autres espèces favorisent l'agrégation cellulaire (*Streptococcus sp.*, *Ethanoligenens sp.*) (Cabrol *et al.*, 2017).

Afin de maximiser les performances de production d'hydrogène, des co-cultures de deux ou trois souches ayant une action synergique peuvent être mises en œuvre, généralement de forts

producteurs strictement anaérobies avec des bactéries ayant diverses fonctions auxiliaires (Elsharnouby *et al.*, 2013).

Cependant, une part importante des tests de fermentation obscure met en œuvre des cultures mixtes, c'est-à-dire une culture bactérienne dont la composition initiale ou en cours de fermentation n'est pas forcément connue et évolue selon la pression de sélection exercée par les conditions de fermentation (Cabrol *et al.*, 2017). L'objectif de ces procédés est de sélectionner les espèces productrices et de limiter le développement de microorganismes compétiteurs ou consommateurs d'hydrogène. Ainsi, alors que l'*inoculum* initial contient une diversité importante d'espèces bactériennes, la diversité diminue au cours de la fermentation (Jung *et al.*, 2011). Les consortia bactériens de 20 différents réacteurs de laboratoire ont été comparés par Etchebehere *et al.* (2016), montrant que les *inocula*, les réacteurs et le substrat jouent un rôle sur la composition du *consortium*. Le *phylum Firmicutes* prédomine dans la plupart des échantillons, cependant le *phylum Thermotogae* ou *Proteobacteria* étaient parfois majoritaires. Trois groupes physiologiques ont été détectés : des producteurs d'hydrogène (*Clostridium*, *Kosmotoga*, *Enterobacter*), les fermenteurs avec des rendements faibles en hydrogène (essentiellement *Veillonellaceae*) et des compétiteurs (*Lactobacillus*).

Les bactéries productrices d'acide lactique sont les principaux compétiteurs détectés dans les bioréacteurs ; elles diminuent la production d'hydrogène via la compétition pour le substrat et l'inhibition causée par la production des quantités d'acide lactique, par de faibles pH et par la production de peptides antimicrobiens (bactériocines) (Noike *et al.*, 2002).

Les archées méthanogènes et des bactéries sulfato- et nitrato-réductrices consomment l'hydrogène produit par fermentation et leur présence doit être évitée.

*Les modes de mise en œuvre et de contrôle de la biomasse bactérienne seront détaillés paragraphe 3. Deux propriétés des bactéries exploitées par certaines études de mise en œuvre de la fermentation obscure sont présentées : la sporulation et la formation de biofilm.*

## 2.1.2 Propriétés utiles pour la fermentation obscure : sporulation et organisation en biofilm

### 2.1.2.1 Sporulation

En période de croissance, les cellules bactériennes se divisent et se multiplient, produisant des acides, du CO<sub>2</sub> et de l'hydrogène. En réponse à des signaux encore peu connus, le métabolisme cellulaire est modifié et il y a formation d'endospores, formes dormantes résistantes à des conditions environnementales extrêmes. Par la suite, les endospores germent pour former de nouvelles cellules végétatives (figure 11) (Cabrol *et al.*, 2017).

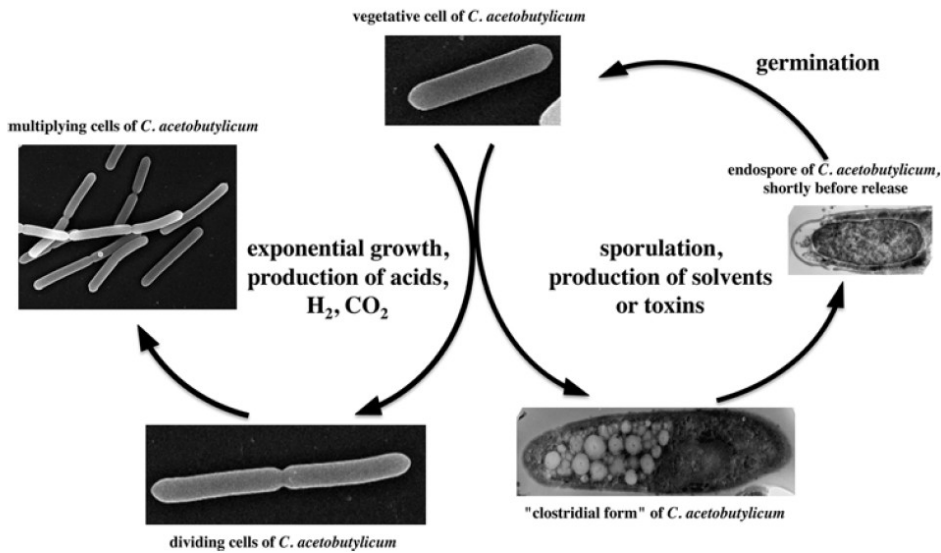


Figure 11 : Exemple de cycle de sporulation : *Clostridium acetobutylicum* (Dürre, 2014)

Cette propriété est utilisée pour éliminer les espèces méthanogènes et lactiques non sporulantes par divers prétraitements, notamment thermiques (cf §3.2.1.2).

### 2.1.2.2 Organisation sous forme de biofilm

Un biofilm est une structure complexe, organisée et auto régénérée de cellules microbiennes agglomérées dans une matrice de polymères extracellulaires, qu'elles produisent elles-mêmes. Un biofilm peut être immobilisé sur un support ou sous forme de floes et agrégats (Madigan *et al.*, 2012). La figure 12 présente les différentes étapes de formation d'un biofilm. La première étape est l'adhésion bactérienne initiale à un support. Cette adhésion peut être réversible ou irréversible. Ensuite, les bactéries se multiplient et sont enchâssées dans la matrice qu'elles synthétisent, le biofilm vieillit et sa structure change. Les biofilms bactériens sont largement répandus et jouent des rôles importants dans de nombreux environnements (Pantaléon *et al.*, 2014 ; Madigan *et al.*, 2012).

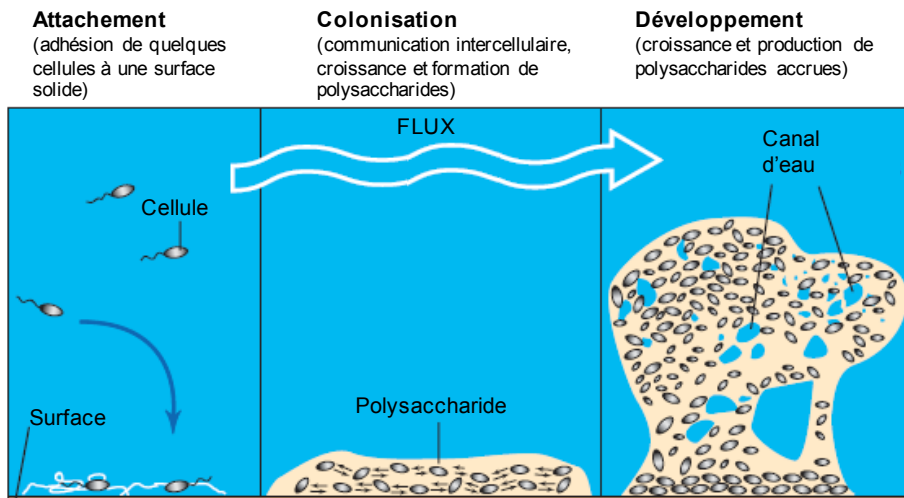


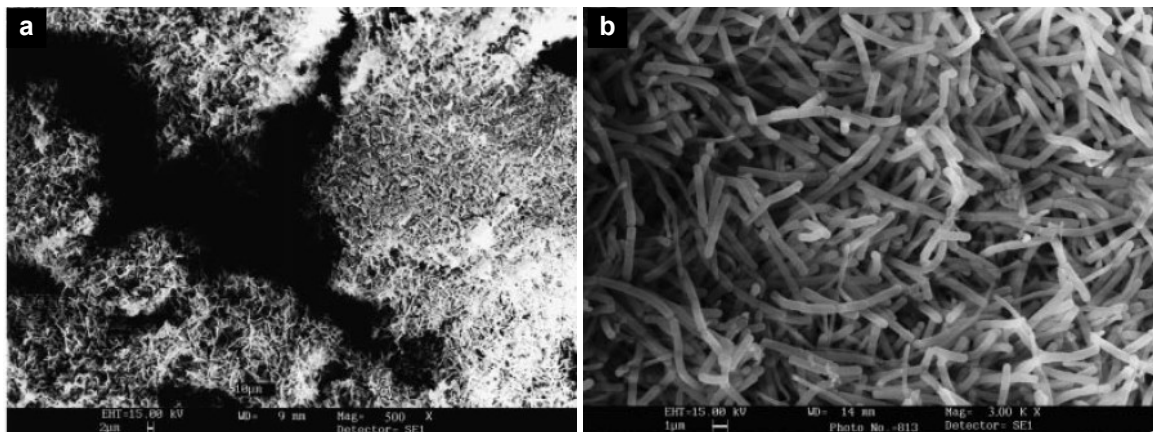
Figure 12 : Formation d'un biofilm (Madigan *et al.*, 2012)



Les microorganismes se développant dans des biofilms bénéficient d'une coopération métabolique, d'une spécialisation, ainsi que d'un niveau élevé d'organisation structurale entre les cellules voisines, et sont en général moins sensibles à des substances toxiques et/ou produits de leur métabolisme (Halan *et al.*, 2012).

Plusieurs paramètres peuvent affecter la formation de biofilms : la nature et la forme du support, la disponibilité en substrat, les conditions hydrodynamiques (Barca *et al.*, 2015). Les principaux facteurs gouvernant l'adhésion des cellules à un support incluent : la charge de surface de la cellule, la nature ionique de la matrice, des forces électrostatiques type Van der Waals, les interactions ioniques, hydrophiles et hydrophobes (Kumar *et al.*, 2016).

En l'absence d'une surface solide et sous certaines conditions, les cellules microbiennes peuvent adhérer les unes aux autres et former de larges et denses particules de biofilm autosupportées (granules) (Zhang *et al.*, 2007) (figure 13).



**Figure 13 : Micrographies MEB de la structure poreuse de bioparticules productrices d'hydrogène (a) et morphologie bactérienne de la surface (b) (adapté de Zhang et al., 2007)**

*Ainsi, plusieurs éléments caractéristiques des écosystèmes microbiens peuvent être exploités pour la mise en œuvre du procédé de fermentation obscure. Nous avons relevé que les bactéries productrices d'hydrogène incluent des anaérobies sporulants (*Clostridium sp.*), producteurs « conventionnels » majoritaires, des anaérobies facultatifs non sporulants, producteurs auxiliaires. La sporulation et la formation de biofilms sont deux propriétés utiles. Les écosystèmes sont riches en interactions, à la fois positives (épuisement de l'oxygène, régulation du pH, hydrolyse du substrat, agrégation cellulaire) et négatives (présence d'organismes consommant l'hydrogène, compétition et inhibition).*

## 2.2 Métabolisme énergétique, fermentations et production d'hydrogène

Deux grands processus antagonistes caractérisent le métabolisme cellulaire chez les microorganismes assimilant de l'énergie de substrats organiques (chimioorganotrophes) : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme est un ensemble de réactions d'oxydoréduction dégradant la matière organique pour produire de l'énergie chimique directement utilisable pour le

fonctionnement des processus anaboliques de biosynthèse de matériel cellulaire (Madigan *et al.*, 2012). La production bactérienne d'hydrogène a lieu au cours du catabolisme oxydatif cellulaire (Hallenbeck et Benemann, 2002).

## 2.2.1 Molécules clés du catabolisme oxydatif en lien avec la formation d'hydrogène

### 2.2.1.1 Les transporteurs d'électrons (Jones et Wood, 1986 ; Madigan *et al.*, 2012).

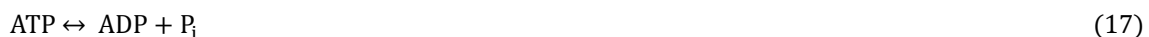
Les réactions métaboliques d'oxydoréduction entre des donneurs et des accepteurs d'électrons chimiquement différents sont réalisées par l'intermédiaire de diverses molécules, dont le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), son homologue pourvu d'un groupement phosphate supplémentaire (NADP), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la ferrédoxine (Fd), la rubrédoxine, etc. La ferrédoxine est une protéine de faible poids moléculaire ayant un noyau Fe-S qui peut donner et accepter des électrons à un très faible potentiel (-410 mV). Présent en quantité limitée car constamment recyclé, le couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est utilisé dans les réactions du catabolisme et le couple  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  est utilisé dans les réactions de biosynthèse.

Ces éléments fournissent des électrons pour l'oxydation des composés organiques, ils sont donc réduits. Leur réoxydation et l'élimination de l'excès d'électrons est essentielle pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. La cellule a la capacité d'utiliser différents accepteurs finaux d'électrons. Lorsqu'il est disponible, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons préférentiel des bactéries aérobies et anaérobies facultatives. En condition anaérobies, ces dernières et les anaérobies stricts peuvent utiliser différents accepteurs finaux organiques ou inorganiques, dont l'hydrogène ( $\text{H}^+$ ).

*Ainsi, la formation d'hydrogène moléculaire ( $\text{H}_2$ ) est liée au mode de réoxydation des transporteurs d'électrons réduits dans des conditions anaérobies.*

### 2.2.1.2 Les composés à haut potentiel énergétique (Madigan *et al.*, 2012).

L'énergie libérée lors des réactions d'oxydoréduction du catabolisme est stockée via la formation de composés phosphorylés dits à haut potentiel d'hydrolyse, le principal étant l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) (17). L'hydrolyse de l'ATP est une réaction très exergonique, permettant la réalisation de réactions thermodynamiquement défavorables par couplage chimique. C'est la « monnaie » énergétique de la cellule.



Par voie fermentaire, l'ATP est produit par phosphorylation au niveau du substrat, c'est-à-dire par couplage à l'oxydation d'un composé organique. L'absence d'oxygène limitant les transferts d'électrons, l'oxydation du substrat est incomplète, fournissant une quantité d'ATP inférieure à celle obtenue par voie respiratoire, mais rapide et sans besoin d'oxygène. Les cellules peuvent également utiliser l'énergie libre disponible via l'hydrolyse de dérivés du coenzyme A (dont l'acétyl-coenzyme A ou acétyl-CoA). Ces molécules contiennent des liaisons thioesters dont

l'hydrolyse fournit suffisamment d'énergie pour la formation d'ATP. Ces dérivés jouent un rôle majeur de carrefours métaboliques chez les organismes fermentaires.

*Les réactions d'oxydoréduction du catabolisme oxydatif aboutissent à la formation de composés essentiels pour la production d'énergie cellulaire, avec parfois une coproduction d'hydrogène.*

## 2.2.2 Assimilation de substrats carbonés

### 2.2.2.1 Voies d'assimilation

Les bactéries chimioorganotrophes sont généralement capables de métaboliser divers composés organiques (glucides, protéines, lipides, acides gras volatils (AGV), *etc.*), dont l'assimilation peut être divisée en deux niveaux : central et périphérique.

Les étapes périphériques transforment les différents substrats en intermédiaires phosphorylés, qui peuvent être canalisés à différents niveaux des chaînes de réactions des voies centrales (Plumbridge, 2014). Des réactions de transamination/désamination des protéines sont réalisées pour séparer le groupement alpha-aminé du squelette carboné, qui entre dans la voie de la glycolyse. Selon la réaction de Stickland, deux acides aminés, l'un accepteur et l'autre donneur d'un atome de carbone, sont simultanément dégradés pour former du CO<sub>2</sub>, de l'ammonium et des AGV (Reitzer, 2005). Pour les lipides, les acides gras à longues chaînes sont dégradés en acides gras plus courts et en hydrogène au cours de l'hélice de Lynen (Clark et Cronan, 2005). D'autres substrats (acétate, éthanol, lactate, *etc.*) peuvent être assimilés par les bactéries (Madigan *et al.*, 2012).

L'assimilation d'un composé organique donné nécessite la mise en œuvre de transporteurs spécifiques de ce substrat dans la cellule et des enzymes permettant son insertion dans les voies centrales, dont la synthèse est modulée par des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Il existe ainsi une hiérarchie, pour l'utilisation des différentes sources de carbone (Tangney et Mitchell, 2007 ; Mitchell, 2016). Le glucose est le substrat préférentiel de nombreuses espèces bactériennes, sa présence limitant l'utilisation des autres sucres (répression catabolique) (Plumbridge, 2014 ; Deutscher *et al.*, 2008). Par exemple, *Clostridium acetobutylicum* est capable d'utiliser des substrats variés (glucose, fructose, xylose, arabinose) mais la présence de glucose est défavorable à la consommation efficace du xylose (Mitchell, 2016). De plus, l'excès de certains produits intermédiaires et finaux inhibe l'assimilation des substrats carbonés (Plumbridge, 2014).

*Ainsi, les bactéries ont la capacité de métaboliser divers substrats carbonés.*

### 2.2.2.2 La glycolyse : exemple du glucose

Les voies centrales d'assimilation sont les trois voies interconnectées de la glycolyse (figure 14): la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie d'Entner-Doudoroff (ED) et

la voie des pentoses phosphates (PP), dont les bilans respectifs de réaction à partir du glucose sont présentés équations 18, 19 et 20. Ces réactions génèrent de l'énergie (ATP), du pouvoir réducteur (NADH et NADPH), du pyruvate et, de façon directe ou indirecte, des précurseurs pour toutes les réactions de biosynthèse (Plumbridge, 2014). Leur importance relative varie selon les microorganismes (Akinterinwa et Cirino, 2010).

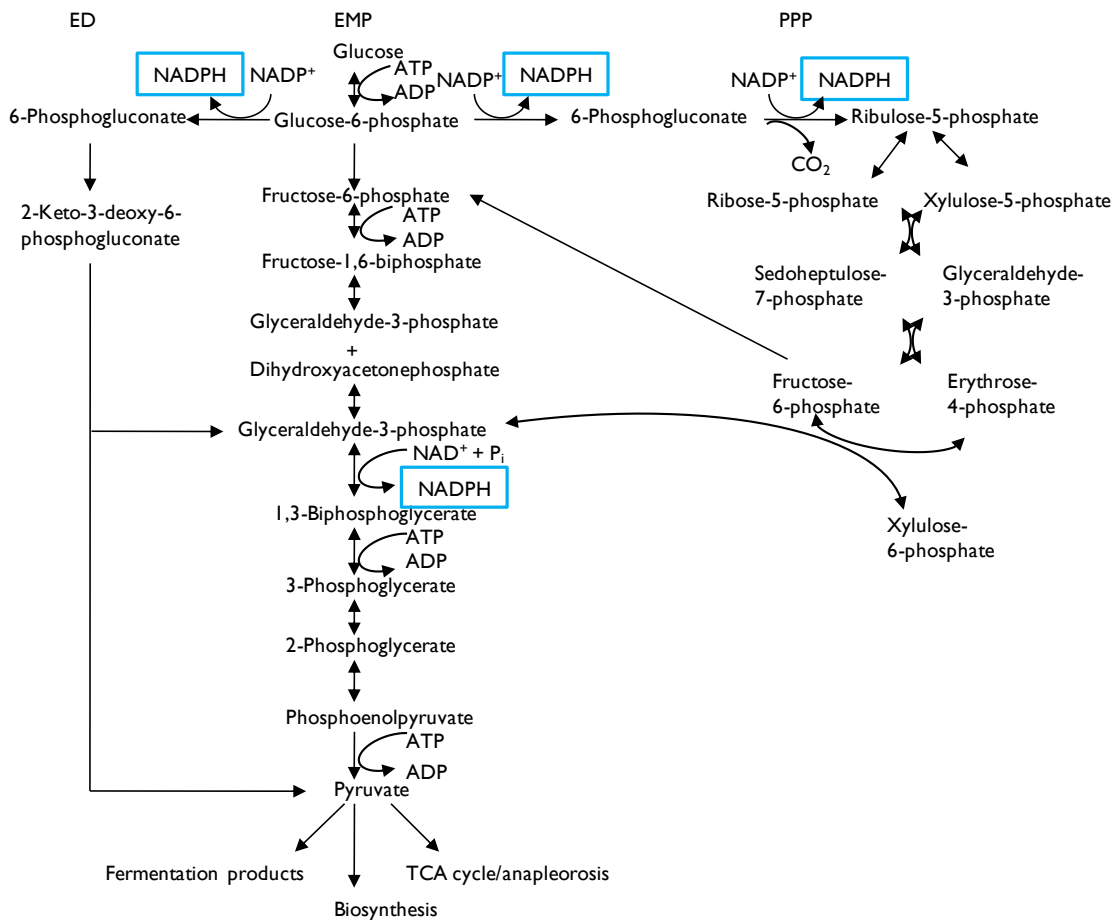


Figure 14 : Voies de la glycolyse et génération de transporteurs d'électrons réduits (adapté de Akinterinwa et Cirino, 2010)

*Le pyruvate est une molécule carrefour consommée au cours de voies respiratoires ou fermentaires. Son destin métabolique, fortement dépendant des conditions de croissance bactérienne et de la présence ou non d'oxygène, conditionne le rendement de production d'hydrogène.*

2.2.3 Métabolisme anaérobie du pyruvate et formation d'hydrogène

La fermentation cellulaire ne requiert aucun accepteur externe d'électrons. La réduction de métabolites internes (pyruvate et acétyl-CoA) permet la régénération du NADH en NAD<sup>+</sup>, indispensable à la poursuite de la glycolyse, et l'excès d'électrons est éliminé via la sécrétion d'acides et d'alcools réduits. Ces réactions sont parfois associées à une production supplémentaire d'ATP et à la réduction de deux protons, formant de l'hydrogène moléculaire excrété du compartiment cellulaire (Akinterinwa et Cirino, 2010). La figure 15 propose un schéma général simplifié des principales voies métaboliques de consommation du pyruvate pouvant avoir lieu dans un bioréacteur de fermentation obscure. Pour simplifier, seules les formes réduites des transporteurs d'électrons sont indiquées.

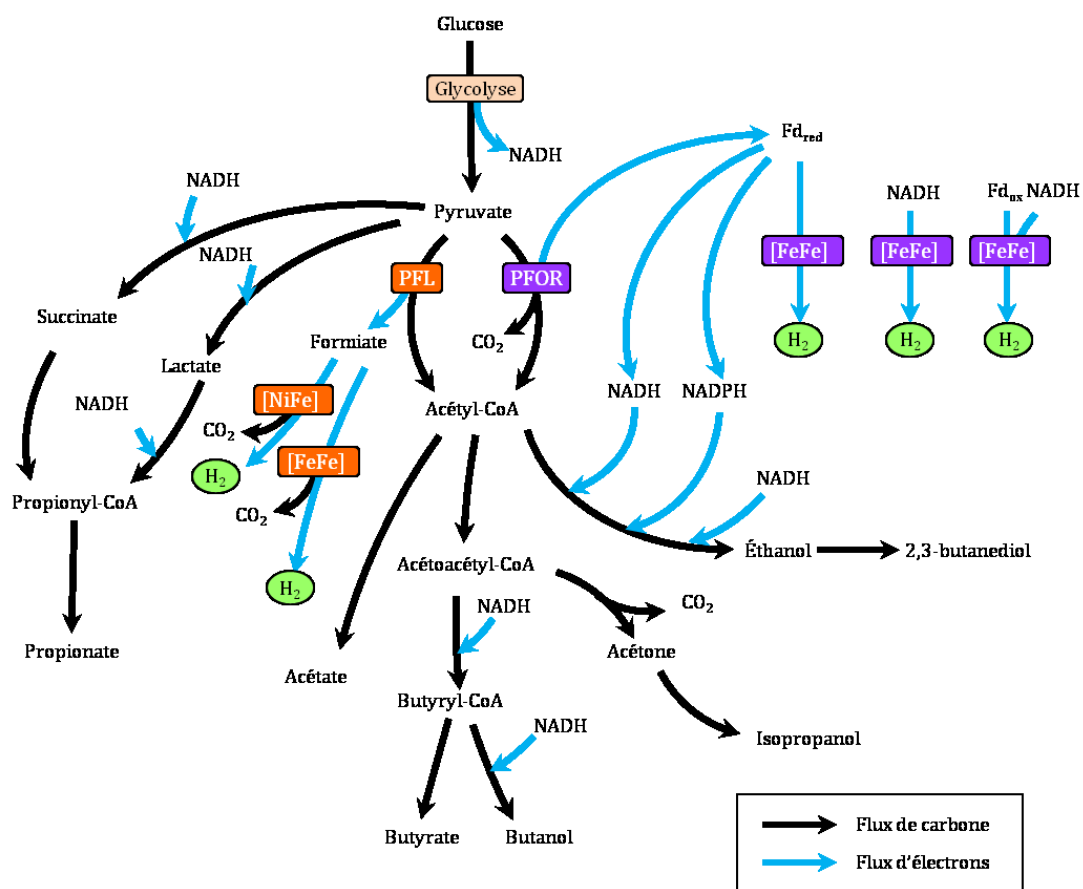
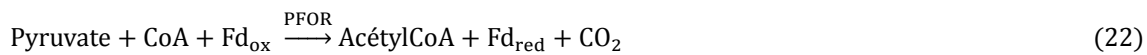


Figure 15 : Flux de carbone, flux d'électrons et génération d'hydrogène (adapté de Lo *et al.*, 2017 ; Cabrol *et al.*, 2017)

En conditions anaérobies, la conversion du pyruvate peut être catalysée par divers groupes enzymatiques. La formation d'hydrogène a lieu lorsque le pyruvate est converti en acétyl-CoA, via la pyruvate formiate lyase (PFL) (21) ou via la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) (22). En présence d'O<sub>2</sub>, la PFOR est inhibée et la PFL est inactivée parce que d'autres voies de consommation du pyruvate sont mises en œuvre (complexe pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PDHc)) (Akinterinwa et Cirino, 2010).

La voie de consommation du pyruvate dépend de l'équipement enzymatique des microorganismes. La PFOR et la PFL sont présents chez plusieurs *Clostridium sp.*, la PFOR, la PFL et le PDHC chez plusieurs *Enterobacter sp.* et *Enterococcus sp.* La PFOR seule est présente chez *Thermotoga sp.*, *Thermoanaerobacterium sp.*, *Calducellulosiruptor sp.*. La diversité est plus importante chez *Lactobacillus sp.* (KEGG, 2018).

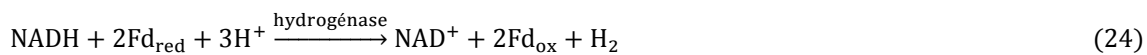


Plusieurs voies d'oxydation du formiate de  $\text{Fd}_{\text{red}}$  et du NADH issu de la glycolyse sont couplées à la réduction de deux  $\text{H}^+$  en  $\text{H}_2$  (Hallenbeck et Benemann, 2002 ; Kim *et al.*, 2011).

(i) L'oxydation de  $\text{Fd}_{\text{red}}$  couplée à la réduction de  $\text{H}^+$  et la formation de  $\text{H}_2$  (23) intervient lors de la production d'acétate ou de butyrate et aboutit à la formation de  $2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ .



(ii) L'oxydation du NADH généré lors de la glycolyse couplée à l'oxydation de  $\text{Fd}_{\text{red}}$  libère deux  $\text{H}^+$ , réduits en  $\text{H}_2$  par une oxydoréductase (24). Comme deux NADH sont générés lors de l'oxydation d'une mole de glucose, le rendement maximal de formation d'hydrogène selon cette voie est de  $2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$



Ainsi, l'ensemble des voies de production utilisant des molécules de NADH générées lors de la glycolyse entrent en concurrence avec la production d'hydrogène. La production d'éthanol et de lactate consomme les deux molécules de NADH générées à partir du pyruvate, ce qui ne permet aucune coproduction d'hydrogène. La voie de formation du propionate et du succinate nécessite plus de NADH qu'elles n'en génèrent, diminuant directement le « pool » de NADH mobilisable pour la formation d'hydrogène. Seule la voie acétate ne consomme pas de NADH et permet ainsi de générer  $2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ . Cependant, l'acétate n'est jamais produit seul en cultures mixtes.

(iii) Deux pyruvates sont convertis en une molécule d'acétylCoA et une molécule de formiate par la PFL. L'oxydation du formiate aboutit à la formation d'hydrogène (25).



*Ainsi, les voies de formation d'hydrogène sont multiples et dépendent de la nature des populations bactériennes, ainsi que des conditions de fermentation.*

### 2.2.4 Mécanismes limitant la formation d'hydrogène

La régulation du métabolisme du genre *Clostridium*, notamment de *Clostridium acetobutylicum*, a été très étudié en raison de son intérêt technologique pour la production de bioéthanol, afin d'améliorer la solvantogénèse et minimiser les voies acidogènes, objectif inverse du but recherché des tests de fermentation obscure. La fermentation génère peu d'énergie et l'assimilation du carbone contenu dans la biomasse est faible. De l'ATP supplémentaire est parfois produit au cours des voies de formation d'acétate et de butyrate (Akinterinwa et Cirino, 2010). Chez *Clostridium*, la synthèse des hydrogénases est liée aux besoins énergétiques importants sous forme d'ATP des cellules en phase de croissance, la formation d'acétate et de butyrate n'utilisant pas la totalité du pouvoir réducteur généré lors de la glycolyse. La synthèse d'hydrogène permet alors d'éliminer rapidement cet excès d'électrons. En phase stationnaire, les besoins en ATP sont moins importants et une baisse de la production d'acétate et de butyrate, donc d'hydrogène, est observée. Le métabolisme est réorienté vers la formation de solvants, plus réduits que les AGV, permettant d'éliminer l'excès d'électrons sans formation d'hydrogène (Jones et Wood, 1986). L'augmentation de la pression partielle en hydrogène et de la teneur en acides gras volatils sous forme indissociée conditionne également cette transition métabolique (figure 16) (Elbeshbishy *et al.*, 2017).

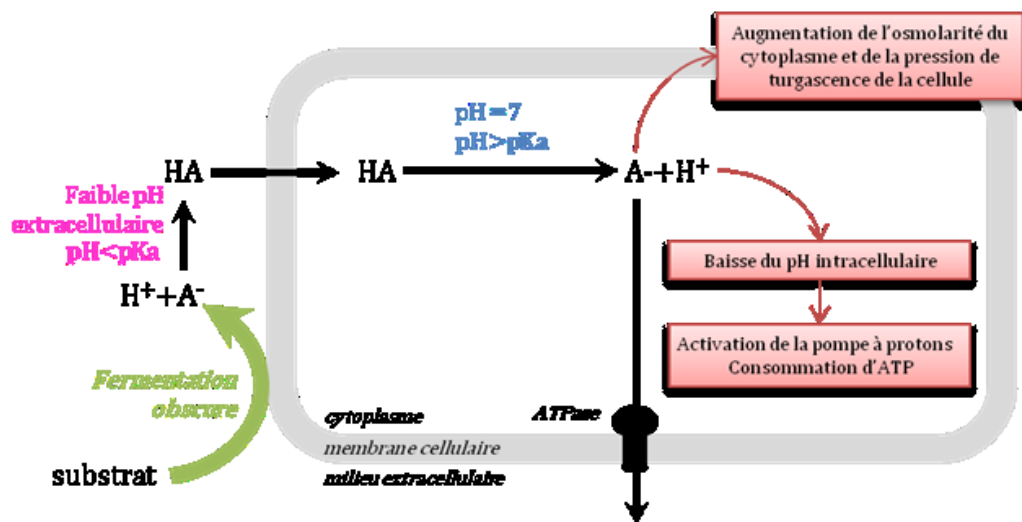


Figure 16 : Effet du pH et des acides gras sur les cellules bactériennes (adapté de Elbeshbishy *et al.*, 2017)

### 2.2.5 Bilans stœchiométriques des voies de consommation du glucose

La stœchiométrie de la conversion d'un substrat en acides, solvants, gaz, *etc.* peut seulement être déterminée avec une quantification exacte de la quantité de substrat utilisée et des produits formés. Lors des tests de fermentation obscure, les distributions des produits solubles majoritaires donnent une idée des voies prédominantes empruntées favorables ou non à la production d'hydrogène ou des voies diminuant le potentiel de formation d'hydrogène moléculaire (pouvant être perçues comme une consommation d'hydrogène). Les réactions liées à la production d'hydrogène sont présentées, de façon non exhaustive, dans le tableau 4.

Tableau 4 : Réactions principales du métabolisme microbien lié à la production d'hydrogène

Réactions		$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)
<i>Réactions formatrices d'hydrogène</i>		
Voie « acétate »	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	-215
Voie « butyrate »	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	-264
Voie « acétate + éthanol »	$C_6H_{12}O_6 + 3H_2O \rightarrow CH_3COOH + CH_3CH_2OH + 2H_2 + 2CO_2$	-225
Voie « acétate + butyrate »	$4C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 3CH_3(CH_2)_2COOH + 2CH_3COOH + 8CO_2 + 10H_2$	-252
<i>Réactions concurrentes à la formation d'hydrogène</i>		
Voie homolactique	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOCOOH$	-117
Voie hétérolactique « lactate + éthanol »	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOCOOH + CH_3CH_2OH$	-216
Voie hétérolactique « lactate + acétate »	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOCOOH + CH_3COOH$	-359
Voie éthanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2$	-235
<i>Réactions « consommatrices d'hydrogène »</i>		
Voie propionate	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	-359
Homoacétogénèse	$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$	-94
Sulfato-réduction	$4H_2 + SO_4^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_4S + 4H_2O$	-152
Méthanisation/Méthanation	$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-136

NB : Pour simplifier l'écriture des équations, les bilans sont réalisés avec les formes acides des métabolites.

Afin d'évaluer l'efficacité d'un test de fermentation, il serait utile qu'un rendement théorique maximum soit établi. Cependant, il apparaît difficile d'établir une valeur absolue de rendement théorique maximal en cultures mixtes. En effet, la nature branchée des voies impliquées et les différences d'équipement enzymatiques des espèces bactériennes impliquées dans la fermentation obscure conduisent à différentes aptitudes à dégrader les substrats.

Si la fermentation pouvait être mise en œuvre avec la seule production d'acétate, le rendement en hydrogène serait de  $4 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ , ce qui est considéré dans de nombreux travaux comme le rendement maximal de production théorique *in vivo*. Le rendement en hydrogène s'élève à  $2 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  dans l'hypothèse où seul du butyrate est produit. Selon Hawkes *et al.* (2007), comme la production d'acétate est systématiquement accompagnée de butyrate, le rendement maximal de production est inférieur. Les auteurs donnent l'exemple de formation de  $2,5 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  selon des travaux expérimentaux avec des cultures mixtes, selon la voie mixte acétate + butyrate. La production mixte d'acétate et d'éthanol donne lieu à la formation de  $2 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ .

L'action de bactéries lactiques peut donner lieu à la formation de lactate seul (fermentation homolactique) ou accompagnée d'éthanol ou d'acétate (fermentation hétérolactique), consommant le substrat sans production d'hydrogène. La voie éthanol seule ne donne pas lieu à la formation d'hydrogène. La fermentation propionique est dite consommatrice d'hydrogène, dans le sens où elle consomme plus de NADH qu'elle n'en produit.



Dans des écosystèmes naturels, les microorganismes ayant la capacité d'éliminer leur excès d'électrons via la formation d'hydrogène ont une relation symbiotique avec d'autres microorganismes utilisant l'hydrogène comme substrat, raison de plus de maintenir une pression partielle en hydrogène faible. La réaction d'homoacétogenèse aboutit à la formation d'acétate et est réalisée par *Clostridium acetivum*, *Clostridium thermoaceticum* notamment. Les archées méthanogènes consomment l'hydrogène pour produire du méthane. La sulfato-réduction est quant à elle conditionnée par la présence d'ions sulfate dans le milieu réactionnel de départ (Trably *et al.*, 2018).

*L'efficacité de la production d'hydrogène dépend donc de l'émergence de populations aptes à produire de l'hydrogène et de l'orientation de leur métabolisme, dont les facteurs d'influence sont nombreux et interconnectés. Le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène est essentiel. Le paragraphe suivant vise à exposer les modalités de mise en œuvre du procédé de fermentation obscure.*

### 3 Conduite des procédés de fermentation obscure et voies d'intensification des performances de production d'hydrogène

Après avoir défini les critères de performances du procédé, un état des lieux des paramètres de sa mise en œuvre (*consortium* bactérien, substrat, bioréacteur) et de ses voies d'amélioration sera réalisé.

#### 3.1 Critères de performance du procédé

De manière analogue au procédé de méthanisation (Moletta, 2009), au cours du procédé de production d'hydrogène, seule la fraction biodégradable de la matière organique peut être convertie. Cela ne signifie pas que toute la matière organique soit effectivement transformée en hydrogène, c'est ici qu'intervient la notion de performance des réacteurs de fermentation obscure.

##### 3.1.1 Rendements et production en hydrogène

Le rendement en hydrogène ( $R_{H_2}$ ) est associé aux objectifs souhaités, c'est-à-dire maximiser la production d'hydrogène dans le cas de la fermentation obscure. Les mesures de production de gaz et des différentes fractions de la matière à métaboliser permettent de calculer différents rendements, en comparant l'entrée et la sortie du système en fonction de la matière organique ajoutée ou consommée. La production d'hydrogène  $P_{H_2}$  (molaire, massique ou volumique) peut être rapportée à la quantité de biomasse utilisée. La fraction de la matière considérée varie selon les études. Ainsi, le calcul du rendement en hydrogène  $R_{H_2}$  par rapport à la matière brute permet d'évaluer la potentialité du procédé pour une biomasse donnée.

La comparaison de différentes études ne peut se faire qu'avec un rendement normalisé, du fait de la diversité de la composition (humidité et teneur en substrats métabolisables) des biomasses étudiées. Ainsi,  $R_{H_2}$  est souvent rapporté à la matière sèche ou volatile pour s'affranchir des différences d'humidité d'un même type de biomasse, ou à la quantité de substrat effectivement métabolisé (souvent le glucose (26), ou la DCO de façon plus générale).

$$R_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n_{\text{glucose}}} \quad (26)$$

Le rendement de consommation du substrat ( $C_{\text{glucose}}$ ) renseigne sur la capacité du processus à traiter le substrat. Un exemple est donné pour le glucose (27) où  $m_{\text{glucose},e}$  est la masse de glucose entrant dans le système et  $m_{\text{glucose},s}$  est la masse de glucose sortant du système.

$$C_{\text{glucose}} = \frac{m_{\text{glucose},e} - m_{\text{glucose},s}}{m_{\text{glucose},e}} \times 100 \quad (27)$$

$R_{H_2}$  peut également être rapporté au volume de travail du réacteur ( $V_T$  en L) (28)

$$R_{H_2} = \frac{V_{H_2}}{V_T} \quad (28)$$

### 3.1.2 Productivité

La vitesse spécifique de production de l'hydrogène, ou productivité  $P'_{H_2}$  (en mL/L/h ou en L/L/j) renseigne sur la vitesse de production d'hydrogène du procédé (29), où  $Q_{H_2}$  est le débit d'hydrogène mesuré (mL/h).

$$P'_{H_2} = \frac{Q_{H_2}}{V_T} \quad (29)$$

### 3.1.3 Rapport molaire $H_2/CO_2$

Le ratio  $H_2/CO_2$  (30) permet d'estimer l'orientation du métabolisme vers la production d'hydrogène, où  $n_{H_2}$  est le nombre de moles d' $H_2$  et  $n_{CO_2}$  est le nombre de moles de  $CO_2$  produites.

$$H_2/CO_2 = \frac{n_{H_2}}{n_{CO_2}} \quad (30)$$

### 3.1.4 Modélisation selon l'équation de Gompertz modifiée

Le profil sigmoïdal de production cumulée d'hydrogène peut être modélisé avec l'équation de Gompertz modifiée (31). Cette modélisation donne accès au maximum de production cumulée d'hydrogène  $H_{\text{max}}$  ( $L_{H_2}/L_{\text{réacteur}}$ ), à la vitesse maximale de production  $P'_{\text{max}}$  ( $L_{H_2}/L_{\text{réacteur}}/h$ ) et au temps de latence  $\lambda$  (h) normalisés et permet de comparer différentes études (Gibson *et al.*, 1988).

$$H(t) = H_{\text{max}} \cdot e^{-e^{-\frac{P'_{\text{max}}(\lambda-t)}{H_{\text{max}}}} + 1}} \quad (31)$$

## 3.2 La biomasse bactérienne

### 3.2.1.1 Origine et composition du consortium bactérien

Le procédé peut être mis en œuvre en utilisant une culture pure d'une souche bactérienne productrice d'hydrogène seule, ou en co-culture avec une souche hydrolytique (Elsharnouby *et al.*, 2013). Cependant, ce mode de mise en œuvre nécessite de maintenir des conditions stériles, ce qui représente un besoin d'énergie supplémentaire, à moins que la souche d'intérêt puisse se développer et rester majoritaire dans des conditions non stériles. Le mode de fonctionnement le plus commun est celui utilisant des cultures mixtes, par l'incubation de différents microorganismes qui ne sont pas toujours connus, conduite dans des conditions non stériles (Jung *et al.*, 2011).

Concernant l'origine des cultures mixtes, il est difficile d'être exhaustif du fait du très grand nombre d'études publiées. L'origine de l'*inoculum* (boues de STEP, compost ou bactéries indigènes) affecte clairement la composition microbienne de la biomasse, de même que la configuration du réacteur et les paramètres opératoires (*cf.* 3.4.3) (Etchebehere *et al.*, 2016). Les boues de STEP sont utilisées comme *inoculum* dans la majorité des études donnant lieu à une fermentation exogène. Elles sont souvent mises en œuvre après un prétraitement thermique pour favoriser l'émergence d'espèces sporulantes, notamment du genre *Clostridium*.

Cependant, les bactéries anaérobies facultatives ont une sensibilité plus faible à l'oxygène, épuisant ainsi rapidement l'oxygène présent dans le milieu de culture soit durant la mise en régime du procédé ou après une entrée d'oxygène accidentelle. De plus, elles rendent inutiles les prétraitements thermiques qui entraînent une dépense énergétique supplémentaire. Comme attendu, les bactéries anaérobies facultatives sont abondantes lorsque l'origine du substrat et/ou de l'*inoculum* est aérobie, mais elles peuvent également être détectées après des prétraitements drastiques (Cabrol *et al.*, 2017).

### 3.2.1.2 Prétraitement des cultures mixtes

Les cultures mixtes sont constituées d'une grande variété de microorganismes producteurs ou non d'hydrogène ainsi que des archées méthanogènes hydrogénotrophes, et sont généralement prétraitées pour supprimer autant que possible ces derniers, n'ayant pas la capacité de sporuler, avant l'inoculation des réacteurs (Wong *et al.*, 2014).

L'*inoculum*, avant d'être additionné au substrat, est généralement soumis à un prétraitement acide (pH 3 pendant 24 h) et/ou thermique (90-105 °C pendant 10–120 min) visant à éliminer les bactéries consommatrices d'hydrogène non sporulantes (Barca *et al.*, 2015). Kumari et Das (2017) ont comparé différents prétraitements pour l'acclimatation de cultures mixtes acidogènes (choc thermique, acide, alcalin, congélation) pour la production de biohydrogène. Le traitement de choc thermique a permis d'obtenir les meilleures performances de

production d'hydrogène en comparaison avec le test sans prétraitement (+107,7%), suivi par les traitements acide (+42,0%) et alcalin (27,2%). Le traitement de congélation a eu le moins d'impact sur la production, avec un effet légèrement négatif (-29,1%).

### 3.2.1.3 Cas des consortia mixtes endogènes à la biomasse

Dans un environnement naturel, l'hydrogène produit est ensuite consommé pour produire du méthane. Il y a donc potentiellement des bactéries productrices d'hydrogène présentes dans toutes les biomasses. La majorité des tests de fermentation obscure s'est focalisée sur l'ajout d'un *inoculum* producteur d'hydrogène. Peu d'études se sont essayées à ne pas utiliser d'*inoculum* microbien externe mais uniquement la population bactérienne endogène, contenue dans la biomasse.

Néanmoins, la mise en œuvre de procédé de fermentation obscure basé sur l'utilisation d'une biomasse ayant fonction de substrat et d'*inoculum* a plusieurs avantages : stérilisation du substrat non nécessaire, pas de coûts additionnels pour l'ajout d'un *inoculum* dédié, pas de consommation d'énergie pour le prétraitement de l'*inoculum* (Asunis *et al.*, 2019). Ainsi, le procédé serait plus simple et moins coûteux à implémenter.

Diverses biomasses ont été testées en fermentation endogène : fumier de vache (Yokoyama *et al.*, 2007a), lisier de vache (Yokoyama *et al.*, 2007b), déchets de fruits et de légumes (Shimizu *et al.*, 2008 ; Marone *et al.*, 2014), déchets alimentaires d'une cafétéria (Kim *et al.*, 2009), boues d'abattoir de volaille (Sittijunda *et al.*, 2010), biomasses vitivinicoles (François-Lopez, 2016), glycérol et gâteau de décanteur d'huile de palme (Kanchanasuta et Pisutpaisal, 2017), résidus de production de champignons (Lin *et al.*, 2017) et lactosérum de fromage de brebis (Asunis *et al.*, 2019).

La faisabilité de produire de l'hydrogène à partir de déchets alimentaires prétraités à 90°C pendant 20 minutes avec des valeurs de rendement de  $2,1 \pm 0,4 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}} \text{ consommé}$  et de volumes d'hydrogène produit de  $153 \pm 24 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{MS}}$  a été montrée (Kim *et al.*, 2009). La digestion double des boues d'abattoir de volaille a été utilisée pour produire de l'hydrogène par fermentation spontanée sans ajout d'*inoculum* supplémentaire. Les boues (5% de matières sèches) ont été digérées à 55°C par digestion aérobie thermophile avec différents temps de rétention avant d'être utilisées en fermentation anaérobie. Le meilleur temps de digestion était de 48h, car permettant de réprimer complètement l'activité méthanogène et donne le meilleur rendement en hydrogène de  $136,9 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{boues}}$  avec une vitesse de production d'hydrogène de  $2,56 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{h}$ . La production d'hydrogène de boues traitées à 48h ( $136,9 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{boues}}$ ) était 15 fois meilleure que celle de boues non prétraitées ( $8,83 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{boues}}$ ) (Sittijunda *et al.*, 2010).

Différents tests sans prétraitements ont été réalisés. Marone *et al.* (2014) et Shimizu *et al.* (2008) ont étudié la faisabilité d'utiliser des déchets de fruits et/ou de légumes pour produire de l'hydrogène par fermentation endogène sans effectuer de prétraitement thermique ni ajout de

nutriments additionnel. Ils concluent que la fermentation endogène est faisable à partir de ces déchets sans production de méthane et dans les conditions indiquées précédemment mais avec des valeurs faibles de production d'hydrogène : respectivement  $90 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{MS}}$  et  $24 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{matière volatile}}$ . Au laboratoire, les travaux de François-Lopez (2016) ont montré que la production d'hydrogène avec le *consortium* endogène de biomasses vitivinicoles était comparable à la production utilisant un *consortium* exogène (boues de STEP) prétraitées thermiquement et meilleure sans prétraitement thermique du *consortium* bactérien sur des bourbes viticoles avec une production de  $50 \pm 6 \text{ L/L}_{\text{bourbes}}$  et un rendement de  $2,0 \pm 0,2 \text{ mol/mol}$  et marcs :  $20 \pm 4 \text{ L/kg}_{\text{marcs}}$  avec un rendement de  $1,3 \pm 0,3 \text{ mol/mol}$  à  $37^\circ\text{C}$ . Dans l'étude de Lin *et al.* (2017), la production maximale d'hydrogène à partir de déchets de champignons sans *inoculum* est de  $6,84 \text{ mmol}_{\text{H}_2}/\text{L/j}$  à pH 9 et  $60 \text{ g}_{\text{biomasse}}/\text{L}$  en fermentation batch dans des flacons de 125 mL à  $55^\circ\text{C}$ . La fermentation de fumier et de lisier de vache a produit de l'hydrogène (respectivement  $743 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{fumier}}$  et  $392 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{purin}}$ ) à une température optimale de  $60^\circ\text{C}$ , avec une coproduction de butyrate et d'acétate pour le fumier et majoritairement d'acétate pour le lisier. Une bactérie similaire à *Clostridium cellulosi* a été détectée par analyse biomoléculaire lors de la fermentation de fumier. Des bactéries productrices d'hydrogène mésophiles et thermophiles ont été détectées lors de la fermentation de lisier: *Clostridium thermocellum* et *Caldanaerobacter subterraneus*. Un gâteau de décanteur d'une chaîne de production d'huile de palme a été testé (2% solides totaux) en co-culture avec du glycérol à pH initial de 7 et à  $27^\circ\text{C}$ , en comparaison avec l'ajout de boues anaérobies (Kanchanasuta et Pisutpaisal, 2017). Les auteurs concluent que les types d'*inocula* ont un fort effet sur les compositions du biogaz produit et sur l'utilisation du glycérol avec la prédominance de méthane et l'absence d'hydrogène lors de la fermentation de glycérol avec les boues alors que la production d'hydrogène a été détectée de façon prédominante dans la fermentation combinée avec le gâteau de décantation. Des tests de fermentation en réacteur batch ont été réalisés sur du lactosérum de fromage de brebis sans ajout d'*inoculum*. Deux phases sont observées : conversion initiale de carbohydrates en acide lactique suivi par la dégradation de l'acide lactique en acétate, butyrate, hydrogène et propionate. La production maximale obtenue est de  $5,2 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}$  (Asunis *et al.*, 2019)

*Le prétraitement de l'inoculum mixte a généralement un effet positif pour la production d'hydrogène. Cependant, afin de limiter le coût énergétique du procédé, tester l'utilisation de cultures mixtes endogènes à la biomasse sans prétraitement est pertinent.*

### 3.3 Le substrat de fermentation

La composition du substrat conditionne la croissance bactérienne et le métabolisme cellulaire, donc la production d'hydrogène. Des macronutriments (C, N, P) et des micronutriments sont requis en quantités respectivement importantes et faibles (Madigan *et al.*, 2012).

### 3.3.1 Effet de la composition des substrats sur les performances de production d'hydrogène

Les substrats testés pour le procédé de fermentation obscure sont de natures très diverses : déchets alimentaires, boues de STEP, déchets municipaux, paille (riz, blé, *etc.*), fumier, *etc.* (Ghimire *et al.*, 2015). La composition du substrat impacte les performances du procédé de production d'hydrogène (Jung *et al.*, 2011).

#### 3.3.1.1 Macronutriments

L'émergence de populations bactériennes productrices d'hydrogène est dépendante de la richesse en monomères fermentescibles du milieu réactionnel, seule la fraction soluble et facilement dégradable en carbohydrates pourrait être convertie en biohydrogène dans un bioréacteur de fermentation obscure (Guo *et al.*, 2014). En effet, les propriétés structurelles des biomasses lignocellulosiques (crystallinité de la cellulose, protection par la lignine, caractère hétérogène des particules de biomasse et enlacement de cellulose et hémicellulose) limitent l'utilisation microbienne des carbohydrates au cours des procédés de fermentation (Mosier *et al.*, 2005). Il a été observé qu'un degré de polymérisation élevé des glucides favorise la spécialisation des communautés bactériennes pour l'hydrolyse, au détriment de la production d'hydrogène (Quémeneur *et al.*, 2011). L'ajout d'une étape de prétraitement visant à hydrolyser les macromolécules glucidiques des biomasses pauvres en substrat facilement métabolisable est très étudiée (Kumar *et al.*, 2017) (*cf* 3.2.2).

La nature et la concentration des monomères glucidiques influence l'orientation des voies métaboliques. Notamment, Chatellard *et al.* (2016) ont observé une production d'hydrogène supérieure en utilisant des pentoses comme substrat, en comparaison avec des hexoses. Park *et al.* (2018a) rapportent un effet négatif de faibles concentrations en glucose, permettant à des bactéries lactiques de prendre le pas sur les bactéries productrices d'hydrogène.

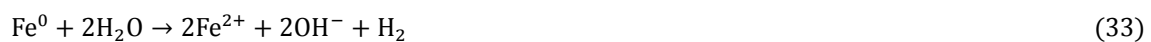
La concentration d'azote ammoniacal a également un effet sur l'activité bactérienne. Une concentration en azote trop élevée peut interférer avec le pH intracellulaire, augmenter la quantité d'énergie requise pour la maintenance des cellules microbiennes et inhiber les activités des enzymes liées à la production d'hydrogène. Néanmoins, la fermentation obscure a lieu à pH acide, où la majorité de l'ammoniac est présent sous forme ionisée ( $\text{NH}_4^+$ ), qui est moins toxique (Elbeshbishy *et al.*, 2017). L'étude de Hamilton *et al.* (2018) montre que la concentration d'azote a un effet sur l'expression des hydrogénases et donc sur le métabolisme de *Clostridium butyricum*. L'optimum du ratio C/N varie de 5 à 200 selon les conditions opératoires de température et de pH et selon *inoculum* et le substrat sélectionnés (Elbeshbishy *et al.*, 2017).

#### 3.3.1.2 Micronutriments

Plusieurs ions métalliques peuvent stimuler la croissance cellulaire, l'activité des cofacteurs enzymatiques et d'autres processus métaboliques en accélérant le transfert intracellulaire

d'électrons et facilitant la formation d'enzymes (Madigan *et al.*, 2012) ; notamment les ions fer et nickel, essentiels pour la biosynthèse des sites actifs des hydrogénases et des ferrédoxines (Adams, 1990).

Yang et Wang (2018) ont recensé 25 études portant sur l'effet de l'ajout dosé de fer sous forme de sels dans le milieu réactionnel. Des augmentations de  $P_{H_2}$  de 7 à 152% et de  $R_{H_2}$  de 17 à 161% sont observées. Cependant, la majorité de ces études a été réalisée en utilisant un substrat glucidique modèle, ce qui peut expliquer l'effet aussi marqué de l'ajout de fer. Une étude réalisée à partir de déchets alimentaires ne rapporte qu'une augmentation de la production de 7,1%, après optimisation de la quantité de fer ajoutée (Lay *et al.*, 2005). Taherdanak *et al.* (2016) rapportent que l'ajout de nanoparticules de fer zéro-valent ( $Fe^0$ ) diminue la quantité d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel (32), améliorant potentiellement les performances des hydrogénases sensible à l'oxygène. Bien que cette réaction soit également catalysée par des bactéries anaérobies facultatives, la voie chimique est plus rapide. De plus, après consommation de l'oxygène dissous, les nanoparticules  $Fe^0$  sont converties en ions  $Fe^{2+}$ , ce qui est accompagné par la génération d'hydrogène (33).



Yang et Wang (2018) ont relevé 8 études concernant l'ajout de nickel sous différentes formes. Par exemple, l'ajout d'ions nickel (0,6 mg/L de  $Ni^{2+}$ ) dans un substrat constitué de sucre et d'eaux usagées permet d'obtenir un rendement maximal en hydrogène de 2,05 mol $_{H_2}$ /mol $_{saccharose}$ , 107,1% fois supérieur au rendement du groupe témoin, due à la réorientation du métabolisme bactérien (Gou *et al.*, 2015).

Les concentrations massiques optimales de fer et de nickel varient beaucoup selon les études (respectivement de 9,2 à 589,5 mg/L et de 0,1 à 25 mg/L). L'ajout d'une quantité excessive de ces ions métalliques diminue l'efficacité de la production d'hydrogène (Yang et Wang, 2018).

Les ions magnésium, calcium, sodium ont également des rôles essentiels chez les bactéries. L'ion magnésium est utilisé pour l'activation du glucose nécessaire à son entrée dans les processus métaboliques (Madigan *et al.*, 2012). Il est également un composant de plusieurs transporteurs d'électrons, des membranes cellulaires et l'activateur de nombreuses enzymes (Bao *et al.*, 2013). Les ions calcium sont probablement utilisés dans les constituants polymériques extracellulaires utilisés comme matrice par les bactéries (Banu *et al.*, 2018). L'ion sodium est un élément indispensable de la pompe enzymatique Na-K stimulant le transfert du glucose dans la cellule microbienne (Cao *et al.*, 2009). Pour ces raisons, ces ions ont également été utilisés comme additifs dans des tests de fermentation obscure et ont permis l'amélioration des performances de production d'hydrogène lors d'études réalisées majoritairement en mode batch et sous des conditions mésophiles (Yang et Wang, 2018). L'amélioration de la production d'hydrogène avec l'ajout de  $Mg^{2+}$  ou de  $Ca^{2+}$  a été associée à une meilleure croissance de la

biomasse bactérienne (Zhao *et al.*, 2012) et à un effet bénéfique pour l'immobilisation d'un biofilm dans un réacteur continu (Blanco *et al.*, 2017).

*Les biomasses complexes permettent de se dédouaner de l'ajout d'additifs de par les nutriments qu'elles contiennent.*

### 3.3.1.3 Inhibiteurs de fermentation

Les composés inhibiteurs de fermentation comprennent les dérivés furaniques (furfural et hydroxyméthylfurfural (HMF)) formés lors de la dégradation de biomasses lignocellulosiques, les acides gras volatils, les solvants produits par le *consortium* bactérien lors de la fermentation et les composés phénoliques initialement présents dans les biomasses (Lin *et al.*, 2015 ; Elbeshbishy *et al.*, 2017 ; Karla *et al.*, 2016). Munoz-Paez *et al.* (2018) rapportent que ces agents promeuvent la croissance des genres *Lactobacillus* et *Clostridium* qui participeraient à la détoxification du milieu réactionnel. Selon Lin *et al.* (2015), certains composés phénoliques (vanilline, syringaldéhyde) ont un effet inhibiteur encore plus important que les dérivés furaniques.

## 3.3.2 Prétraitements des substrats complexes pour améliorer les performances de production d'hydrogène

### 3.3.2.1 Prétraitements des biomasses lignocellulosiques

La biomasse végétale lignocellulosique contient de 55 à 75% de carbohydrates en poids sec sous forme de cellulose et d'hémicellulose, sources potentielles de sucres fermentescibles, mais les propriétés chimiques et structurelles des biomasses lignocellulosiques, la rendent résistante à la dégradation par les enzymes et les microorganismes, rendant parfois nécessaire l'ajout d'une étape de prétraitement (Zheng *et al.*, 2014). On distingue les procédés biologiques des procédés non biologiques (physiques, chimiques, physico-chimiques) (Kumar *et al.*, 2017), dont les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 5.



Tableau 5 : Prétraitements pour l'hydrolyse de biomasses lignocellulosiques (d'après Kumar *et al.*, 2017)

Prétraitement	Avantages	Inconvénients
<b>Physiques</b>		
- Broyage - Irradiation (rayons gamma, microondes, ultrasons) - Extrusion - Pyrolyse - Champs électriques pulsés	- Action sur les hémicelluloses et la lignine - Faible consommation énergétique	- Faible taux d'hydrolyse - Faible efficacité sur la cellulose
<b>Chimiques</b>		
- Acides (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , acides dicarboxyliques) - Bases (NaOH, KOH) - Solvants organiques (acétone, alcools) - Liquide ionique - Solvants eutectiques profonds - Ozonolyse	- Augmente la digestibilité de la cellulose - Haut rendement en glucose- - Solubilisation et réduction de la quantité de lignine - Température ambiante	- Perte de sucres fermentescibles - Formation d'inhibiteurs - Besoin d'intrants chimiques - Coût des intrants chimiques - Recyclage et retrait des solvants - Corrosion des réacteurs
<b>Physico-chimiques</b>		
- Explosion vapeur - Explosion au CO <sub>2</sub> - Explosion à froid à l'ammoniac - Eau chaude (acides, bases ou solvants) - Oxydation humide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	- Action efficace sur la lignine - Solubilisation de l'hémicellulose - Peu coûteux - Peu d'intrants chimiques - Augmentation de la surface accessible à la biodégradation - Minimise la demande en énergie thermique	- Pas efficace pour les substrats avec de forts taux de lignine - Faible taux d'hydrolyse - Coût énergétique élevé (hautes pressions) - Coût élevé des catalyseurs
<b>Biologiques</b>		
- Bactéries - Champignons (pourritures brune, blanche et molle) - Enzymes (laccases, cellulases, hémi-cellulases, peroxydases)	- Dégradation de la lignine et de l'hémicellulose - Hydrolyse efficace de la cellulose - Faible coût énergétique	- Faible vitesse d'hydrolyse - Problèmes de contaminations

### 3.3.2.2 Prétraitements des substrats de fermentation obscure

L'ajout d'une étape de traitement de la biomasse, initialement testée et mature pour la production de bioéthanol, est également étudiée en couplage avec la production de biométhane. Cette approche d'utiliser des biomasses saccharifiées est plus récente pour la production d'hydrogène. L'objectif est alors d'augmenter le rendement et la productivité en hydrogène mais le bénéfice doit être suffisamment élevé au vu du coût énergétique supplémentaire engendré ou de l'ajout d'intrants chimiques.

Classiquement le prétraitement est réalisé en amont, mais il est également possible de le réaliser en simultané avec la fermentation, notamment pour l'hydrolyse enzymatique (Mosier *et al.*, 2005). La configuration du réacteur a également un impact sur les performances : Liu *et al* (2013) ont comparé la mise en œuvre de paille de riz prétraitée par hydrolyse acide dans un réacteur en mode batch et un réacteur continu. Un rendement 1,5 fois supérieur ( $0,69 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{sucres totaux}}$ ) est obtenu en mode batch avec une productivité de  $10 \pm 1,17 \text{ L/L/j}$ .

#### ❖ Prétraitements physiques et chimiques

Les prétraitements chimiques sont majoritairement utilisés et se révèlent plus efficaces que des traitements thermiques, microondes et avec différentes combinaisons de ces procédés (Ozcan

*et al.*, 2011), ou qu'un traitement d'ultrasonication et d'ajout de CaCO<sub>3</sub> (Battista *et al.*, 2016). Toutefois, le coût élevé des intrants chimiques, souvent issus de voies de production non renouvelables, est un inconvénient majeur de cette méthode. De plus, l'efficacité d'un prétraitement acide ne fait pas toujours consensus : l'étude de Liu *et al.* (2013) montre qu'un tel prétraitement sur de la paille de riz génère un rendement en hydrogène par rapport à la quantité de sucres totaux plus de 4 fois plus faible que le rendement obtenu lors de l'étude de Chang *et al.* (2011) avec un traitement similaire. Les auteurs suggèrent que cette différence est due à l'hydrolyse survenant dans un environnement acide beaucoup plus fort, ce qui favoriserait la formation d'inhibiteurs et affecterait la production d'hydrogène, ce pourquoi la plupart des tests utilise de faibles concentrations. Certaines techniques physiques ont mis en évidence la solubilisation accrue de composés organiques (ultrasonication, prétraitements thermiques) mais ont peu ou pas d'effet sur l'hydrolyse des polymères glucidiques (Kumar *et al.*, 2017).

#### ❖ Prétraitements biologiques

Les prétraitements biologiques sont peu coûteux en comparaison aux prétraitements chimiques et physiques. De plus, l'énergie requise est moins élevée comparativement aux prétraitements physiques.

L'utilisation d'enzymes commerciales a été testée dans plusieurs études de fermentation obscure (Cui *et al.*, 2010 ; Contreras-Dávila *et al.*, 2017 ; Liu *et al.* 2014 ; Wang *et al.*, 2010). Simples à mettre en œuvre, leur efficacité est montrée dans l'étude de Cui *et al.* (2010) : l'ajout d'une solution de Viscozyme® L (22%) permet de multiplier par 3 les performances de production d'hydrogène à partir de feuilles de peuplier par rapport au test sans prétraitement, et par 1,3 par rapport au test avec prétraitement acide. Le traitement enzymatique est souvent utilisé en couplage avec un autre traitement : thermique ou basique comme par exemple sur de la bagasse de canne à sucre (Liu *et al.*, 2014), ou par ultrasonication sur des marcs de pommes (Wang *et al.*, 2010).

Néanmoins, l'action des cocktails enzymatiques commerciaux est incomplète. En effet, une vingtaine d'enzymes est nécessaires pour hydrolyser la grande variété de liaisons chimiques des biomasses végétales (Van Dyk et Pletschke, 2012). Sørensen *et al.* (2007) proposent le concept de « cocktail minimum d'enzymes » qui consiste à déterminer la quantité minimale d'enzymes différentes pour l'hydrolyse d'une biomasse donnée. Cependant, l'utilisation d'enzymes commerciales purifiées augmente considérablement le coût de production de l'hydrogène.

Une alternative consiste à utiliser des extraits crus d'enzymes sécrétés directement par des bactéries ou des champignons sur la biomasse, moins sujets aux effets d'inhibition par le substrat et plus stables aux effets du pH et de la température (González-Fernández *et al.*, 2014 ; Farinas *et al.*, 2015). Une étude mélangeant une portion de rafles et tiges de maïs prétraitées par fermentation fongique à une portion de la même biomasse brute montre l'augmentation de l'activité cellulase couplée à un fort taux d'hydrolyse des composés lignocellulosiques, générant

une production environ 2 fois plus élevée que celle obtenue par fermentation directe des rafles brutes (Cheng et Liu, 2012). La production d'hydrogène à partir de déchets alimentaires avec un processus combiné de fermentation en milieu solide (*Aspergillus awamori* et *Aspergillus oryzae*, producteurs de glucoamylase et protéases respectivement) et de fermentation obscure a également été testée (Han *et al.*, 2016). Le rendement de production d'hydrogène à partir d'eaux de traitement de moulin à riz, prétraitées par hydrolyse enzymatique (*Aspergillus niger*), est plus élevé que celui du même substrat ayant subi un traitement acide (Liu *et al.*, 2013).

*Les biomasses collectées pour notre étude ont des structures et compositions très diversifiées. L'évaluation de leur potentiel de fermentation dans les mêmes conditions opératoires est donc pertinente. Pour les biomasses les moins riches en glucides solubles, le test de l'ajout d'une étape de prétraitement pourra être pertinent. Dans une logique de production d'hydrogène durable, l'utilisation de cocktails crus d'enzymes paraît prometteuse.*

### 3.4 Les bioréacteurs

La mise en œuvre de la fermentation obscure dans un réacteur a pour but de convertir de la matière organique en hydrogène et dioxyde de carbone par l'action de la biomasse bactérienne. Les modes de conduite des bioréacteurs, de la phase de démarrage à un régime permanent, seront présentés. Les diverses configurations des bioréacteurs mises en œuvre pour lever les verrous du procédé, ainsi que le choix des paramètres opératoires seront discutés.

#### 3.4.1 Modes de fonctionnement et paramètres clés

##### 3.4.1.1 Fonctionnement batch, semibatch ou continu

Le fonctionnement du bioréacteur est discontinu ou en mode batch lorsque le ou les réactifs sont chargés et que la fermentation se déroule sans flux de matière entrant ou sortant du système. Par opposition, les appareillages fonctionnant en continu, sont dotés d'une ou plusieurs entrées pour introduire les réactifs, et d'une ou plusieurs sorties par lesquelles les produits en phase liquide de la fermentation sont évacués. Le mode semibatch, ou semi-continu, est une variante du système discontinu : une partie des réactifs (solution de régulation de pH, nutriments) et/ou des produits (biogaz) est introduite ou extraite du bioréacteur ; le déchargement de la totalité des produits se faisant en fin de fermentation (Latrille *et al.*, 2011). Le mode discontinu séquentiel est un mode de fonctionnement hybride entre le continu et le discontinu, avec des cycles alternant le remplissage, la réaction, la décantation et la vidange du réacteur (Badiei *et al.*, 2011).

L'avantage des réacteurs batch réside dans leur simplicité de mise en œuvre, de fonctionnement et de contrôle (Jung *et al.*, 2011). Cependant, des arrêts de fonctionnements réguliers sont nécessaires pour récolter les produits de fermentation et recharger le réacteur en substrat (Hawkes *et al.*, 2007). Dans le cas d'une production de gaz sans extraction de ceux-ci,

une augmentation de la pression dans le réacteur a lieu, l'hydrogène produit pouvant inhiber les hydrogénases ou être consommé par des microorganismes hydrogénéotrophes, malgré les éventuels prétraitements subis par les cultures mixtes. De plus, le pH du milieu réactionnel tend à baisser avec la production d'acides gras volatils, et s'éloigne ainsi de l'optimum de croissance des microorganismes producteurs d'hydrogène (Latrille *et al.*, 2011).

Différentes configurations de réacteurs fonctionnant en mode semibatch permettent de pallier ces inconvénients. L'extraction ponctuelle ou continue de l'hydrogène peut être libre ou favorisée par l'ajout d'un système d'extraction ou par gaz de balayage (Kim *et al.*, 2006, Mizuno *et al.*, 2000 ; Clion *et al.*, 2015). La régulation du pH peut être réalisée par ajout contrôlé d'une solution alcaline. L'alimentation peut être séquentielle (mode fedbatch) ou continue (Badiei *et al.*, 2011 ; Hawkes *et al.*, 2007).

Dans un contexte industriel, pour des raisons pratiques de fonctionnement des bioréacteurs batch et pour des considérations économiques, les procédés continus sont favorisés (Stanbury *et al.*, 2017). Le renouvellement du milieu réactionnel avec apport de substrat favorise la croissance continue de la biomasse, tout en éliminant les cellules mortes, le milieu épuisé en substrat et les inhibiteurs éventuels de la fermentation (métabolites, toxines, produits de dégradation de substrats complexes) (Elbeshbishy *et al.*, 2017). Les gaz produits sont évacués via le ciel gazeux du réacteur. La recirculation ou la dilution du substrat peut être un moyen de s'assurer de bonnes conditions hydrauliques dans les réacteurs continus, offrant de nombreux avantages tels que la diminution de la DCO du substrat, l'ajustement des demandes d'alcalinité et la dilution des composés toxiques (Jung *et al.*, 2011). La durée totale de production est théoriquement infinie, dès lors qu'un régime permanent peut être maintenu. Ce dernier point représente un enjeu pour la mise en œuvre d'un bioréacteur continu de fermentation obscure, en raison du risque de *shift* métabolique de l'acidogénèse vers la solvantogénèse.

#### 3.4.1.2 Définition de paramètres clés du fonctionnement continu

Le débit d'alimentation en substrat (DAS), ou charge appliquée, permet d'estimer le temps moyen passé par le produit organique dans le réacteur (Moletta, 2009). Il s'agit de la quantité de substrat ajoutée au milieu réactionnel par unité de temps et de volume de réacteur (34).

$$DAS = \frac{[S] \times Q_a}{V_t} \quad (34)$$

[S] est la concentration en substrat,  $Q_a$  le débit d'alimentation et  $V_t$  le volume de travail du réacteur.

Le temps de séjour hydraulique (TSH) correspond à la durée théoriquement nécessaire pour le renouvellement complet du milieu réactionnel (35). (Stanbury *et al.*, 2017). Le TSH conditionne la quantité de substrat pouvant être traitée par unité de temps, avec un impact direct sur l'économie du procédé : des temps de séjour courts permettent d'augmenter le débit

d'alimentation en substrat sans nécessiter de concentrer les matières métabolisables (Jung *et al.*, 2011).

$$\text{TSH} = \frac{V_t}{Q_e} \quad (35)$$

$V_t$  est le volume de travail et  $Q_e$  le débit d'effluent.

Dans le cas des procédés avec une circulation des solides découplée de celle des liquides, il est possible de définir un temps de séjour des solides (TSS) (36) (Badiei *et al.*, 2011). Le suivi de ce paramètre est un peu plus complexe car les substrats solides sont transformés au cours de la fermentation et de plus, de la biomasse bactérienne est produite dans le réacteur, ainsi, le flux massique en entrée n'est pas forcément égal au flux massique en sortie, engendrant de l'accumulation. Ainsi, dans ce mode de fonctionnement, le régime permanent n'est pas atteint.

$$\text{TSS} = \frac{[\text{MES}]_{\text{réacteur}}}{[\text{MES}]_{\text{effluent}}} \times \text{TSH} \quad (36)$$

$[\text{MES}]_{\text{réacteur}}$  est la concentration en matières en suspension dans le réacteur,  $[\text{MES}]_{\text{effluent}}$  la concentration en matières en suspension dans l'effluent et TSH le temps de séjour hydraulique.

### 3.4.2 Configurations du bioréacteur : verrous et voies d'intensification

La configuration du bioréacteur a un impact majeur sur les performances et la stabilité du procédé ; de nombreuses technologies ont été étudiées pour la mise en œuvre de la fermentation obscure en bioréacteur continu.

#### 3.4.2.1 Bioréacteurs à biomasse bactérienne libre

Le réacteur le plus couramment utilisé pour les études de fermentation obscure est le réacteur agité continu ou CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) (figure 17). Il consiste en la mise en œuvre d'une biomasse libre dans un réacteur infiniment mélangé (Villiermaux, 1994). Ce type de réacteur est en général adapté aux biomasses contenant une grande quantité de particules, tels que les déchets solides ou les déchets alimentaires (Jung *et al.*, 2011). L'homogénéité du milieu en termes de température et de pH permet une mesure et un contrôle facilité de ces différents paramètres.

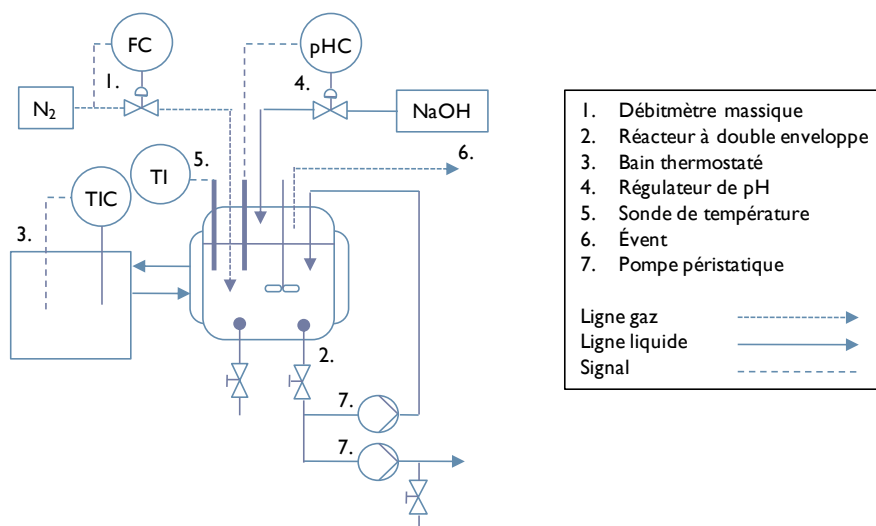


Figure 17 : Exemple de CSTR (adapté de Clion, 2016)

Cependant, comme les temps de séjour des phases liquides et solides sont couplés, un temps de séjour trop court peut conduire à un lessivage des microorganismes, évacués du système avant que la population ne puisse croître (Li et Fang, 2007). Les techniques d'immobilisation des cultures bactériennes, présentées par la suite, visent à lever ce verrou (Jung *et al.*, 2011). Un autre inconvénient de ce type de réacteur en fonctionnement continu est l'homogénéisation du milieu réactionnel, qui induit une concentration relativement élevée de substrat dans l'effluent du bioréacteur, la composition de l'effluent étant identique à celle du milieu réactionnel. Certains auteurs mettent en œuvre une recirculation permettant d'augmenter le TSS indépendamment du TSH (Lay *et al.*, 2016 ; Clion, 2016).

Un mode de fonctionnement alternatif du CSTR est le mode ASBR (*Anaerobic Sequenced Batch Reactor*), correspondant à une alimentation séquentielle avec 4 phases de fonctionnement : alimentation en substrat, production, sédimentation, vidange du milieu de culture. Cette technique est intéressante dans le cas de substrats complexes comme les déchets alimentaires ou agricoles difficilement hydrolysables. Ainsi, la phase liquide riche en acides gras volatils peut être en partie extraite tout en conservant la majorité de la biomasse (Jung *et al.*, 2011). Cependant, un TSS infini n'est pas souhaitable. En effet, dans l'étude de Badiei *et al.* (2011), un découplage non linéaire entre l'optimum du TSS et du TSH est observé. Les meilleures performances de production d'hydrogène ( $0,34 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{DCO}}$  et  $6,7 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{j}$ ) à partir d'effluents du procédé de production d'huile de palme n'ont pas été obtenues pour un TSS élevé (19 j) mais pour un TSS de 11 j, à un TSH de 72 h. Les auteurs supposent que pour un TSS supérieur à 11 j, il y a eu prévalence de populations consommatrices d'hydrogène ou non productrices, et que pour un TSS inférieur, il y a eu lessivage des producteurs d'hydrogène. Ainsi, le système n'a pas pu être maintenu en dessous d'un TSH de 36 h.

*Malgré l'avantage d'une mise en œuvre simplifiée par l'homogénéisation du milieu réactionnel, le CSTR présente l'inconvénient du lessivage des nutriments et de la biomasse bactérienne. Une alimentation et vidange séquentielle ont été testées mais*

*un effondrement de la production d'hydrogène a lieu en dessous d'un TSH de 36 h. Afin de pallier les limites du CSTR, plusieurs études se sont focalisées sur l'amélioration de la configuration du bioréacteur de fermentation obscure en fonctionnement continu.*

#### 3.4.2.2 Bioréacteurs d'immobilisation des cellules bactériennes

L'objectif de ce type de dispositif est de découpler le temps de séjour des bactéries productrices d'hydrogène du TSH. Les cellules bactériennes, en présence d'un support, vont progressivement coloniser sa surface et former un biofilm. L'immobilisation des cellules bactériennes permet d'atteindre de très fortes concentrations en biomasse bactérienne et de réduire d'autant les volumes réactionnels nécessaires (Moletta, 2009).

L'immobilisation par adsorption physique est la technique la plus communément utilisée. Le choix et la sélection du support est crucial pour l'adhésion des cellules et les propriétés de formation du biofilm, influencées par la charge de surface de la cellule bactérienne, la porosité de la matrice et des forces électrostatiques telles que les forces de Van der Waals, ionique, interactions hydrophiles et hydrophobes (Kumar *et al.*, 2016 ; Kerčmar *et al.*, 2017 ; Banu *et al.*, 2018). Les matériaux utilisés sont variés : charbon actif (Wu *et al.*, 2012 ; Kerčmar *et al.*, 2017), polyéthylène (Del Pilar Anzola-Rojas *et al.*, 2015 ; Blanco *et al.*, 2017), polyuréthane (Kerčmar *et al.*, 2017), polystyrène (Barros *et al.*, 2010), billes d'argile (Barros *et al.*, 2010 ; Kerčmar *et al.*, 2017), billes de céramique (Keskin *et al.*, 2012), grille en polyester (Park *et al.*, 2017), *etc.* Cependant, lors d'une immobilisation par adsorption physique, l'attachement des cellules bactériennes à la surface du support est réversible et le lessivage de la biomasse active voire du matériel support peut survenir sous de faibles temps de rétention (Zhang *et al.*, 2007). L'ajout de calcium permet de favoriser la formation du biofilm (Wu *et al.*, 2012 ; Blanco *et al.*, 2017).

L'immobilisation par piégeage dans une matrice gel semi-perméable, permettant le transfert de nutriments et de substrats entre la matrice et le milieu réactionnel, est de plus en plus étudiée. Cette technique permet de protéger les bactéries productrices d'hydrogène et de limiter le lessivage causé par des flux hydrauliques élevés à de faibles TSH, permettant d'augmenter la productivité du bioréacteur. Plusieurs matériaux ont été testés : alginate de sodium, agar, alginate de calcium, cellulose, polypropylène, polyacrylamide, *etc.* L'encapsulation, une technique similaire, permet de retenir totalement les cellules immobilisées à l'intérieur du matériel support, qui ne sont pas libérées dans le milieu, ce qui permet un meilleur traitement de l'effluent (Kumar *et al.*, 2016 ; Banu *et al.*, 2018).

L'immobilisation sous forme de granules autosupportés, inspirée des techniques de traitement des eaux usées et de méthanisation est très utilisée, améliorant l'efficacité du bioréacteur en fournissant des biofilms plus actifs et un meilleur contact microorganismes/substrat. La forte concentration en bactéries autorise l'application de charges volumiques plus importantes et ainsi une réduction du volume et de la surface des réacteurs (Ning *et al.*, 2013). Fang *et al.* (2002b) ont observé la formation de tels granules à 26°C, pH = 5,5 pour

un TSH de 6 h en 80 jours. En comparaison avec les granules multicouches des granules méthanogènes, les granules producteurs d'hydrogène ont une matrice plus simple, composée principalement de bactéries acidogènes productrices d'hydrogène. Comme ces bactéries se développent rapidement, la formation des granules producteurs d'hydrogène est aussi beaucoup plus rapide que celle des granules méthanogènes. La composition et la microstructure des granules dans le bioréacteur dépendent fortement des conditions opératoires (température, pH, substrat (présence et concentrations adéquates de nutriments et de certains métaux, en particulier le calcium et le fer) (Abbasi et Abbasi, 2012 ; Zhang *et al.*, 2007). De multiples configurations ont été testées ; quelques exemples sont présentés sur la figure 18.

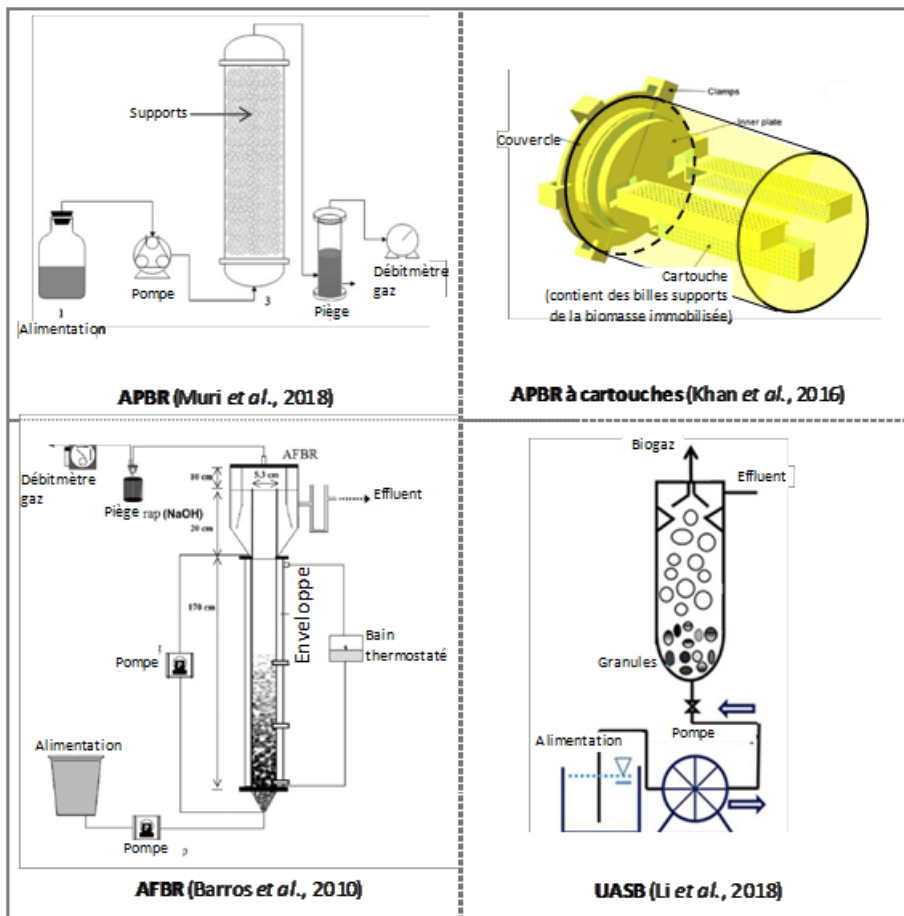


Figure 18 : Exemples de bioréacteurs à biomasse immobilisée  
(adapté de Muri *et al.*, 2018 ; Khan *et al.*, 2016, Barros *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2018)

Les supports solides peuvent être mis en œuvre en lits fixes ou APBR (*Anaerobic Packed Bed Reactors*) (figure 18), où le support est immobilisé dans le bioréacteur et placé dans le flux du liquide ; ou en lit fluidisé ou AFBR (*Anaerobic Fluidized Bed Reactor*) (exemple figure 18), où le flux de liquide met les différents supports en suspension dans le milieu (Muri *et al.*, 2018 ; Barros *et al.*, 2010). L'étude de Khan *et al.*, 2016 propose une configuration où le support du biofilm (billes d'alginate) est disposé dans des cartouches, permettant d'agiter et d'homogénéiser le milieu réactionnel. Cependant, dans les études précitées, le support n'est pas recyclé. Dans un bioréacteur à lit de boue anaérobie à flux ascendant ou UASB (*Up Flow Anaerobic Sludge*



*Blanket*) (figure 18), le support ou les granules sont généralement disposés dans une colonne alimentée par le bas à l'aide d'une pompe péristaltique, l'écoulement se faisant de façon ascensionnelle vers une sortie haute (Li *et al.*, 2018). L'inconvénient majeur de cette configuration est l'installation d'un gradient de pH et de nutriments. L'avantage des réacteurs UASB est que le support n'est pas nécessaire, diminuant le coût du procédé. De plus, la concentration en biomasse bactérienne est augmentée, permettant de maximiser les productivités en hydrogène. Cependant, l'UASB présente certains inconvénients de circulation du milieu réactionnel (flux préférentiels, raccourcis hydrauliques, volumes morts) (Kato *et al.*, 2003) et de temps de formation des granules matures (Ning *et al.*, 2013).

Le réacteur à lit de boue granulaire en expansion ou EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*) est une variante du réacteur UASB développé pour pallier ses inconvénients. Une vitesse de flux ascensionnel supérieure à 4 m/h permet l'expansion partielle (fluidisation) du lit granulaire, et favorise ainsi un meilleur contact substrat/granules et améliore la séparation des petites particules inactives suspendues. Cependant, les inconvénients liés au temps de formation des granules, à la colonisation par des bactéries méthanogènes sont les mêmes que pour les réacteurs UASB.

*Les techniques d'immobilisation présentent donc l'avantage de retenir les bactéries productrices d'hydrogène dans le milieu réactionnel. Cependant, plusieurs inconvénients spécifiques sont liés à ce type de configuration : temps de développement d'une biomasse bactérienne productrice d'hydrogène élevé, non recyclage des supports solides en AFBR, extraction limitée de l'hydrogène des APBR et UASB car le milieu réactionnel n'est pas agité, développement de microorganismes méthanogènes dans le réacteur UASB.*

#### 3.4.2.3 Couplage de la fermentation obscure avec une séparation membranaire

Un bioréacteur membranaire ou BRM est la mise en œuvre d'un procédé biologique couplé à un module membranaire. La membrane est une barrière matérielle qui permet le passage sélectif de certains composés, sous l'action d'une force motrice : gradient de pression, de potentiel électrique ou de potentiel chimique, ou la mise en contact de deux phases distinctes (Aimar et Daufin, 2004).

Deux modes de couplage de la membrane au bioréacteur sont utilisés. Dans le mode externe, le module membranaire est placé en série avec le réacteur sur une boucle de recirculation, tandis qu'en mode immergé, la membrane est directement immergée au sein du bioréacteur, en contact direct avec le milieu de culture. Dans les deux cas, le retentât retourne dans le bioréacteur, tandis que le perméat est extrait de celui-ci, avec une extraction secondaire réalisée pour éliminer l'effluent. L'intérêt principal des membranes externes est de permettre un remplacement et un entretien plus faciles des membranes, tandis que la configuration immergée permet de réaliser une économie de pompage et de recirculation. Des modules membranaires tubulaires en céramique sont généralement employés en configuration externe, tandis que des fibres creuses ou des

membranes planes polymériques sont immergées dans le milieu (Singhania *et al.*, 2012). Le mode immergé est de plus en plus étudié car moins coûteux en énergie et nécessitant moins de maintenance de la membrane (Lee *et al.*, 2009). L'utilisation de membrane dynamique autoformée avec un réacteur continu, utilisant des cultures mixtes, a été récemment appliquée à la fermentation obscure (Park *et al.*, 2017 ; Saleem *et al.*, 2018). Les objectifs du couplage d'une séparation membranaire avec un bioréacteur de fermentation obscure sont multiples et varient selon les phases séparées. La figure 19 présente quelques exemples de configurations. Le tableau 6 présente les performances de production d'hydrogène de différents BRM.

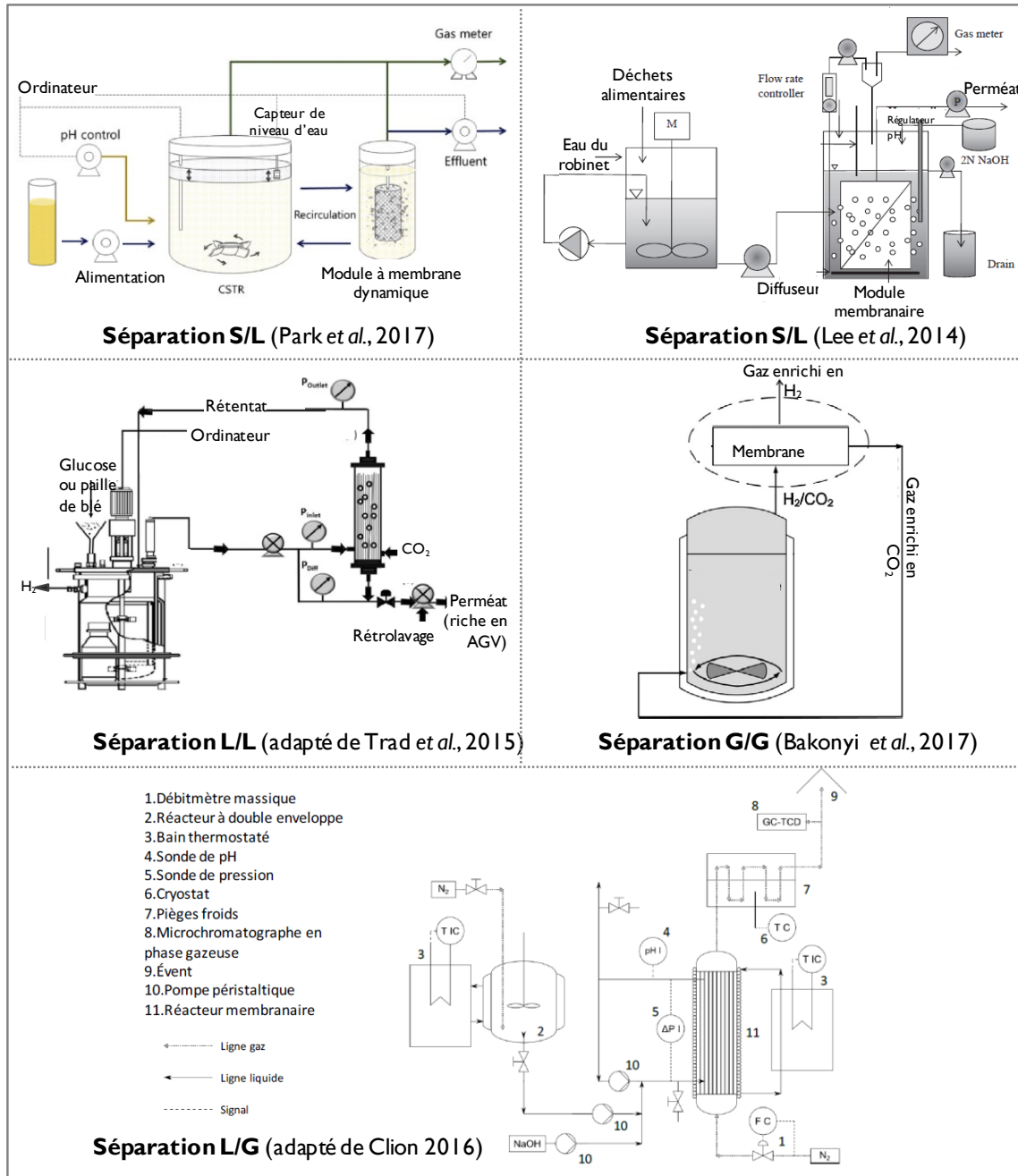


Figure 19 : Exemples de bioréacteurs membranaires (adapté de Park *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2014 ; Trad *et al.*, 2015 ; Bakonyi *et al.*, 2017 ; Clion, 2016)

**Tableau 6 : Exemples de bioréacteurs membranaires en fermentation obscure : objectifs de la séparation membranaire, conditions opératoires et performances**

Configuration	Objectif(s) séparation membranaire	Module et membrane	Source de carbone	T°C	Rendement H <sub>2</sub>	Production H <sub>2</sub>	Référence
G/G, E	Purifier l'H <sub>2</sub>	Tubulaire, alliage Pd-Ag	Déchets ménagers	65-70	na	na	Nielsen <i>et al.</i> , 2001
G/G, E	Préconcentrer l'H <sub>2</sub>	1 : Fibres creuses, PES/PI 2 : Fibres creuses, PE	Farine de plume	85	na	na	Belafi-Bako <i>et al.</i> , 2006
G/G, E	Préconcentrer l'H <sub>2</sub>	2 modules : fibres creuses, PDMS	Glucose	35	1,9 mol/mol <sub>hex cons</sub>	9,2 L/L/j*	Bakonyi <i>et al.</i> , 2017
L/G, S	Maintenir faible pression partielle H <sub>2</sub>	Fibres creuses, silicone	Glucose	35	0,3 mol/ mol <sub>hex aj</sub> *	0,11 L/L/j*	Liang <i>et al.</i> , 2002
L/G, S	Maintenir faible pression partielle H <sub>2</sub>	Plane, PTFE	Glucose, extrait levure	65	nd	nd	Zheng <i>et al.</i> , 2010
L/G, S	Maintenir faible pression partielle H <sub>2</sub> Eviter le lessivage des BPH	Fibres creuses, PTFE	Glucose	37	1,1 mol/mol <sub>ajouté</sub>	1,5 L/L/j	Clion, 2016
L/L, E	Extraire les AGV	Fibres creuses, PVDF	Glucose ou paille de blé	35	1,1 mol/mol <sub>hex aj</sub>	nd	Trad <i>et al.</i> , 2015
L/L, S	Extraire les AGV Eviter le lessivage des BPH	Fibres creuses, PVDF	Glucose	35	1,6 mol/mol <sub>hex aj</sub>	18-59,0 L/L/j*	Noblecourt <i>et al.</i> , 2017
S/L, S	Eviter le lessivage des BPH	Plane, PE	Glucose	35	0,3-1,2 mol/mol <sub>hex aj</sub>	2,0-5,8 L/L/h	Lee <i>et al.</i> , 2010
S/L, S	Eviter le lessivage des BPH Augmenter DAS et productivité	Tubulaire, céramique	Glucose	23	1,8 mol/mol <sub>hex cons</sub>	0,20 L/L/j	Shen <i>et al.</i> , 2009 Shen <i>et al.</i> , 2010
S/L, S	Augmenter TSS (substrats et BPH)	Fibres creuses	Effluents de production de tofu	60	1,0-1,9 mol/mol <sub>hex aj</sub>	8,2-19,9 L/L/j	Kim <i>et al.</i> , 2011
S/L, S	Augmenter TSS (substrats et BPH)	Plane, PE	Déchets alimentaires	55	1,2-2,2 mol/mol 63,0-111,1 ml/g <sub>MV</sub>	3,4-10,7 L/L/j	Lee <i>et al.</i> , 2014
S/L, E	Eviter le lessivage des BPH Préconcentrer H <sub>2</sub>	2 modules : Plane, nd Plane, PDMS	Glucose, extrait levure	37	1,1 mol/mol <sub>hex aj</sub>	0,2 L/L/j*	Bakonyi <i>et al.</i> , 2015
S/L, S	Eviter le lessivage des BPH	Tubulaire, membrane dynamique, Polyester	Glucose	37	1,3-3,0 mol/mol <sub>hex aj</sub>	6,1-51,4 L/L/j	Park <i>et al.</i> , 2017
S/L, E	Eviter le lessivage des BPH	Tubulaire, membrane dynamique, polyamide, nylon	Saccharose	34	8 L/g <sub>MS</sub>	19 L/L/j	Saleem <i>et al.</i> , 2018

*PI = polyimide ; PE = polyéthylène ; PDMS = polydiméthylsiloxane ; Pd = palladium ; M=Matrimid® ; S = Sumikaexcel®, PBI = polybenzimidazole ; PV = polyvinyle ; BPH = bactéries productrices d'hydrogène ; E = externe et I = immergé ; hex = hexoses ; cons = consommé, aj=ajouté  
nd : non disponible  
\*recalculé*

## ❖ Séparation G/G

Les procédés développés dans les études de la séparation gaz/gaz (G/G) visent à purifier (Nielsen *et al.*, 2001) ou préconcentrer (Belafi-Bako *et al.*, 2006 ; Bakonyi *et al.*, 2015 ; Bakonyi *et al.*, 2017) l'hydrogène en sortie du réacteur.

Dans l'étude Nielsen *et al.* (2001), un très bon taux de recouvrement en hydrogène est obtenu (85-90%). Malgré les performances de séparation utilisant les membranes métalliques, cette technologie n'est pas adaptée car sans effet sur la bioproduction et induit un surcoût énergétique engendré par les conditions de température et de pression élevées nécessaires à la purification de l'hydrogène. De plus, des problèmes de contamination peuvent survenir du fait des impuretés présentes dans le biogaz (H<sub>2</sub>S). Bien que moins performantes, les membranes polymères sont utilisables dans des conditions de pression et de température très proches de celles du procédé de fermentation obscure. L'utilisation de modules membranaires à fibres creuses permet d'obtenir une pré-concentration de l'hydrogène, jusqu'à 70% environ, mais avec une part importante d'H<sub>2</sub> dans le gaz résiduel, jusqu'à 40% dans l'étude de Bakonyi *et al.*, 2013 et 29% pour Bélafi-Bakó *et al.*, 2006 ; la mise en recirculation du flux de gaz permettant d'améliorer le taux de recouvrement de H<sub>2</sub>. La séparation des constituants du biogaz par passage à travers une membrane offre l'avantage d'extraire l'hydrogène et de récupérer et de réinjecter le CO<sub>2</sub> produit lors de la fermentation.

## ❖ Séparation S/L

Les BRM mettant en œuvre la configuration solide/liquide (S/L) permet de découpler le TSH et le TSS et plusieurs sous-objectifs peuvent être atteints : diminuer le TSH, augmenter le temps de résidence des substrats complexes, éviter le lessivage des bactéries productrices d'hydrogène. Cette configuration est la plus étudiée, le liquide passe à travers la membrane, les éléments dont la taille est supérieure au seuil de coupure de la membrane (bactéries et particules solides de substrat) sont retenus dans le milieu réactionnel. Ce mode de fonctionnement offre des perspectives très intéressantes d'utilisation de substrats très concentrés en matières métabolisables et en biomasse bactérienne avec un TSH faible, sans accumulation des produits de fermentation inhibiteurs.

Dans une étude, les auteurs ont montré la possibilité d'optimiser le TSS (Lee *et al.*, 2010). Shen *et al.* (2009) montre que ce système permet d'atteindre de meilleures productivités qu'en CSTR. Un découplage des optima de TSH et de TSS sont notés par Kim *et al.* (2011) et Lee *et al.* (2010).

L'inconvénient majeur de ce système est le colmatage (Lee *et al.*, 2010 ; Shen *et al.*, 2009, 2010, Oh *et al.* en 2004), qui serait dû à l'adhésion colloïdale de substances polymériques extracellulaires (SPE), produites par les bactéries dans le milieu réactionnel et augmentant considérablement en concentration avec l'augmentation du TSH (Jung *et al.*, 2011). Ce problème est limité en augmentant la surface de membrane. De plus, l'utilisation d'un fonctionnement

séquentiel peut être mise en place, alternant phase de pompage et phase de repos dans les tests de Lee *et al.* (2014) ou d'inversion du flux de liquide (*back flushing*) voire l'utilisation du biogaz produit par la fermentation pour réaliser ce contre flux, comme dans l'étude de Kim *et al.*, 2011. Mais une fois installé, l'élimination complète du biofilm est impossible et ajoute une résistance au transfert de matière qui devient problématique pour l'extraction de liquide au travers de la membrane. L'utilisation d'une membrane dynamique, c'est-à-dire la formation d'un biofilm sur un support, servant de filtre, a été testée par Park *et al.*, (2017), afin de limiter le problème du colmatage et les coûts associés à la membrane.

❖ Séparation L/L

L'objectif recherché d'une séparation liquide/liquide (L/L) est le retrait des acides organiques inhibiteurs avec un module membranaire externe au bioréacteur (Trad *et al.*, 2015). Les auteurs proposent un dispositif d'extraction des AGV permettant de conserver la majeure partie de l'eau et de la matière organique en suspension. Dans un tel système en mode de fonctionnement séquentiel, l'effet inhibiteur des acides gras volatils est supprimé (Noblecourt, 2017)

❖ Séparation L/G

En configuration liquide/gaz (L/G), l'objectif est principalement l'augmentation des performances de production d'H<sub>2</sub> (rendement et productivité) par le retrait de l'hydrogène et la diminution de l'inhibition due à une forte pression partielle en hydrogène.

Ce mode de fonctionnement est très peu étudié dans la littérature : il est mentionné dans seulement trois études à notre connaissance. Les auteurs utilisent des membranes polymères de séparation (Liang *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2010 ; Clion, 2016). Les bioréacteurs utilisés permettent d'augmenter la surface de contact entre le milieu liquide de fermentation et la phase gaz, afin de maximiser le flux gazeux.

L'objectif de l'ajout d'une membrane, dans le test réalisé par Zheng *et al.* (2010) dans un bioréacteur batch, est de fournir une surface permettant le développement d'un biofilm producteur d'hydrogène et agissant comme un « puit d'hydrogène » mimant le rôle des archées méthanogènes et en abaissant la pression partielle en hydrogène dans le milieu. Différentes membranes planes (membranes tamis moléculaire CTMSS (Carbon Template Molecular Sieve Silica), membrane de nanofiltration en alumine- $\gamma$  et membranes en PTFE) ont été testées. L'hydrogène produit à la surface de la membrane a été extrait en totalité durant le premier jour du test de fermentation utilisant les membranes CTMSS et PTFE. Cependant, un colmatage total des pores par l'eau, au bout de 24 h pour la membrane en PTFE et en deux jours pour la membrane CTMSS, est observé. La détérioration rapide des performances de la membrane dans ces conditions limite l'application industrielle de ce système. Les auteurs suggèrent l'utilisation de membranes hydrophobes comme amélioration du système.

En revanche, Liang *et al.* (2002) montrent qu'un bioréacteur membranaire à fibres creuses en silicone avec une surface membranaire de  $3400 \text{ m}^2/\text{m}^3_{\text{milieu}}$  avec dépression transmembranaire (pression absolue de 108 mbar), permet d'extraire l'ensemble des gaz produits, en mode de fonctionnement semibatch. Une légère augmentation du rendement en hydrogène (9%) est obtenue par rapport à un réacteur sans membrane (respectivement 0,93 et 0,84  $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ ). Ces résultats prometteurs n'ont cependant pas été vérifiés en mode de fonctionnement continu, les tests ne dépassant pas 24 h.

Au laboratoire, l'étude de Clion (2016) porte sur la mise en œuvre d'un bioréacteur membranaire à fibres creuses en PTFE en fonctionnement continu avec une extraction in situ L/G des gaz produits à l'aide d'un gaz de balayage. Le fonctionnement en continu de ce type de réacteur permet d'extraire les effluents liquides contenant les AGV et les gaz dans deux compartiments séparés ; la membrane jouant le rôle de contacteur L/G. Les travaux ont montré une forte amélioration du rendement ( $> +90\%$ ) et de la productivité en hydrogène ( $> +300\%$ ) par rapport au mode de fonctionnement continu en réacteur agité (CSTR) sur un substrat modèle. Il reste nécessaire d'évaluer le potentiel de ce procédé en utilisant des biomasses comme substrat et d'optimiser divers paramètres opératoires.

*L'avantage d'une séparation L/G dans un BRM à fibres creuses est de coupler l'immobilisation de la biomasse et de maintenir une pression partielle en hydrogène basse par extraction L/G in situ des gaz produits. Cependant, l'utilisation d'un gaz de balayage dilue l'hydrogène produit.*

### 3.4.3 Paramètres opératoires

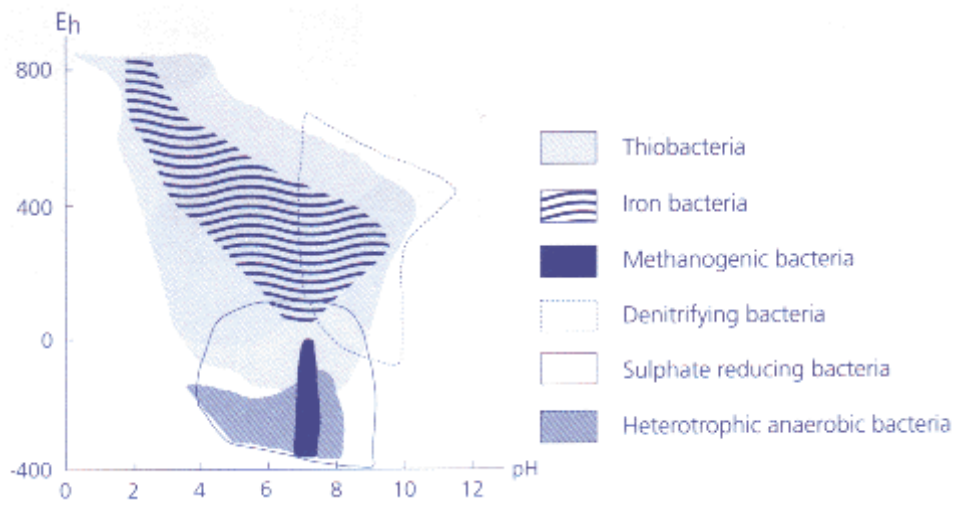
#### 3.4.3.1 Température, pH et potentiel d'oxydoréduction

La température, le potentiel d'oxydoréduction, dépendant de la concentration en oxygène dissous, et le pH de fonctionnement du bioréacteur ont un effet de sélection sur la composition et le métabolisme des cultures mixtes.

La plupart des travaux portant sur la production d' $\text{H}_2$  ont été réalisés soit à des températures ambiantes (15-30°C), mésophiles (32-39°C) ou thermophiles (50-64°C) (Jung *et al.*, 2011). Pour des substrats complexes, les rendements de conversion communément rapportés dans la littérature sont plus élevés sous conditions thermophiles, favorisant l'hydrolyse des composés lignocellulosiques et diminuant la solubilité des gaz produits (Sivagurunathan *et al.*, 2016). En mode batch, la fermentation d'hydrolysats de cannes de maïs avec des cultures mixtes provenant de boues de STEP est optimale à 55°C, avec une production majoritaire d'acétate et de butyrate au détriment de la production d'éthanol (tests réalisés à 30, 37, 55 et 70°C). La diversité microbienne diminue avec l'augmentation de la température (Zhang *et al.*, 2015). Dessi *et al.* (2018) rapportent le même optimum dans un AFBR en mode de fonctionnement continu, ainsi que la mise en place de voies d'homocétogenèse à 37°C. Cependant, ce mode de fonctionnement représente un surcoût énergétique et d'autres techniques de diminution de la pression partielle en

hydrogène ont été développées pour limiter l'homoacétogénèse et les autres effets négatifs associés (cf. § 3.3.3.3). En bioréacteur semibatch, un optimum à 37°C a été rapporté (Clion *et al.*, 2015).

Les valeurs de pH initial et opérationnel optimales varient selon les études, la nature du substrat utilisé et la composition des communautés microbiennes (Wong *et al.*, 2014). A pH acide, le développement des archées méthanogènes, dont la gamme de croissance se situe autour de 7,8-8,2, est inhibé (Won *et al.*, 2011) (figure 20).



**Figure 20 : Gamme de développement de divers groupes microbiens selon le pH et le potentiel rédox**

Une étude montre que lorsque le pH est inférieur à 4, les hydrogénases sont inhibées et les processus métaboliques sont détournés vers les voies de la solvantogénèse (Fang et Liu, 2002a). Selon l'étude de Dareioti *et al.*, (2014), la production de propionate est favorisée entre pH 6 et 6,5. La revue bibliographique réalisée par Li et Fang (2007) compare plus de 160 expériences de fermentation obscure et relève plus de 22 valeurs optimales de pH. Ces différences sont dues aux variations d'espèces bactériennes utilisées, au type de substrat, à la température et à la durée des expériences. Won *et al.* (2011) rapportent une variation du pH optimum selon le temps de séjour hydraulique. Oh *et al.* (2004) et Zhang *et al.* (2008) ont trouvé que le pH optimal pour la production d'hydrogène dans des bioréacteurs utilisant des cultures mixtes était compris entre 5,2 et 6,0. La production d'hydrogène est améliorée pour des valeurs de pH initiales proches de la neutralité (entre 6 et 7) sur des substrats simples (Muri, 2016) ou complexes (Cui *et al.*, 2009), sans régulation de pH au cours de la fermentation. Mota *et al.*, 2018, rapportent une productivité de 175 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/h et un rendement en hydrogène de 3,4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>saccharose</sub>) dans un UASB, avec un métabolisme acétate/éthanol, à un pH effluent de 2,8, sans ajout d'alcalin.

Pour limiter l'effet inhibiteur de l'accumulation d'AGV sous forme indissociée (cf. §2.), de nombreux procédés incluent une méthode de contrôle du pH, généralement par addition d'une solution alcaline, ce qui peut augmenter le coût opératoire du procédé. La quantité nécessaire d'intrants chimiques n'est généralement pas indiquée. A notre connaissance, peu de solutions de

remplacement ont été étudiées. L'utilisation d'un substrat en co-digestion ayant un pouvoir tampon pourrait être une solution économique. Ghimire *et al.* (2015) ont montré qu'une large quantité d'ions hydroxyde  $\text{OH}^-$  et d'ions ammonium  $\text{NH}_4^+$  seraient libérés durant la fermentation de déchets riches en protéines et limiteraient la chute de pH due à la production d'acides organiques.

#### 3.4.3.2 Pression partielle en $\text{H}_2$ et en $\text{CO}_2$

La concentration en hydrogène conditionne les réactions de fermentation (*cf.* §2). Dans un environnement naturel ou un réacteur de digestion anaérobie, les microorganismes consommateurs d'hydrogène (archées méthanogènes, bactéries sulfato-réductrices, *etc.*) permettent le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène. La production d'hydrogène et de dioxyde de carbone génère la sursaturation de ces gaz dans le milieu liquide, ce qui favorise la formation de gaz diffusant vers la phase gazeuse. Si aucune stratégie d'extraction de l' $\text{H}_2$  ou du  $\text{CO}_2$  n'est mise en place, la pression partielle de ces gaz augmente au sein du réacteur et inhibe la production d'hydrogène.

Plusieurs stratégies de réduction de la pression partielle en  $\text{H}_2$  ont été étudiées : utilisation d'un gaz de balayage (Mizuno *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2006 ; Clion, 2016), diminution de la pression dans le bioréacteur (Clion, 2016 ; Gadamshetty *et al.*, 2009), configuration membranaire (Zheng *et al.*, 2010 ; Liang *et al.*, 2002 ; Clion, 2016). Malgré des performances de production supérieures avec le balayage du réacteur avec de l'azote, la nécessité de séparer l'azote de l'hydrogène, requiert des conditions de pression et de température élevées si la technologie membranaire est utilisée. L'utilisation du  $\text{CO}_2$  produit en tant que gaz de balayage est potentiellement pertinente, s'il n'y a pas d'effet sur les espèces bactériennes. L'utilisation du vide pour instaurer une dépression représente un surcoût énergétique.

Une étude montre que le retrait du  $\text{CO}_2$  du ciel gazeux permet d'augmenter la production de biohydrogène (Park *et al.*, 2005), contradictoire avec l'étude de Kim *et al.* (2012) montrant une augmentation de la production avec le balayage au  $\text{CO}_2$ . Nasr *et al.*, (2015) ont étudié l'effet de la séquestration du  $\text{CO}_2$  dans l'espace de tête sur les communautés microbiennes : une augmentation du rendement en hydrogène de 22%, de la quantité d'acétate et une diminution de la quantité de butyrate ont été observées. Modigell *et al.* (2008) ont développé un contacteur pour la séparation du  $\text{CO}_2$ .

*Ainsi, l'extraction membranaire a un effet très positif pour l'extraction de l'hydrogène du bioréacteur.*

#### 3.4.3.3 Temps de séjour hydraulique (TSH)

Un TSH court permet de sélectionner les bactéries productrices d'hydrogène ayant des cinétiques de croissance rapides, notamment en comparaison avec les archées méthanogènes (Goldammer, 2008) et des espèces productrices d'acide propionique, dont le lessivage a été



observé avec une diminution de TSH de 8h à 6h (Zhang *et al.*, 2006). Si *et al.*, (2015) rapportent la suppression de la méthanogenèse lors de la baisse du TSH de 24h à 4 h et de 24h à 2 h dans un UASB et PBR, respectivement, et la suppression de l'homoacétogenèse lors du passage du TSH de 8h à 4h.

De plus, un TSH court permet de maintenir les populations bactériennes du genre *Clostridium* en phase de croissance exponentielle, favorisant ainsi la production d'acides gras volatils et d'acides organiques au détriment d'alcools, produits durant la phase stationnaire (Jones, 1986). Enfin, le renouvellement rapide du milieu réactionnel évite l'accumulation des métabolites produits, potentiellement inhibiteurs, et l'acidification du milieu (Elbeshbishy *et al.*, 2017).

La majorité des tests d'optimisation du TSH ont été réalisés sans le découpler du débit d'alimentation en substrat (DAS): les réacteurs continus sont généralement mis en fonctionnement en mode batch ou avec des TSH longs, pour l'acclimatation du *consortium*, puis le TSH est progressivement abaissé. Kumar *et al.* (2014) rapportent le découplage de l'optimum du TSH concernant le rendement maximal de production d'hydrogène (TSH = 6h) et le taux de production (TSH = 18h), et le fait que l'optimum dépende de la nature du monomère glucidique (glucose ou galactose). Van Ginkel *et al.* (2005) ont testé différents TSH sur une gamme de 1 à 10h en faisant varier la teneur en substrat de la solution d'alimentation (glucose 0,5-18,9 g/h et DCO 2,5-10 g<sub>DCO</sub>/L). Les résultats suggèrent que les rendements en hydrogène seront optimisés pour des alimentations plus diluées et des DAS plus faibles que ceux qui ont été typiquement utilisés.

La configuration du réacteur, la complexité du substrat, et les autres paramètres opératoires impactent l'optimum de TSH, variant de 38 h à 0,5 h selon les études (Si *et al.*, 2015 ; Jung *et al.*, 2011). Les temps de séjour optimaux sur substrats simples sont de l'ordre de 4 à 12 h alors qu'avec des substrats complexes, ils sont généralement de plusieurs jours (Jung *et al.*, 2011). Avec l'utilisation de longs temps de séjour, l'*inoculum* doit être prétraité pour éviter l'émergence de microorganismes consommateurs d'hydrogène.

L'utilisation de techniques d'immobilisation ou de séparation membranaire ont nettement réduit le TSH optimal, permettant une augmentation de la productivité en d'hydrogène. Une étude utilise un réacteur membranaire couplant un module de microfiltration à fibres creuses avec un CSTR, utilisant un *consortium* mixte ; alors que l'utilisation du CSTR seul mène au lessivage des cellules bactériennes à un TSH de 2 à 4 h, l'utilisation du BRM permet la rétention des cellules bactériennes à un TSH de 1h. L'acétate et le butyrate sont les métabolites solubles majoritaires (70 à 85% du taux de métabolites solubles) (Lee *et al.*, 2007). Dans l'ensemble, la production d'hydrogène était 50% plus importante en mode BRM, 0,78 contre 0,51 mol/j en mode CSTR, pour lequel le DAS était trop élevé. Ces résultats suggèrent qu'un DAS qui maximise le rendement en hydrogène et la production d'hydrogène pourrait être proche du DAS causant la surcharge d'utilisation de substrat (Shen *et al.*, 2009).

#### 3.4.3.4 Débit d'alimentation en substrat (DAS)

Le débit d'alimentation en substrat peut être contrôlé soit en augmentant la concentration en substrat dans l'alimentation avec un TSH fixé, soit en diminuant le TSH avec une concentration en substrat fixée (Siguravanathan *et al.*, 2016). En fonctionnement continu, une concentration élevée en substrat limite le coût énergétique du fonctionnement du réacteur tout en augmentant théoriquement la productivité, mais des effets d'inhibition par le substrat et les produits de fermentation peuvent avoir lieu et fixer une limite haute. (Arimi *et al.*, 2015 ; Elbeshbishy *et al.*, 2017). Dans l'étude de Van Ginkel *et al.* (2005), l'augmentation du débit d'alimentation en substrat permet d'augmenter la productivité du procédé, mais cet effet est accompagné d'une baisse du rendement en hydrogène et de la concentration en hexose résiduel (Van Ginkel *et al.*, 2005). La baisse de rendement de production en hydrogène associée à un DAS élevé est due à la réorientation des voies métaboliques vers la production de solvants et autres acides plus réduits que l'acétate et le butyrate (Lin *et al.*, 2011) et la réduction de la consommation du glucose (Pasupuleti *et al.*, 2014). L'immobilisation de la biomasse bactérienne dans le bioréacteur par les techniques d'immobilisation précitées permet de mettre en œuvre le bioréacteur à un DAS plus élevé en limitant les effets de surcharge de substrat.

*Les optima dépendent des configurations des réacteurs. Il est difficile de prédire un optimum sans tests expérimentaux. Il existe peu d'études d'optimisation en bioréacteur membranaire, ce sont souvent essentiellement des preuves de concept.*

#### 3.4.4 Maturité du procédé de fermentation obscure

La plupart des études de fermentation obscure ont été menées dans des réacteurs de laboratoire pour évaluer l'effet de différents paramètres clés du procédé : nature et prétraitement du substrat, *consortium* bactérien, type de réacteur, paramètres environnementaux (pH, température), *etc.* Toutefois, les effets négatifs d'une mauvaise homogénéisation du milieu réactionnel, d'un effet de lessivage, de concentrations localement inhomogènes et d'une hydrodynamique non maîtrisée peuvent seulement être révélés par les études à l'échelle pilote ou supérieure (Zhang *et al.*, 2018).

Le tableau 7 présente un récapitulatif des réalisations à l'échelle pilote.

Tableau 7 : Pilotes de fermentation obscure

Procédé	Réacteur	Consortium bactérien FO	Substrat	T°C	Rendement H <sub>2</sub>	Productivité H <sub>2</sub>	Réf.
FO	continu 1,48 m <sup>3</sup>	boues STEP	molasses	35°C	26,1 mol/kg <sub>DCOcons</sub>	5,6 m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /j	Ren <i>et al.</i> , 2006
FO/PF	continu 100 m <sup>3</sup>	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i>	effluents distillerie canne à sucre	non contrôlée (initial 60°C)	2,8 mol/mol <sub>gluc</sub>	1,5 m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /j*	Vatsala <i>et al.</i> , 2008
FO	batch séquentiel 0,15m <sup>3</sup>	boues STEP traitement alcalin	déchets alimentaires	35°C	0,7 mol/mol <sub>hex aj</sub>	n. a.	Kim <i>et al.</i> , 2010
FO/DA	continu FO : 0,5 m <sup>3</sup> ; DA : 2,3 m <sup>3</sup>	na	déchets alimentaires	33°C	1,8 mol/mol <sub>hex cons</sub>	n. a.	Lee et Chung, 2010
FO	continu 0,40 m <sup>3</sup>	<i>C. pasteurianum</i> <i>C. tyrobutyricum</i>	saccharose	35°C	1,7 mol/mol <sub>saccharose</sub>	15,6 m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /j	Lin <i>et al.</i> , 2011
FO/DA	continu FO : 0,20 m <sup>3</sup> DA : 0,76 m <sup>3</sup>	n.a.	déchets alimentaires	55°C	0,8 m <sup>3</sup> /kg <sub>MV aj</sub>	2,8 m <sup>3</sup> <sub>hythane</sub> /m <sup>3</sup> /j	Cavinato <i>et al.</i> 2012
FO/DA	continu 0,225 m <sup>3</sup>	<i>C. saccharolyticus</i>	paille	77°C	1,2 mol/mol <sub>hexose</sub>	n. a.	HyTIME, 2015
FO	batch séquentiel 0,20 m <sup>3</sup>	<i>E. coli</i>	glycérol (biodiesel)	37°C	0,6 mol/mol <sub>glycérol</sub>	n.a.	Cofré <i>et al.</i> , 2016
FO/DA	batch séquentiel FO : 0,20 m <sup>3</sup> DA : 0,38 m <sup>3</sup>	n.a.	déchets alimentaires	55°C	FO : 170 L/kg <sub>MS</sub>	n.a.	Gottardo <i>et al.</i> 2017
FO/PF	batch séquentiel 11 m <sup>3</sup>	<i>Clostridium</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>E.coli</i>	hydrolysats de canne de maïs	FO : 35°C PF : 30°C	n.a.	FO: 7,5 m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /j PF : 4,7m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /j-	Zhang <i>et al.</i> , 2018

n. a. = non analysé

FO = fermentation obscure, PF = photo-fermentation, DA = digestion anaérobie

R<sub>H<sub>2</sub></sub> = rendement en hydrogène, P<sub>H<sub>2</sub></sub> = productivité en hydrogène

hex = hexose ; cons = consommé, aj=ajouté, MS = matières sèches, MV = matières volatiles

Les études à l'échelle pilote concernent souvent le couplage de la fermentation obscure avec un autre procédé, majoritairement la digestion anaérobie, parfois la photo-fermentation. La biomasse bactérienne utilisée est une culture pure ou une co-culture de deux ou trois espèces, des cultures mixtes (généralement boues de station d'épuration (STEP) prétraitées). Les bioréacteurs sont majoritairement mis en œuvre en continu, avec des rendements en hydrogène variables et compris entre 0,7 et 2,8 mol/mol<sub>hexose</sub> et des productivités comprises entre 1,5 et 15,6 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/j. On observe toutefois une augmentation de l'utilisation du mode de fonctionnement séquentiel ces dernières années. Les volumes de travail des bioréacteurs vont de 0,2 à 100 m<sup>3</sup>. Les substrats utilisés sont essentiellement des déchets riches en matière organique utilisés directement (déchets alimentaires, molasses) ou lignocellulosiques prétraités.

## 4 Conclusion et objectifs de la thèse

L'hydrogène est appelé à jouer un rôle essentiel dans le mix énergétique de demain ; il est donc nécessaire que l'impact environnemental de la filière hydrogène soit réduit, ce qui implique d'innover à différents niveaux, notamment celui de la production.

En complément aux procédés d'électrolyse de l'eau, la mise en œuvre de procédés utilisant de la biomasse est pertinente pour une production durable d'hydrogène. L'implication de la biomasse dans le domaine de l'énergie devra se faire de manière contrôlée dans une transition où les bénéfices environnementaux en termes de durabilité alliés au caractère renouvelable de son utilisation doivent primer. Ainsi, les procédés biologiques, moins énergivores et plus durables que les procédés thermochimiques, représentent une piste de production intéressante.

Dans ce contexte, le développement de procédés de production d'hydrogène peu énergivores et utilisant des ressources renouvelables est nécessaire. La fermentation obscure permet d'obtenir de bonnes productivités en hydrogène, sans contrainte d'apport de lumière ou d'oxygène ni d'étape intermédiaire de gazéification. Elle peut être mise en œuvre dans des conditions opératoires douces et ne nécessite pas de conditions stériles car l'usage de cultures mixtes est possible.

L'efficacité de la production d'hydrogène dépend de l'émergence de populations aptes à produire de l'hydrogène, de leur rétention au sein du bioréacteur, et de l'orientation de leur métabolisme, dont les facteurs d'influence sont nombreux et interconnectés. Le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène est essentiel. De même, les propriétés des bactéries productrices d'hydrogène (sporulation et formation de biofilm) sont des éléments clés pour la mise en œuvre de la fermentation obscure.

Des travaux récents, notamment ceux de la thèse de François-Lopez (2016) au laboratoire, ont montré la faisabilité de la mise en œuvre d'une fermentation obscure endogène, c'est-à-dire sans apport en bactéries autre que les bactéries indigènes de la biomasse, mais le nombre d'études réalisées reste faible, ne concernant souvent qu'une seule biomasse. De plus, parmi les bioréacteurs développés récemment, le bioréacteur membranaire à fibres creuses, développé par Clion (2016) au laboratoire, présente l'avantage de coupler l'immobilisation des bactéries et de maintenir une pression partielle en hydrogène basse par extraction liquide/gaz. Cependant, l'utilisation d'un gaz de balayage dilue l'hydrogène produit. De plus, l'étude a été réalisée uniquement sur substrat modèle, et seul un test de production 6 jours après le dernier ensemencement du module membranaire a été réalisé.

Ainsi, le premier objectif de cette étude est de tester la robustesse de la production d'hydrogène dans le bioréacteur membranaire (BRM) avec extraction *in situ* de l'hydrogène liquide/gaz (BRM L/G), sans nouvel apport d'*inoculum* bactérien, 8 mois après son dernier reensemencement. Plusieurs tests d'amélioration du mode d'extraction des gaz produits seront

réalisés. De plus, l'examen de la littérature met en évidence que les optima de fonctionnement dépendent des différentes configurations des bioréacteurs. Il est donc difficile de prédire un optimum sans tests expérimentaux et très peu d'études d'optimisation en bioréacteur membranaire ont été effectuées ; celles-ci se limitant souvent à la preuve de concept. Une dernière étude visera à optimiser son fonctionnement par le contrôle de paramètres essentiels de fonctionnement d'un bioréacteur en continu que sont le débit d'alimentation en substrat (DAS) et le temps de séjour hydraulique (TSH). Les bénéfices de cette configuration seront mis en évidence par la caractérisation du métabolisme du milieu réactionnel et des communautés bactériennes se développant au sein du module membranaire.

D'autre part, dans la dynamique d'insérer ce procédé dans une bioraffinerie de déchets organiques, en couplage avec d'autres procédés, il est nécessaire de cibler les ressources potentielles. Pour leur abondance et leur richesse en matières métabolisables, nous nous intéresserons aux déchets agricoles et issus d'industries agroalimentaires. Il existe suivant les coproduits identifiés dans cette étude des voies plus ou moins nombreuses de valorisation. Cependant, un pourcentage important de déchets organiques agroalimentaires est peu ou pas valorisé, ce qui en fait un gisement très intéressant de substrats du procédé de fermentation obscure. Ainsi, de façon plus large, le procédé de fermentation obscure pourrait constituer une brique d'une chaîne de bioraffinerie de déchets organiques agricoles et agroalimentaires.

Les biomasses, issues de filières vitivinicole, brassicole et caféicole, sélectionnées suite à des entretiens avec leurs producteurs industriels, réalisés tout au long de la thèse, et sélectionnées pour notre étude ont des structures et compositions très diversifiées. L'évaluation de leur potentiel de fermentation dans les mêmes conditions opératoires est donc pertinente et constitue le second objectif de cette étude. Pour les biomasses les moins riches en glucides solubles, le test de l'ajout d'une étape de prétraitement pourra être pertinent. Dans une logique de production d'hydrogène durable, l'utilisation de cocktails crus d'enzymes paraît prometteuse.

Certaines de ces biomasses sont déjà connues pour leur potentiel en valorisation énergétique (biomasses vitivinicoles) ; pour les biomasses brassicoles et caféicole, cette approche est innovante et leur intérêt est encore à démontrer. Les biomasses permettent de se débarrasser des additifs de par les nutriments qu'elles contiennent et de plus, notre approche sera de les tester dans des conditions de fermentation endogène afin de déterminer s'il est possible de se passer de l'ajout d'un *inoculum* et/ou d'un prétraitement visant à sélectionner les bactéries productrices d'hydrogène. L'analyse approfondie du métabolisme et des populations bactériennes émergentes en cours de fermentation sera effectuée.

Enfin, très peu d'études associent le développement d'un nouveau bioréacteur et le test de son efficacité avec des biomasses complexes. Le troisième objectif est donc de tester la flexibilité du bioréacteur membranaire par la mise en œuvre des biomasses complexes.



## Chapitre II

# Matériels et Méthodes

Ce chapitre expose les matériels et méthodes de ce travail de thèse : les substrats de fermentation, les procédés de fermentation fonctionnant en mode semibatch et en bioréacteur membranaire et les méthodes analytiques utilisées.

## 1 Substrats de fermentation et prétraitement des biomasses

### 1.1 Substrat modèle

Une solution de glucose et de nutriments a été utilisée comme substrat modèle pour une partie des tests réalisés en BRM (chapitre III). Cette solution a été diluée pour obtenir une gamme de concentration de 3 à 24 g glucose/L. Pour 24 g de glucose, 25 mL de solution à 14 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mL de solution à 280 g/L de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 25 mL de solution à 20 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 mL de solution à 4 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  et 1 mL de solution de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  à 4 g/L ont été ajoutés dans une fiole jaugée de 2 L. De l'eau q.s.p. 2 L a été ajoutée dans la fiole. Le mélange a été ensuite filtré sur un filtre Büchner, avec un papier filtre ayant un diamètre de pores de 40  $\mu\text{m}$  (VWR, Louvain, Belgique). La solution a été conservée à 4°C.

### 1.2 Biomasses

Des entretiens ont été réalisés avec différents industriels pour identifier les déchets organiques disponibles pour être valorisés en hydrogène par fermentation obscure. Les biomasses présentant une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ont été privilégiées : richesse en matières organiques fermentescibles et/ou faible valorisation jusqu'à présent et/ou importantes quantités disponibles.

Des déchets et coproduits issus de la vitiviniculture et de diverses industries agro-alimentaires (brasseries, malterie, torréfaction de café) ont ainsi été sélectionnées. Des bourbes et des marcs de raisin de cépage Pinot Gris (domaine viticole), des levures, des drèches, du kieselguhr et des eaux résiduaires (plusieurs brasseries industrielles et une microbrasserie), des radicules d'orge (malterie) et des pellicules argentées de café (usine de torréfaction de café) ont été collectés.

## 1.3 Prétraitements des biomasses pour les tests en bioréacteur semibatch

### 1.3.1 Prétraitements physiques

Une étude a été menée sur l'impact de prétraitements de marcs de raisins sur la production d'hydrogène (chapitre IV). Différents traitements thermiques et mécaniques (ultrasonication, broyage) ont été mis en œuvre.

#### 1.3.1.1 Ultrasonication

Un bécher contenant un mélange de marcs et d'eau a été placé dans un bain à ultrasons (Fisher Scientific Inc.) et exposé aux ultrasons durant 4h. De l'eau q.s.p. 700 mL a été ajoutée au mélange.

#### 1.3.1.2 Broyage

Une masse de marcs a été broyée dans un broyeur-mixeur à couteaux (Grindomix GM200, Retsch™) durant 15 s à 10 000 tr/min. De l'eau q.s.p. 700 mL a été ensuite ajoutée au broyat.

#### 1.3.1.3 Traitements thermiques

Une masse de marcs a été placée dans la cuve du réacteur et 700 mL d'eau du réseau de Strasbourg ont été ajoutés. La température du bain-marie a été ajustée à 55°C ou 70°C pendant 1h, puis à 37°C pour la suite du test.

### 1.3.2 Prétraitements enzymatiques

Deux études ont été menées sur l'effet d'un traitement enzymatique des biomasses (marcs de raisin puis radicules d'orge) pour les tests en semibatch (chapitre IV). Pour la campagne sur les marcs de raisin, un cocktail enzymatique commercial a été utilisé. Des cocktails enzymatiques produits par fermentation fongique en milieu solide pour les tests sur radicules d'orge ont été testés. Deux types de traitements enzymatiques ont été testés dans les deux cas : prétraitement des biomasses avant fermentation (cf §) et saccharification et fermentation simultanées (cf. §2.1.4).

#### 1.3.2.1 Cocktail enzymatique commercial

Une solution de cellulases de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) a été utilisée. Ce cocktail enzymatique catalyse l'hydrolyse de la cellulose en glucose, cellobiose et autres polymères de glucose de plus hauts poids moléculaires.



### 1.3.2.2 Cocktails enzymatiques produits par fermentation fongique en milieu solide (FMS)

La production de cocktails enzymatiques a été réalisée en collaboration avec le laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM), Polytech Lille, EA 1026.

#### ❖ Origine des souches fongiques et production de spores

Des souches de champignons modèles (*Mucor sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium sp.*) ont été fournies par l'Université de Bourgogne (UMR Procédés Agroalimentaires et Microbiologiques, Laboratoire Vin Aliment Microbiologie et Stress). Des souches isolées à partir d'échantillons de biomasse déposées sur milieu *Potato Dextrose Agar* (PDA) sur des boîtes de Pétri ont également été utilisées. Dans tous les cas, les souches ont été mises en culture en boîtes de Pétri sur milieu PDA à 25°C. Les suspensions de spores résultantes de ces cultures ont été récoltées à partir de boîtes âgées de 5-6 jours avec une solution stérile de tween® 80 (Sigma-Aldrich) 0,2%(v/v). Les spores ont été dénombrées avec une cellule de Malassez et stockées à -20°C.

#### ❖ Inoculation des substrats, FMS et récolte des cocktails enzymatiques

Différentes biomasses (marcs de raisin, radicules d'orge, pellicules argentées de café) ont été séchées dans une étuve à 105°C puis broyées pour obtenir des particules de tailles comprises entre 0,25 et 1 mm. Dans un pilulier, 5 g de substrat solide ont été autoclavés à 121°C et 3 bar pendant 20 minutes. Les substrats ont été inoculés avec les suspensions de spores pour obtenir  $10^4$  spores/g<sub>MS</sub>. De l'eau a été ajoutée aux différents substrats pour ajuster leur humidité initiale, afin d'obtenir une activité de l'eau proche de 1. Après mélange, les piluliers ont été recouverts d'un film d'échange de gaz et incubés à 25°C pendant 5 jours. Ces conditions de fermentation ont été maintenues pour toute l'étude. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

Après fermentation, le substrat fermenté a été mélangé avec une solution de tampon phosphate 0,1 M à pH 7 (5 mL/g<sub>MS</sub> initiale). Les préparations ont été centrifugées (8000 g pendant 10 minutes) pour éliminer les résidus solides. Puis, une seconde centrifugation a été réalisée pour ôter le mycélium et les spores (13600 g pendant 30 minutes).

Pour les cocktails dont l'activité enzymatique (*cf.* ci-après) a été la plus élevée une fermentation à grande échelle (100 g de biomasse séchée) a été réalisée. Les fermentations et les récoltes des cocktails enzymatiques ont été réalisées comme décrit précédemment, dans un bac en pyrex. Ces cocktails enzymatiques ont été lyophilisés pour être conservés et utilisés ultérieurement.

#### ❖ Tests d'activité enzymatique

Les activités des cocktails enzymatiques ont été mesurées en utilisant des substrats chromogènes (*azurine-crosslinked* (AZCL) *polysaccharides*) : AZCL-HE-cellulose, AZCL-xylane, AZCL-xyloglucose et AZCL-xyloarabinose (Megazyme). Les activités correspondantes ont été déterminées en suivant la solubilisation des composés colorés et en mesurant l'absorbance du surnageant à 595 nm par spectrophotométrie UV visible. Les substrats ont été préparés à 0,5% (m/v) dans du tampon phosphate à une concentration de 0,1 M et à pH 7. Les réactions ont été réalisées avec 450  $\mu$ L de substrats AZCL et 50  $\mu$ L de cocktails enzymatiques incubés à 25°C pendant 1 à 4 h. Les surnageants ont été isolés par centrifugation à 13600 g pendant 1 min. Etant donné que le coefficient d'extinction molaire de l'AZCL est inconnu, les activités enzymatiques ont été exprimées en unités arbitraires correspondant à la variation de densité optique ( $\Delta$ DO) par minute et par millilitre de surnageant ( $\Delta$ DO/min/mL).

#### 1.3.2.3 Prétraitement enzymatique des biomasses

Un volume de cocktail enzymatique a été ajouté à la biomasse diluée dans de l'eau ( $T = 37^{\circ}\text{C}$  ou  $T=55^{\circ}\text{C}$ ) pendant 1-4h.

### 1.4 Prétraitements des biomasses pour les tests en BRM

Les marcs de raisin ont été broyés, puis trempés dans de l'eau. Une première filtration a été réalisée sur une grille ayant un diamètre de pores de 1 mm, puis le perméat a été ensuite filtré sur un filtre Büchner, avec un papier filtre ayant un diamètre de pores de 40  $\mu$ m (VWR). La quantité de sucres du mélange a été dosée puis le mélange a été dilué pour ajuster la concentration en sucres en fonction du débit d'alimentation en substrat désiré. Les pellicules argentées ont été juste trempées, puis filtrées ainsi que décrit pour les marcs de raisin. Les bourbes ont été seulement diluées dans l'eau pour atteindre la concentration en sucres souhaitée.

## 2 Procédés de fermentation

### 2.1 Fermentation en mode semibatch

#### 2.1.1 Configuration du bioréacteur

Le réacteur en configuration semibatch (Büchi AG) comporte une cuve en verre de 1 L équipée d'une double enveloppe. Une photographie et le schéma de principe du montage sont présentés sur la figure 21.

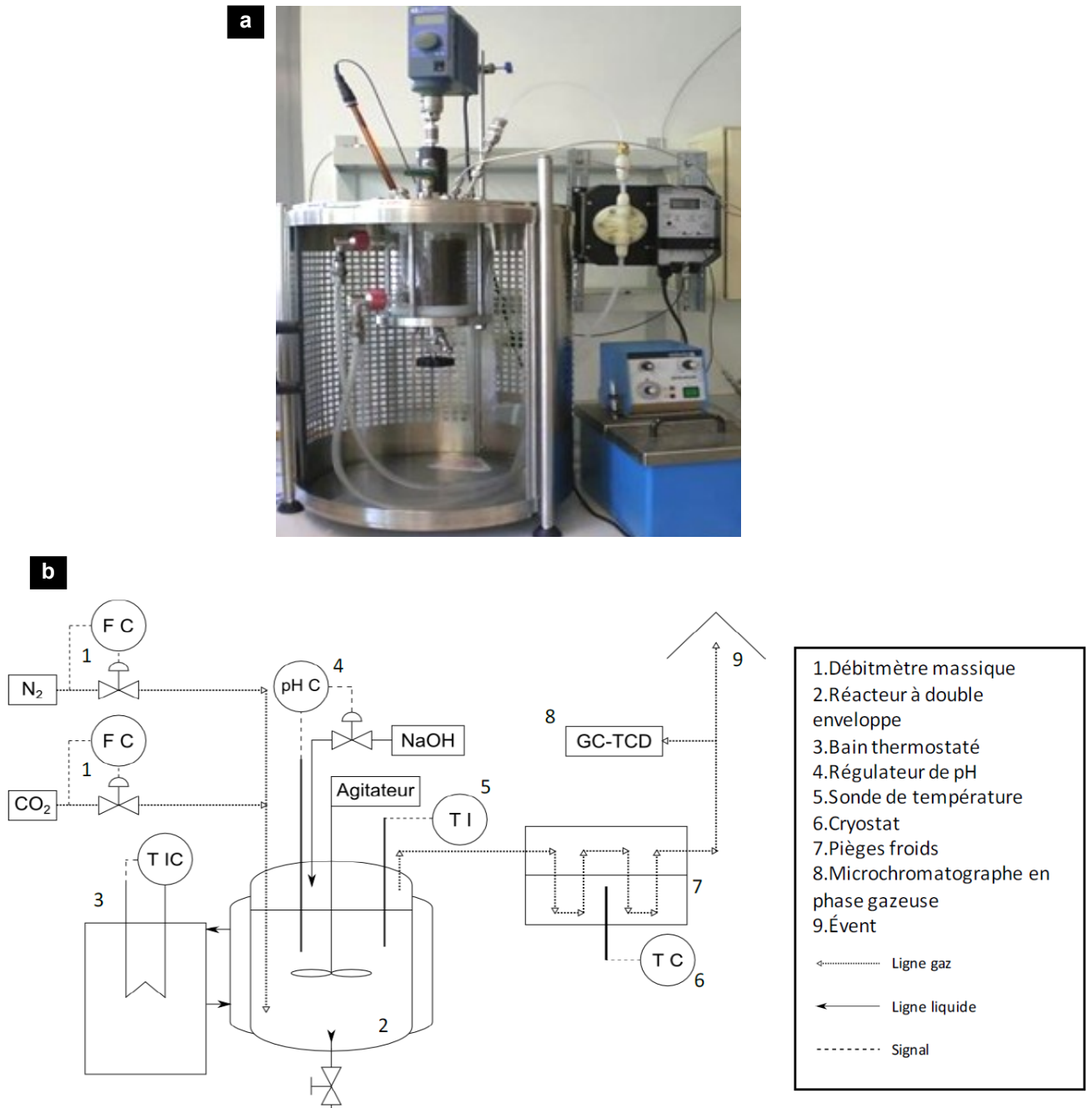


Figure 21 : Photographie (a) et schéma (b) du bioréacteur en configuration semibatch (adapté de Clion, 2016)

### 2.1.2 Préparation des biomasses

Après collecte, les biomasses solides sont stockées à  $-18^{\circ}\text{C}$ . La veille de chaque fermentation en semi-batch, une aliquote est placée à  $4^{\circ}\text{C}$  pour être décongelée. Les échantillons liquides sont décongelés le jour même de la fermentation.

Avant chaque fermentation, la biomasse est prétraitée (cf 1.4) ou non, puis mélangée avec de l'eau du réseau de Strasbourg, pour obtenir un volume de travail de 700 mL dans le bioréacteur.

### 2.1.3 Mise en œuvre du bioréacteur semibatch

Avant la mise en fermentation, le bioréacteur est alimenté en biomasse prétraitée ou non. La sonde de mesure du pH (SI Analytics) est étalonnée. Le pH du milieu liquide est ajusté manuellement à  $7,0 \pm 0,2$  avec une solution de NaOH 3M. Le début du test correspond au moment de fermeture de la ligne d'ajout de NaOH.

Au cours de la fermentation, un gaz inerte (azote) est introduit dans le bioréacteur par balayage à un débit de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  régulé avec un débitmètre massique (5850E Brooks, Brooks Instruments) est réalisé. L'objectif est de placer le milieu réactionnel en anaérobie et d'extraire les gaz produits. La température est maintenue à  $37^\circ\text{C}$  grâce à de l'eau chauffée par un bain thermostaté (Polystat 5A, Bioblock Scientific) circulant dans la double enveloppe du réacteur. Le réacteur est recouvert de papier aluminium pour placer le milieu réactionnel dans l'obscurité. Le mélange est agité à 220 tr/min avec un agitateur tripale. Le pH est maintenu au-dessus de 5,65 par ajouts automatiques d'une solution de NaOH 1M (3M pour les tests réalisés avec des bourbes vitivinicoles) par un régulateur de pH (Hanna Instruments).

Chaque expérience dure entre 40 h et 90 h. Des échantillons sont prélevés par la vanne de fond du réacteur au cours du temps dans des tubes de 15 mL, centrifugés à 4500 tr/min pendant 30 min puis le surnageant est séparé du culot et aliquoté dans des microtubes de 2 mL. Les surnageants et culots ainsi obtenus sont stockés à  $-18^\circ\text{C}$  avant d'être analysés.

A la suite de chaque test de fermentation, un nettoyage complet du réacteur est réalisé par brossage avec du détergent et rinçage à l'éthanol (70%).

### 2.1.4 Fermentation et traitement enzymatique simultané

Un volume de cellulases de *Trichoderma reesei* ou de cocktail enzymatique produit par FMS est ajouté au milieu réactionnel en début de fermentation.

## 2.2 Fermentation continue en bioréacteur membranaire avec extraction liquide/gaz (BRM L/G)

### 2.2.1 Configuration du bioréacteur et caractéristiques du module membranaire

Le BRM L/G est constitué d'un module à fibres creuses (Polymem) et d'un réacteur agité (Büchi AG) est utilisé comme réservoir de substrat. Une photographie et le schéma de principe du montage dans les conditions de référence sont présentés sur la figure 22.

La cuve de 1,5 L du réacteur est équipée d'une double enveloppe où circule de l'eau refroidie par un cryoplongeur (TC40, Huber), permettant de maintenir la température de la solution d'alimentation à  $6^\circ\text{C}$ . Le substrat est balayé par de l'azote afin de placer le milieu en anaérobie stricte. Dans notre étude, seuls le DAS et le TSH ont été calculés. En effet, le seul

prélèvement de milieu était celui de l'effluent du bioréacteur, ne permettant pas de calculer le TSS.

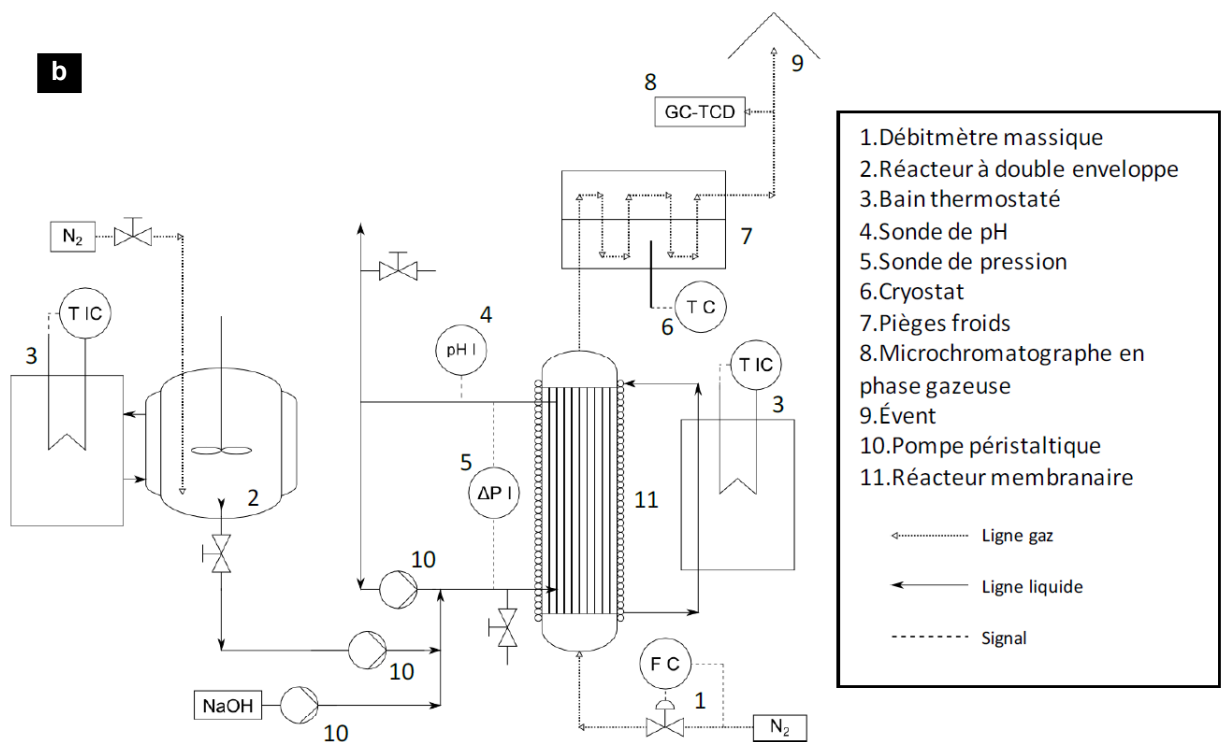


Figure 22 : Photographie et schéma de fonctionnement du BRM L/G dans les conditions de référence (adapté de Clion, 2016)

Deux modules membranaires (extracteur G/L) à fibres creuses identiques ont été utilisés pour les tests en BRM. Le volume total de la calandre est de 500 mL.

La figure 23 présente une photographie du module membranaire avec le trajet de circulation des fluides liquides et gazeux.

Des fibres creuses en PTFE (PolyTétraFluoroEthylène) traversent la calandre et sont empotées à chaque extrémité du module. Les fibres mesurent 30 cm, ont un diamètre interne de 0,45 mm et un diamètre de pores de 0,1  $\mu\text{m}$ . Le module contient 238 fibres.

Le taux de remplissage du module est de 8,5% et son volume utile de 478 mL.

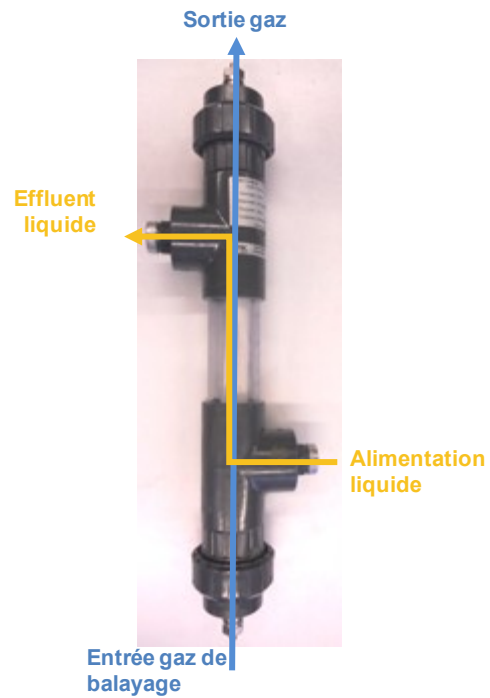


Figure 23 : Photographie du module membranaire avec circulation des fluides

### 2.2.2 Mise en circulation des fluides

Avant chaque test, le substrat a été injecté dans le circuit du bioréacteur membranaire grâce à une pompe péristaltique à débit rapide (ISM 849) en 30 minutes environ. Le temps initial de la fermentation correspond à la fin du remplissage du circuit.

### 2.2.3 Mise en régime permanent

Au cours de la fermentation, le système a été ensuite alimenté en continu en substrat grâce à une pompe péristaltique (ISM 940E, Ismatec). Une solution de soude a été ajoutée en continu grâce à une pompe péristaltique (LabCraft, Jobin Yvon Instruments). La concentration et le débit de la solution de NaOH ont été optimisés au cours des fermentations afin de maintenir le pH en sortie du réacteur  $5,0 \pm 0,2$ . Une solution de soude à 0,5 M a été ajoutée en continu, dans le but de stabiliser le pH à la valeur souhaitée. La température du module membranaire a été maintenue à 37°C au cours de la fermentation grâce à de l'eau chauffée par un bain thermostaté (Polystat™ 24, Fischer Scientific), circulant dans un tube positionné en serpentin autour du module membranaire. En conditions de référence, les fibres ont été balayées par du N<sub>2</sub> à un débit moyen de 11 mL/min, en co-courant avec la circulation de l'alimentation en substrat. Au niveau de la sortie des gaz, des pièges froids permettent de piéger les condensables. Au niveau de la sortie liquide du bioréacteur, le pH et la conductivité ont été mesurés et enregistrés en continu grâce à un analyseur multi-paramètres (C3020, Consort). Le nettoyage du bioréacteur membranaire a été réalisé par vidanges et rinçages répétés de la calandre avec de l'eau osmosée.

### 2.2.4 Fonctionnement sans gaz de balayage

Plusieurs tests ont été réalisés sans gaz de balayage (cf chapitre III), selon le schéma présenté sur la figure 24. Afin de mesurer les débits d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> en sortie du module membranaire, de l'azote a été injecté dans la ligne de gaz en sortie du module membranaire à un débit moyen de 11 mL/min.

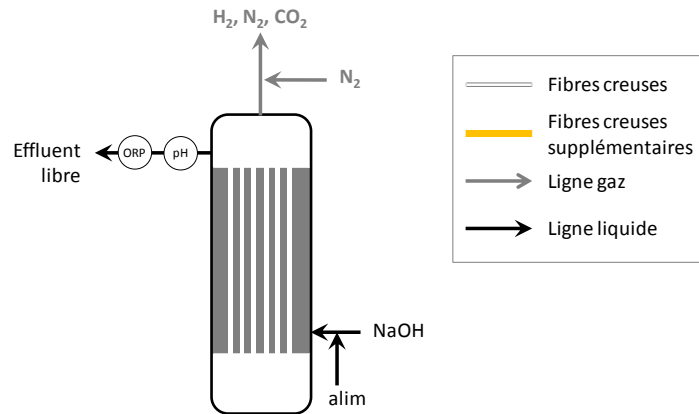


Figure 24 : Schéma simplifié du fonctionnement du BRM sans gaz de balayage

### 2.2.5 Fonctionnement avec ajout de fibres creuses dans le module membranaire

Deux tests ayant pour objectif d'analyser le profil du biofilm se développant à la surface des fibres creuses ont été réalisées (cf chapitres III et V). Comme les fibres creuses ont été empotées de façon irréversible dans le module membranaire, des fibres supplémentaires ont été ajoutées au début du test comme présenté sur le schéma de la figure 25. Dans la configuration sans gaz de balayage (figure 25a), afin de mesurer les débits d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> en sortie du module membranaire, de l'azote a été injecté dans la ligne de gaz en sortie du module membranaire à un débit moyen de 11 mL/min.

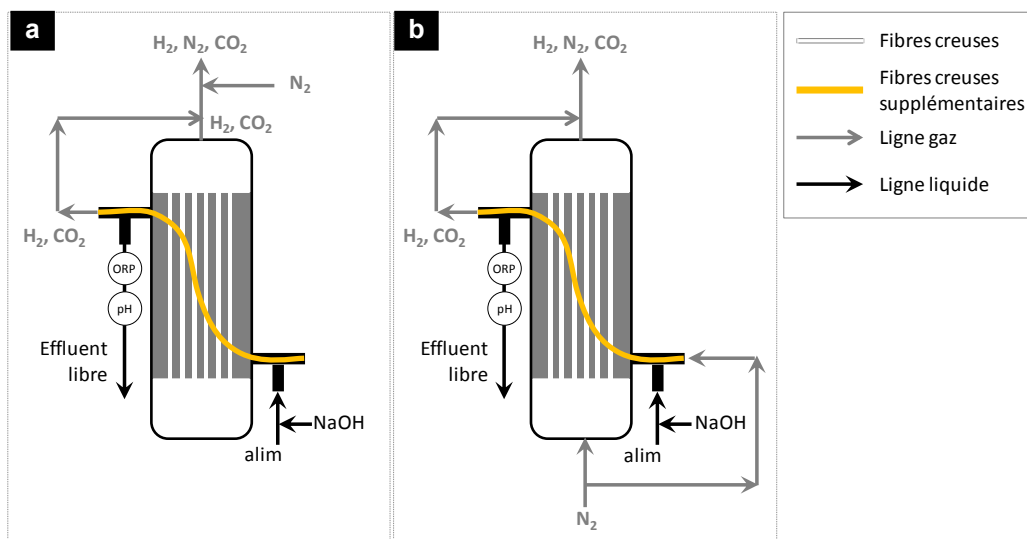


Figure 25 : Schéma simplifié du fonctionnement du BRM avec des fibres creuses supplémentaires, sans gaz de balayage (cf chapitre III) (a) et avec gaz de balayage (cf chapitre V) (b)

Après le fonctionnement du réacteur et le retrait des fibres, celles-ci ont été séparées en trois segments de 6 cm chacun. Les floes ont été récoltés dans le fond du BRM. Tous les échantillons ont été immédiatement stockés dans une solution d'agent fixateur (tampon cacodylate 0,2M, H<sub>2</sub>O, tétr oxyde d'osmium 4%) à l'obscurité à 4°C avant leur analyse par microscopie électronique à balayage.

## 3 Méthodes d'analyse des fermentations

### 3.1 Caractérisation des biomasses

#### 3.1.1 Mesure des matières sèches et minérales, calcul des matières volatiles

Un échantillon de biomasse est déposée dans un creuset de porcelaine préalablement séché et taré  $m_0$ , puis l'ensemble est pesé ( $m_1$ ) et est incubé à 105°C pendant 24h. L'eau s'étant évaporée, la masse de biomasse restante dans le creuset correspond aux matières sèches (MS). Le creuset est ensuite pesé après refroidissement dans un dessiccateur  $m_2$ . Les matières sèches (MS) se calculent à partir de l'équation (1).

$$MS(g.kg^{-1}) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 1000 \quad (1)$$

Le creuset est ensuite incubé dans un four à moufle à 550°C pendant 2h. 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 se calculent selon l'équation (2).

$$Mi(g.kg^{-1}) = \frac{m_3 - m_0}{m_1 - m_0} \times 1000 \quad (2)$$

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

#### 3.1.2 Analyse de la composition élémentaire

L'analyse de la composition élémentaire de la biomasse est réalisée par spectrométrie d'émission atomique par torche plasma (ICP-AES = Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry).

La fraction soluble obtenue après centrifugation et filtration sur un filtre de 0,45  $\mu$ m est analysée directement par ICP-AES, la fraction totale ou le culot de centrifugation de la biomasse nécessitent quant à eux une étape de minéralisation. Lors de cette étape, 3 mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) Trace Select (Sigma) sont ajoutés à 0,5 g de biomasse, puis l'ensemble est minéralisé par le minéraliseur micro-ondes Eco (Anton Paar) à 200°C pendant 25 minutes. L

Lors de l'analyse, l'échantillon mélangé à l'argon est nébulisé sous forme de fines gouttelettes et est ensuite entraîné vers le plasma d'argon à couplage inductif dont la très haute température (8000°C) permet d'ioniser et d'exciter les ions présents dans l'échantillon. Les



radiations émises lors de la désexcitation des ions sont séparées par un polychromateur, puis détectées par un spectrophotomètre ICPAES 720ES (Varian).

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

### 3.1.3 Dosage de glucides solubles

La quantité de glucides présents dans les échantillons est déterminée par dosage spectrophotométrique. Les résultats sont donnés en équivalents hexose. Cette méthode permet d'obtenir un résultat indépendant de la nature des sucres en solution. Pour chaque échantillon, le dosage est réalisé en triplicat. Pour les prélèvements initiaux et finaux, le dosage est réalisé sur deux prélèvements indépendants.

Pour le dosage des sucres solubles, une aliquote de surnageant est décongelée. Pour le dosage des sucres totaux, une aliquote de la fraction totale est décongelée. Les échantillons sont centrifugés durant 15 min à 15000 tr/min puis dilués dans de l'eau ultra-pure.

Une solution d'anthrone dissous (2 g/L) dans de l'acide sulfurique à 95% est réalisée. 1 mL de l'échantillon à analyser est pipeté dans un tube en verre puis recouvert de 2 mL du réactif à l'anthrone. Une gamme étalon de six dilutions (0 à 100 mg/L) d'une solution mère de glucose est préparée dans les mêmes conditions. Après homogénéisation, les tubes sont incubés 20 minutes à 80°C et aussitôt placés dans un bac de glace pour stopper la réaction. Après retour à température ambiante, l'absorbance des échantillons et des étalons est mesurée par spectrophotométrie (Cary 3 UV-Visible, Palo Alto, Etats-Unis). La concentration des différents échantillons est obtenue grâce à la droite d'étalonnage. Les teneurs en glucides des fractions solubles en début et en fin de fermentation permettent de calculer un rendement en hydrogène en moles d'hydrogène produit par moles d'hydrogène consommé (mol/mol).

### 3.1.4 Dosage de la DCO totale

Les analyses de la DCO totale des biomasses est réalisée à l'aide de tubes prédosés (Hanna Instruments). Pour chaque échantillon, le dosage est réalisé en triplicat. Un échantillon de matière sèche de biomasse est ajouté dans le tube. L'échantillon est digéré en présence de dichromate à 150°C pendant 2h. Tous les composants organiques oxydables réduisent les ions dichromates (orange) en ions chromiques (verts). La quantité de DCO dans les échantillons est déterminée par dosage spectrophotométrique ( $\lambda=280$  nm). Les résultats sont donnés en  $g_{DCO}/kg$ .

## 3.2 Analyse des gaz produits en bioréacteur

Les analyses des gaz produits sont réalisées grâce à un microchromatographe en phase gazeuse ( $\mu$ -GC) M200 (Agilent Technologies) et un T-3000 (SRA Instruments). Les deux  $\mu$ GC sont équipés de deux modules et détecteurs de conductivité thermique (TCD). Ces modules

comportent une colonne à tamis moléculaire de 0,5 nm (10 m x 0,32 mm, 30 mm) et une colonne PoraPLOT U (8 m x 0,32 mm, 10 µm) pour la séparation des gaz N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Une membrane gaz/liquide est placée en amont du µGC-TCD afin de retenir toutes les phases condensées. Une série de 3 analyses de 75 s est réalisée toutes les 10 min durant la fermentation.

### 3.3 Analyse des acides gras volatils (AGV) produits en bioréacteur par HPLC-UV et des glucides solubles par HPLC-RI

Les AGV et les glucides solubles sont analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) couplée à un détecteur UV ( $\lambda = 210$  nm) et à un détecteur mesurant l'indice de réfraction (RID). Les surnageants échantillonnés sont centrifugés durant 15 min à 15 000 tr/min puis filtrés à 0,2 µm. Un volume de 20 µL est injecté dans une colonne chromatographique Agilent HiPlex-H (7,7 m x 300 mm, 8 µm) précédée d'une colonne de garde Hiplax H (7,5 m x 50 mm x 8 µm) placée dans un four à 65°C et traversée par une phase mobile avec un débit de 0,4 mL/min, en élution isocratique d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM. Pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée en duplicat.

Une droite d'étalonnage des composés majoritairement présents sur les chromatogrammes obtenus (citrate, pyruvate, succinate, lactate, formiate, tartrate, acétate, propionate, butyrate, valérate, isovalérate, glucose, fructose, arabinose) est réalisée afin de pouvoir calculer leurs concentrations dans les échantillons.

### 3.4 Analyse des alcools produits en bioréacteur par GC-FID

L'analyse des alcools est réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (7890A GC, Agilent Technologies) et d'un injecteur automatique. La colonne chromatographique, *HP-INNOWax* (30 m x 0,250 mm, 0,50 µm) (Agilent Technologies), comporte une phase stationnaire en polyéthylène glycol et est spécifique à l'analyse des alcools. De l'hélium à un débit de 0,6 mL/min est utilisé comme gaz vecteur. Les surnageants échantillonnés sont centrifugés durant 15 min à 15 000 tr/min puis filtrés à 0,2 µm. Le volume d'injection est 0,5 µL en mode split 1:200. Le programme de température du four comporte un plateau de 4 min à 45°C suivi d'une rampe de 10°C/min jusqu'à atteindre 200°C. Le temps d'analyse est ainsi fixé à 23,5 min. Pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée quatre fois.

Une droite d'étalonnage des composés majoritairement présents sur les chromatogrammes obtenus (éthanol, butanol, propan-1-ol) est réalisée afin de pouvoir calculer leurs concentrations dans les échantillons. Un étalon interne est utilisé (isopropanol).

### 3.5 Bilan de matière

Un bilan matière a été réalisé entre la composition organique soluble initiale et finale. Pour cela, les sucres, les métabolites et les gaz produits sont convertis en équivalent DCO (g éq. DCO/mol) grâce à la réaction d'oxydation de la matière organique (37) établie par Angelidaki et Sanders (2004).



### 3.6 Analyses microbiologiques

#### 3.6.1 Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'analyse MEB est sous-traitée au Centre d'Imagerie de l'IGBMC. Les échantillons de fibres et de flocs sont extraits du module membranaire et aussitôt placés dans un agent fixateur (tampon cacodylate 0,2M, H<sub>2</sub>O, tétraxyde d'osmium 4%(m/v) à l'obscurité à 4°C. Ils ont ensuite été déshydratée dans de l'éthanol à des concentrations croissantes (de 50% à l'éthanol absolu). La déshydratation est achevée par l'ajout d'hexaméthylidisilazane. Après évaporation du produit, l'échantillon est déposé sur un plot métallique recouvert de scotch carboné. Pour que l'échantillon réémette les électrons à l'intérieur de la chambre d'observation du microscope, celui-ci est recouvert d'une fine pellicule de palladium à l'aide d'un métalliseur pendant 6 minutes. L'observation est ensuite réalisée au MEB.

#### 3.6.2 Etudes de communautés bactériennes

##### 3.6.2.1 Extraction de l'ADN bactérien

Les extractions sont réalisées à partir de culots de centrifugation (4500 tr/min, 30 min) stockées à -20°C L'ADN génomique est extrait et purifié à l'Institut Botanique, UMR7156 Génétique Moléculaire Génomique Microbiologique, Département Micro-organismes, Génome Environnement, équipe Adaptation et Interactions microbiennes dans l'Environnement. en utilisant le kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. La concentration d'ADN génomique extrait est déterminée en utilisant le kit Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen).

##### 3.6.2.2 Séquençage

Le séquençage des séquences d'échantillons d'intérêt a été sous-traité à l'INRA Transfert Environnement à Narbonne à partir de l'ADN total extrait. Les régions variables V4-V5 des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S sont amplifiés par PCR grâce à des amorces spécifiques. Les échantillons sont séquencés avec le séquenceur MiSeq (Illumina). Le traitement bioinformatique

des séquences est réalisé par l'INRA transfert. L'identification des espèces bactériennes est réalisée au laboratoire en utilisant le logiciel en ligne NCBI Nucleotide Blast et la base de données *16S ribosomal RNA sequences*. Seules les séquences présentant un pourcentage de similarité supérieur à 97% sont considérées comme appartenant au même phylotype.

La diversité bactérienne est estimée via les indices de Shannon, de Simpson et ACE.

L'indice de diversité de Shannon estime la diversité des taxons contenus dans un échantillon environnemental, en tenant compte du nombre de séquences obtenues pour chaque taxon (Mouillot et Leprêtre, 1999). Plus sa valeur augmente, plus la population observée possède une diversité élevée.

L'indice de Simpson aussi appelé indice de dominance, tient compte du nombre de taxons observés et de la part de chaque taxon dans la population totale. Cet indice donne plus de poids aux taxons les plus représentés. Plusieurs indices de diversité sont déclinés à partir de cette définition. Celui utilisé dans cette étude rend compte de la probabilité de sélectionner aléatoirement deux séquences appartenant à deux OTU différents. Autrement dit, plus cette probabilité est élevée, plus la diversité de l'échantillon est élevée.

L'indice ACE (Abundance-based Coverage Estimator of species richness) est un indice de richesse, utilisée pour estimer le nombre d'espèces en utilisant le taux de couverture, qui est défini comme la somme des probabilités des espèces observées. La méthode ACE divise les fréquences observées en groupes abondants et rares. Les espèces abondantes sont celles avec plus de 10 individus dans l'échantillon, le reste représentant les espèces rares. Seule la présence ou l'absence d'espèces abondantes est considérée dans cette méthode (Kim *et al.*, 2017). Plus cet indice est élevé, plus le nombre d'espèces est élevé.

### 3.6.2.3 Analyse qPCR

La réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est une technique de biochimie permettant de mesurer la quantité d'ADN d'un échantillon, en mesurant la quantité d'amplicons (portions d'ADN) produite lors de la réaction.

L'analyse par qPCR été sous-traitée à l'INRA Transfert Environnement à Narbonne à partir de l'ADN total extrait comme précédemment décrit.

## 3.7 Analyse statistique multivariée des tests réalisés en bioréacteur semibatch

L'analyse statistique des données a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire d'HYdrologie et de GEochimie de Strasbourg (LHYGES) UMR CNRS/EOST 7517, Strasbourg.

L'analyse statistique multivariée a été réalisée avec le logiciel R (R Development Core Team, 2017) à partir de différentes matrices de données expérimentales (composition des biomasses, productions de métabolites, composition taxonomique des extraits d'ADN des tests à 24h).

### 3.7.1 Clustering

L'analyse par cluster décrit une classe de techniques dont l'objectif est de placer des objets dans des groupes (clusters). Les dissimilarités entre les objets dans ces groupes doivent être plus petites que celles entre les groupes. La définition d'un cluster varie, et les différentes techniques d'analyse de cluster peuvent approcher le problème de manières très différentes. L'analyse par classification hiérarchique peut être réalisée en utilisant une matrice « objet x objet » de dissimilarités ou distances. Son objectif est de trouver un bon, même si ce n'est le meilleur, regroupement d'objets basé sur les distances fournies de façon hiérarchique, d'abord en regroupant les objets avec les plus faibles dissimilarités avant de continuer.

La méthode de Ward détermine quels clusters et/ou entités individuelles rassembler en évaluant le « coût » de ce rassemblement contre une fonction objective (Ward, 1963). Les rassemblements avec les coûts minimaux sont réalisés à chaque étape de l'algorithme. Chaque rassemblement possible est évalué à chaque étape de l'algorithme et celui qui donne la plus petite augmentation des écarts-types est choisi. Ainsi, on agrège les individus qui font le moins varier l'inertie intra-classe.

### 3.7.2 Analyses multidimensionnelles

Afin de visualiser les dissimilarités entre les taxa bactériens associés à la production d'hydrogène et de métabolites et la composition des biomasses testées, différentes analyses multidimensionnelles (ACP, NMDS) sont menées sur une matrice de dissimilarité Bray-Curtis sur laquelle a été appliquée la transformée avec Hellinger (Legendre et Gallagher, 2001).

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode utilisée pour résumer, dans un espace de faibles dimensions, la variance d'un nuage de points multivariés. Ce faisant, cela fournit un aperçu des relations linéaires entre les objets et les variables.

Le positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) est une analyse indirecte qui produit une ordination. A l'inverse de l'ACP, qui cherche à représenter le maximum de variance du nuage de points, la NMDS essaie de représenter la dissimilarité deux à deux entre objets dans un espace à faible nombre de dimensions, c'est-à-dire que les données de distance originales sont remplacées par des rangs. Alors que l'information concernant la grandeur des distances entre objets est perdue, la méthode est robuste pour les données n'ayant pas une distribution identifiable.

Enfin, combiner les résultats d'une analyse de clustering hiérarchique avec une ordination, telle que celle produite à partir d'une analyse multidimensionnelle peut aider à valider des clusters potentiels en fournissant des perspectives alternatives sur les données.

## 4 Critères de performances

### 4.1 Paramètres issus de la modélisation selon l'équation de Gompertz modifiée

Avec les conditions de fermentation utilisées en réacteur semibatch, le profil de production cumulée d'hydrogène peut être modélisé efficacement avec l'équation de Gompertz modifiée (3):

$$H(t) = H_{\max} \cdot e^{-e^{-\frac{R_{\max}(\lambda-t).e}{H_{\max}}+1}} \quad (3)$$

Cette modélisation donne accès au maximum de production cumulée d'hydrogène  $H_{\max}$  ( $L_{H_2}/L_{\text{réacteur}}$ ), à la vitesse maximale de production  $R_{\max}$  ( $L_{H_2}/L_{\text{réacteur}}/h$ ) et au temps de latence  $\lambda$  (h).

### 4.2 Paramètres de production et de rendement

Le rendement de production d'hydrogène par mole de glucides initialement présents  $R_{H_2}$  ajouté est le rapport de la quantité d' $H_2$  produit et de la quantité de glucides initiaux dans le bioréacteur. Le résultat est donné en  $\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ .

Le rendement de production d' $H_2$  par mole de glucides consommés  $R_{H_2 \text{ consommé}}$  est le rapport de la quantité d' $H_2$  produit et de la différence de quantité de glucides initiaux et de la quantité de glucides dosés en fin de fermentation. Le résultat est donné en  $\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ .

La production  $P_{H_2}$  correspond au rapport de la quantité d' $H_2$  produit et du volume de travail (en L/L) et la production  $P'_{H_2}$  correspond au rapport de la quantité d' $H_2$  produit et de la masse ou du volume de biomasse ajoutée dans le bioréacteur (en L/kg ou L/L).

Le rapport molaire  $H_2/CO_2$  représente le rapport molaire de la quantité d' $H_2$  produit sur la quantité de  $CO_2$  produit.

## Chapitre III

# Robustesse et limites du procédé en BRM L/G sans ensemencement initial

## 1 Introduction

Le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène et la rétention des bactéries productrices d'hydrogène dans le milieu de culture sont deux paramètres essentiels du procédé de fermentation obscure. La plupart des études se concentrent sur un seul de ces paramètres.

L'extraction de l'hydrogène peut être réalisée sans action particulière (extraction libre), mais une extraction forcée favorise l'amélioration des performances de production d'hydrogène. Plusieurs stratégies de diminution de la pression partielle en hydrogène ont été étudiées (tableau 8) : utilisation d'un gaz de balayage (Mizuno *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2006 ; Clion, 2015 ; Bakonyi *et al.*, 2017), relâchement intermittent de pression (Gadamshetty *et al.*, 2009) ou légère dépression continue (Lee *et al.*, 2012 ; Clion, 2016), extraction membranaire liquide/gaz seule (Liang *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2010) ou combinée à l'utilisation un gaz de balayage (Clion, 2016).

Plusieurs études ont été réalisées avec un gaz de balayage inerte (azote) (Mizuno *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2006 ; Clion, 2015), pour lesquelles le rendement en hydrogène est amélioré de 23 à 88% et la productivité est multipliée par 2,6 à 3,7. Cependant, l'ajout d'une étape de séparation H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>/Ar augmente le coût énergétique du procédé. Ainsi, l'utilisation du CO<sub>2</sub> issu du procédé a également été envisagée, du fait de la séparation plus aisée du mélange H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Dans ce cas, une amélioration des performances de production d'hydrogène a également été constatée (Kim *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2012 ; Bakonyi *et al.*, 2017). L'étude de Bakonyi *et al.* (2017) montre notamment la mise en œuvre du bioréacteur avec une membrane de séparation gaz/gaz permettant de retenir le CO<sub>2</sub> produit et de le réintroduire dans le milieu réactionnel, avec une augmentation de la productivité de 25% en comparaison avec un CSTR.

Nasr *et al.* (2015) ont étudié l'effet de la séquestration du CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête sur les communautés microbiennes. Cette étude montre une augmentation du rendement hydrogène de 22%, ainsi qu'une augmentation de la quantité d'acétate produite, couplée à une diminution de la quantité de butyrate. Cependant, l'étude de Park *et al.*, (2005) est contradictoire avec ces résultats. Dans ces travaux, le retrait du CO<sub>2</sub> du ciel gazeux permet d'augmenter la production d'hydrogène.

Une diminution de la pression, même faible, dans le bioréacteur représentent un surcoût énergétique. Cette stratégie permet malgré tout une augmentation de 16% du rendement et 24% de la productivité (Clion, 2016) et de 8% du rendement et de la productivité en hydrogène (Lee *et al.*, 2012). Le relâchement intermittent de pression a également été testé (Gadamshetty *et al.*, 2009) et donne lieu à un gain de 8% du pourcentage d'hydrogène dans le biogaz par rapport à un fonctionnement avec extraction libre.

**Tableau 8 : Exemples de stratégies de diminution de la pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel**

Source de carbone	Inoculum	Réacteur	Stratégie	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	Référence
Glucose	Cultures mixtes	CSTR	Extraction libre	0,85	49,9**	Mizuno <i>et al.</i> , 2000
Glucose	Cultures mixtes	CSTR	Balayage N <sub>2</sub> (110 mL/min)	1,43 (+68%)	184 (x3,7)	
Glucose	Boues UASB	BRM	Membrane + vide	0,92	3 mmol/g <sub>vss</sub> /h	Liang <i>et al.</i> , 2002
Saccharose	Boues STEP	CSTR	Extraction libre	0,77	na	Kim <i>et al.</i> , 2006
Saccharose	Boues STEP	CSTR	Balayage biogaz produit (100 mL/min)	0,86 (+11%)	na	
Saccharose	Boues STEP	CSTR	Balayage N <sub>2</sub> (300 mL/min)	0,95 (+23%)	na	
Saccharose	Boues STEP	CSTR	Balayage CO <sub>2</sub> (300 mL/min)	1,68 (x2,2)	na	
Glucose +levure	na	Semibatch	Membrane	na	na	Zheng <i>et al.</i> , 2010
Déchets alim.	Déchets alim..	ASBR	Balayage CO <sub>2</sub>	2,72-3,18	77,5 à 90,4	Kim <i>et al.</i> , 2012
Sucrose	Boues STEP	CSTR	Pression réduite	1,74	409*	Lee <i>et al.</i> , 2012
Sucrose	Compost	Semibatch	Relâchement ponctuel de pression	2,15*	na	Gadamshetty <i>et al.</i> , 2009
Glucose	Boues STEP	Semibatch	Extraction libre	1,12	104	Clion, 2016
Glucose	Boues STEP	Semibatch	Balayage N <sub>2</sub>	2,11 (+88%)	268 (x2,6)	
Glucose	Boues STEP	Semibatch	Faible dépression	1,32 (+16%)	129 (+24%)	
Glucose	Boues STEP	BRM	Membrane	0,80-1,20 (+7%)	97-159 (+24%)	
Glucose	Boues STEP	BRM	Balayage CO <sub>2</sub> produit	-	370-383*	Bakonyi <i>et al.</i> , 2017

\*recalculé

\*\*calculé à partir de 4,3 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol saccharose

na : non analysé

L'utilisation d'une membrane perméable à l'hydrogène placée dans le milieu de culture a également été envisagée, afin de simuler le rôle des bactéries méthanogènes consommatrices d'hydrogène (Zheng *et al.*, 2010). La membrane doit ainsi avoir des propriétés de surface favorables à la colonisation par un biofilm, être mise en œuvre en conditions immergées et être perméable au flux d'hydrogène généré par le biofilm. L'étude de Zheng *et al.*, (2010) a montré la faisabilité de ce système. Le biogaz diffuse dans la lumière des fibres creuses et est retiré par une pompe à vide. Dans l'étude de Liang *et al.* (2002), l'utilisation d'une membrane de fibres creuses augmente le rendement en d'hydrogène de 9%. Si plus de fibres étaient utilisées, l'augmentation



de la surface de la membrane permettrait d'extraire plus d'hydrogène et de diminuer davantage la pression partielle en hydrogène.

Les contacteurs membranaires L/G à fibres creuses sur lesquelles se développent un biofilm ont été étudiés pour la production de carburants ou produits chimiques valorisables à partir de gaz de synthèse (mélange  $H_2/CO$ ), le gaz étant distribué par la membrane (Wang *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2013). La formation d'un biofilm à la surface des fibres creuses a été observée. Pour le traitement d'eaux usées, Fu *et al.* (2017) ont utilisé un module membranaire à fibres creuses pour la formation d'un biofilm, en diffusant du  $CH_4$  dans la lumière des fibres pour la dénitrification. Cette étude révèle une organisation des communautés bactériennes en deux couches/fonctions. Cette configuration a permis d'augmenter les performances du réacteur, par la sélection des espèces bactériennes (modifications par rapport à l'ensemencement) et la formation de granules microbiens.

Le lessivage des bactéries productrices d'hydrogène est un autre problème. Pour améliorer la rétention des bactéries productrices d'hydrogène dans le milieu réactionnel, diverses configurations de bioréacteurs à biomasse immobilisée ont été testées. Leur objectif commun est de découpler le temps de séjour des bactéries productrices d'hydrogène du TSH. Les cellules bactériennes, en présence d'un support, vont progressivement coloniser sa surface et former un biofilm. Le support ou les granules sont généralement disposés dans une colonne alimentée par le bas à l'aide d'une pompe, l'écoulement se faisant de façon ascensionnelle vers une sortie haute. L'inconvénient majeur de cette configuration est l'installation d'un gradient de pH et de nutriments. Park *et al.*, (2018b) ont mis en évidence la formation d'une membrane dynamique, c'est-à-dire d'un biofilm sur une membrane de microfiltration solide/liquide. De plus, l'extraction de l'hydrogène n'est pas optimisée.

Lors de travaux précédents au laboratoire, la faisabilité de la mise en œuvre en mode continu du procédé de fermentation obscure en bioréacteur membranaire en configuration liquide/gaz a été démontrée (Ernst *et al.*, 2015). Un module membranaire à fibres creuses est utilisé. L'objectif de ce dispositif est double : permettre l'extraction continue de l'hydrogène et du  $CO_2$  via la membrane constituée des fibres creuses et fournir un support pour le développement d'un biofilm producteur d'hydrogène. Le milieu fermentaire est mis en circulation dans la calandre du module, à l'extérieur des fibres creuses. Les gaz produits sont extraits en continu via les fibres creuses dans lesquelles circule un gaz de balayage, diminuant ainsi la pression partielle en hydrogène. Une séparation de type liquide/solide permettant d'éviter le lessivage des matières en suspension avec le renouvellement de la phase liquide est également partiellement réalisé par décantation dans le module membranaire. Ceci est permis par la géométrie du module, présentant un volume mort sous l'arrivée de liquide. Il s'agit de la seule étude en continu en application au procédé de fermentation obscure en bioréacteur membranaire. Les travaux de thèse de Clion (2016) révèlent que les productivités en BRM sont triplées en comparaison avec un CSTR. De

façon exploratoire, un test a montré la possibilité de mettre en fonctionnement le BRM sans aucun apport microbien externe après un premier ensemencement (Clion, 2016).

Les travaux présentés dans ce chapitre concernent le développement de ce procédé, avec plusieurs études exploratoires visant à améliorer le procédé et à enrichir les connaissances sur son fonctionnement. Afin de simplifier la mise en œuvre, ces tests seront réalisés avec une solution de substrat modèle (glucose et nutriments) ; la finalité de ces travaux étant de mettre en œuvre le système avec un substrat réel. La possibilité de la mise en œuvre sans réensemencement du module membranaire devra être validée. L'objectif est de déterminer si le fonctionnement du bioréacteur sur une longue période avec des arrêts, vidange et reprise de la production est possible sans réensemencement. Puis, diverses possibilités d'amélioration de l'extraction des gaz seront testées : optimisation du débit du gaz de balayage (azote), balayage sous  $\text{CO}_2$ , fonctionnement sans gaz de balayage. Une étude sur la répartition des espèces bactériennes au sein du module membranaire (effluent liquide, surface des fibres creuses, flocs) lors du régime pseudo-stable sera réalisée, dans le but d'identifier la localisation des bactéries productrices d'hydrogène. Les limites opératoires de fonctionnement du procédé en termes de temps de séjour hydraulique (TSH) et de débit d'alimentation en substrat (DAS) sont encore peu connues, ainsi que leur effet sur les performances de production d'hydrogène, le métabolisme et la composition de la culture bactérienne. Nous nous proposons donc d'étudier les corrélations entre ces deux facteurs (TSH et DAS) et les performances de production d'hydrogène.

## 2 Robustesse de la production sans ensemencement initial du module membranaire

Le principe des tests réalisés est présenté sur la figure 26. Le premier test sans réensemencement initial avec des boues de station d'épuration (STEP) traitées thermiquement a été réalisé lors de précédents travaux au laboratoire, 6 jours après le dernier ensemencement (BRM-6j\*) (Clion, 2016). Les tests suivants ont été réalisés dans des conditions similaires, 330, 365, 418 et 432 jours après le dernier réensemencement du module membranaire en début de test. Pour comparaison, les résultats de production du dernier test avec ensemencement initial du module membranaire (BRM-E\*) (Clion, 2016) sont rapportés. Le tableau 9 présente les conditions opératoires de ces tests.

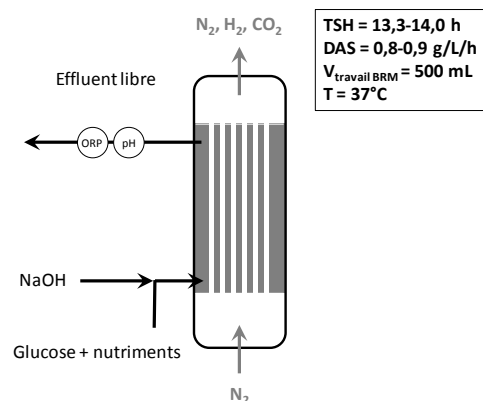


Figure 26 : Configuration des tests sans réensemencement initial

Tableau 9 : Conditions des tests suivant le dernier réensemencement du module membranaire

Test	Durée depuis dernier ensemencement (j)	TSH (h)	DAS (g/L/h)	Régime pseudo-stable
BRM-E*	0	11,0	1,1	de 26h à 68h
BRM-6j*	6	14,0	0,9	de 60 à 134 h
BRM-330j	330	13,7	0,8	de 36 à 96 h
BRM-365j	365	13,5	0,8	de 48 à 120 h
BRM-418j	418	14,0	0,8	de 30 à 96 h
BRM-432j	432	13,3	0,8	de 30 à 68 h

\*données issues des travaux de thèse de Clion, 2016

Dans cette partie, les productions d'hydrogène et de métabolites seront présentées. Les compositions des consortia bactériens présents à  $t = 68\text{h}$  dans l'effluent liquide du BRM ensemencé en début de test (BRM-E) et de BRM-418j seront comparées.

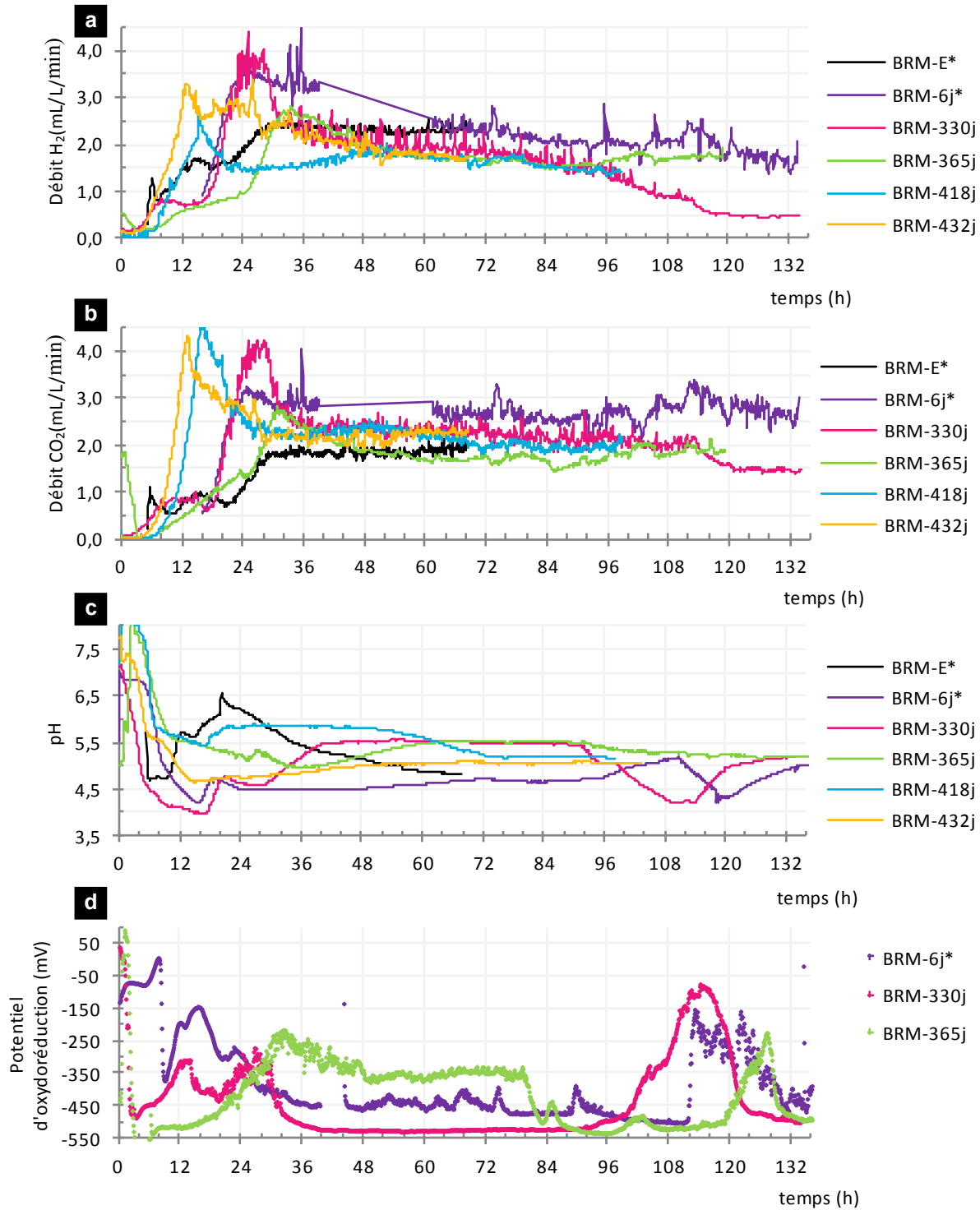
## 2.1 Production d'hydrogène

La figure 27 présente les débits de production d'hydrogène (a) et de dioxyde de carbone (b), ainsi que les suivis du pH (c) et du potentiel d'oxydoréduction (d) au niveau de l'effluent du module membranaire.

Le temps de latence (<6 h) est suivi d'une augmentation exponentielle de la productivité jusqu'à un maximum (2,5-4,0 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min), puis d'une baisse de la productivité jusqu'à la mise en place d'un régime pseudo-stable, hormis pour le test correspondant à BRM-E\*. Lors de cette dernière phase, la productivité tend à décroître pour tous les tests, sauf pour BRM-365j.

Le maximum de productivité est variable ; il a lieu vers 24 h et oscille entre 2,5 et 4,0 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/h. Pour BRM-418j et BRM-432j, le maximum de productivité est atteint 12 h plus tôt que pour les autres tests et est respectivement de 2,5 et 3,0 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min. Lors du régime pseudo-stable, pour BRM-6j\*, la productivité décline légèrement de  $t = 24\text{ h}$  à  $t = 38\text{ h}$ . De  $t = 38\text{ h}$  à  $t = 62\text{ h}$ , la productivité a baissé de 3,0 à 2,5 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min. Les productivités des tests BRM-330j, BRM-365j et BRM-432j sont proches (2,5 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min) à  $t = 30\text{ h}$  et décroissent à 1,7 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min jusqu'à  $t = 100\text{ h}$ . La productivité du test BRM-418j, augmente de 1,5 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min à  $t = 24\text{ h}$  pour atteindre 2,0 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/min à  $t = 54\text{ h}$ , rejoignant ainsi la productivité des autres tests (figure 27b), si ce n'est que la productivité reste plus stable au cours de la phase pseudo-stable.

Les valeurs de pH (figure 27c) et de potentiel d'oxydoréduction (figure 27d) en sortie liquide du BRM sont dans les gammes favorisant le développement de bactéries acidogènes. Au début du test, les variations observées pourraient résulter de l'adaptation des microorganismes à leur nouvel environnement de culture. Dans l'étude de Lin *et al.*, (2017), des valeurs moyennes comprises entre -450 et -480 mV sont observées. Dans cette étude, des fluctuations de potentiel d'oxydoréduction ont été observées lors de la survenue de coupures de l'alimentation.



\*données issues de la thèse de Clion, 2016

**Figure 27 : Production d'hydrogène, lors du dernier ensemencement et de 6 jours à 432 jours après le dernier ensemencement du module membranaire. Débits d'hydrogène (a), débits de CO<sub>2</sub> (b), pH (c), potentiel d'oxydoréduction (d). Pour les tests BRM-E\*, BRM-418j et BRM-432j, le potentiel d'oxydoréduction n'a pas été enregistré.**

Les performances de production d'hydrogène des différents tests (rendement en hydrogène par rapport à la quantité de glucose ajoutée et consommée  $R_{H_2}$ , productivité  $P_{H_2}$  et rapport molaire

H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sont présentées dans le tableau 10. Les calculs ont été effectués sur les périodes pseudo-stables de la production d'hydrogène (cf tableau 9).

**Tableau 10 : Consommation du substrat, rendement en hydrogène par rapport à la quantité de glucose ajoutée (glucose ajouté) et à la quantité de glucose consommée (glucose conso.), productivité en hydrogène, rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, en fonction du temps écoulé depuis le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP traitées thermiquement**

Test	Conso. glucose (%)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol) (glucose ajouté)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol) (glucose conso.)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	pH moyen	Potentiel redox moyen (mV)
BRM-E*	60	1,09	1,81	153,0	1,27	5,2	na
BRM-6j*	99	1,41	1,44	179,0	0,83	4,7	-417
BRM-330j	100	1,08	1,08	112,9	1,08	5,5	-520
BRM-365j	100	0,95	0,95	102,0	0,97	5,4	-535
BRM-418j	100	0,90	0,90	98,8	0,77	5,5	na
BRM-432j	98	1,07	1,13	118,6	0,90	5,0	na
Moy. >330 j sans ensemencement	99 ± 0	1,00 ± 0,08	1,02 ± 0,09	108,1 ± 8,0	0,93 ± 0,11	5,4	-528

\*données issues de la thèse de Clion, 2016

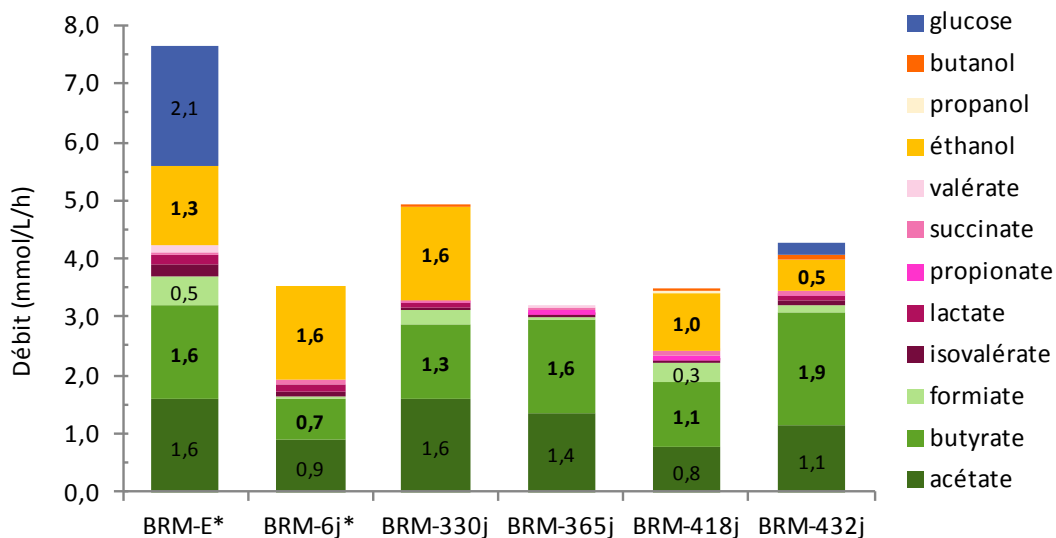
\*\*na = non analysé

La consommation du glucose est globalement très élevée et similaire (≈99%) pour tous les tests, hormis pour le test BRM-E\*, pour lequel la consommation est plus faible (60%), expliqué par un TSH plus faible et un DAS plus élevé ou par la spécificité de ce test correspondant à l'ensemencement avec une mise en culture particulière de l'*inoculum*. Les valeurs de rendement et de productivité sont plus élevés pour BRM-6j que pour les tests suivants (1,41 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub> ajouté contre 1,00 ± 0,08 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub> ajouté et 179 mL/L/h contre 108,1 ± 8,0 mL/L/h). Le rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> est comparable pour tous les tests. Pour les deux tests réalisés après BRM-6j, le rendement, la productivité en hydrogène et le rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sont proches et ne semblent pas évoluer au cours du temps.

*Ainsi, on note une légère baisse des performances de production d'hydrogène en BRM entre 6 jours et 330 jours après le dernier ensemencement du module membranaire. De 330 jours à 432 jours, les performances de production d'hydrogène sont stables. Les valeurs moyennes en période pseudo-stable de ces tests serviront de point de référence pour les tests suivants.*

## 2.2 Production de métabolites

La figure 28 présente une comparaison des valeurs moyennes des métabolites produits et analysés lors du régime pseudo-stable (cf tableau 9) de fonctionnement des différents tests.



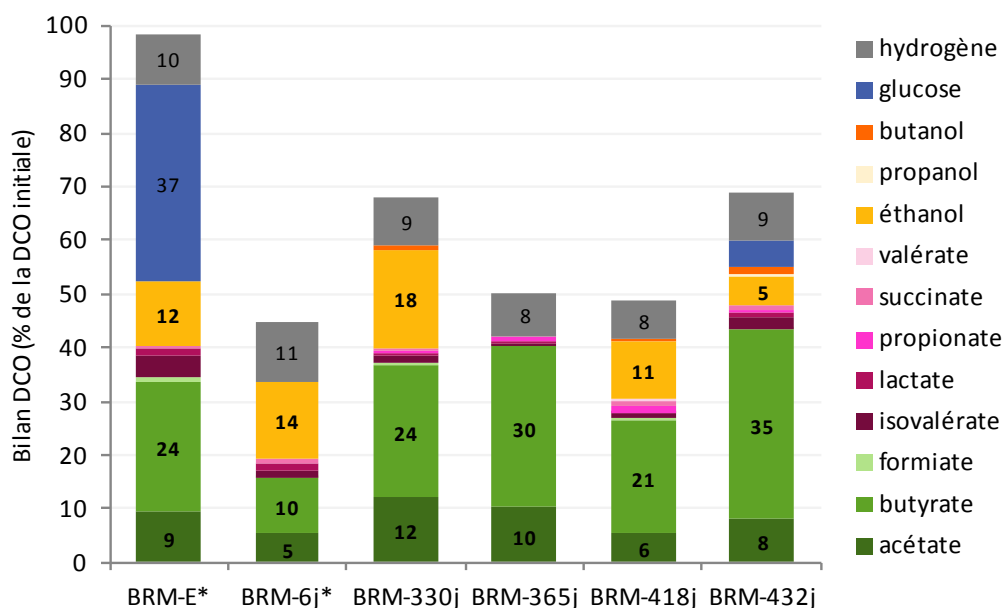
*\*données issues de la thèse de Clion, 2016*

**Figure 28 : Comparaison du débit de production des métabolites lors du régime pseudo-stable des tests de production d'hydrogène en BRM en fonction du temps écoulé depuis le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP. Pour BRM-365j, l'éthanol n'a pas été analysé.**

La consommation du glucose est totale ou quasi-totale pour tous les tests sans réensemencement. Les profils de distribution des métabolites sont proches en termes de natures de métabolites produits : l'acétate (0,8-1,6 mmol/L/h), le butyrate (0,7-1,9 mmol/L/h) et l'éthanol (0,5-1,6 mmol/L/h) sont les métabolites majoritaires. Ces métabolites sont associés à la production d'hydrogène dans le cadre d'une production mixte acétate-butyrates ou acétate-éthanol. Du formiate est également produit lors des tests BRM-E\*, BRM-330j et BRM-418j (<0,5 mmol/L/h). Notons que le formiate produit représente une réserve de production d'hydrogène non exploitée puisqu'il peut également être transformé en hydrogène et dioxyde de carbone en cours de fermentation. D'autres métabolites, non associés à la production d'hydrogène (isovalérate, lactate, propionate, succinate) sont également produits, mais en très faibles quantités (<0,1 mmol/L/h).

Si l'on écarte le test BRM-365j, la productivité en éthanol semble diminuer avec l'augmentation de la durée de fonctionnement du BRM écoulée depuis le dernier ensemencement du module membranaire. Sur cette même période, notons que le rapport butyrate/acétate (B/A) tend à augmenter. Il semble donc qu'il y ait un transfert d'un métabolisme acétate-éthanol vers un métabolisme acétate-butyrates.

La figure 29 présente une comparaison des bilans DCO, effectués entre le glucose ajouté en alimentation et les métabolites produits et analysés lors du régime pseudo-stable de fonctionnement des différents tests.



\*données issues de la thèse de Clion, 2016

Figure 29 : Comparaison des bilans DCO lors du régime pseudo-stable des tests de production d'hydrogène en BRM en fonction du temps écoulé depuis le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP. Pour BRM-365j, l'éthanol n'a pas été analysé.

Seul le bilan du test BRM-E\* est complet et correspond à celui pour lequel la consommation de glucose n'est pas totale. Les autres bilans DCO sont globalement incomplets (45-69%). Une part du bilan manquante peut être liée à la croissance de la biomasse bactérienne (multiplication cellulaire, synthèse de polymères extracellulaires). De plus, tous les pics HPLC et GC-FID ne sont pas identifiés. D'autre part, la transformation d'une partie du glucose en milieu basique peut mener à la production d'acide gluconique. En effet, l'arrivée de la soude sur le circuit de l'alimentation en substrat peut potentiellement induire un tel effet.

### 2.3 Analyse microbiologique : comparaison des *consortia* bactérien des tests BRM-E\* et BRM-418j

Des échantillons de l'effluent prélevés à 68h pendant les tests de fermentation en BRM fraîchement ensemencé par l'*inoculum* provenant de boues de STEP (BRM-E) et le test BRM-418j ont été analysés par séquençage Illumina à haut débit.

Le nombre d'OTU de l'échantillon BRM-418j est inférieur à celui de l'échantillon BRM-E\* (tableau 11). Les indices de Simpson sont faibles pour les deux tests, ce qui est révélateur d'une forte diversité bactérienne dans les deux échantillons. Cette diversité est extrêmement marquée pour l'échantillon BRM-E\*, l'indice de Simpson étant presque nul. Ainsi, la diversité bactérienne a diminué avec le fonctionnement du bioréacteur sans réensemencement.

Tableau 11 : Paramètres des échantillons analysés par séquençage, tests BRM-E\* et le BRM-418j, à t=68h

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson
BRM-418j	100	0,20
BRM-E*	880	0,03

\*données issues de la thèse de Clion, 2016

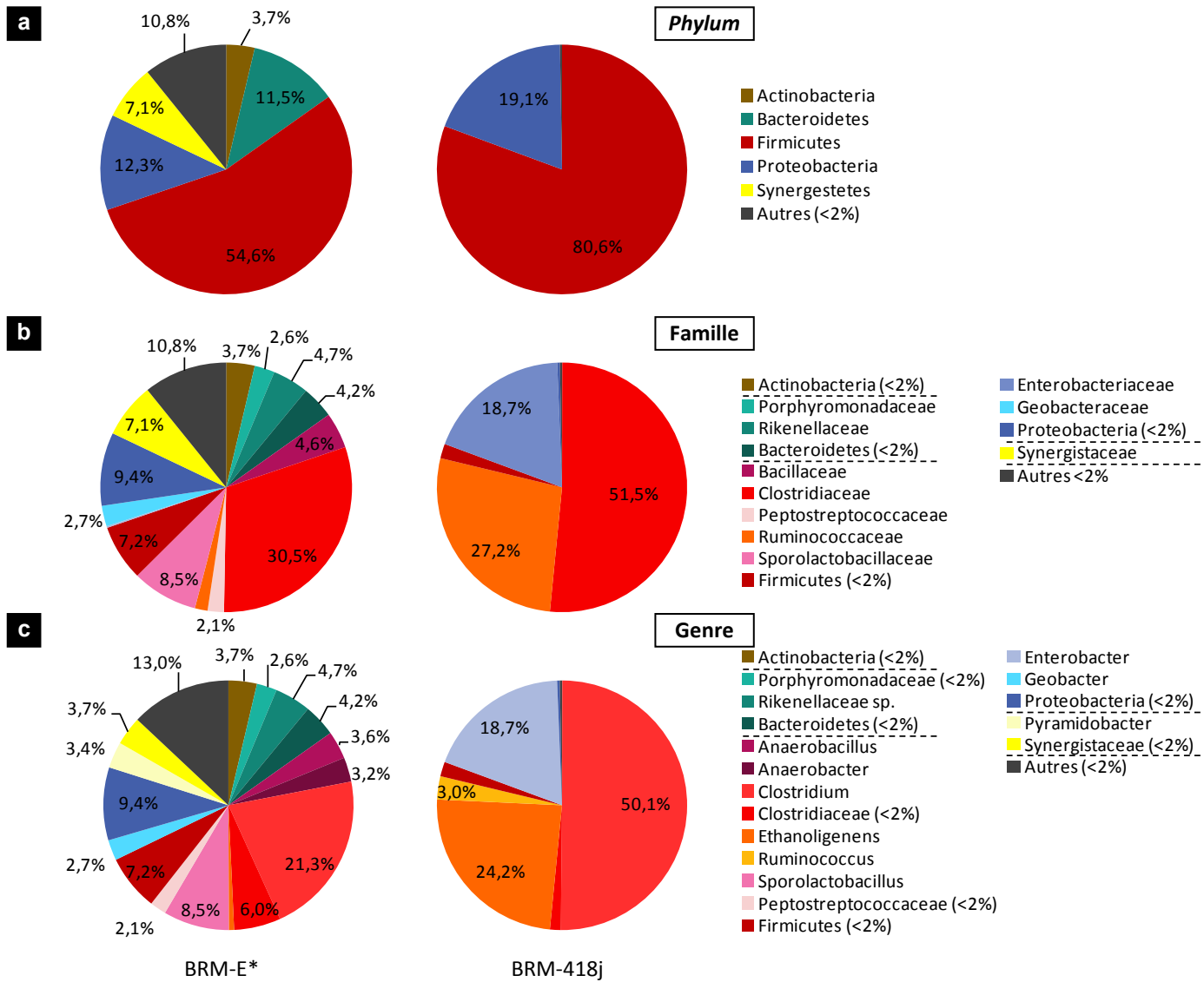
La figure 30 présente la répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) des échantillons d'effluent des deux tests de fermentation en BRM fraîchement inoculé ou non.

Pour les deux tests, une prédominance du *phylum Firmicutes* est observée (figure 30a), mais avec une présence nettement moins importante dans l'effluent de BRM-E\* (54,6%) que dans l'effluent de BRM-418j (80,6 %). On observe une diversité bactérienne beaucoup plus importante dans le BRM-E\* par rapport au BRM-418j avec en particulier la présence des *phyla Actinobacteria* (3,7%), *Bacteroidetes* (11,5%) et *Synergistetes* (7,1%). Le *phylum Proteobacteria* est légèrement plus abondant dans l'effluent de BRM-418j (19,1% contre 12,3%). La part d'autres *phyla* dont l'abondance est inférieure à 2% est beaucoup plus importante dans l'effluent du test BRM-E.

Dans l'effluent du test BRM-E\*, le *phylum Firmicutes* est plus diversifié, avec la présence des familles *Peptostreptococcaceae* et *Sporolactobacillaceae*, absentes de l'effluent du test BRM-418j (figure 30a et figure 30b). Pour les deux échantillons, les *Clostridiaceae* représentent la plus grande proportion (30,5% pour BRM-E\* et 51,5% pour BRM-418j). La même tendance est retrouvée pour les familles des autres *phyla*. Notons que les *Enterobacteriaceae* sont présentes en proportion importante (18,7%) uniquement dans l'échantillon du BRM-418j. Les *Ruminococcaceae* sont présentes en proportions plus importante (+25%) dans le test BRM-418j, de même que les *Clostridiaceae* (+21,5%).

Ainsi, le fonctionnement sans réensemencement entraîne un raffinement de la composition bactérienne du milieu réactionnel. En effet, la diversité au niveau du genre est nettement plus faible dans l'effluent de BRM-418j (figure 30c). *Clostridium* est présent en proportion importante, avec 21,3% dans l'effluent de BRM-E\* et 50,1% dans l'effluent de BRM-418j. *Ethanoligenens* (24,2%), *Enterobacter* (18,7%) et *Ruminococcus* (3%) sont présents en proportions significatives alors qu'ils ne sont présents qu'en très faibles proportions dans l'effluent de BRM-E\*.





\*Données issues de Clion (2016)

Figure 30 : Répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation des tests BRM-E\* et BRM-418j à t = 68 h- Abondance >2% pour au moins un échantillon

La plupart des études rapportent que les producteurs d'hydrogènes prédominants sont des genres *Clostridium* et *Enterobacter* (Hung *et al.*, 2011b ; Cabrol *et al.*, 2017) et l'association *Clostridium-Enterobacter* a été observée dans plusieurs études (Koskinen *et al.*, 2007; Maintinguer *et al.*, 2008). Comme relevé par l'étude de Tolvanen *et al.* (2010), quand à la fois des anaérobies stricts et facultatifs coexistent en culture mixte, *Enterobacter* (présent après 400 jours sans réensemencement dans notre étude) contribue probablement à la production d'hydrogène, bien que n'étant pas le producteur majoritaire. Cependant, plusieurs travaux ont conclu que le rôle d'*Enterobacter* comme producteur d'hydrogène dans les fermentations avec des cultures mixtes n'était pas clair (Fang et Liu., 2002b; Hung *et al.*, 2011b). Son rôle pourrait-être de consommer l'oxygène du milieu en début de fermentation (Cabrol *et al.*, 2017).

*Ethanoligenens* est également un genre producteur d'hydrogène ayant la propriété de s'auto-agrégéer en phase de croissance exponentielle (Ren *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2008). *Ethanoligenens*, *Ruminococcus*, *Clostridium* sont connues pour leur capacité à former des agrégats cellulaires. Zoutberg *et al.* (1989) ont notamment rapporté la formation d'agrégats par une culture pure de *Clostridium butyricum* à de hautes concentrations en glucose comme seule source de carbone et d'énergie. *Clostridium pasteurianum* serait également promoteur de la formation de granules grâce à sa capacité à produire des exopolysaccharides (EPS) et à s'auto-agrégéer (Liang *et al.* 2010).

Des bactéries hydrolytiques peuvent également être des anaérobies stricts, comme rapporté pour *Ruminococcus*, connu pour son activité cellulolytique et lignolytique, trouvé en symbiose avec des bactéries productrices d'hydrogène manquant de cette capacité (Ueno *et al.* 2001; Motte *et al.* 2014). Cependant, dans notre cas, l'alimentation du BRM est un substrat simple (glucose) ; ainsi, *Ruminococcus* a sans doute une autre fonction que celle rapportée dans la littérature. Dans certains cas, le genre *Clostridium* lui-même n'est pas seulement utilisé pour sa capacité à produire de l'hydrogène mais aussi pour sa capacité hydrolytique. Par exemple, *C. acetobutylicum*, ayant l'aptitude de dégrader la cellulose, a été utilisé en co-culture avec la productrice d'hydrogène *E. harbinense*, inapte dégrader la cellulose mais pouvant consommer efficacement les sucres réducteurs pour la production d'hydrogène à partir de cellulose microcristalline (Wang *et al.* 2008).

Outre les bactéries participant de façon directe ou indirecte à la production d'hydrogène, on retrouve dans le test BRM-E\* seulement une espèce ayant un impact négatif sur la production d'hydrogène. En effet, Saraphirom et Reungsang (2011) ont rapporté que *Sporolactobacillus*, produit des bactériocines, qui peuvent avoir un effet négatif sur les bactéries productrices d'hydrogène. Elles pourraient ainsi être responsables des relativement faibles productions initiales en hydrogène observées pour ce test malgré au final de bonnes performances en régime pseudo-stable.

*En conclusion, la mise en fonctionnement du BRM non réensemencé favorise une diminution de la diversité bactérienne et l'émergence d'une majorité de bactéries productrices d'hydrogène (Clostridium, Enterobacter et Ethanoligenens). Cette population est composée d'anaérobies stricts (Clostridium, Ethanoligenens) et facultatif (Enterobacter).*

## 2.4 Discussion

Cette étude a été réalisée dans des mêmes conditions de fonctionnement similaires à celles du dernier test avec réensemencement effectué lors des travaux de Clion (2016). Elle montre que la production d'hydrogène sans réensemencement lors de la mise en fonctionnement du réacteur est possible. Les performances ont été maintenues au moins jusqu'à 432 jours après le dernier ensemencement du module membranaire, et ce malgré 8 mois d'arrêt complet du bioréacteur.

Puhulwella *et al.* (2014) ont étudié la mise en œuvre d'un bioréacteur de production d'hydrogène (bioréacteur à biofiltre à écoulement) ensemencé avec une culture pure (*Clostridium butyricum*). Après vidange complète du milieu liquide et ajout de substrat sans *inoculum*, les auteurs rapportent que des performances similaires à la mise en œuvre avec ensemencement du réacteur sont retrouvées. Néanmoins, les auteurs rapportent également des problèmes de contamination du bioréacteur, ce qui est difficilement décelable dans notre étude puisque nous travaillons en culture mixte avec une forte diversité bactérienne.

Pour l'ensemble des tests réalisés, les mêmes phases de fonctionnement sont observées : temps de latence, phase de croissance exponentielle jusqu'à un maximum de productivité suivie d'une chute des performances de production et mise en place d'un régime de fonctionnement pseudo-stable. Les performances de production d'hydrogène sont proches à partir de 330 jours de fonctionnement et au-delà sans réensemencement. Le procédé est donc répétable. On note que le régime pseudo-stable est maintenu tant que les variations du pH du milieu réactionnel ne sont pas trop importantes. En effet, le pH, régulé par l'ajout d'une solution de NaOH (pompe péristaltique sur le circuit de l'alimentation, a été ajusté manuellement pour les tests présentés dans cette étude. Les variations du pH et de potentiel d'oxydoréduction en résultant peuvent être un facteur du déclin des performances de production d'hydrogène. Lors de la montée en échelle du procédé, la régulation automatique de l'ajustement du pH pourra être mise en place.

De plus, selon la littérature, plusieurs autres paramètres de fonctionnement (TSH, DAS, concentration en glucose de la solution d'alimentation) ont un impact sur les performances de production et pourront être optimisés.

Le tableau 12 compare les performances de production d'hydrogène de notre procédé avec des études de la littérature en BRM.

**Tableau 12 : Comparaison des performances de bioréacteurs membranaires de production d'hydrogène par fermentation obscure avec extraction d'inhibiteurs de la fermentation obscure (hydrogène ou AGV) et découplage TSS/TSH**

Séparation	Membrane	T°C	pH	TSH (h)	DAS (g/L/h)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	Référence
L/G continu	Fibres creuses (PTFE)	37	4,5-5,5	14	0,8	1,0	108	Notre étude
S/L continu	Fibres creuses (PVDF)	23	5,5	8	0,9	1,8	187	Shen <i>et al.</i> , 2009
S/L continu	Membrane plane (PE)	35	5,5	9	2,7	0,86	101 – 107	Lee <i>et al.</i> , 2009
S/L semi-séquentiel	Fibres creuses (PVDF)	35	6,0	13	évalué à 5,0	1,6	751	Noblecourt <i>et al.</i> , 2017
L/L continu	Mailles de polyester	37	5,5-6	3	5	3,0	2141	Park <i>et al.</i> , 2017

Les productivités en hydrogène les plus élevées (>750 mL/L/h) sont obtenues pour les DAS les plus élevés (5 g/L/h) (Noblecourt *et al.*, 2017 ; Park *et al.*, 2017) des conditions opératoires des études présentées, et notamment de notre étude (1,0 g/L/h). Notons aussi que la mise en

œuvre du bioréacteur de l'étude de Noblecourt *et al.* (2017) dit continu séquentiel, est proche d'un fonctionnement semibatch, donc diffère de notre procédé. Les rendements et productivités de notre étude sont comparables à ceux de Lee *et al.* (2009) et se situent dans la gamme basse.

Une explication des faibles rendements ( $1,1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ ) est que de l'acétate peut avoir été produit par homoacétogénèse, acétogénèse, acidogénèse, ne coproduisant donc pas de l'hydrogène dans le cas de l'homoacétogénèse (Saady *et al.*, 2013) mais consommant le substrat, ce qui baisse le rendement. Notons toutefois que plus on s'éloigne du dernier ensemencement, plus le ratio B/A augmente et la quantité d'éthanol produite diminue. Il semble donc qu'il y ait un transfert progressif d'un métabolisme acétate-éthanol vers un métabolisme acétate-butyrate. Ce résultat est en accord avec les analyses microbiologiques montrant une augmentation des genres connus comme producteurs d'hydrogène (*Clostridium*, *Enterobacter*, *Ethanoligenens*).

Enfin, on observe une diminution de la diversité bactérienne dans le BRM non réensemencé en comparaison avec le BRM réensemencé en début de test. Ceci peut s'expliquer par le fait que certaines espèces se sont développées en majorité car elles étaient présentes en quantité importante dans les boues STEP et ont survécu au traitement thermique précédent l'ensemencement. Suite aux vidanges et rinçages du bioréacteur, la biocharge de l'ensemble des taxa (biofilm, granules) a été abaissée. Par la suite, les bactéries restant dans le BRM et pour lesquelles la pression de sélection engendrée par les conditions opératoires est positive se développent de façon majoritaire. Il est probable qu'un biofilm reste présent à la surface des fibres après les étapes de nettoyage. Le développement des espèces composant ce biofilm est alors favorisé lors du test suivant, car leur population est plus importante en début de test. L'analyse des communautés sur les fibres après rinçage du BRM permettrait de déterminer quelles espèces sont ainsi favorisées.

Dans le milieu réactionnel des tests BRM-E\* et BRM-418j, on retrouve des taxa connus pour avoir un ou plusieurs rôles annexes et favorisant la production d'hydrogène, dont Hung *et al.* (2011a) ont proposé une classification des bactéries : améliore la production d'hydrogène via la formation de granules/la rétention de la biomasse (*Ethanoligenens sp.*), maintient un environnement anaérobie par déplétion d'oxygène (*Enterobacter sp.*), augmente la production d'hydrogène par la lyse de substrats complexes (*Ruminococcus sp.*).

Ainsi, un fonctionnement sans réensemencement du bioréacteur membranaire permet de favoriser systématiquement la sélection d'un écosystème symbiotique ayant l'ensemble des rôles bénéfiques pour la production d'hydrogène. L'étape initiale de réensemencement du BRM peut alors être supprimée. L'avantage du système est de permettre une mise en œuvre et un arrêt simplifiés, par simple vidange, rinçage et remplissage du module membranaire.

*Ainsi, les avantages de la production d'hydrogène en BRM L/G sont multiples : il ne nécessite qu'un ensemencement unique, elle est répétable sur une longue période avec une mise en œuvre et un arrêt simplifiés, par simple vidange du module membranaire. De plus, les conditions opératoires du BRM fonctionnant sans réensemencement initial*

*permettent de sélectionner des espèces bactériennes connues pour leur rôle bénéfique lors de la production d'hydrogène par fermentation obscure.*

*L'intensification du procédé de production d'hydrogène dans ce bioréacteur est double : extraction des gaz in situ et immobilisation d'un biofilm producteur d'hydrogène, en fonctionnement et à l'arrêt. Ce biofilm est résistant à des vidanges et remises en route du bioréacteur successives. Le procédé est robuste mais il doit être optimisé : l'extraction des gaz d'une part et l'impact du couple TSH- DAS d'autre part vont être étudiés afin de stabiliser la production d'H<sub>2</sub> au cours du temps.*

### 3 Amélioration du procédé : mode d'extraction des gaz produits

L'objectif de cette partie est d'améliorer la stratégie d'extraction des gaz, afin de simplifier et d'améliorer le procédé de production d'hydrogène. Deux études sont présentées, avec les problématiques suivantes :

- Quel est l'effet du débit de gaz de balayage circulant dans les fibres sur l'extraction des gaz produits ? Dans quelle mesure l'augmentation de ce débit permettrait d'augmenter la productivité du procédé ?
- Afin de limiter voire d'éviter la dilution de l'hydrogène produit avec de l'azote, serait-il envisageable d'utiliser le CO<sub>2</sub> produit comme gaz de balayage, ou de ne pas utiliser de gaz de balayage ? Quel en sera l'impact sur le métabolisme bactérien et/ou sur les communautés bactériennes se développant dans le bioréacteur ?

#### 3.1 Effet du débit de gaz de balayage sur la production d'hydrogène

La figure 31a présente les profils de production d'hydrogène avec différents débits de gaz de balayage (azote) : 11,0 (débit de référence) ; 19,2 et 35,2 mL/min. Le gaz de balayage initial ayant été modifié vers 45h, la figure 31b présente un agrandissement au niveau de ce changement. Le tableau 13 présente les résultats de production correspondants. Les calculs ont été effectués sur les périodes pseudo stables de production d'hydrogène sur une première phase d'environ 30 à 47 h de temps de fermentation et sur une seconde phase de 47 h à 80 h.

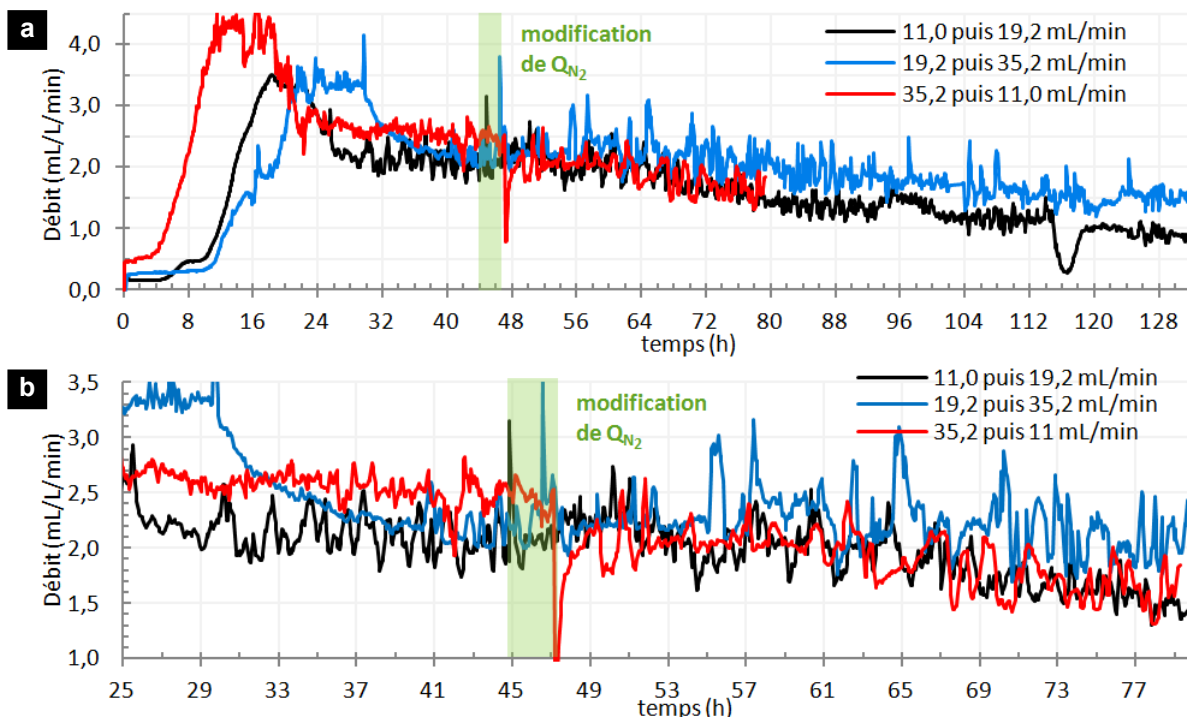


Figure 31 : Débits de production d’hydrogène en fonction de la variation du débit de gaz de balayage, tests complets de 0 à 132 h (a) et de 25 à 80 h (b)

Avant  $t = 45\text{h}$ , on observe une très légère amélioration de la productivité en hydrogène avec l’augmentation du débit de gaz de balayage (+8% lorsque le débit est doublé, +15% lorsqu’il est triplé). Cependant, lorsque le débit d’azote est multiplié par trois, la productivité en hydrogène augmente de façon moins importante. Après modification des débits de gaz de balayage, la productivité en hydrogène diminue graduellement au cours du temps pour l’ensemble des tests. Cependant, lorsque l’on double le débit d’azote de 11,0 à 19,2 mL/min, on constate une légère hausse de la productivité en hydrogène dans les 10 premières heures puis un fléchissement. On observe la même tendance lorsque l’on modifie le débit de 19,2 à 35,2 mL/min avec cependant un maintien du débit de production d’hydrogène sur une plus longue durée alors que diviser le débit d’azote par 3 induit clairement une baisse de la productivité dès les premières heures. Ainsi, les meilleures performances de production sont à nouveau obtenues avec le test réalisé avec le débit de gaz de balayage le plus élevé, mais l’effet d’augmentation du gaz de balayage reste faible (Tableau 13).

Tableau 13: Performances de production d'hydrogène avec différents débits de gaz de balayage

Test	Phase étudiée	Débit (mL/L/min)	R <sub>H<sub>2</sub> ajout</sub> (mol/mol)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
BRM-336j	35-45h	11,0	1,27	133,7	1,0
BRM-342j	30-47h	19,2	1,38	144,2	1,0
BRM-348j	25-47h	35,2	1,46	153,5	1,1
BRM-336j	45-80h	19,2	1,09	114,6	0,8
BRM-342j	47-80h	35,2	1,28	133,9	0,8
BRM-348j	47-80h	11,0	1,08	113,8	0,9

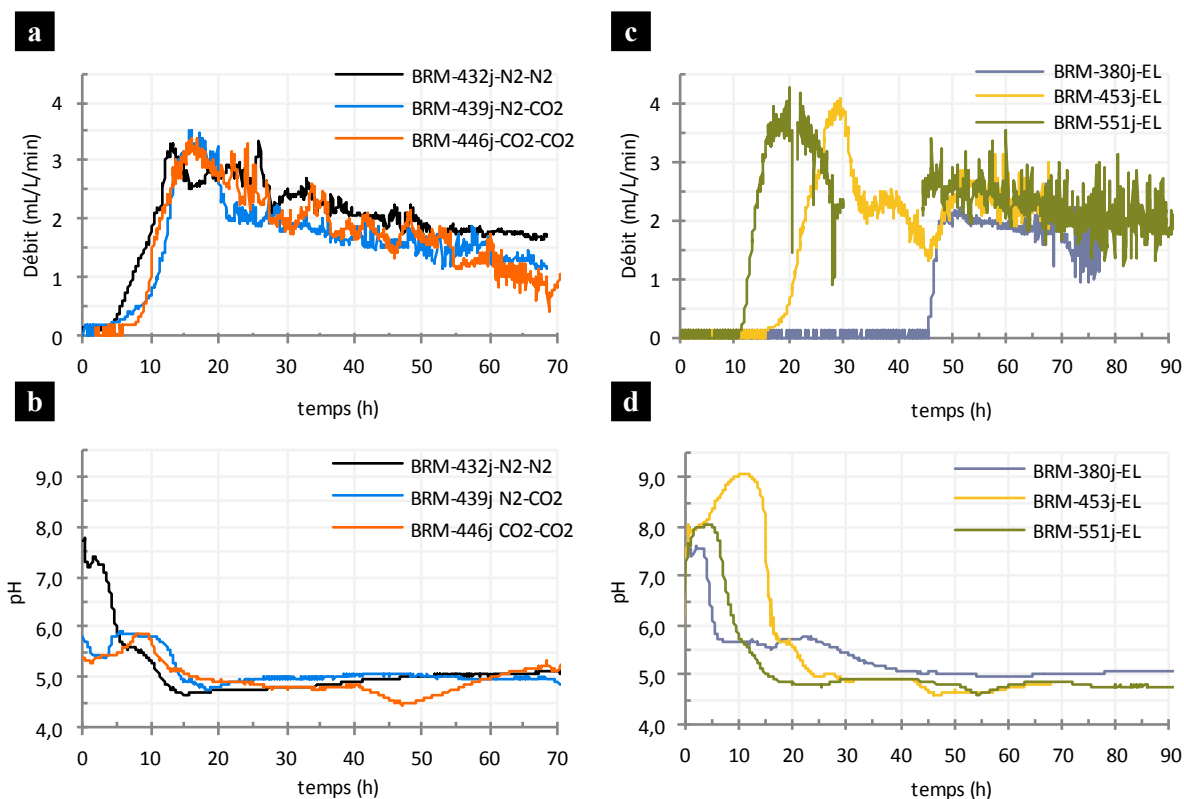
Ainsi, le rendement en hydrogène par rapport à la quantité d'hexose ajoutée et la productivité en  $H_2$  sont légèrement améliorés avec l'augmentation du débit de gaz de balayage, potentiellement parce que l'extraction d'hydrogène y est plus efficace sans pour autant modifier drastiquement les performances de production d'hydrogène. Le rapport  $H_2/CO_2$  reste équivalent pour toutes les conditions testées.

*L'effet de l'augmentation du gaz de balayage est sur les performances de production d'hydrogène est faible et entraîne l'augmentation de la dilution de l'hydrogène produit. Il est donc préférable que le BRM soit mis en œuvre avec un débit de gaz de balayage le plus faible possible.*

## 3.2 Effets de la nature du gaz de balayage ( $N_2$ ou $CO_2$ ) et de l'extraction libre des gaz produits

### 3.2.1 Production de gaz

La figure 32 présente les profils de production d'hydrogène de tests mis en œuvre avec un gaz de balayage ( $N_2$  ou  $CO_2$ ) circulant dans la lumière des fibres du module membranaire à un débit de 11 mL/min ou avec une extraction libre (EL). Le temps de séjour hydraulique (TSH) et le débit d'alimentation en substrat (DAS) sont fixés pour toutes les expériences respectivement à 13 h et 0,8 g/L/h. Le mode de dégazage de la solution d'alimentation a été également testé : avec dégazage de la solution d'alimentation avec du  $N_2$  (BRM- $N_2$ - $N_2$  et BRM- $N_2$ - $CO_2$ ) ou du  $CO_2$  (BRM- $CO_2$ - $CO_2$ ). Les profils de production d'hydrogène, l'évolution du pH de l'effluent et du potentiel d'oxydoréduction, sont présentés. Seul le profil de production d' $H_2$  est présenté car la production de  $CO_2$  n'a pas pu être quantifiée pour les tests où le  $CO_2$  est utilisé comme gaz de balayage, l'étalonnage de l'analyseur n'étant pas adapté aux fortes concentrations en  $CO_2$  ; la distinction entre gaz produit et gaz de balayage ne peut être faite dans ces conditions. Par conséquent, le rapport  $H_2/CO_2$  n'a pas été calculé pour les expériences avec du  $CO_2$  comme gaz de balayage.



**Figure 32 : Profil de production avec différents gaz de balayage (a) et suivi des pH correspondants (b), sans gaz de balayage (c) et suivi des pH correspondants (d)**

Les profils de production en hydrogène sont relativement proches pour les deux modes de balayage (N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) du module membranaire et pour le dégazage de la solution de substrat (N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>) (figure 32a). Le temps de latence est du même ordre de grandeur (4-6 h). Une phase d'augmentation exponentielle de la production est observée de t = 4-6h à t = 13-17 h. A l'issue de cette période, un maximum de productivité est atteint (3,5 mL/L/min). Le test avec un balayage à l'azote est celui pour lequel la productivité en hydrogène décline le moins vite pour se stabiliser vers 1,8 mL/L/min ; on peut cependant remarquer une légère diminution du débit pour les tests faisant intervenir du CO<sub>2</sub> en gaz de balayage et/ou pour le dégazage de la solution de substrat.

Plusieurs phases sont également observées pour la production d'hydrogène pour les tests sans gaz de balayage (extraction libre : EL) (figure 32c) : une période de latence, une phase d'augmentation exponentielle de la production (variant de 4 à 24 h) un pic de production (présent pour les tests à 453 et 551 j après l'ensemencement initial et absent pour le premier test réalisé sans gaz de balayage à 380 jours) et une période de production stable avec un débit d'hydrogène produit de l'ordre de 2-2,5 mL/L/min.

La variation la plus importante porte sur le temps de latence, variant de 12 à 44 h. Plus la durée du dernier ensemencement du module augmente, plus le temps de latence diminue sans lien apparent de cause à effet. On observe cependant que la production d'hydrogène analysée est la plus importante au démarrage de l'essai pour le test avec le temps de latence le plus faible (BRM-551j-EL) et que lors du régime pseudo-stable, le test avec le temps de latence le plus long (BRM-



380j-EL) est celui dont la productivité en hydrogène est la plus faible. Notons que comme il n'y a pas de gaz de balayage, la pression dans le réacteur côté calandre doit être suffisamment élevée pour instaurer une différence de pression transmembranaire permettant le passage des gaz produits. Ceci est sans doute à l'origine des variations de mise en place du régime permanent, en comparaison avec les tests avec le balayage d'un gaz vecteur pour lesquels ces fluctuations ne sont pas observées.

Pour l'ensemble des tests, le pH de l'effluent se stabilise entre 4,5-5,2 à partir de 10-20 h de production. Notons une variation du pH à 40 h pour le test avec balayage et dégazage au CO<sub>2</sub> (BRM-446j-CO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>), inhérente à la régulation du pH (figure 32b et figure 32d). La forte croissance du pH (jusqu'à 9) du test BRM-453j-EL peut potentiellement expliquer le décalage du temps de latence avec le test BRM-551j-EL. Pour les tests où le module est balayé avec du CO<sub>2</sub>, le pH initial est plus faible (5,2-5,9) que pour le test où l'azote est utilisé comme gaz de balayage (figure 32b) montrant que du CO<sub>2</sub> passe certainement au travers des fibres creuses au démarrage, acidifiant le milieu réactionnel.

Le tableau 14 présente les résultats de production correspondants.

**Tableau 14 : Performances de production avec balayage N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, dégazage N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et extraction libre**

test	Balayage	Dégazage	$\lambda$ (h)	Phase étudiée (h)	Conso gluc (%)	R <sub>H<sub>2</sub> ajout</sub> (mol/mol)	R <sub>H<sub>2</sub> cons</sub> (mol/mol)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
BRM-432j-N <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	4,6	30-68	97,7	1,07	1,10	118,6	0,9
BRM-439j-N <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	4,8	30-68	100	0,86	0,86	94,3	-
BRM-446j-CO <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	5,6	30-68	na*	1,16	na.	97,6	-
BRM-380j-EL	aucun	aucun	45,8	46-75h	na.	1,03	na.	98,7	1,05
BRM-453j-EL	aucun	aucun	15,5	35-70h	98,4	1,21	1,23	132,7	1,01
BRM-551j-EL	aucun	aucun	10,9	45-90h	100,0	1,29	1,29	153,0	1,03

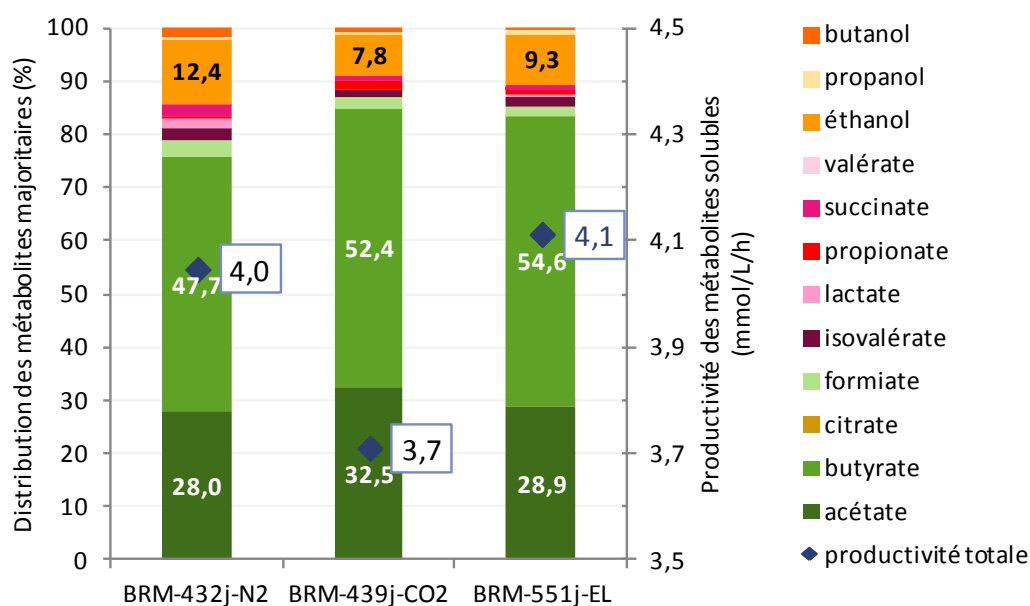
\*non analysé

Dans l'ensemble, la nature du gaz de balayage utilisé (N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>) impacte relativement peu les performances de production d'hydrogène, même si le balayage avec de l'azote permet de générer les rendements et productivités en hydrogène les plus élevés entre 30 et 68 h. Toutefois les valeurs de rendements et de productivités en hydrogène sont légèrement plus faibles avec un balayage au CO<sub>2</sub>, quel que soit le gaz utilisé pour le dégazage du substrat. Pour le dégazage du substrat avec du CO<sub>2</sub>, la variation de température entre le réservoir de substrat à 4°C et les conduites du BRM à température ambiante induit une libération de CO<sub>2</sub> gazeux (observation de bulles) dans le milieu liquide, augmentant le temps de séjour hydraulique à 17 h. De plus, le rendement en hydrogène par rapport à la quantité de glucose ajouté, la productivité et le rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sont respectivement 24 %, 38 % et 10% plus élevés avec une extraction libre des gaz produits qu'avec un balayage à l'azote. Ces résultats ne semblent pas corrélés avec la durée d'utilisation du BRM depuis le dernier ensemencement.

*En conclusion, le mode de balayage du module membranaire impacte peu les performances de production d'hydrogène, il semble même que l'absence de gaz de balayage permette d'obtenir de meilleures performances de production d'hydrogène, après un temps de latence plus important lié à l'instauration d'une différence de pression transmembranaire au niveau de la paroi des fibres creuses.*

### 3.2.2 Analyse métabolique

La production de métabolites est comparée sur la période de production stable (figure 33). Trois tests, représentatifs de la nature du gaz de balayage ( $N_2$  ou  $CO_2$ ), avec l'azote pour le dégazage du substrat et en extraction libre des gaz (BRM-432j- $N_2$ , BRM-439j- $CO_2$  et BRM-551j-EL) ont été sélectionnés ; la productivité totale moyenne en métabolites est également présentée.



**Figure 33 : Distribution des métabolites produits et productivité totale en métabolites pour les tests avec balayage à l'azote, au  $CO_2$ , ou avec une extraction libre des gaz**

Le débit de production totale de métabolites est comparable pour les tests BRM-432j- $N_2$  et BRM-551j-EL (4,0 et 4,1 mmol/L/h respectivement) alors qu'elle est légèrement plus faible pour le test BRM-439j- $CO_2$  (3,7 mmol/L/h). La distribution des métabolites solubles est proche pour les différents tests, avec une majorité de butyrate ( $\approx 50\%$ ), d'acétate ( $\approx 30\%$ ) et d'éthanol ( $\approx 10\%$ ). Les rapports B/A sont également proches : 1,7 pour le test BRM-432j- $N_2$ , 1,6 pour le test BRM-439j- $CO_2$  et légèrement plus élevé pour le test en extraction libre des gaz produits (BRM-551j-EL) à 1,9. On remarque de plus que la proportion d'éthanol est légèrement plus faible pour le test avec un balayage au  $CO_2$ . D'autres métabolites sont produits de façon minoritaire : butanol, propanol, succinate, propionate, lactate, isovalérate et formiate.

### 3.2.3 Analyse microbiologique

Des échantillons de l'effluent à 68 h de fermentation ont été prélevés pour les tests avec différentes extractions des gaz : balayage N<sub>2</sub> (BRM-432j-N<sub>2</sub>), balayage CO<sub>2</sub> (BRM-439j-CO<sub>2</sub>) et 53 h pour un des tests avec extraction libre des gaz (BRM-EL-551j). L'ADN des culots bactériens de ces échantillons a été extrait comme décrit précédemment et l'ADN codant l'ARN 16S a été analysé par séquençage Illumina à haut débit. Le tableau 15 présente les résultats de diversité du séquençage de ces échantillons.

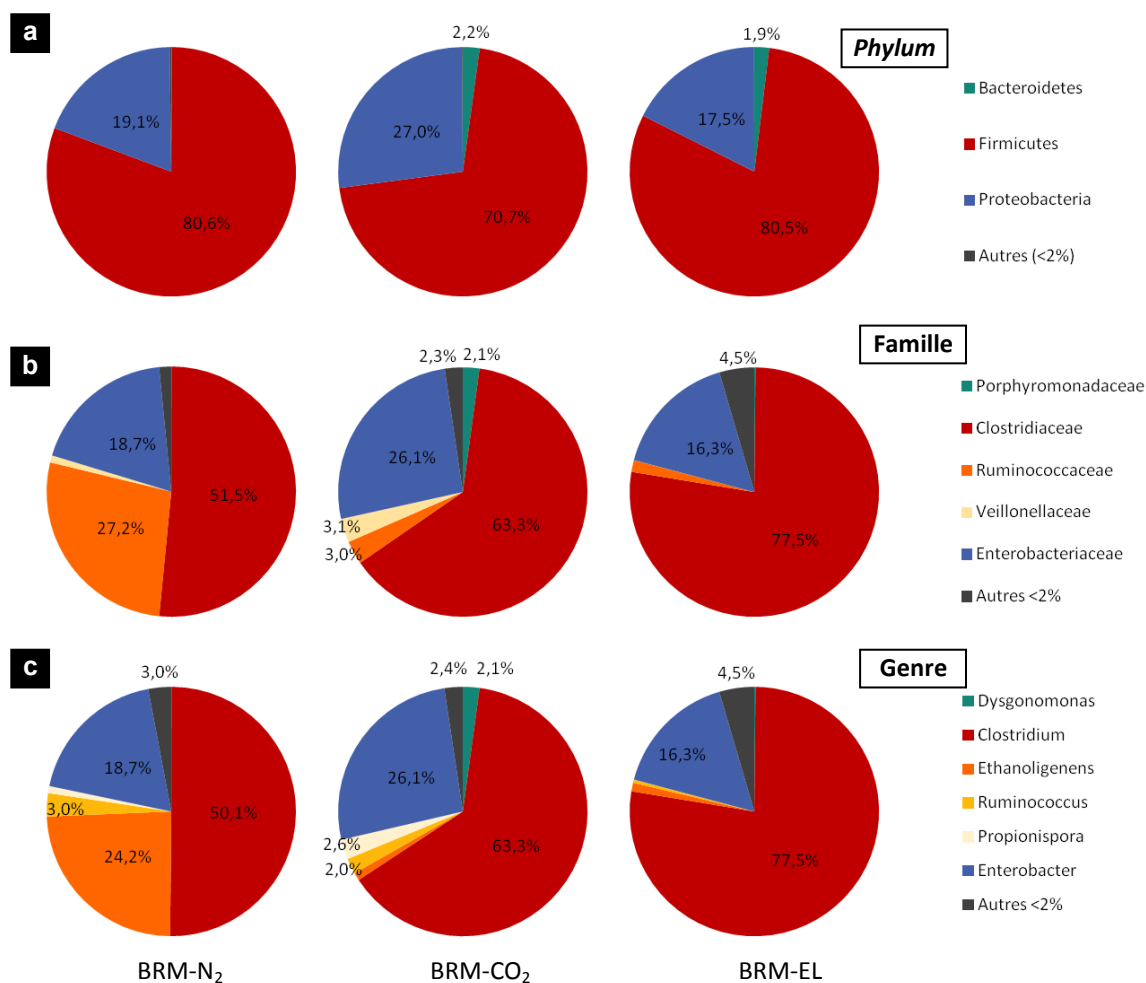
**Tableau 15: Diversité des échantillons analysés par séquençage, tests BRM-432j-N<sub>2</sub>, BRM-439j-CO<sub>2</sub>, BRM-551j-EL**

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson	Indice de Shannon	Indice ACE*
BRM-432j-N <sub>2</sub>	100	0,20	1,93	106,5
BRM-439j-CO <sub>2</sub>	89	0,42	1,39	90,1
BRM-551j-EL	62	0,38	1,42	50,3

\*Abundance-based Coverage Estimator

Le nombre d'OTU est proche pour les tests BRM-432j-N<sub>2</sub> et BRM-439j-CO<sub>2</sub>, il est plus de deux fois plus faible pour le test BRM-EL-551j. Les indices de Simpson sont faibles, ce qui témoigne d'une diversité bactérienne élevée. Les indices de Simpson des tests BRM-551j-EL et BRM-439j-CO<sub>2</sub> sont similaires et plus élevés que celui du test BRM-432j-N<sub>2</sub>. Cela suggère que l'utilisation du CO<sub>2</sub> ou l'absence de gaz de balayage diminue la diversité bactérienne au sein du module. La tendance pour l'indice de Shannon varie dans le sens inverse de la tendance de l'indice de Simpson, confirmant l'analyse précédente. Concernant l'indice ACE, les échantillons BRM-432j-N<sub>2</sub> et BRM-439j-CO<sub>2</sub> ont des indices proches, alors que l'indice de l'échantillon du test BRM-551j-EL est deux fois plus faible. Ceci confirme que la diversité bactérienne est plus faible dans ce dernier échantillon. Au regard de ces trois indices de diversité et de richesse, l'échantillon du test avec un balayage à l'azote est celui avec la plus grande diversité bactérienne. A l'opposé, le test avec une extraction libre des gaz semble être celui où la diversité bactérienne est la plus faible.

La figure 34 présente les abondances des populations des tests BRM-432j-N<sub>2</sub>, BRM-439j-CO<sub>2</sub> et BRM-551j-EL au niveau du *phylum* (a), de la famille (b) et du genre (c).



**Figure 34 : Répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation des tests avec différentes extractions des gaz (balayage N<sub>2</sub> et balayage CO<sub>2</sub> à 68 h, extraction libre à 53 h) - Abondance >2% pour au moins un échantillon**

Dans les trois échantillons, les *phyla* *Firmicutes* et *Proteobacteria* représentent plus de 97% de l'ensemble *phyla* (figure 34a). Les proportions de *Firmicutes* sont élevées (80%) et équivalentes pour les tests BRM-432j-N<sub>2</sub> et BRM-551j-EL et 10% plus faible pour le test BRM-439j-CO<sub>2</sub> (70%). Pour ce dernier échantillon, la part de *Proteobacteria* est un peu plus élevée (+9% par rapport aux tests BRM-432j-N<sub>2</sub> et BRM-551j-EL) et atteint 27% des *phyla*. Notons également la présence de *Bacteroidetes* (environ 2%) dans les tests BRM-551j-EL et BRM-439j-CO<sub>2</sub>.

Dans les effluents issus des tests BRM-551j-EL et BRM-439j-CO<sub>2</sub> la famille des *Clostridiaceae* représente l'essentiel du *phylum* *Firmicutes* (89,8% et 96,3% respectivement) (figure 34b). Cependant, elle ne représente que 63,9% des *Firmicutes* pour l'effluent du test BRM-432j-N<sub>2</sub>, dans lequel la famille des *Ruminococcaceae* représente une part non négligeable (27,5%).

Notons que chacune des familles bactériennes présente est essentiellement représentée par un ou deux genres bactériens (abondance >2%) (figure 34c) : *Clostridium-Ethanoligenens-Enterobacter-Ruminococcus* pour BRM-432j-N<sub>2</sub>, *Clostridium-Enterobacter-Ruminococcus-Propionispora* pour BRM-439j-CO<sub>2</sub> et *Clostridium-Enterobacter* seulement pour BRM-551j-EL. Ainsi, 2 à 4 genres bactériens sont prédominants. Les genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Ruminococcus* sont producteurs d'hydrogène, et représentent ainsi la très large majorité des genres présents dans l'effluent du BRM, quelle que soit le mode d'extraction du gaz (soit 96,0% pour BRM-432j-N<sub>2</sub>, 91,4% pour BRM-439j-CO<sub>2</sub> et 93,8% pour BRM-551j-EL).

Selon l'identification taxonomique d'après la base de données NCBI (tableau 16), *Clostridium (beijerinckii/diolis)* est majoritaire (>50%) dans l'effluent du test BRM-551j-EL et celui du test BRM-439j-CO<sub>2</sub> et est présente en plus faible proportion dans le test BRM-432j-N<sub>2</sub> (14,2%). A l'inverse, le taxon *Clostridium pasteurianum* est fortement représenté dans l'effluent du test BRM-432j-N<sub>2</sub> (28,1%), presque deux fois moins dans l'effluent du test BRM-551j-EL (14,3%) et est quasiment absent de l'effluent du test BRM-439j-CO<sub>2</sub>. Le balayage au CO<sub>2</sub> semble inhiber le développement de *Clostridium pasteurianum*. De façon similaire, *Ethanoligenens harbinense* est fortement représenté dans le test BRM-432j-N<sub>2</sub> (24,2%) et quasiment absent des effluents des tests BRM-551j-EL et BRM-439j-CO<sub>2</sub> (<2%). Enfin, *Enterobacter sp.* est fortement représenté dans le test BRM-439j-CO<sub>2</sub> (26,1%) et environ 1,5 fois moins dans les tests BRM-432j-N<sub>2</sub> et BRM-551j-EL (18,7% et 16,3% respectivement).

Quelques disparités sont notables parmi les *taxa* minoritaires (<10%). La présence de *Propionispora hippei* est un peu plus élevée de (4,6%) dans le test BRM-CO<sub>2</sub>. *Clostridium (carboxidivorans/drakei)* (5,5%) et *Caloramator quimbayensis* (1,4%) émergent uniquement dans le test BRM-432j-N<sub>2</sub>. *Prevotella paludivivens* représente 4,4% des *taxa* dans le test BRM-551j-EL.

**Tableau 16 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des test avec différentes extractions des gaz (balayage N<sub>2</sub>, balayage CO<sub>2</sub>, extraction libre)  
Abondance >1% pour au moins un échantillon**

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° ordre	Balayage N <sub>2</sub> (68h)	Balayage CO <sub>2</sub> (68h)	Libre (53 h)
Bacteroidetes	Prevotellaceae	Prevotella	<i>Prevotella paludivivens</i>	100	NR_113122.1	0,0	0,0	4,4
		Caloramator	<i>Caloramator quimbayensis</i>	<97	NR_109502	1,4	0,0	0,0
			<i>Clostridium pasteurianum</i>	99	NR_104822.1	28,1	0,4	14,3
	Clostridiaceae		<i>Clostridium (beijerinckii/diolis)</i>	99	/	14,2	58,9	57,4
		Clostridium	<i>Clostridium (punense/huakuii/tunisiense)</i>	<97	/	0,3	1,1	4,4
Firmicutes			<i>Clostridium (carboxidivorans/drakei)</i>	100	/	5,5	0,5	0,7
	Lactobacillaceae	Lactobacillus	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	99	NRIC0604	0,7	<0,1	1,1
	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	<i>Caproiciproducens galactitolivorans</i>	<97	NR_145929.1	1,8	1,7	<0,1
		Ethanoligenens	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	98	NR_074333.1	24,2	1,0	1,1
	Sporomusaceae	Propionispora	<i>Propionispora hippei</i>	<97	NR_114884.1	0,9	4,6	0,1
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	Enterobacter	<i>Enterobacter sp.</i>	NA	NA	18,7	26,1	16,3

### 3.3 Discussion

Globalement, lors de la mise en œuvre de la fermentation obscure en bioréacteur membranaire avec une séparation liquide/gaz *in situ*, le mode d'extraction des gaz et le débit de gaz de balayage impactent relativement peu les performances de production d'hydrogène. Les différentes stratégies testées (augmentation du débit de gaz de balayage (N<sub>2</sub>), utilisation du N<sub>2</sub> plutôt que du CO<sub>2</sub> comme gaz de balayage et extraction libre des gaz par rapport à un balayage avec du N<sub>2</sub>) donnent lieu à de légères améliorations de la productivité et du rendement en hydrogène dans des conditions de TSH et de DAS équivalentes (TSH = 13h et DAS = 0,8 g/L/h). Ces résultats diffèrent de ce qui a été observé lors d'autres études avec d'autres configurations de réacteur. En effet, en mode semibatch, avec un balayage au N<sub>2</sub>, le rendement en hydrogène est amélioré de 88% et la productivité est multipliée par 2,6 (Clion, 2016). En CSTR, le rendement est amélioré de 23% avec un balayage à l'azote (Kim *et al.*, 2006). Notre résultat peut paraître surprenant mais ceci est directement lié à la configuration du BRM à fibres creuses. En effet, dans notre cas le gaz circulant dans la lumière des fibres ne bulle pas dans le milieu liquide de culture contrairement aux configurations précitées ; l'objectif de la configuration L/G est d'instaurer une différence de pression transmembranaire la plus élevée possible pour favoriser le transfert des gaz produits vers la lumière des fibres creuses. Ainsi, l'intensification du procédé par ajout d'une extraction gazeuse *in situ* via une membrane de fibres creuses se substitue à la présence d'un gaz de balayage. En outre, les tests réalisés sans gaz de balayage montrent qu'il n'y a pas de résistance au transfert de matière induite par cette configuration. Il est donc possible, dans notre configuration, d'extraire les gaz produits sans les diluer dans un gaz de balayage, tout en conservant les performances de production d'hydrogène, avec un rendement et une productivité en hydrogène optimaux de 1,29 mol/mol et de 153 mL/L/h respectivement.

De plus, il apparaît que la productivité en hydrogène est plus stable en l'absence de gaz de balayage sur la période testée, c'est-à-dire que le débit de production d'hydrogène se maintient, contrairement aux tests avec gaz de balayage (N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>), où il est légèrement décroissant. C'est également le seul mode de fonctionnement où la production d'hydrogène est supérieure ou égale à la production de CO<sub>2</sub> tout le long du test. Enfin, la production de métabolites est légèrement supérieure avec une extraction libre (4,1 mmol/L<sub>milieu</sub>/h) et un balayage au N<sub>2</sub> (4,0 mmol/L<sub>milieu</sub>/h) qu'avec un balayage au CO<sub>2</sub> (3,7 mmol/L<sub>milieu</sub>/h). Ce résultat est corrélé à la meilleure productivité en hydrogène observée pour ces deux premiers modes d'extraction. La distribution des métabolites solubles est peu influencée par le mode d'extraction des gaz, avec pour métabolites principaux le butyrate et l'acétate.

On observe d'autre part des différences plus marquées au niveau des populations microbiennes de l'effluent du bioréacteur. Le test avec extraction libre des gaz produits favorise la présence combinée de *Clostridium beijerinckii/diolis*, *Clostridium pasteurianum* et *Enterobacter sp.* tout en limitant la diversité des espèces secondaires. La production légèrement plus faible du

test avec balayage de la lumière des fibres avec du CO<sub>2</sub> pourrait être associée à l'absence de *Clostridium pasteurianum*. De plus, une proportion plus importante d'*Enterobacter sp.* est observée pour ce test alors que c'est celui qui montre la plus faible production d'éthanol.

Dans tous les cas, le glucose est totalement consommé (ou presque), ce qui suggère que le TSH et le DAS pourraient être optimisés, afin d'augmenter la production d'hydrogène. L'effet de la variation de ces deux paramètres est étudié par la suite.

*Ainsi, l'extraction libre des gaz semble le mode le plus favorable pour un métabolisme orienté vers la production d'hydrogène et une production stable au cours du temps. De plus, ce mode d'extraction présente l'avantage de ne pas diluer les gaz produits. Des tests de fonctionnement sur une plus longue durée permettraient de déterminer si les populations bactériennes sélectionnées par la mise en œuvre sans gaz de balayage permettent un fonctionnement stabilisé.*

## 4 Etude des communautés bactériennes du module membranaire

Le module membranaire du bioréacteur a été ensemencé avec des boues de station d'épuration prétraitées thermiquement. Plusieurs fermentations de la même solution modèle (glucose et nutriments) ont été répétées, sans nouvel ajout de biomasse bactérienne, de 256 à 695 jours après l'ensemencement initial. Comme présenté dans la partie précédente, la fermentation a repris à chaque fois, avec des résultats comparables entre les différents tests.

Le module membranaire représente un système non homogène (absence d'agitation et donc gradient de nutriments et de pH sédimentation de floes bactériens, bactéries en suspension et potentiellement installées sur la surface des fibres creuses *etc.*). Il est donc possible que la composition des populations bactériennes varie, de même que la capacité des différentes communautés à produire de l'hydrogène. Ainsi, l'étude des populations présentes dans trois zones du module membranaire (sédiments du fond du réacteur, mélange en suspension (effluent) et surface des fibres creuses) a été réalisée pour le mode de fonctionnement avec extraction libre des gaz.

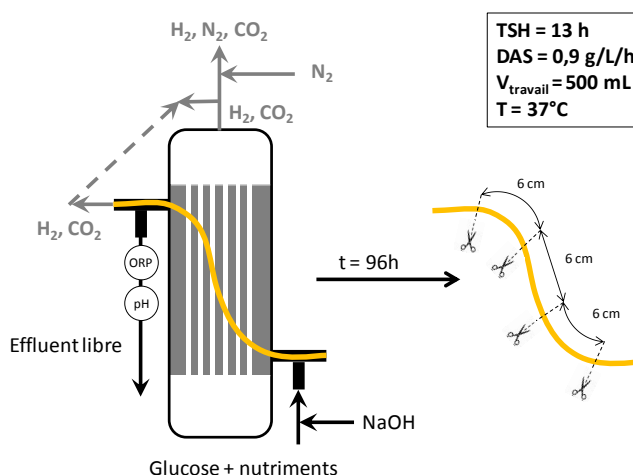


Figure 35 : Configuration du test BRM-551j-EL

La configuration du test est présentée sur la figure 35. Des fibres creuses supplémentaires ont été empotées dans le module membranaire comme expliqué dans le chapitre II.



Les échantillons correspondant aux trois zones ont été prélevés à 96 h de fermentation. Après prélèvement de 7 mL d'effluent en sortie du BRM selon le même protocole qu'usuellement, le module membranaire a été vidangé par la sortie liquide basse de façon à récupérer les floccs sédimentés dans l'extrait liquide. Les fibres creuses additionnelles ont été coupées au niveau de ses deux extrémités d'emportage et retirée par le haut du module ; elles ont ensuite été sectionnées en trois tronçons de 6 cm.

Nous présenterons brièvement les performances de ce test, puis l'analyse microbiologique de l'ensemble des échantillons prélevés.

#### 4.1 Production de gaz

Les débits de production de gaz et le suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction sont présentés sur la figure 36 pour l'expérience en BRM sans gaz de balayage (BRM-551j-EL) avec un TSH de 13 h et un DAS de 0,8 g/L/h.

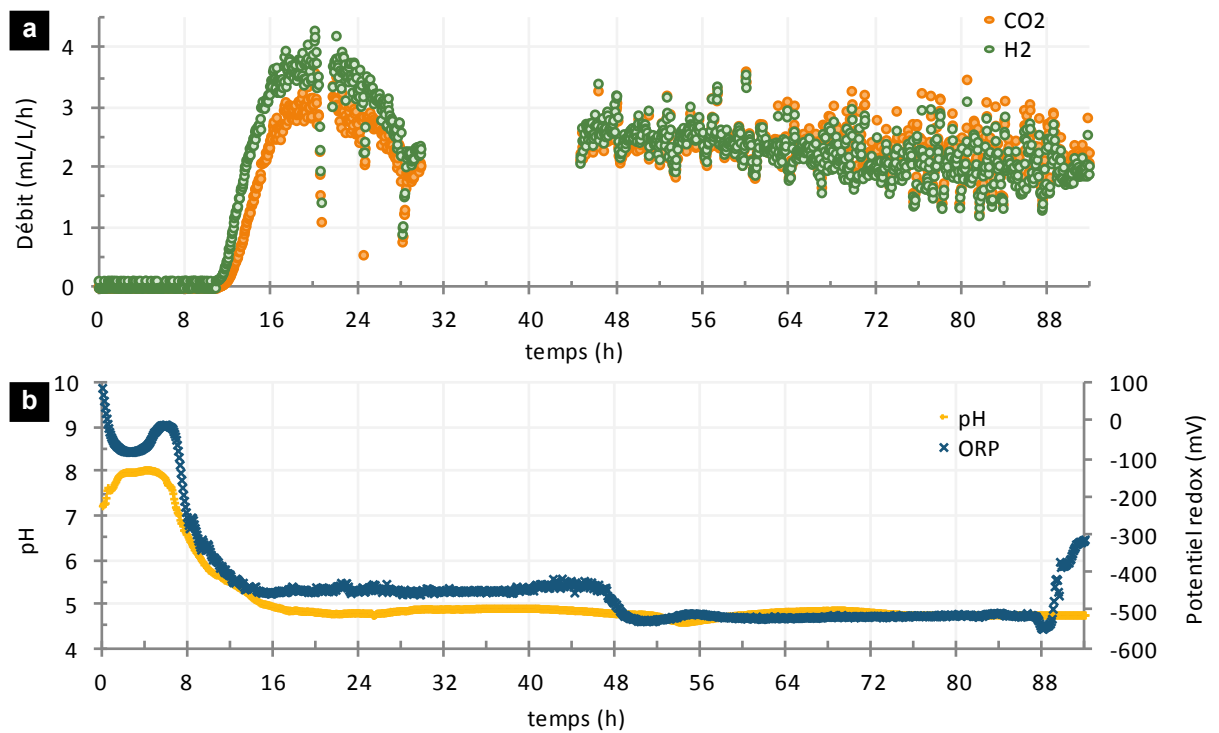


Figure 36 : Profils de production d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> (a) et suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction. Test sans gaz de balayage, TSH = 13h, DAS = 0,8 g/L/h .

On observe un temps de latence de 12 h environ pour les productions d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> (figure 36a). En même temps, on observe une chute du pH de 8 à 5 et du potentiel d'oxydoréduction de 0 à -400 mV (figure 36b). De t = 12h à t = 30 h, on observe un pic de production de gaz, alors que le pH et le potentiel redox restent stables. De t = 30 h à t = 44 h, une interruption de l'analyse en ligne n'a pas permis de mesurer les gaz produits. Comme le pH et le potentiel d'oxydoréduction restent stables, on peut supposer que les débits de gaz produits sont du même ordre de grandeur

que celles à  $t = 30$  h et à  $t = 44$  h, soit environ  $2,5$  mL/L/h. A partir de  $t = 48$  h, le pH baisse très légèrement et le potentiel d'oxydoréduction chute de  $-400$  mV à  $-500$  mV. Les productions de gaz sont constantes de  $t = 44$  h à  $t = 60$  h, puis décroissent légèrement ensuite, et deviennent irrégulières avec des débits moyens autour de  $2$  mL/L/h.

## 4.2 Analyse des métabolites

Les débits de métabolites et le bilan DCO sont présentés sur la figure 37.

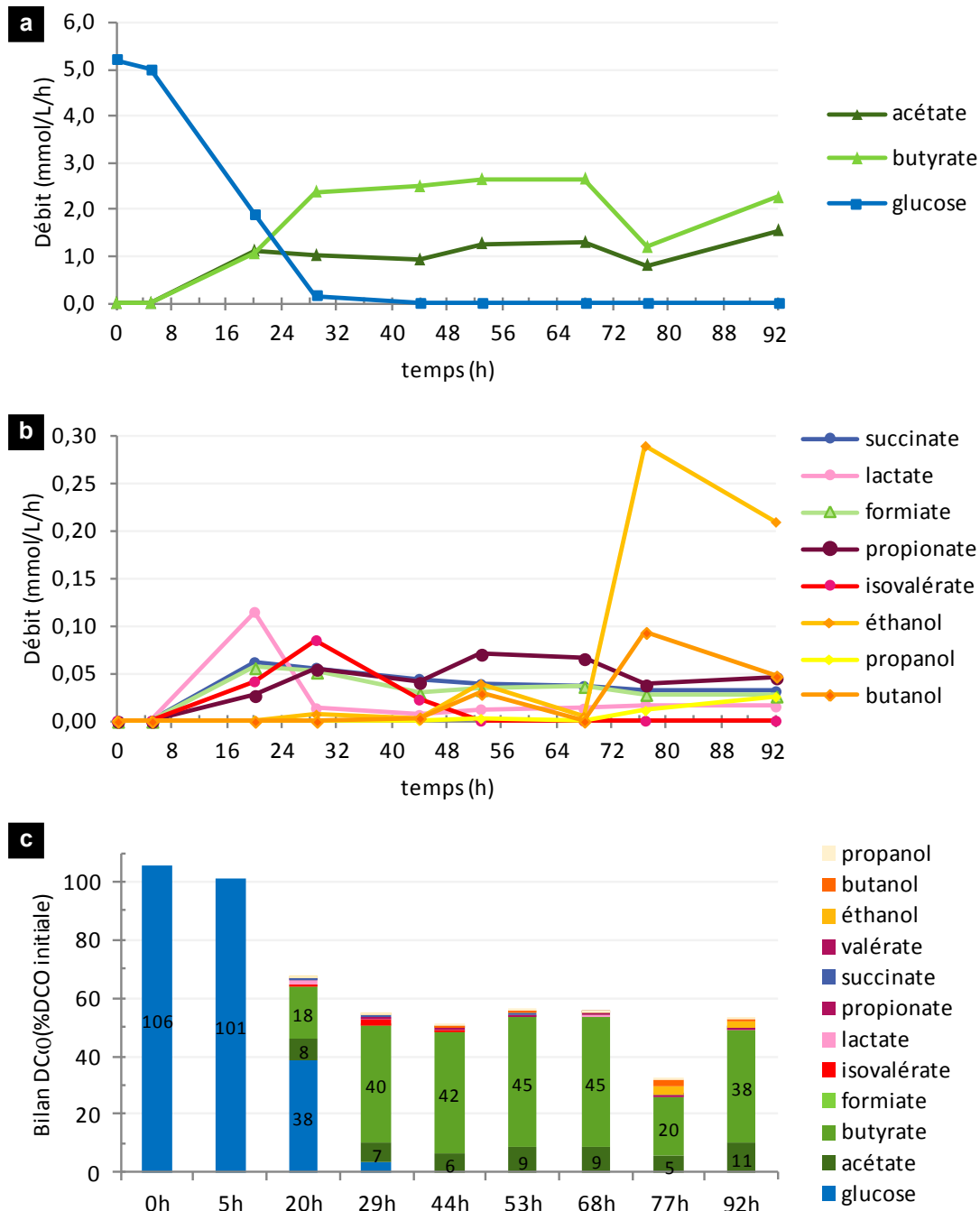


Figure 37 : Débits de glucose et des métabolites majoritaires (acétate et de butyrate) (a), des métabolites minoritaires (b) et bilan DCO (c) lors du test de fermentation sans gaz de balayage (BRM-551j-EL)

La consommation de glucose augmente dès le début du test et est quasiment totale à partir de  $t = 29$  h. Le butyrate et l'acétate sont les métabolites majoritaires (figure 37a). Ils sont produits en proportions identiques jusqu'à  $t = 20$  h, le ratio molaire B/A est d'environ 2,2 par la suite. Leurs débits de production respectifs sont stables au cours du temps sauf à  $t = 77$  h. La production des autres métabolites est très minoritaire (figure 37b) ( $< 0,3$  mmol/L/h) et variable. Un pic de lactate est analysé à  $t = 20$  h et un pic de production d'isovalérate est observé à  $t = 29$  h. Les productions de propionate, formiate et succinate sont stables et proches dès  $t = 20$  h. La production d'alcools est faible ( $< 0,05$  mmol/L/h), seul un pic (0,4 mmol/L/h) est observé à  $t = 77$  h, juste après la chute du potentiel d'oxydoréduction, en même temps que la chute de production de butyrate et d'acétate. Après la mise en place du régime pseudo-stable à  $t = 29$  h, l'ensemble des paramètres ont été maintenus constants avec une orientation du métabolisme vers la production d'hydrogène par les voies butyrate et acétate. Notons à  $t = 77$  h un fléchissement important des débits de production d'acétate et de butyrate (rétablis à 92 h) au profit de la production des alcools (éthanol et butanol), potentiellement lié au fléchissement léger de la production d'hydrogène et à l'augmentation sensible de la production de  $\text{CO}_2$ .

### 4.3 Analyse microbiologique

#### 4.3.1 Analyse MEB

La figure 38 présente une micrographie obtenue par MEB (x500) d'une fibre nue identique à celles présentes dans le module membranaire. La fibre est exempte de toute contamination bactérienne. On observe une mésostructure homogène avec des stries attribuables à la mise en œuvre du matériau polymère.

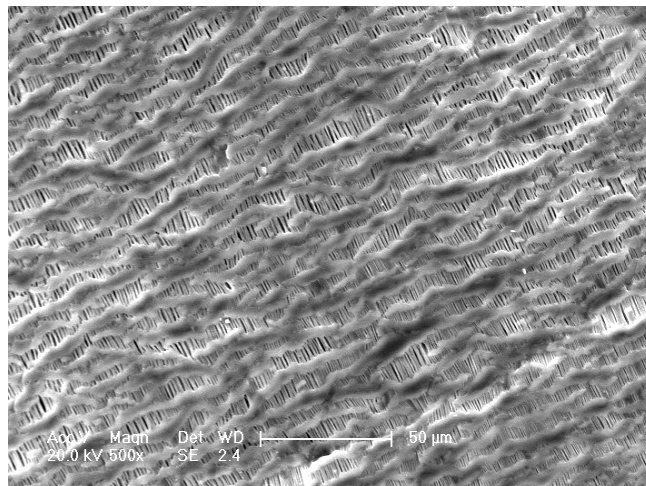
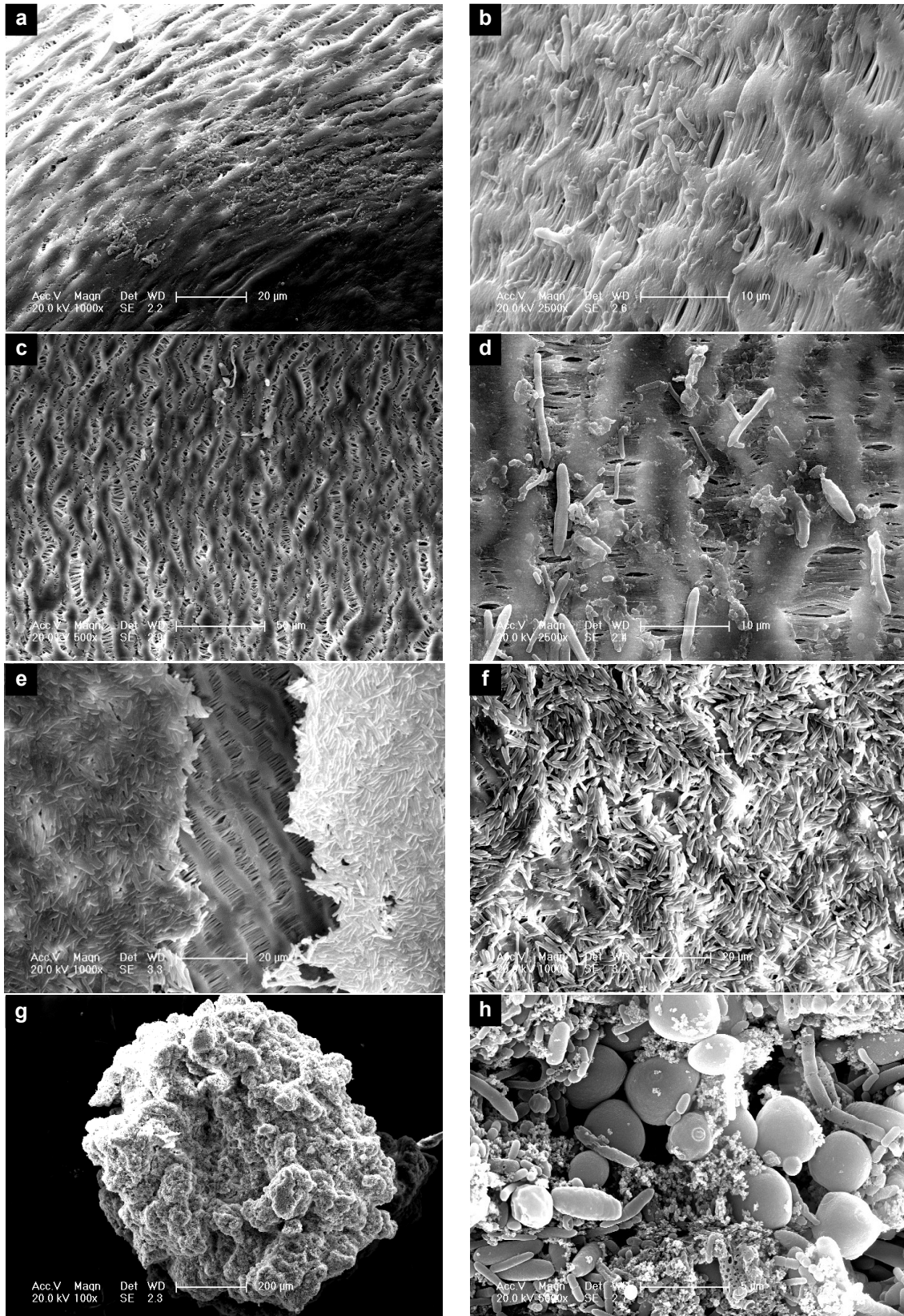


Figure 38 : Micrographie d'une fibre PTFE avant test de fermentation en BRM (MEB x500)

La figure 39 présente les différents clichés obtenus pour le test avec extraction libre des gaz, à 92h, lorsque la production d'H<sub>2</sub> est stabilisée. La densité de la population bactérienne est éparse et inégale dans la partie haute (figure 14a) et la partie centrale (figure 14c) et est largement supérieure sur la partie basse de la fibre (figure 39e). En effet, sur la figure 39e, on observe un film bactérien très dense recouvrant la surface de la fibre (craquelé sur l'image, potentiellement lié à l'échantillonnage (étape de déshydratation)), sans matrice extracellulaire apparente. Ces images montrent donc l'existence d'un biofilm réparti de façon hétérogène le long des fibres du réacteur, sur une ou deux couches maximum et essentiellement sur la partie basse de la fibre.

Un grossissement plus important (figure 39b, figure 39d et figure 39f) révèle une diversité de tailles et de formes avec majoritairement des bâtonnets. Sur la figure 39, on peut observer plusieurs bâtonnets en train de sporuler, ce qui est caractéristique de plusieurs espèces du genre *Clostridium*.

La figure 39g présente un granule prélevé dans le fond du bioréacteur. Ces structures, de tailles plus ou moins importantes, sont visibles à l'œil nu et sont assimilables à celles trouvées dans un réacteur UASB. De forme sphérique, le floc semble constitué d'un amas de plusieurs éléments qui se seraient accumulés au fur et à mesure de la fermentation. Le grossissement sur la figure 39h révèle une diversité de populations encore plus importante que sur la fibre, mélangée à des amas de particules. En bas de l'image, on observe une enveloppe bactérienne perforée de trous, ce qui suggère que ces particules ne sont autres que des débris cellulaires. Notons également la présence de boules blanches, apparemment en train de bourgeonner. La structure poreuse avec de multiples craquements à la surface d'un granule facilite potentiellement le passage des nutriments et du substrat, de même que la libération de l'hydrogène.



**Figure 39: Segments de fibre en différents points du module membranaire (haut, milieu et bas) et flocs à l'issue du test BRM-551J-EL. Fibre, partie haute du module. a : MEB 1000X, b : MEB 2500X . Fibre, partie centrale du module. c : MEB 500X , d : MEB 2500X . Fibre, partie basse du module. e : MEB 350X, f : MEB 1000X). Floc. g :MEB 100X, h : MEB 5000X**

#### 4.3.2 Analyse par séquençage

L'ADN des culots bactériens des échantillons d'effluent liquide à 20 h, 53 h et 92 h, du floc et du biofilm de la surface des segments de fibres issues du haut et du bas du module ont été extraits comme décrit précédemment. L'ADN bactérien codant l'ARN 16S des 4 échantillons a été analysé par séquençage Illumina à haut débit. Le tableau 17 présente les indices de diversité des échantillons, ainsi que les résultats de l'analyse qPCR réalisée exclusivement pour les échantillons d'effluent.

**Tableau 17 : Diversité et abondance bactérienne des échantillons analysés par séquençage et qPCR à différents temps de fermentation et différentes zones du module membranaire à t = 96h pour le test BRM-551j-EL**

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson	Indice de Shannon	ACE	qPCR
Effluent t = 20h	156	0,54	1,13	160	$7,29 \times 10^8$
Effluent t = 53h	49	0,38	1,42	50	$1,57 \times 10^7$
Effluent t = 92h	62	0,28	1,81	64	$1,66 \times 10^9$
Fibre haut t = 92 h	211	0,09	2,98	213	na
Fibre bas t = 92 h	100	0,12	2,59	107	na
Flocs t = 92 h	68	0,34	1,50	72	na

\*na = non analysé

Le nombre d'OTU est trois fois plus important dans l'effluent du BRM L/G à t = 20h, en comparaison à t=53h et 2,5 fois en comparaison à t = 96h. L'indice de Simpson tend à diminuer et l'indice de Shannon est en augmentation, ce qui signifie que la diversité bactérienne est en augmentation au cours du temps. L'indice ACE est de 2 à 3 fois plus important à t = 20h qu'à t = 53h et t = 96h.

En fin de fermentation (92h), le nombre d'OTU extrait de l'échantillon d'effluent liquide, de la fibre haut et du floc sont du même ordre de grandeur, avec une diversité équivalente pour le floc et l'effluent alors que les échantillons de la fibre haut et bas présentent une diversité très importante selon les indices de Shannon et Simpson. L'indice ACE le plus élevé correspond à l'échantillon de la partie haute de la fibre. Concernant les résultats de qPCR, l'échantillon à t = 20 h présente un nombre de copies supérieur à celui de l'échantillon à t = 53 h et le nombre de copies augmente à nouveau à t = 96 h, ce qui montre que les bactéries sont en phase de croissance.

Dans un premier temps, nous commenterons l'évolution des populations bactériennes au cours du temps. Ensuite, la répartition de ces populations à t = 96 h dans différentes zones du module membranaire (effluent liquide, surface des fibres en haut en bas du module et flocs) sera détaillée.

❖ Evolution des populations bactériennes de l'effluent au cours du temps

La part du *phylum Firmicutes* est très majoritaire et augmente au cours du temps (de 73% à 94%) au détriment de la part du *phylum Proteobacteria*, qui est environ cinq fois moins importante à t = 96 h (5%) qu'à t = 20 h (25,0%) (figure 40a).

La diversité des familles du *phylum Firmicutes* (figure 40b) évolue de façon marquée : à 20 h, la famille des *Clostriciaceae* est la plus abondante (72,4%), de même qu'à t = 53 h (77,5%) et à t = 92 h (88,2% et 88,4% respectivement). A t = 92h, les *Ruminocaceae* émergent et représentent 5% de l'ensemble des familles de l'échantillon (avec 3,3% d'*Ethanoligenens* et 1,7% de *Ruminococcus*). La famille *Clostridiaceae* reste majoritaire mais en proportion légèrement plus faible par rapport à t = 53 h. Globalement, les genres composant chaque famille (figure 40b et figure 40c) sont peu diversifiés. Notamment, le genre *Clostridium* représente l'essentiel de la famille des *Clostridiaceae*.

Comparativement, la diversité des genres du *phylum Proteobacteria* reste stable, *Enterobacter* représentant l'essentiel du *phylum* (19,7%, 8,6%, 4,7% respectivement à 20 h 53 h et 96 h). Notons la présence minoritaire de la famille *Comamonadaceae* à t = 20 h (2,3%) qui tend à disparaître au cours du temps.

Les abondances cumulées des genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Ethanoligenens* à t = 20h (92,4%), à t = 53 h (96,6%) et à t = 92 h (98,1%) sont légèrement croissantes au cours du temps et expliquent l'essentiel des genres analysés dans les échantillons de l'effluent du BRM. Ces trois genres sont connus pour la production d'hydrogène mais avec des voies métaboliques différentes.

L'étude des taxa (tableau 18) montre qu'à t = 20 h, le taxon *Clostridium (beijerinckii/diolis)* est majoritaire (70,9%) suivi par le taxon *Enterobacter sp.* (19,9%). A eux deux, ces deux taxa représentent 90,8% de la population bactérienne de l'effluent, les autres taxa étant minoritaires (présence inférieure à 1%). A t = 53 h, les taxa *Clostridium (beijerinckii/diolis)* et *Enterobacter sp.* sont toujours fortement représentés (30,1% et 8,6% respectivement), mais leurs abondances sont en baisse par rapport à t=20 h (-57%). On observe l'émergence du taxon *Clostridium pasteurianum* (53,9%). A t = 92 h, *Clostridium pasteurianum* est majoritaire (78,6%) alors que les abondances de *Clostridium (beijerinckii/diolis)* (5,8%) et d'*Enterobacter sp.* (4,7%) sont toujours en déclin contrairement à *Ethanoligenens harbinense* dont la proportion augmente de 0,6 à 3,3 %.

Ainsi, on observe au cours de ce test une majorité de *Clostridium*, bactéries productrices d'hydrogène, dans l'effluent.

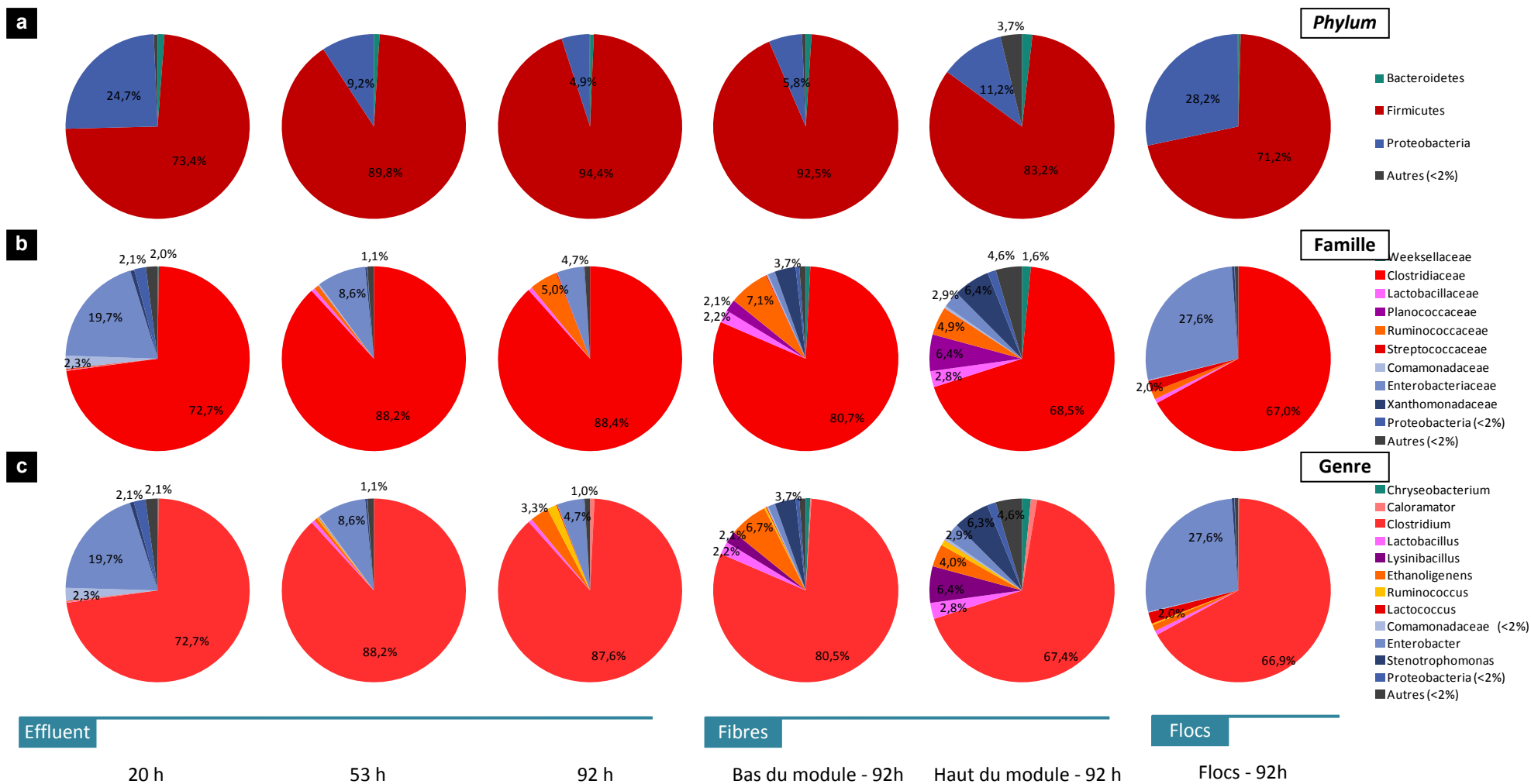


Figure 40 : Répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation à différents temps de fermentation et à différents points du module membranaire à t = 96h pour le test BRM-551j-EL



**Tableau 18 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons du test BRM-551j-EL sans gaz de balayage - Abondance >1% pour au moins un échantillon**

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° ordre	20h	53h	96h	Fibre bas	Fibre haut	Floc	
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium geocarposphaerae	100	NR_133727.1	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	1,4	<0,1	
Firmicutes	Bacillaceae	Lysinibacillus	Lysinibacillus (mangiferihumi/fusififormis/sphaericus)	100	/	<0,1	<0,1	0,0	2,1	6,4	<0,1	
Firmicutes	Clostridiaceae	Clostridium	Caloramator	Caloramator quimbayensis	95	NR_109502	0,0	0,0	0,8	0,2	1,0	0,1
			Clostridium pasteurianum	Clostridium pasteurianum	99	NR_104822.1	1,0	53,9	78,6	73,7	51,9	52,2
			Clostridium (beijerinckii/diolis)	Clostridium (beijerinckii/diolis)	99	/	70,9	30,1	5,8	3,5	4,2	12,7
			Clostridium (punense/huakuii/tunisiense)	Clostridium (punense/huakuii/tunisiense)	96	/	0,1	1,3	0,8	0,1	0,4	1,1
			Clostridium (carboxidivorans/drakei)	Clostridium (carboxidivorans/drakei)	100	/	0,2	0,3	1,9	2,5	9,6	0,5
			Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus satsumensis	99	NRIC0604	0,1	0,6	0,7	2,2	2,8
Firmicutes	Ruminococcaceae	Caproiciproducens	Caproiciproducens galactitolivorans	<97	NR_145929.1	<0,1	0,2	1,2	0,1	0,5	<0,1	
		Ethanoligenens	Ethanoligenens harbinense	98	NR_074333.1	0,1	0,6	3,3	6,7	4,0	1,1	
	Streptococaceae	Lactococcus	Lactococcus (laudensis/raffinolactis/chungangensis)	100	/	0,1	0,1	0,2	0,1	<0,1	2,0	
Proteobacteria	Comamonadaceae	Comamonas	Comamonas (testosteroni/thiooxydans)	100	/	1,0	0,2	<0,1	0,2	0,2	0,1	
	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter sp.	-	-	19,9	8,6	4,7	1,3	2,9	27,6	
	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Stenotrophomonas (pavanii/maltophilia)	100	/	0,6	0,2	0,1	3,6	6,2	0,4	

❖ Répartition des populations bactériennes à t = 96 h dans différentes zones du module membranaire

A t = 96 h, de même que dans l'échantillon d'effluent liquide, les *phyla Firmicutes* et *Proteobacteria* sont majoritaires dans les flocs et sur la surface de la fibre (figure 40a). Cependant, la répartition de ces populations varie selon le type d'échantillon : les *Firmicutes* sont majoritaires dans l'effluent (94,4%) alors qu'ils sont présents en proportion moindre mais toujours prédominante dans les flocs (71,2%). La surface des fibres présente un profil intermédiaire, proche de l'effluent au niveau des *phyla* : les *Firmicutes* sont majoritaires (92,5% en bas et 83,2%, en haut du module respectivement) suivis par les *Proteobacteria* (5,8% en bas et 11,2%, en haut du module respectivement).

Néanmoins, la population de *Firmicutes* est plus diversifiée sur la surface de la fibre (figure 40b) avec notamment une part de *Clostridiaceae* qui reste importante (80,7% en bas et 68,5% en haut de la fibre contre 88,4% dans l'effluent) et l'émergence des familles *Lactobacillaceae* et *Planococcaceae*. La représentativité des *Ruminococcaceae* est quasi similaire sur la surface de la fibre en haut du module ainsi que dans l'effluent (4,9% et 5%), alors qu'elle est presque trois fois plus élevée sur la partie basse de la fibre (7,1%). Le genre *Ethanolinogenens* représente l'essentiel de cette famille dans tous les échantillons (figure 40c) ; notons toutefois qu'il est accompagnée d'une très faible proportion de bactéries du genre *Ruminococcus*.

Le *phylum Proteobacteria* comporte une majorité d'*Enterobacteriaceae* dans les échantillons de flocc (27,6%) et d'effluent (4,7%), alors que sa diversité est plus élevée dans les échantillons de surface des fibres avec la présence de *Xanthomonadaceae* (3,7% à 6,4% respectivement en bas et en haut de la fibre) et *Enterobacteriaceae* (1,3 à 2,9% respectivement en bas et en haut de la fibre).

La diversité des *taxa* (tableau 18) est la plus faible pour les échantillons de flocc et d'effluent. *Clostridium pasteurianum* (52,2%), *Enterobacter sp.* (27,6%) et *Clostridium beijerinckii/diolis* (12,7%), constituent 92,5% de l'ensemble des *taxa* du flocc et 89,1% de l'ensemble des *taxa* de l'effluent. En comparaison avec les floccs et l'effluent, les surfaces des fibres creuses hébergent de plus grandes diversité de *Clostridiaceae*, avec la présence de *Clostridium carboxidivorans/drakei* représentant 2,5% et 9,6% des séquences respectivement en bas et en haut de la fibre. Notons qu'*Enterobacter sp.*, bien que présente dans le biofilm des fibres, est minoritaire (<3%). *Lactobacillus satsumensis* est présente principalement sur la fibre mais en faibles proportions (<3%). *Stenotrophomonas pavanii/maltophilia* (3,6% et 6,2%), *Lysinibacillus sp.* (2,1% et 6,4%), *Chryseobacterium geocarposphaerae* (0,6% et 1,4%) sont uniquement présentes sur la surface des fibres (respectivement en bas et en haut des fibres). *Stenotrophomonas maltophilia* a une forte capacité à adhérer et à former des biofilms sur différentes surfaces, y compris abiotiques. Elle est aérobie, et n'a pas d'activité fermentaire (An et Gerg, 2018).

L'abondance d'*Ethanoligenens harbinense* diffère selon les échantillons. Elle est installée majoritairement en bas des fibres (6,7%), puis en haut du module (4%). Elle est également présente dans l'effluent, en proportion similaire (3,3%) avec le haut des fibres, et dans le floc mais de façon moindre (1,1%).

Notons que 4,6% des genres bactériens (figure 40c) présents sur le haut de la fibre constituent moins de 2% de la population totale, soit plus de trois fois plus de genres qu'en bas de la fibre (1,1%), et que dans l'effluent (2,4%) et presque 8 fois plus que dans le floc (0,6%). Certains *taxa* émergent ponctuellement de façon minoritaire (entre 1 et 2%) dans un ou deux échantillons : *Caproiciproducens galactitolivorans* dans l'effluent et *Caloramator quimbayensis* dans la partie haute de la fibre, *Lactococcus sp.* dans le floc.

#### 4.4 Discussion

Les populations de l'effluent évoluent au cours du temps avec une baisse de la proportion de *Clostridium beijerinckii/diolis* au profit de *Clostridium pasteurianum*. Sur la fibre, comme dans les floccs, les espèces principales analysées sont connues comme productrices d'hydrogène (*Clostridium*, *Enterobacter*, *Ethanoligenens*) (Cabrol *et al.*, 2017). Malgré une certaine variabilité de la composition des communautés bactériennes observée à différents niveaux du BRM et dans l'effluent à différents temps de fermentation, la production d'hydrogène est maintenue en régime de fonctionnement pseudo-stable. La sélection de *Clostridium pasteurianum* dans l'effluent d'un bioréacteur de production d'hydrogène ensemencé avec des boues de STEP, accompagnée d'*Enterobacter aerogenes* et de *Lactobacillus casei* a été rapportée dans une autre étude avec un BRM G/G visant à extraire le biogaz produit par balayage du bioréacteur avec le CO<sub>2</sub> produit (Bakonyi *et al.*, 2017). Néanmoins, dans cette étude, la proportion des bactéries du genre *Clostridium* est nettement plus faible que dans notre système (30-40% environ contre 72-88%). Les conditions opératoires utilisées (TSH=12h et DAS = 1,7 g/L/h) diffèrent légèrement de notre étude, ce qui peut potentiellement aussi expliquer cet écart. Dans l'étude de Park *et al.* (2017) (TSH = 12 h et DAS = 1,25 g/L/h), une large majorité de *Clostridium butyricum* est observée (environ 90%) dans l'effluent du bioréacteur membranaire S/L, le reste des espèces n'étant pas identifiées. La composition du biofilm a été analysée à TSH = 3 h/DAS = 5 g/L/h et de même, une large majorité de *Clostridium butyricum* est identifiée (quasiment la totalité), ce qui concorde avec notre étude montrant une prévalence du genre *Clostridium* dans notre système.

L'étude de Zhang *et al.* (2008) porte sur le fonctionnement d'un bioréacteur à lit fluidisé, dans des conditions différentes de notre étude (pH=5,5 ± 0,2, t=37°), avec un TSH plus faible (0,125-3h) et un DAS fixe très élevé (40 g/L/h), pendant 50 jours. Leur étude montre que la proportion de biofilm diminue de façon significative avec une augmentation de granules au cours du temps. Du fait du rendement de développement élevé des bactéries productrices d'hydrogène (0,1 g<sub>VSS</sub>/g<sub>glucose</sub>) et du DAS élevé (40 g<sub>glucose</sub>/L/h) utilisé, une grande quantité de biomasse (72–

127 g<sub>VSS</sub>) a été produite de façon journalière. De plus, il a été observé que l'épaisseur du biofilm a augmenté de façon significative au cours du temps, diminuant l'adhérence des microorganismes au support qui se détachent du fait de collisions particulières. Les fragments de biofilm ainsi mis en suspension évoluent en granules, devenus prédominants dans le bioréacteur après 50 jours de fonctionnement. Aucun impact sur les performances du bioréacteur n'a été observé. Entre 0 et 5 jours (échelle de temps correspondant à notre procédé), il y a une majorité de biofilm (>30 g<sub>VSS</sub>/L) et une minorité de granules (2-3g<sub>VSS</sub>/L) (sur un total de 34,7-37,6 g<sub>VSS</sub>/L), et la tendance s'inverse progressivement jusqu'à 50 jours de fonctionnement. Nous pouvons supposer que la même tendance pourrait se mettre en place dans notre système avec un fonctionnement plus long. Il serait intéressant de voir si les performances du BRM seraient maintenues sur une période de temps plus longue.

L'hétérogénéité de populations entre le haut et le bas du module est peut être lié au gradient de pH, à la diminution de la disponibilité en substrat. Ceci laisse supposer que le module n'est pas exploité à son maximum, si seul le bas du module consomme le glucose.

*Ainsi, la composition des communautés bactériennes évolue au sein du module membranaire mais reste majoritairement constituée de bactéries productrices d'hydrogène du genre Clostridium. Malgré les différentes zones et les évolutions dans le temps, la production d'hydrogène en BRM L/G est robuste. Il est nécessaire d'optimiser le TSH et le DAS pour une utilisation maximale du module membranaire.*

## 5 Effet du TSH et du DAS sur la production d'hydrogène, le métabolisme et la microbiologie du milieu fermentaire

Le TSH et le DAS sont des paramètres majeurs de la fermentation obscure en mode de fonctionnement continu. Dans plusieurs études d'impact du TSH, la valeur du DAS augmente lorsque le TSH est réduit, car la concentration de la solution d'alimentation reste fixe (Zhang *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2014 ; Anburajan *et al.*, 2017 ; Pugazhendi *et al.*, 2017). Cette augmentation du DAS peut avoir un impact important sur le métabolisme bactérien, qui peut être inhibé par une concentration élevée en substrat, ou au contraire permettre une amélioration importante de la productivité grâce à un apport en substrat plus important, mais avec une réduction du rendement en hydrogène (Kumar *et al.*, 2014). Ainsi, pour l'ensemble des tests portant sur le TSH et le DAS effectués sur le BRM, il a été décidé de conserver un DAS ou un TSH fixe en ajustant la concentration en substrat de la solution d'alimentation.

Une première étude de l'effet du TSH dans le BRM a été réalisée dans les travaux de thèse de Clion (2016). Des tests avec un TSH allant de 12 à 46 h (12,17, 20 et 46 h) en conservant le DAS à une valeur proche de 1 g<sub>glucose</sub>/L<sub>milieu</sub>/h, ont été effectués. Les meilleures performances de production d'hydrogène ont été observées pour des TSH de 12 et 17h, lorsque le rapport B/A est maximal. La consommation d'hexose diminue avec l'augmentation du TSH, qui semble provoquer un effet de saturation du milieu. En conclusion de cette étude, il avait été déterminé

qu'un TSH réduit (12h) permet de réduire la concentration en substrat dans le BRM, d'optimiser l'utilisation du glucose et d'obtenir les meilleures productions d'hydrogène.

L'objectif de notre étude est de préciser les limites opératoires de la configuration du BRM L/G à fibres creuses. Les problématiques suivantes ont été explorées :

- Est-il possible de diminuer davantage le TSH ? Quel est le DAS optimal pour différents TSH ?
- Quels sont les effets de la variation du TSH et du DAS sur le métabolisme et la microbiologie du milieu réactionnel ?

Les tests ont été réalisés entre 538 et 733 jours après le dernier réensemencement du module membranaire.. Les productions de gaz ( $H_2$  et  $CO_2$ ) et de métabolites, ainsi que l'analyse microbiologique de l'effluent du module membranaire, seront présentées. Notons qu'au cours de cette étude exploratoire, chaque modification du TSH et/ou du DAS a nécessité un ajustement de la régulation du pH par ajout de base (modification de la concentration de la solution d'alimentation et de la fréquence d'ajout), limitant le nombre de tests pouvant être réalisés. Les corrélations identifiées dans cette étude sont donc des premières tendances qu'il faudra confirmer avec des expériences complémentaires.

## 5.1 Productions d'hydrogène et de dioxyde de carbone

Les profils de production d'hydrogène et de dioxyde de carbone et l'évolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction des différents tests sont rapportés dans l'annexe 1.

Le tableau 19 récapitule les performances de production d'hydrogène du procédé en régime de fonctionnement pseudo-stable : rendement par rapport à la quantité de glucose ajouté ( $R_{H_2 \text{ ajouté}}$ ) ou consommé ( $R_{H_2 \text{ conso}}$ ), productivité ( $P_{H_2}$ ), rapport molaire  $H_2/CO_2$ , et taux de consommation du glucose ( $C_{\text{glucose}}$ ).

**Tableau 19 : Performances moyennes de production d'hydrogène pour différentes combinaisons de TSH et de DAS.**

Test	DAS (g/L/h)	TSH (h)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> ajouté (mol/mol)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> conso (mol/mol)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	C <sub>glucose</sub> (%)	POR** (mV)	pH	Régime pseudo-stable
BRM-607j	0,6	4,9	0,79	0,81	66,5	1,09	97,7	na*	5,3	12-77 h
BRM-432j	0,8	13,7	1,00	n.a.	108,1	0,87	n.a.	-350	5,4	19-68 h
BRM-538j	0,8	7,5	1,05	1,07	112,0	1,00	98,2	-500	5,1	12-68 h
BRM-706j	1,4	2,1	0,86	0,94	170,8	1,34	91,9	-250	5,0	20-68 h
BRM-692j	1,4	4,9	1,00	1,00	184,4	1,04	100	-377	5,3	25-44 h
BRM-733j	1,4	6,7	1,02	1,07	186,3	0,89	95,6	-395	5,0	20-68h
BRM-684j	1,4	8,0	1,16	1,25	225,3	0,98	92,8	-250	4,7	20-36 h
BRM-729j	1,4	10,2	1,13	1,37	210,0	1,02	81,9	-298	4,6	19-38 h
BRM-677j	1,7	13,5	0,60	0,77	137,5	0,93	78,1	-196	4,7	51-92 h
BRM-726j	2,1	7,8	0,92	1,17	253,7	0,97	78,4	-350	4,7	16-68 h

\*non analysé, \*\* Potentiel d'OxydoRéduction

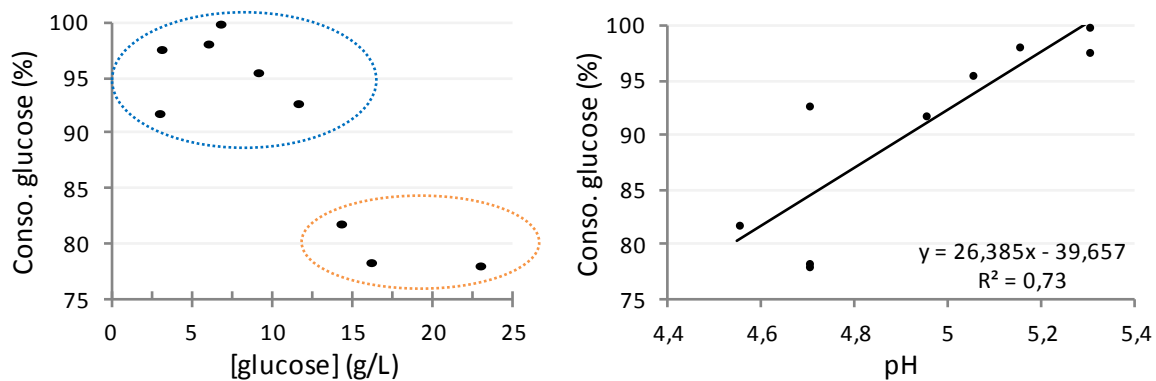
### 5.1.1 Consommation du glucose

Le taux de consommation du glucose (C<sub>glucose</sub>) varie entre 78,1% et 100%. On distingue deux groupes de tests :

(i) C<sub>glucose</sub> > 92% : Le TSH est compris entre 2 et 8 h et le DAS entre 0,5 et 1,5 g/L/h, avec les concentrations en glucose dans le bioréacteur ([glucose]) les plus faibles (<13 g/L). Notons que pour ces tests, pH < 4,7.

(ii) C<sub>glucose</sub> < 82% : Le TSH est compris entre 8 et 14 h et le DAS entre 1,4 et 2,1 g/L/h, avec les plus fortes concentrations en glucose (>13 g/L). Pour ces tests, pH > 4,8, à l'exception de BRM-684 j (pH = 4,7).

Autrement dit, la consommation en glucose diminue au-delà d'une concentration en glucose de l'alimentation de 13 g/L (figure 41a). Cette concentration en substrat dans le bioréacteur semble être la limite de ce qui peut être consommé par le *consortium* bactérien. De plus, on observe que la consommation du glucose semble augmenter avec le pH (figure 41b).



**Figure 41 : Corrélations entre la concentration en glucose dans le bioréacteur et le pourcentage de glucose consommé (a) et entre le pH du milieu réactionnel et le pourcentage de glucose consommé (b)**

### 5.1.2 Rendement

Pour l'ensemble des tests réalisés,  $R_{H_2}$  ajouté est compris entre 0,60 et 1,16 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub> et  $R_{H_2}$  consommé entre 0,77 et 1,37 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub>.  $R_{H_2}$  consommé est optimal pour une concentration en glucose de 14 g/L (figure 42). Il a été généré lors du test BRM-729j combinant un TSH de 10,2 h avec un DAS d'environ 1,4 g/L/h (1,37 mol/mol).  $R_{H_2}$  ajouté est également maximal pour ce test (1,13 mol/mol) et pour le test combinant un TSH de 8h et un DAS de 1,4 g/L/h.

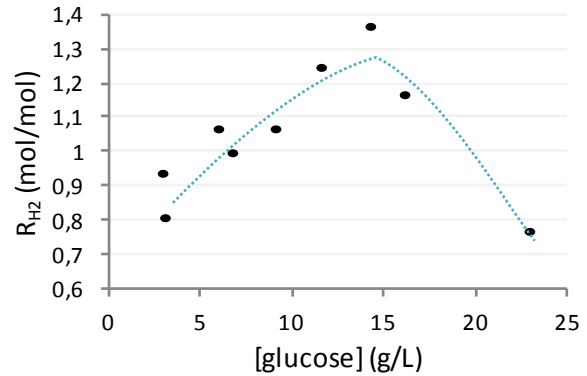


Figure 42 Corrélation entre la concentration en glucose et le rendement en hydrogène

Le rendement minimal correspond au test BRM-677j (DAS = 1,7 g/L/h et TSH = 13,5 h). Pour ce test, la concentration en glucose dans le milieu est maximale (23 g/L) et le taux de consommation de glucose est minimal (78,1%). Notons que la régulation du pH de ce test n'a pu être réalisée finement, du fait de variations rapides du pH de l'effluent. Toutefois, malgré une consommation du glucose équivalente (78,4%),  $R_{H_2}$  ajouté et  $R_{H_2}$  consommé sont 1,5 fois plus élevés pour le test BRM-726j, réalisé avec un DAS légèrement plus élevé (2,0 g/L/h) et un TSH deux fois plus faible (7,8 h) soit un taux de glucose de 15,6 g/L, plus proche de l'optimum mis en évidence sur la figure 42.

Pour un même DAS, on observe que  $R_{H_2}$  augmente lorsque le TSH est croissant, alors que pour un même TSH, il n'y a pas de corrélation entre  $R_{H_2}$  et le DAS.

### 5.1.3 Productivité

La productivité en hydrogène  $P_{H_2}$  est comprise entre 66,5 et 253,7 mL/L/h. On observe que l'augmentation du DAS permet d'augmenter  $P_{H_2}$  (figure 43), excepté pour le test BRM-677 j (DAS = 1,7 g/L/h) avec les moins bons rendements. Pour un même TSH, on observe que plus le DAS, et donc la concentration en glucose, est élevé, plus la productivité en hydrogène est élevée. Néanmoins, cette augmentation n'est pas linéaire (à TSH = 8 h).

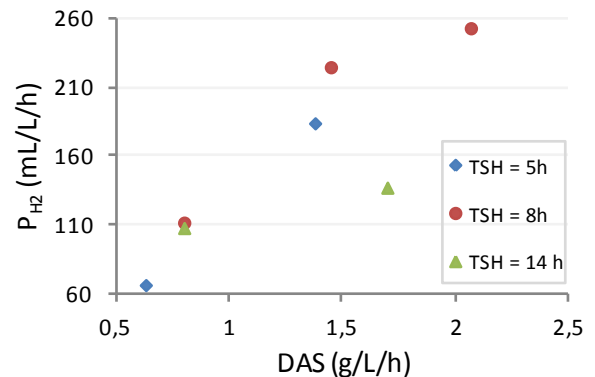


Figure 43 : Corrélation entre la productivité en hydrogène et le DAS pour différents TSH

#### 5.1.4 Rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

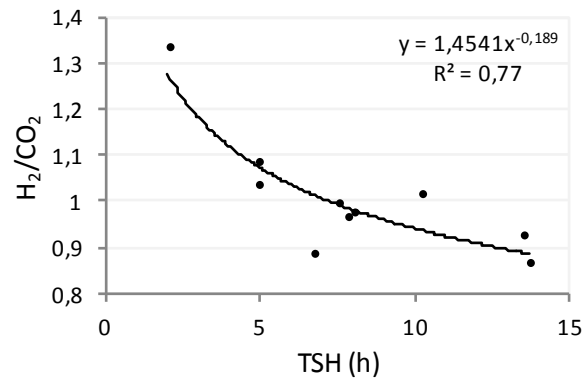
Pour la majorité des tests, le rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> varie peu (de 0,87 à 1,09), mais on note tout de même que plus le TSH est grand, plus le rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> est faible (figure 44).

Notons que pour un TSH faible (2,1 h) et un DAS moyen (1,4 g/L/h), le rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> se détache (+35% par rapport à la moyenne des tests). Cette différence peut être explicable par un ajout de solution de NaOH pour réguler le pH plus important pour ce test. En effet, l'équilibre du CO<sub>2</sub> est dépendant de la concentration d'ions hydroxyde dans le milieu (38) (Iida *et al.*, 2007) :



De plus, pour un TSH faible, le débit de liquide parcourant le BRM est élevé. Ainsi, un TSH faible permet d'évacuer plus de CO<sub>2</sub> dissous via l'effluent, ce qui est profitable au rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

*Ainsi, pour un DAS ≈ 1,4 /L/h, il est possible faire de fonctionner le BRM pour un TSH compris entre 2 et 10,2 h. L'augmentation du TSH a un impact positif sur la productivité et le rendement en hydrogène (relation linéaire). De la même façon, mais pour toutes les séries de TSH, l'augmentation du DAS est corrélée à l'amélioration de la productivité en hydrogène. Le produit TSHxDAS, correspondant à la concentration en glucose dans le milieu de culture, semble être un paramètre clé des performances de production en hydrogène dans le BRM. En effet, l'augmentation de la concentration en substrat permet d'augmenter le R<sub>H<sub>2</sub></sub> consommé jusqu'à un optimum vers 14 g/L. Au-delà de cet optimum, on observe une baisse du rendement en hydrogène.*



**Figure 44 : Corrélation entre le rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et le TSH**



## 5.2 Production de métabolites

Les valeurs de bilans DCO en période de fonctionnement pseudo-stable de l'ensemble des tests (figure 45) sont comprises entre 45 et 92%. Cela signifie que l'équivalent DCO final n'a pas été identifié complètement pour tous les tests. On note que le glucose n'a pas toujours été consommé en totalité.

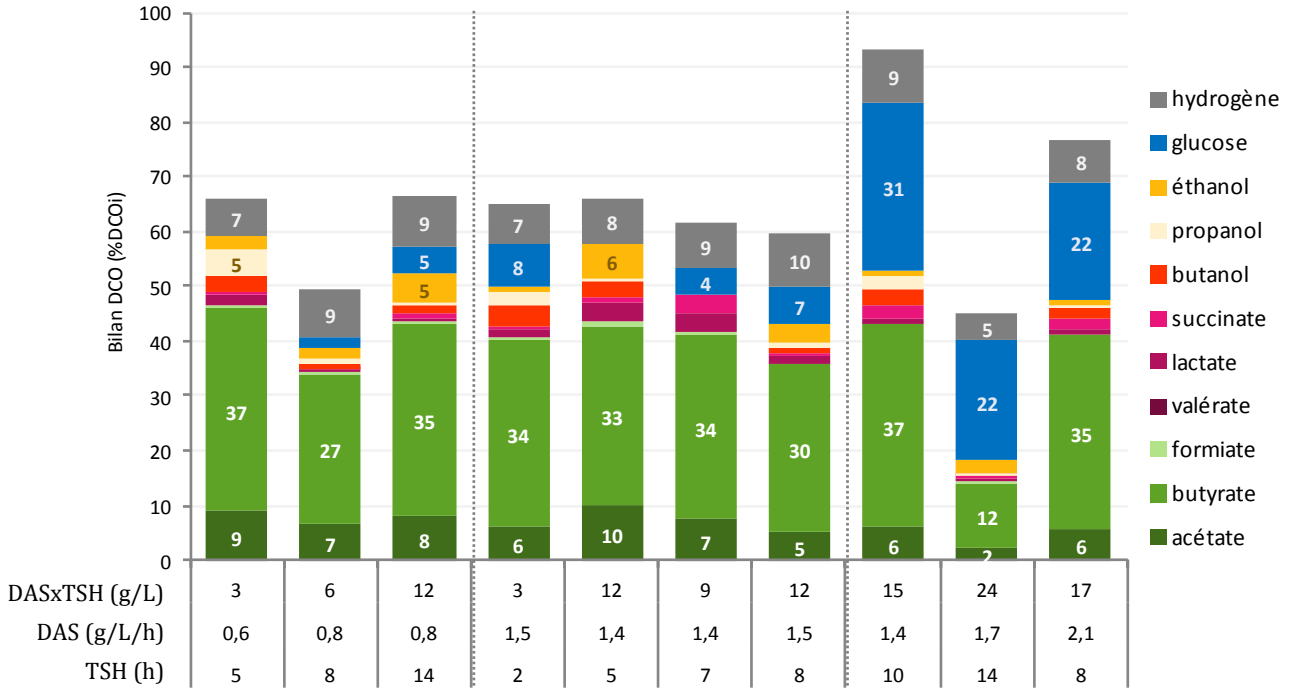


Figure 45 : Bilans DCO avec différentes combinaisons TSH/DAS

La figure 46 présente l'analyse des métabolites en fonction d'un DAS croissant et pour différentes valeurs de TSH en période de fonctionnement pseudo-stable de l'ensemble des tests (a) ainsi que les corrélations ayant été identifiées (b et c).

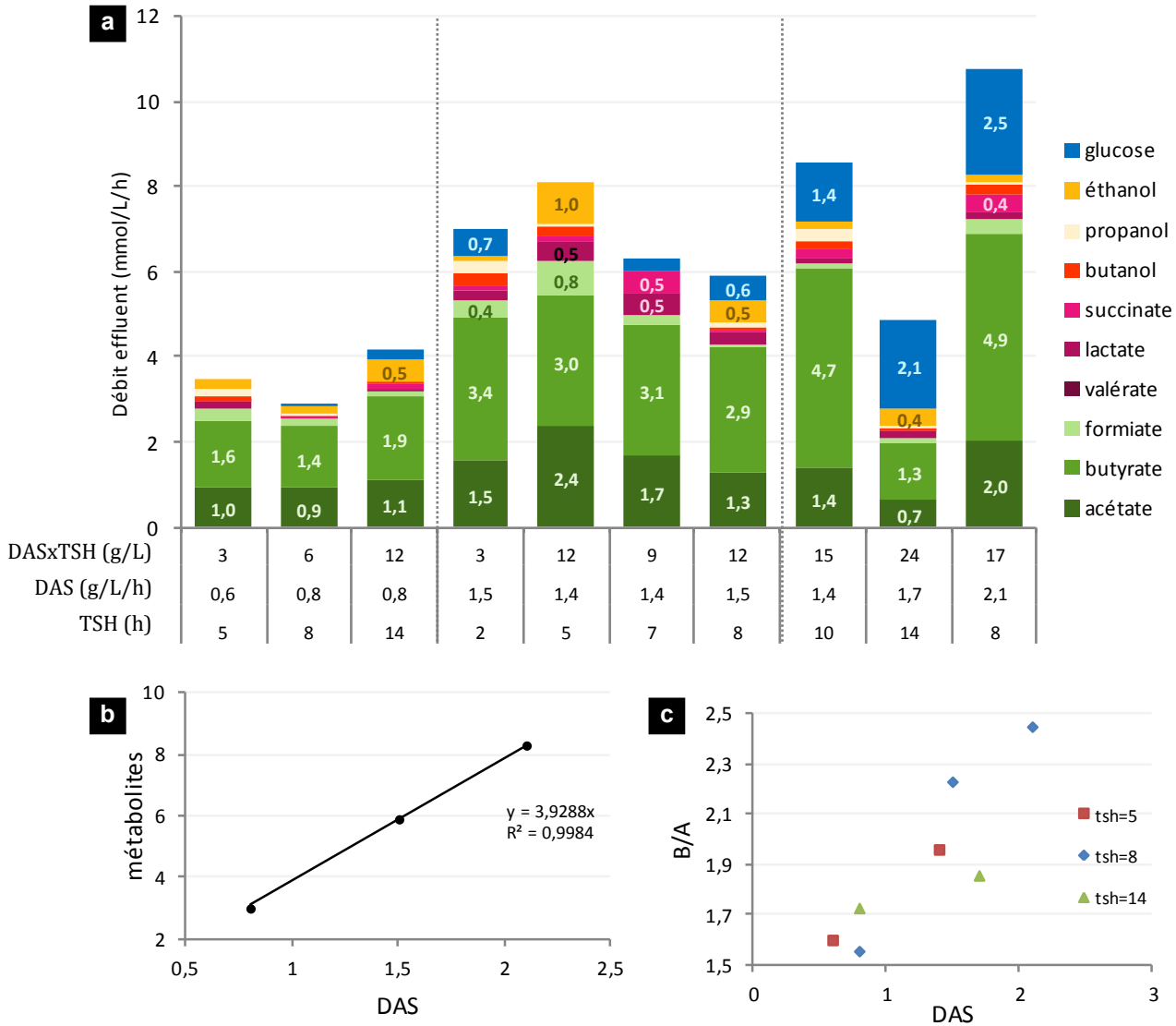
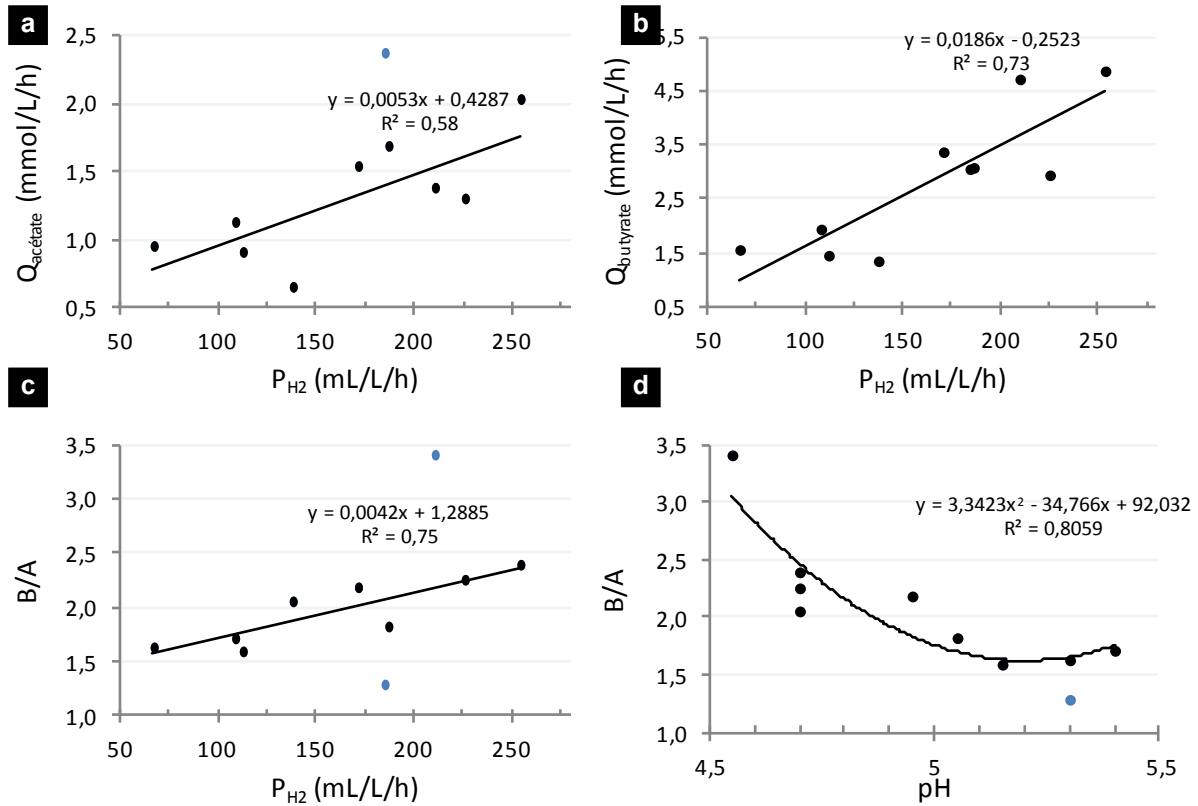


Figure 46 : Débits de métabolites majoritaires (>0,1 mmol/L/h) et de glucose dans l'effluent du module membranaire avec différentes combinaisons TSH/DAS (TSH = 8h) et corrélations entre la productivité en hydrogène et le débit de métabolites pour un TSH de 8 h (b), et entre le rapport molaire B/A et le DAS (c)

On remarque que la productivité en métabolites augmente globalement avec le DAS, indépendamment du TSH (figure 46b) sauf pour le test le plus concentré en substrat (DAS = 1,7 g/L/h) et que cette augmentation est proportionnelle pour TSH = 8h. Les métabolites majoritaires sont le butyrate et l'acétate pour tous les tests. Le rapport B/A augmente avec DAS, quel que soit le TSH (figure 46a). Le rapport B/A augmente sensiblement avec le TSH mais est surtout dépendant du DAS, quel que soit le TSH (figure 46c). Du formiate, du lactate, du succinate et de l'éthanol sont formés de façon minoritaire. Il y a plus de formiate lorsque le pH est supérieur à 5 (cf tableau 19). Notons que pour le test à TSH = 5h et DAS = 1,4 g/L/h (pH à 5,3), la consommation en glucose est maximale (100%) et le rapport B/A est minimal, avec une forte production de formiate.

On observe une tendance correspondant à une augmentation de la productivité en hydrogène avec la productivité en acétate et en butyrate (figure 47a et figure 47b). De même, on observe un lien entre productivité en hydrogène et rapport B/A (figure 47c).



**Figure 47 :** Corrélations entre la productivité en hydrogène et le débit acétate (a), entre la productivité en hydrogène et le débit butyrate (b), entre le rapport molaire B/A et le pH (c) et entre le rapport molaire B/A et la productivité en hydrogène (d). En bleu, les points exclus des corrélations.

Ainsi, l'augmentation de la productivité en hydrogène est corrélée à l'augmentation du rapport B/A. Le butyrate, uniquement coproduit avec l'hydrogène est associé avec de bonnes productions d'hydrogène et alors qu'une part de la production d'acétate est issue de l'homoacétogénèse (voie non co-productrice d'hydrogène). Enfin, on note un effet du pH sur le rapport B/A (figure 47c) avec un rapport B/A plus élevé pour les pH les plus acides (environ 4,6).

*Pour un DAS équivalent ( $\approx 1,4$  /L/h), le rendement et la productivité en hydrogène augmentent avec le TSH alors que les débits et compositions en métabolites sont proches hormis une surproduction de butyrate pour un TSH de 9,8h. On peut donc supposer que l'extraction de l'hydrogène est améliorée pour des TSH plus élevés ou que des TSH plus grands sont liés à une meilleure orientation du métabolisme (limitation de la production d'acétate par homoacétogénèse).*

*Pour un même TSH, la quantité totale de métabolites produits (majoritairement butyrate et acétate) est directement proportionnel au DAS et donc à la teneur en glucose dans le milieu réactionnel. On observe une augmentation du rapport molaire B/A en fonction du débit d'alimentation*

### 5.3 Analyse microbiologique

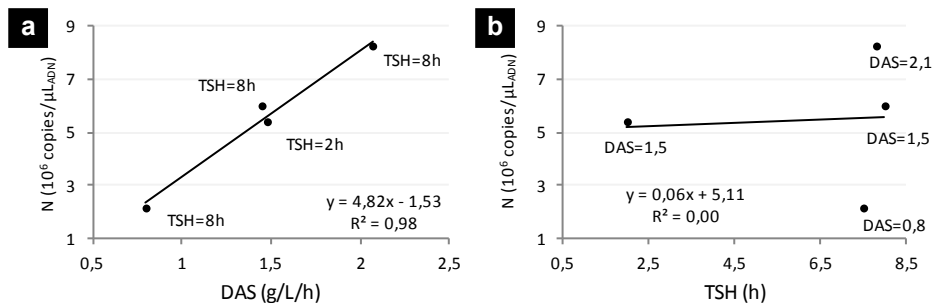
Des échantillons de l'effluent ont été prélevés pour différentes combinaisons TSH/DAS. L'ADN des culots bactériens de ces échantillons a été extrait comme décrit précédemment et l'ADN codant l'ARN 16S a été analysé par séquençage Illumina à haut débit et qPCR (tableau12).

**Tableau 20 : Diversité bactérienne des échantillons avec différents TSH/DAS analysés par séquençage et qPCR**

TSH (h)	DAS (g/L/h)	[glucose] (g/L)	Nombre d'OTU	Indice de Simpson	Indice de Shannon	ACE*	qPCR
2	1,5	3	52	0,29	1,61	52,84	5,41 x 10 <sup>7</sup>
8	0,8	6	80	0,21	2,02	81,90	2,15 x 10 <sup>7</sup>
8	1,5	12	40	0,20	1,93	40,70	6,01 x 10 <sup>7</sup>
8	2,1	17	48	0,24	1,68	49,02	8,27 x 10 <sup>7</sup>
14	0,8	12	100	0,20	1,93	106,5	/

\*Abundance-based Coverage Estimator

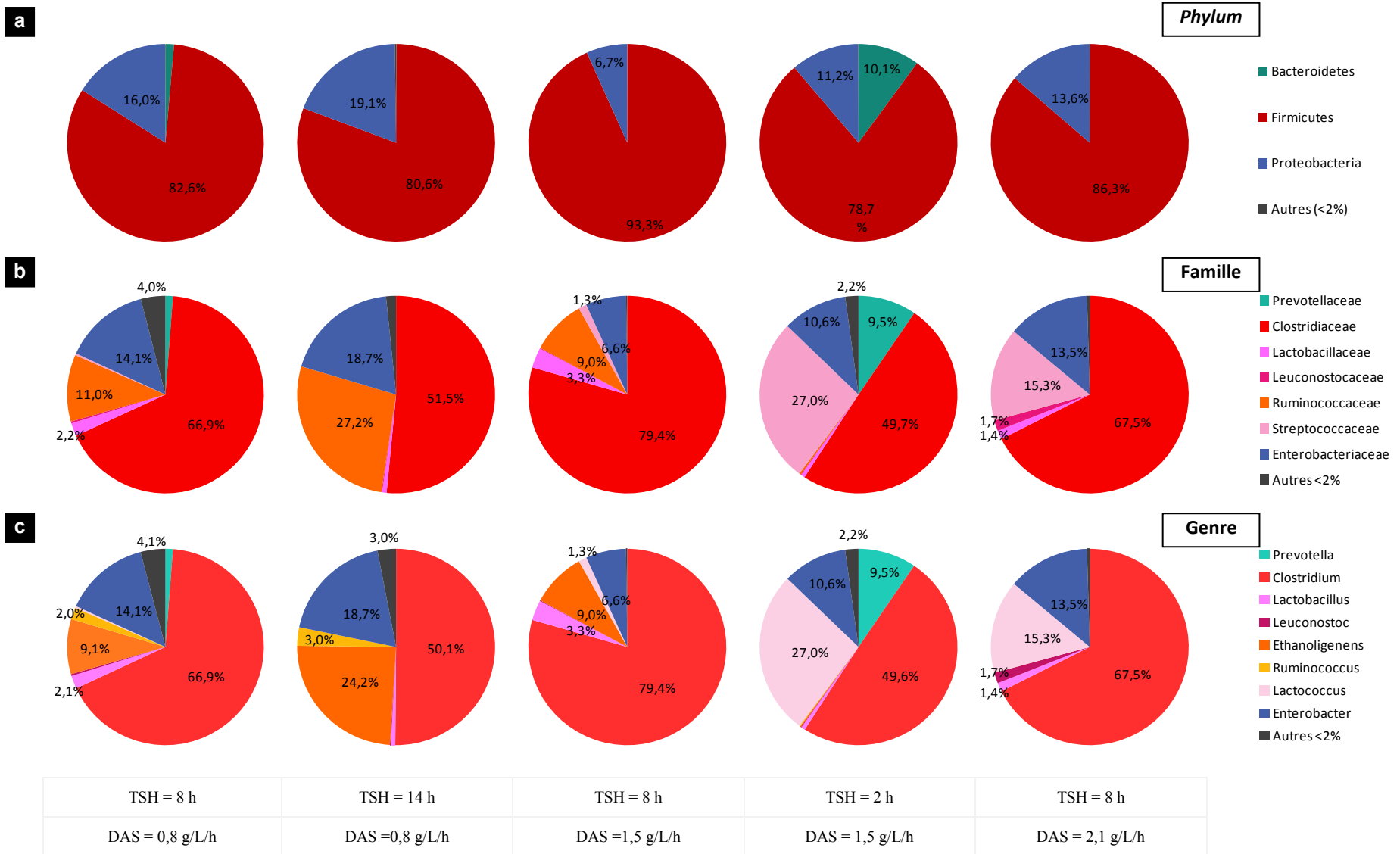
La variation du nombre d'OTU ne semble pas corrélable au DAS ni au TSH. Les indices de Simpson et de Shannon sont similaires pour les différents tests, la diversité bactérienne est donc comparable et importante de bactéries dans le bioréacteur. L'indice ACE est le plus élevé pour TSH = 14 h. La figure 48a présente la relation affine entre le nombre de bactéries N (copies<sub>ADN16S</sub>/μL<sub>ADN extrait</sub>) s'étant développées dans le milieu fermentaire du BRM en fonction du DAS et la figure 48b présente cette même relation entre N avec le TSH.



**Figure 48 : Corrélation DAS-N (a) et TSH-N (b)**

Il y a une forte corrélation positive ( $R^2=0,98$ ) entre le DAS et N : quel que soit le TSH, le nombre de bactéries se développant dans le milieu augmente avec le DAS. Comme la courbe  $N=f(DAS)$  est une droite, le milieu réactionnel n'est donc pas saturé en bactéries, il serait encore possible d'augmenter le DAS pour augmenter la concentration bactérienne dans le milieu. Il n'y a pas de corrélation ( $R^2=0,00$ ) entre le TSH et le nombre de bactéries se développant dans le milieu réactionnel.

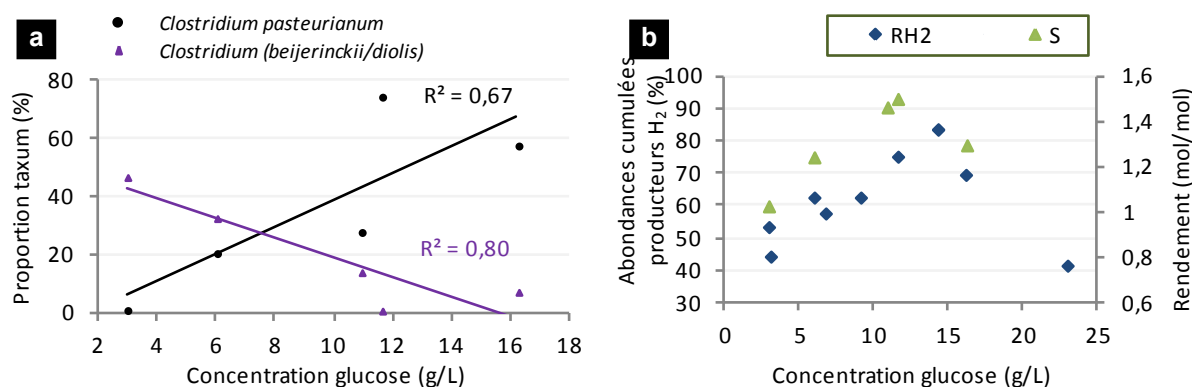
La figure 49 présente les abondances des populations de ces tests au niveau du *phylum* (a), de la famille (b) et du genre (c).



**Figure 49 Répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation des tests de fermentation à 68 h avec différentes combinaisons de TSH et DAS - Abondance >2% pour au moins un échantillon**

Quelle que soit la combinaison TSH/DAS, le *phylum Firmicutes* est fortement majoritaire (78,7-93,3%). Sa proportion est maximale pour un TSH de 8 h et un DAS de 1,4 g/L/h. Le *phylum Proteobacteria* est présent de façon minoritaire (6,7-19,1%). Le *phylum Bacteroidetes*, minoritaire (<10%), décroît avec l'augmentation de la concentration en glucose dans le milieu. Au niveau des familles, la composition du *phylum Firmicutes* est variable avec la présence majoritaire de *Clostridiaceae-Ruminococcaceae* ou la présence majoritaire de *Clostridiaceae-Streptococcaceae* pour les conditions de concentration en glucose la plus élevée (TSH = 8 h et DAS = 2,1 g/L/h) et la plus faible (TSH = 2 h et DAS = 1,5 g/L/h). Un genre bactérien domine systématiquement une famille. Ainsi, les observations notées pour les familles précédemment sont valables pour les genres. Seule la famille *Ruminococcaceae* laisse émerger deux genres : *Ruminococcus* et *Ethanoligenens*.

Le tableau 21 présente l'identification des espèces. On remarque qu'à faible DAS (0,8 g/L/h) et à un TSH élevé (14 h), la diversité bactérienne est la plus forte avec la présence de *Clostridium pasteurianum* (28,1%), *Clostridium (beijerinckii/diolis)* (14,2%), *Enterobacter* (18,7%) et l'émergence en proportion élevée (24,2%) d'*Ethanoligenens harbinense*. Pour la teneur en glucose de 3 g/L (TSH = 2h, DAS = 1,5 g/L/h), le genre *Lactococcus* est fortement représenté par plusieurs *taxa* (26,9%). Notons la faible émergence de *Lactobacillus satsumensis* pour les tests à TSH = 8 h. La figure 50 présente les corrélations identifiées entre la concentration en glucose et les différents *taxa* bactériens.



**Figure 50 : Corrélations identifiées entre la concentration en glucose et l'abondance des *taxa* et la concentration en glucose (a), l'abondance cumulée (S) et le rendement en hydrogène (R<sub>H2</sub>) de *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii/diolis* et *Enterobacter sp.*, *E. harbinense* (b)**

Le pourcentage de *Clostridium pasteurianum* croît en fonction de la teneur en glucose dans le milieu réactionnel alors qu'au contraire, *Clostridium (beijerinckii/diolis)* est majoritaire dans les conditions de faibles concentrations en glucose ([glucose] = 3-6 g/L) (figure 50a). Si l'on tient compte du nombre de bactéries (qPCR x Abondance (%)) (figure non présentée), on observe une tendance similaire.

*Le phylum Firmicutes est majoritaire pour l'ensemble des tests. L'optimum de rendement en hydrogène obtenu à une concentration en sucres de 14 g/L semble parfaitement corrélé avec une abondance maximale de bactéries productrices d'hydrogène dans l'effluent du BRM.*

**Tableau 21 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des tests avec différentes combinaisons DAS/ TSH - Abondance >1% pour au moins un échantillon**

						5	4,7	5,1	4,7	5,4	pH
						-250	-250	-500	-350	-350	ORP
						3	12	6	17	11	C <sub>glucose</sub> (g/L)
						1,5	1,5	0,8	2,1	0,8	DAS (g/L/h)
						2	8	8	8	14	TSH (h)
<b>Phylum</b>	<b>Famille</b>	<b>Genre</b>	<b>Meilleure correspondance dans la base de données NCBI</b>	<b>Homologie (%)</b>	<b>n° ordre</b>	68	68	45	68	68	t <sub>fermentation</sub> (h)
Bacteroidetes	Prevotellaceae	Prevotella	<i>Prevotella paludivivens</i>	100	NR_113122.1	9,5	<0,1	1	<0,1	0	
			<i>Caloramator</i>	<i>Caloramator quimbayensis</i>	95	NR_109502	<0,1	<0,1	<0,1	0	1,4
Firmicutes	Clostridiaceae	Clostridium	<i>Clostridium (beijerinckii/diolis)</i>	99	/	47,1	0,9	32,9	7,4	14,2	
			<i>Clostridium pasteurianum</i>	99	NR_104822.1	1,1	74,9	20,8	58	28,1	
			<i>Clostridium (punense/huakuui/tunisiense)</i>	96	/	0,1	0,1	10,7	<0,1	0,3	
			<i>Clostridium (carboxidivorans/drakei)</i>	100	/	1,2	2	2,2	<0,1	5,5	
	Lactobacillaceae	Lactobacillus	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	99	NRIC0604	0,6	3,3	1,7	1,4	0,7	
	Leuconostocaceae	Leuconostoc	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99	NR_109004.1	0,1	0,1	0,3	1,7	0,1	
	Ruminococcaceae	Ethanoligenens	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	98	NR_074333.1	0,2	9	7,6	0,0	24,2	
		Caproiciproducens	<i>Caproiciproducens galactitolivorans</i>	<96	NR_145929.1	<0,1	<0,1	0,6	0	1,7	
	Sporomusaceae	Propionispora	<i>Propionispora hippei</i>	96	NR_114884.1	0,7	0	1,4	<0,1	0,9	
	Streptococcaceae	Lactococcus	<i>Lactococcus (laudensis/raffinolactis/chungangensis)</i>	100	/	22,3	0,2	0,2	14	0	
Lactococcus		<i>Lactococcus hircilactis</i>	99		4,6	0,9	<0,1	0,5	0		
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	Enterobacter	<i>Enterobacter sp.</i>	-	-	10,6	6,5	11,8	13,5	18,7	
	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	<i>Stenotrophomonas (pavanii/maltophilia)</i>	100	/	<0,1	<0,1	1	<0,1	<0,1	

## 5.4 Discussion

L'objectif de l'étude de l'effet du TSH et du DAS était en premier lieu de préciser les limites opératoires de la configuration BRM liquide/gaz (L/G), sans réensemencement du module membranaire, pour la production d'hydrogène. Des tests pour lesquels le TSH varie entre 2 et 14 h et le DAS entre 0,6 et 2,1 g/L/h ont été réalisées ; de l'hydrogène a été généré pour l'ensemble de conditions mises en oeuvre. Des productivités comprises entre 66,5 et 253,7 mL/L/h, soit entre 1,6 et 6,1 L/L/j, ont été obtenues. Notamment, pour le plus faible TSH (2 h), il n'y a pas eu de lessivage des communautés bactériennes, contrairement à ce qui a été observé dans l'étude de Park *et al.* (2018b). En effet, cette étude, sur un bioréacteur à membrane dynamique (BRM à extraction solide/liquide (S/L) avec une membrane de filtration clarifiante (pores de 100 $\mu$ m) où se développe un biofilm), à TSH = 2 h (DAS = 7,5 g/L/h) la biomasse bactérienne est lessivée, ce qui entraîne une diminution du rendement et de la productivité. Ceci est peut-être dû aux différences de configuration et de volume des bioréacteurs (5,5 L contre 0,5 L pour notre BRM). En effet, les contraintes de cisaillement générées par un débit plus important peuvent décrocher le biofilm de la surface de la membrane S/L ou limiter sa formation.

De plus, dans notre étude, la consommation du glucose reste importante pour un TSH de 2h dans le BRM (91%), contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature en CSTR, où le taux de conversion du glucose chute de 90,4% à 77,8% lors du passage d'un TSH de 8 h (DAS = 1,3 g/L/h) à 6h (DAS = 1,7 g/L/h) (Zhang *et al.*, 2006). Pour l'ensemble de nos tests, la consommation du glucose dépend de la concentration en glucose dans le milieu réactionnel. Lorsque celle-ci est inférieure à 14 g/L, le taux de conversion du glucose est élevé (92-100%), il diminue pour des concentrations en glucose supérieures à 78% environ, sans influence du TSH. A DAS fixe (1,5 g/L/h), le taux de conversion du glucose décroît de 100% à 82% avec l'augmentation du TSH de 5 à 10 h ; et donc avec la concentration en glucose. Ainsi, il semble que la limite de fonctionnement basse du BRM n'a pas été atteinte lors de notre étude, en ce qui concerne le taux de consommation du glucose ; il est alors potentiellement possible de diminuer davantage le TSH tout en augmentant le DAS, afin d'augmenter la productivité du bioréacteur, comme observé dans le BRM S/L mis en oeuvre dans l'étude de Lee *et al.* (2014), tout en évitant la problématique de colmatage de la membrane associée à la mise en oeuvre du BRM S/L à des DAS élevés.

Suite à l'optimisation des paramètres opératoires (TSH, DAS) du BRM L/G, un optimum de fonctionnement concernant le rendement et la productivité en hydrogène a été extrait, qui diffère pour ces deux critères. Un optimum double a également été rapporté dans l'étude de Kumar *et al.* (2014), avec une concentration constante de 15 g/L de glucose dans l'alimentation en CSTR. Les auteurs rapportent une productivité maximale en hydrogène de 4,49 L/L/j à TSH = 6 h (DAS = 2,5 g/L/h) et un rendement de production de 1,62 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucose</sub> ajouté à TSH = 18h (DAS = 1,2 g/L/h).



Dans notre étude, le rendement en hydrogène ajouté optimal est obtenu pour une concentration en glucose de 12-14 g/L (TSH = 8-10h et DAS = 1,4 g/L/h). Pour ces tests, on observe de bonnes productivités en hydrogène (210-225 mL/L/h), un rapport B/A élevé (2,2-3,4), avec de fortes productions de butyrate (>50% des métabolites produits) et un rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> de 1. Le rendement en hydrogène peut être corrélé avec le pourcentage d'abondance des bactéries productrices d'hydrogène dans le milieu réactionnel (*Clostridium pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii/diolis*, *Enterobacter sp.*). La productivité maximale est obtenue avec un DAS élevé (2,1 g/L/h) et une teneur en glucose dans le milieu réactionnel de 16 g/L (proche de la concentration en glucose du rendement optimal). Le nombre de bactéries est croissant avec l'augmentation du DAS. On observe une synergie *Clostridium pasteurianum*, *Ethanoligenens harbinense* et *Clostridium drakei* pour la concentration autour de l'optimum (12 g/L). Le rendement élevé est associée à une forte production de butyrate (>50% des métabolites produits), avec un rapport B/A élevé (2,5) et un rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> de 1. Les analyses microbiologiques montrent que ces conditions favorisent le développement de *C. pasteurianum* qui est très majoritaire (>50% des séquences analysées), représentant plus de 4,5.10<sup>7</sup> bactéries dans l'effluent sortant du BRM L/G. La domination de cette bactérie semble être la source des bonnes performances de production d'hydrogène observées à 12 et 14 g/L de glucose dans le milieu réactionnel. Dans l'ensemble, la productivité en hydrogène est améliorée avec l'augmentation du débit d'alimentation en substrat ce qui est cohérent avec les résultats de l'étude de Van Ginkel et Logan (2005).

Néanmoins, pour les tests où la productivité est améliorée avec l'augmentation du DAS, le rendement en hydrogène diminue (à TSH fixe), l'utilisation de substrat et donc l'efficacité du bioréacteur est alors limitée. Fangkum et Reungsang (2011) ont rapporté qu'une concentration élevée en glucides totaux dans l'alimentation peut diminuer le rendement en hydrogène à cause de l'accumulation d'acides gras volatils (AGV) pouvant inhiber la croissance des microorganismes. En effet, les AGV peuvent provoquer lyse des cellules si leurs formes dissociées sont présentes dans le milieu de culture. Dans l'étude de Noblecourt *et al.* (2017), cette limite est de 12,5 g/L, cependant, dans notre cas, la concentration maximale en métabolites atteinte est de 5,3 g/L. L'hypothèse de l'inhibition par les AGV est pertinente pour des concentrations en glucose de 15-17 g/L dans notre étude (DAS = 2,1 g/L/h, TSH = 8 h), mais des concentrations en métabolites similaires ont été atteintes pour l'optimum de rendement en hydrogène (DAS 1,4 g/L/h, TSH = 10 h). Il n'est pas exclus que la limite de l'extraction *in situ* de l'hydrogène produit ait été atteinte, pouvant avoir un effet inhibiteur sur le métabolisme bactérien. Dans ce cas, l'augmentation du nombre de fibres du module membranaire permettrait de favoriser l'extraction de l'hydrogène et ainsi d'augmenter la capacité de production du BRM.

A l'inverse, à de faibles concentrations en substrat, les bactéries sont supposées utiliser le substrat carboné essentiellement pour leur croissance et non la production de biogaz (Hastuti *et al.*, 2016). Ce dernier point pourrait expliquer la légère baisse de rendement observée dans le BRM L/G à TSH =2 h et concentration en glucose de 3 g/L par rapport à l'optimum (-25%

environ). En effet, pour ce test, il a été observé une augmentation significative de la quantité de floccs produits. Il semble que les croissances des populations de *C. pasteurianum* et d'*Enterobacter sp.* soient ralenties dans ces conditions, au profit de et *Clostridium beijerincki/diolis* et *Lactococcus sp.*, cette dernière espèce ne produisant pas d'hydrogène. Il pourrait être intéressant de tester un faible TSH sur une durée plus longue et avec un DAS plus élevé. En effet, lors de l'étude des communautés bactériennes dans le module membranaire, il avait été observé une forte présence de *Clostridium beijerinckii* en début de test ( $t = 20\text{h}$ ), puis une diminution de ce taxon au profit d'une augmentation progressive de la part de *Clostridium pasteurianum* ( $t = 53\text{ h}$  et  $t = 96\text{ h}$ ). Dans l'étude de variation de TSH et de DAS, on a constaté que la part de *Clostridium beijerinckii* diminue avec l'augmentation de la concentration en glucose, de façon inversement proportionnelle à l'augmentation de *C. pasteurianum* avec l'augmentation de la concentration en glucose. De plus, le nombre de bactéries du genre *Enterobacter* augmente avec la concentration en glucose. Ainsi, l'augmentation de la concentration en glucose couplée à une durée de fonctionnement plus longue pourrait permettre de favoriser l'émergence de ces espèces.

## 6 Conclusion

La robustesse du procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure en BRM (extraction liquide/gaz) a été montrée jusqu'à 432 jours dans des conditions identiques (TSH = 13-14h, DAS = 0,8 g/L/h,  $C_{\text{alim}} = 12\text{ g/L}$ ). Un raffinage des communautés bactériennes se développant dans le module membranaire a été observé par rapport à un fonctionnement avec ensemencement (boues anoxies prétraitées thermiquement) du module membranaire. La démonstration de la possibilité d'extraire les gaz de façon efficace sans gaz de balayage, en maintenant les performances de production d'hydrogène, est une amélioration notable du procédé. En effet, l'augmentation du débit de gaz de balayage n'est que légèrement bénéfique sur les performances de production d'hydrogène. Une gamme de TSH de 2-14h a été testée à DAS fixe (1,4 g/L/h). Une gamme de DAS de 0,7 à 2 g/L/h a été testée à TSH fixe (8h). Il s'avère que la concentration en glucose est le paramètre ayant le plus d'impact sur les performances de production du BRM. Un optimum de rendement en hydrogène a été obtenu à une concentration de 12-14 g/L en ne consommant que 80% du substrat. La productivité est améliorée pour des concentrations en glucose plus élevées, mais au détriment du rendement. De plus, avec cette concentration en substrat, 4 taxa qui semblent efficaces pour la production d'hydrogène sont sélectionnés: *Clostridium pasteurianum*, *Enterobacter sp.*, *Ethanoligenens harbinense* et *Clostridium drakei*. La suite de ce travail de thèse porte sur la mise en œuvre du procédé avec une alimentation en biomasses complexes. Différentes biomasses seront testées puis mises en œuvre dans le bioréacteur.

## Chapitre IV

# Production d'hydrogène à partir de déchets organiques agricoles et agroalimentaires. Prétraitements physiques et enzymatiques.

## 1 Introduction

### 1.1 Choix des biomasses et de la fermentation endogène

Les déchets organiques, et en particulier les déchets et coproduits de l'agriculture et de l'industrie agroalimentaire présentent une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : renouvelabilité, abondance, absence de conflits d'usage. L'ensemble des flux de ces filières agroalimentaires autres que ceux destinés à l'alimentation humaine en première intention sont donc des substrats potentiels pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. Si l'on calcule la quantité de coproduits agricoles et agroalimentaires non valorisés à l'heure actuelle, 2,8 millions de tonnes de matières sèches seraient disponibles pour la fermentation obscure sans entrer en compétition avec une filière de valorisation existante, d'après les données issues du rapport RESEDA (2017). Certaines biomasses déjà valorisées peuvent également servir pour la production de biohydrogène.

Tout au long de ce travail de thèse, des entretiens ont été réalisés avec différents industriels (brasseries, malterie, usine de torréfaction de café) et artisans (microbrasserie) du département du Bas-Rhin (67). A l'issue de ces rencontres, des déchets et coproduits, issus de productions agricoles et agroalimentaires et répondant en partie ou en totalité aux critères énoncés précédemment ont été identifiés et collectés. Un partenariat était également déjà en place avec un domaine viticole, qui a fourni des échantillons de biomasses. Les origines de ces déchets coproduits ont été détaillées dans l'introduction bibliographique, leurs productions annuelles en France et les voies de traitement actuelles sont résumées dans le tableau 22.

**Tableau 22 : Origine et tonnages de production en France des biomasses de notre étude (IVV, 2013 ; sources industrielles)**

Filière	Coproduit	Production en France (t)	Voies de traitements actuelles en France
Vin	Bourbes et lies	1 497 600	Distillerie, compostage, épandage, méthanisation
Vin	Marc de raisin	945 360*	Distilleries, compostage, épandage, méthanisation
Vin	Raisin « moisi »	/	/
Brasserie	Levures	47566	Alimentation animale
Brasserie	Kieselguhr	5284	/
Brasserie	Eaux de process	n.d.	STEP*** sur site
Brasserie	Drèches	283 036	Vente pour alimentation animale
Microbrasserie	Drèches	n.d.	Don pour alimentation animale
Malterie	Radicelles d'orge		Vente pour alimentation animale****
Malterie	Eaux de process		Production de microalgues*****
Café torréfié	Pellicules argentées	2096**	Don pour engrais

\*estimation réalisée à partir de ratios appliqués aux volumes de vins produits en 2015 (Ministère de l'Action et des Comptes publics, 2017 ; IFV, 2013) ; \*\*calculé, en supposant que la quantité moyenne de café vert importée (251631 t entre 2009 et 2013) est torréfiée, avec 1t de PA par 120 t de café torréfié (Alves et al., 2017 ; source industrielle) ; \*\*\*Station d'Épuration ; \*\*\*\*sauf « radiceilles humides » de dégrillage ; \*\*\*\*\*une seule usine concernée ; nd = non disponible

Certaines biomasses sont déjà incluses dans des filières de valorisation. La valorisation en alimentation animale de drèches et levures brassicoles et de radiceilles d'orge est réalisée en direct élevage (*i. e.* sans intermédiaire, du producteur à l'agriculteur) pour une raison pratique et économique : l'humidité limite le transport et le stockage de ces denrées (Dormont *et al.*, 2000 ; RESEDA, 2017). Il est donc possible d'envisager l'utilisation d'une partie de ces coproduits pour la production d'hydrogène. Concernant les coproduits vitivinicoles, l'obligation réglementaire d'élimination après leur production peut être satisfaite par la livraison à une distillerie, à un centre de méthanisation ou à un centre de compostage, de tout ou partie des marcs et lies. Il est également possible de réaliser la méthanisation, l'épandage ou le compostage sur le lieu de l'exploitation. Ainsi, ces biomasses, très abondantes et riches en glucides métabolisables, se prêtent à la production d'hydrogène, comme alternative à la méthanisation ou en amont de cette étape.

D'autres biomasses sont peu ou pas valorisées. En effet, nous n'avons pas connaissance d'une filière de valorisation de raisins « moisis » mais ceux-ci sont écartés de la récolte de raisin. Le kieselguhr issu du procédé de production de bière n'est pas valorisé par la brasserie qui nous a fourni les échantillons. Les eaux de process sont traitées sur site, dans une STEP. Concernant la malterie, il y a deux types de coproduits : des radiceilles sèches, vendues en alimentation animale, et des radiceilles humides, non valorisées. Pour la production de microalgues alimentées en eaux de process, une seule malterie est concernée (différente de celle qui nous a fourni les échantillons). Pour les pellicules argentées de café torréfié, l'usine en fait don à une association pour une utilisation comme engrais. Il est ainsi possible d'envisager l'utilisation de ces biomasses à des fins énergétiques, en partie ou en totalité selon les cas.

A notre connaissance, la production d'hydrogène par fermentation endogène de biomasses, ayant le rôle d'*inoculum* et de substrat, n'est pas commune. En effet, dans la plupart des tests, un *inoculum* riche en bactéries productrices d'hydrogène est ajouté au démarrage du procédé (Ghimire *et al.*, 2015). De plus, des prétraitements de l'*inoculum* sont généralement mis en œuvre pour limiter l'expression de méthanogènes, nécessaires car l'*inoculum* est souvent constitué de boues de STEP ou issues de méthaniseur. Dans les travaux de thèse de François-Lopez (2016), il a été montré que pour une biomasse donnée (bourbes viticoles), de meilleures performances de production peuvent être obtenues sans prétraitement. Ainsi, en première approche, il est pertinent de tester la fermentation endogène pour un ensemble plus varié de biomasses.

## 1.2 Possibilité d'un prétraitement des biomasses

La biomasse est source de composés organiques, substrats de la production d'hydrogène par fermentation obscure. Les monosaccharides (glucose et fructose) et les disaccharides (saccharose, maltose, etc.) sont les sources de carbone préférentielles du métabolisme microbien lors de la fermentation obscure, pouvant directement être métabolisées. Les macromolécules végétales (cellulose, hémicellulose, amidon) peuvent, après hydrolyse, être utilisées comme substrats. L'utilisation de glucides complexes, résistants à une action biologique directe de par leur nature compacte et les liaisons hydrogène existantes entre les monomères glucidiques, nécessite une étape d'hydrolyse préalable à leur consommation par les microorganismes. Cependant, l'ajout d'un prétraitement impacte le coût total de production. En vue de la mise en œuvre de la fermentation des biomasses pauvres en substrat directement métabolisable en bioréacteur membranaire continu, l'implémentation de prétraitements physiques et enzymatiques ont été testés.

## 1.3 Objectifs de l'étude et conditions de mise en œuvre des tests

Les objectifs de cette étude sont donc :

- d'évaluer le potentiel de différentes biomasses pour la production de biohydrogène par fermentation obscure en bioréacteur semibatch, selon plusieurs critères : productions  $H_2$  et  $CO_2$  en  $L/kg_{\text{biomasse}}$ , rendement DCO en  $mL_{H_2}/g_{DCO}$ , productivité maximale en  $mL_{H_2}/L_{\text{réacteur}}/h$ ,
- de comprendre les mécanismes de production d'hydrogène et des métabolites associés, ou de métabolites compétiteurs à la production souhaitée et de connaître les voies métaboliques empruntées par les *consortia* bactériens lors des tests de fermentation, selon les biomasses et leur composition,
- d'identifier des compositions de communautés bactériennes favorables à la production d'hydrogène émergeant par fermentation endogène,

- d'établir des groupes (par nature ou composition des biomasses) selon les paramètres expliquant les profils de productions d'hydrogène/développements bactériens/productions de métabolites obtenus.

Les fermentations sont mises en œuvre dans un réacteur agité semibatch (RASB) à 37°C dont différents paramètres de fonctionnement (tableau 23) ont été précédemment optimisés avec des boues de STEP et un substrat modèle (Clion *et al.*, 2015). Les performances de production d'hydrogène des différentes biomasses par fermentation endogène sont comparées entre elles.

**Tableau 23: Paramètres des tests de fermentation**

Paramètre	Valeur
Température de fermentation	37°C
Agitation du milieu fermentaire	220 tr/min
Débit de gaz de balayage (N <sub>2</sub> )	50 mL/min
Ajustement pH initial	7,0
Régulation du pH par ajout de NaOH	5,7

Les deux premières parties de ce chapitre portent sur la possibilité d'utiliser différentes biomasses en tant que substrat et source de bactéries productrices d'hydrogène (fermentation endogène). Les performances de production d'hydrogène, les productions de métabolites ainsi que les structures des communautés bactériennes identifiées seront abordées. La troisième partie, plus exploratoire, porte sur la possibilité d'extraire les sucres fermentescibles des biomasses, en vue d'une utilisation dans le bioréacteur membranaire fonctionnant en continu.

## 2 Potentiel de production d'hydrogène par fermentation endogène de déchets organiques agricoles et agroalimentaires

Le tableau 24 présente l'ensemble des biomasses, variées en termes de structures et d'origines, testées pour la production d'hydrogène par fermentation obscure endogène.

**Tableau 24 : Récapitulatif des biomasses testées pour la production d'H<sub>2</sub> par fermentation obscure**

Filière	Biomasse	Lots
Vin	Bourbes (bo)	2 années (2015 et 2016)
	Marc (ma)	2 années (2015 et 2016)
	Raisin moisi (rm)	1 lot
Café torréfié	Pellicules argentées (pa)	2 lots
Brasserie industrielle	Levures industrielles (lei)	1 lot
	Drèches industrielles (dri)	1 lot
	Eaux résiduelles industrielles (er)	1 lot
	Kieselguhr industriel (ki)	1 lot
Microbrasserie	Drèches de microbrasserie (drm)	1 lot
	Levures de microbrasserie (lem)	1 lot
Malterie	Radicelles de malterie (ra)	3 lots
	Eaux résiduelles de malterie (-)	1 lot

Les biomasses collectées ont été utilisées en tant que substrat et *inoculum* dans les mêmes conditions, à l'exception de la charge massique introduite dans le bioréacteur. En effet, en premier lieu, les tests sont effectués avec une charge massique initiale de biomasse de 7,1%(m/v). La charge des pellicules argentées a été diminuée à 3,6%(m/v), car dans les conditions testées en premier lieu, l'eau de dilution a été totalement absorbée par la biomasse, induisant des problèmes d'homogénéisation du milieu réactionnel. Pour les levures et les radicales d'orge, la charge a été augmentée à 28,4%(m/v) afin d'obtenir des productions de gaz significatives. Les eaux résiduaire ont été mises en œuvre sans dilution dans le bioréacteur.

## 2.1 Potentiel de productions d'hydrogène des biomasses collectées

Sur l'ensemble des tests réalisés, seules les eaux résiduaire de malterie n'ont pas généré d'hydrogène. La figure 51 présente les performances moyennes de production de l'ensemble des tests ayant généré de l'hydrogène : production (L/kg), productivité maximale (L/L/h), temps de latence (h), rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

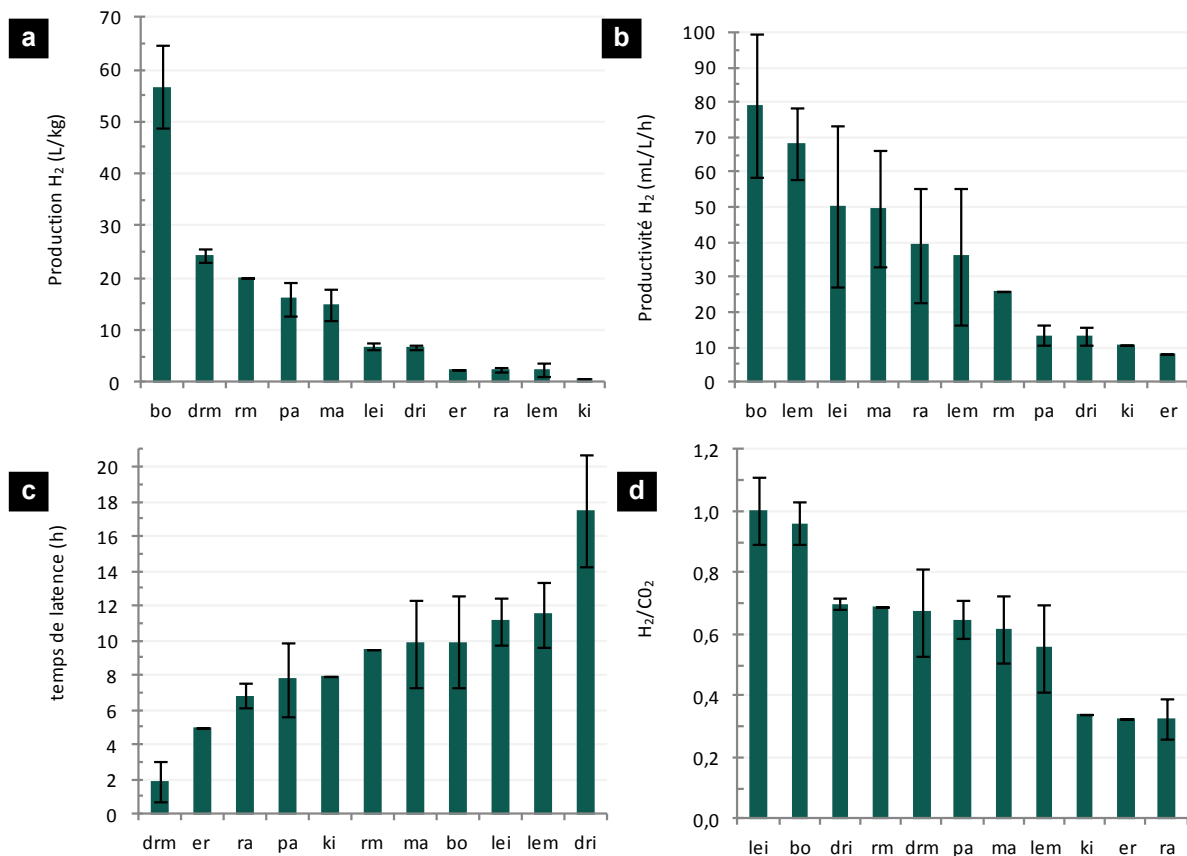


Figure 51 : Comparaison des performances de l'ensemble des tests ayant généré de l'hydrogène : production (L/kg) (a), productivité maximale (mL/L/h) (b), temps de latence (h) (c), rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (d)

Des productions sur une large gamme comprises entre 0,7 et 57 L/kg ont été obtenues et sont peu variables pour les différents réplicats et lots testés. Les meilleures productions moyennes

(>50 L/kg) ont été générées avec les bourbes vitivinicoles. Un second groupe de biomasses a donné des performances moyennes (entre 10 et 25 L/kg) : drèches de microbrasserie, raisin contaminé, pellicules argentées de café, marcs de raisin. Les productions moyennes du reste des biomasses (levures, drèches, kieselguhr, radicelles, eaux résiduaires industrielles, levures de microbrasserie) sont plus faibles (<10 L/kg).

Des productivités maximales moyennes comprises entre 10 et 80 mL/L/h ont été obtenues et sont variables pour l'ensemble des tests sur une même biomasse. Un premier groupe de biomasses a généré de bonnes productivités moyennes (>30 L/L/h) : bourbes, drèches de microbrasserie, levures industrielles, marcs de raisin, radicelles d'orge, levures de microbrasserie. Des productivités plus faibles (<30 mL/L/h) ont été obtenues pour les raisins avec moisissures, les pellicules argentées, les drèches industrielles, le kieselguhr et les eaux résiduaires de brasserie.

Les temps de latence moyens sont compris entre 2 et 11 h. Le temps de latence le plus faible (2h) est celui du test à partir des drèches de microbrasserie, puis des eaux résiduaires de brasserie, les radicelles d'orge, les pellicules argentées et le kieselguhr (<8 h). Des temps de latence moyens (entre 8 et 12 h) ont été obtenus pour le raisin « moisi », les marcs, les bourbes, les levures industrielles et de microbrasserie, et le temps de latence le plus élevé (18 h) a été obtenu pour les drèches de brasserie industrielle.

Des rapports molaires  $H_2/CO_2$  compris entre 0,3 et 1,0 ont été obtenus ; les valeurs les plus élevées (> 0,8) étant celles des tests avec les levures de brasserie industrielle et les bourbes, et les plus faibles (< 0,4) avec le kieselguhr, les eaux résiduaires brassicoles et les radicelles.

*Ainsi, à l'exception des eaux résiduaires de malterie, une production d'hydrogène par fermentation endogène a donc été obtenue à partir de toutes les biomasses avec des performances variables.*

## 2.2 Discussion

La fermentation obscure endogène de biomasses variées en termes de nature et d'origine, sans aucun prétraitement visant à modifier ou enrichir la population bactérienne indigène, a généré de l'hydrogène dans la majorité des cas. Sur 12 biomasses testées, seules une, les eaux résiduaires de malterie, n'a pas généré d'hydrogène. Néanmoins, il s'avère que le potentiel de production diffère selon la nature des biomasses. Si la biomasse 'bourbes viticoles' se distingue par des productions particulièrement élevées (57 L/kg), les productions des autres biomasses sont plus modestes (<25 L/kg). Cependant, selon leurs disponibilités totales, il est possible d'estimer leur potentiel pour la production de biohydrogène, compris entre 3 et 7600 tonnes par an (tableau 25). Comme les pilotes actuels mis en œuvre en fermentation obscure ont des volumes de travail allant de généralement de 0,2 à 100 m<sup>3</sup> (cf I.3.4.4), nous proposons un exemple de la production journalière qu'il serait possible d'atteindre pour un bioréacteur de 1 m<sup>3</sup>.



**Tableau 25 : Estimation du potentiel de production d'hydrogène des biomasses testées**

Filière	Biomasse	P <sub>H<sub>2</sub></sub> moy (L/kg)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> moy (kg/t)	P' <sub>H<sub>2</sub></sub> moy (mg/L/j)	Exemple pour un réacteur de 1 m <sup>3</sup> (g <sub>H<sub>2</sub></sub> /j)	Potentiel annuel (t <sub>H<sub>2</sub></sub> /an)*
Vitivinicole	Bourbes	56,7 ± 8,1	4,7 ± 0,7	158,4 ± 40,7	158 ± 41	7,6 x 10 <sup>3</sup> ± 1,1 x 10 <sup>3</sup>
	Marc de raisin	15,0 ± 2,9	1,2 ± 0,2	77,3 ± 33,4	77 ± 33	1,3 x 10 <sup>3</sup> ± 0,2 x 10 <sup>3</sup>
	Raisin moisi	20,0	0,2	78,5	78,5	-
Torréfaction	Pellicules argentées	16,1 ± 3,2	1,3 ± 0,3	26,9 ± 5,7	16,9 ± 5,7	3,0 ± 6,0
Brasserie	Levures	7,0 ± 0,6	0,6 ± 0,1	120,8 ± 11,3	121 ± 11	30 ± 6,4
	Drèches	6,7 ± 0,3	0,6 ± 0,0	26,4 ± 4,7	26,4 ± 4,7	170 ± 8,5 <sup>3</sup>
	Kieselguhr	0,7	0,1	21,2	21,2	-
	Eaux résiduaires	2,5	0,2	16,5	16,5	-
Microbrasserie	Levures	2,3 ± 1,3	0,2 ± 0,1	71,9 ± 38,3	71,9 ± 38,3	-
	Drèches	24,3 ± 1,3	2,0 ± 0,1	136,5 ± 20,5	136 ± 20	-
Malterie	Radicelles d'orge	2,5 ± 0,6	0,2 ± 0,1	78,5 ± 32,8	79 ± 33	-

\*selon les quantités disponibles des différentes biomasses en France (cf tableau 1).

Ainsi, pour un pilote de 1 m<sup>3</sup>, avec les dilutions utilisées dans cette étude, il serait envisageable de produire entre 16,5 et 158 g<sub>H<sub>2</sub></sub>/j en moyenne, à partir de substrats très diversifiés. La variabilité concernant les performances de production en hydrogène des différents tests est due au fait que les biomasses ont été testées sur différents lots et pour certaines avec différentes conditions de conservation. Ceci dit, cette variabilité reste acceptable, pour une production rapide et simple à mettre en œuvre, limitant les coûts de production car aucun prétraitement n'est réalisé. De plus, les résultats obtenus dans cette étude sont très proches des résultats obtenus lors de travaux antérieurs (François-Lopez, 2016) au laboratoire, sur d'autres lots de biomasses vitivinicoles.

Les pellicules argentées de café, les radicules d'orge et le kieselguhr ont été testés pour la première fois dans cette étude. Les pellicules argentées de café sont très intéressantes car de façon générale, la production de déchets organiques est saisonnière (filière vitivinicole) et/ou ne se conserve pas bien (biomasses brassicoles et maltéicoles). Les pellicules argentées, biomasse produite à l'échelle mondiale, peu valorisée et abondante, se conservent bien grâce à un taux en matières sèches élevées, inhérent au processus de torréfaction du café (Barrel, 2008). Elles peuvent être utilisées en complément des autres biomasses. Cela peut être une forme de stockage du potentiel de production d'hydrogène. Les radicules d'orge sont déjà valorisées en alimentation animale, mais seule une partie est valorisable (dans le cas de l'industriel contacté). Ainsi, une utilisation énergétique serait intéressante. Le kieselguhr, bien qu'ayant donné de faibles productions, peut être intéressant car il n'est pas valorisé actuellement. Notons que dans le cas des déchets organiques de microbrasserie, aucune filière de valorisation n'est en place, et cette filière est en développement en France.

Le tableau 26 propose également une comparaison de nos résultats avec ceux obtenus à partir de biomasses de natures semblable dans la littérature.

**Tableau 26 : Comparaison des performances de nos tests avec celles issues de la littérature**

Substrat	Prétraitement	Inoculum	Rendements	Référence
Bourbes	Aucun	Aucun	$56,7 \pm 8,7 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$ $4,0 \pm 0,6 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$	Notre étude
Lactosérum	Aucun	Aucun	$5,2 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$	Asunis <i>et al.</i> , 2019
Mars de raisin	Aucun	Aucun	$15,0 \pm 2,9 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$ $1,0 \pm 0,0 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$	Notre étude
Raisin « moisi »	Aucun	Aucun	$20,0 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$ $1,43 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$	Notre étude
Drèches de brasserie industrielle	Aucun	Aucun	$6,7 \pm 0,3 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$ $33,5 \pm 1,5 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{MS}}$	Notre étude
Drèches de microbrasserie	Aucun	Aucun	$24,3 \pm 1,3 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$ $86,8 \pm 4,6 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{MS}}^*$	Notre étude
Mars de raisin	Broyage	Boues de méthaniseur	$1 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$	Guo <i>et al.</i> , 2014
Mars de pommes + glycérol brut	Hydrolyse acide, filtration	<i>C. butyricum</i> , <i>E. aerogenes</i>	$0,6 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$	Pachapur <i>et al.</i> , 2015
Raisin mûr	Broyage	Boues de méthaniseur	$0,3 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}$	Hwang <i>et al.</i> , 2011
Drèches	Broyage	Boues de STEP traitées thermiquement	$38,8 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{MS}}$	Zhang et Zang, 2016
Drèches	Acide dilué	<i>C. pasteurianum</i>	$53,0 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{MS}}^{***}$	Cui <i>et al.</i> 2009

\*MS = matière sèche

Ainsi, comme dans l'étude d'Asunis *et al.*, 2019 utilisant un substrat plus riche en glucides solubles que nos biomasses (57,7 g/L contre au maximum 12 g/L dans notre étude), les performances de production endogène des bourbes sont très élevées. Les performances de production à partir de mars de raisin sont 15 fois plus élevées comparativement à celles du test de Guo *et al.* (2014), avec broyage et ajout d'*inoculum* et similaires à celles de Pachapur *et al.*, (2015) sur des mars de pommes et du glycérol brut en utilisant des cultures pures et un prétraitement d'hydrolyse acide. Le test à partir de « raisins moisis » donne des productions très supérieures au test de Hwang *et al.* (2011) utilisant du raisin mûr, avec broyage et ajout d'*inoculum*. Concernant les tests à partir de drèches, un prétraitement acide (Cui *et al.*, 2009) favorise la production d'hydrogène, avec une production 1,6 fois plus élevée que dans notre étude si l'on compare à la fermentation des drèches de brasserie industrielle ; les drèches de microbrasseries, plus riches en matières métabolisables, permettent d'obtenir les meilleurs résultats sans prétraitement ni *inoculum*. L'étude de Zhang *et al.* (2016) également à partir de drèches, avec broyage et ajout d'*inoculum*, donne des résultats similaires à ceux de notre étude menée avec un protocole plus simple. Ainsi, l'ajout d'une étape de prétraitement de la biomasse doit se faire en considérant le gain de production obtenu vis-à-vis de la simplicité et du coût de la mise en œuvre à l'échelle industrielle, mais c'est une piste à envisager pour les biomasses pauvres en matière métabolisable.

*Ainsi, notre méthode de production, par fermentation endogène, peut s'appliquer à un panel varié de biomasses issues de différentes filières de production. Par la suite, nous nous intéressons aux mécanismes de production de différentes biomasses, représentatives de ce qui a été testé et ayant des productions élevées (bourbes viticoles), moyennes (drèches de microbrasserie, pellicules argentées de café, marcs de raisin) et faibles (levures brassicoles, radicules d'orge, kieselguhr). De plus, cette sélection nous permettra de conserver une bonne variété d'origines et de natures de biomasses.*

### 3 Effets des caractéristiques des biomasses, du métabolisme et de la microbiologie du milieu réactionnel sur la production d'hydrogène en bioréacteur semibatch

Comme la production d'hydrogène de nos tests est réalisée sans ensemencement initial, seuls les paramètres de fermentation ont une influence sur le développement et le métabolisme bactérien dans le bioréacteur. L'objectif de cette étude est d'étudier les liens entre les productions d'hydrogène obtenues à partir de différentes biomasses et les productions métaboliques et microbiologiques. Nous tenterons d'identifier les paramètres expliquant les profils de productions d'hydrogène/développements bactériens/productions de métabolites obtenus pour les différents groupes de biomasses, ainsi que les compositions de communautés bactériennes favorables à la production d'hydrogène.

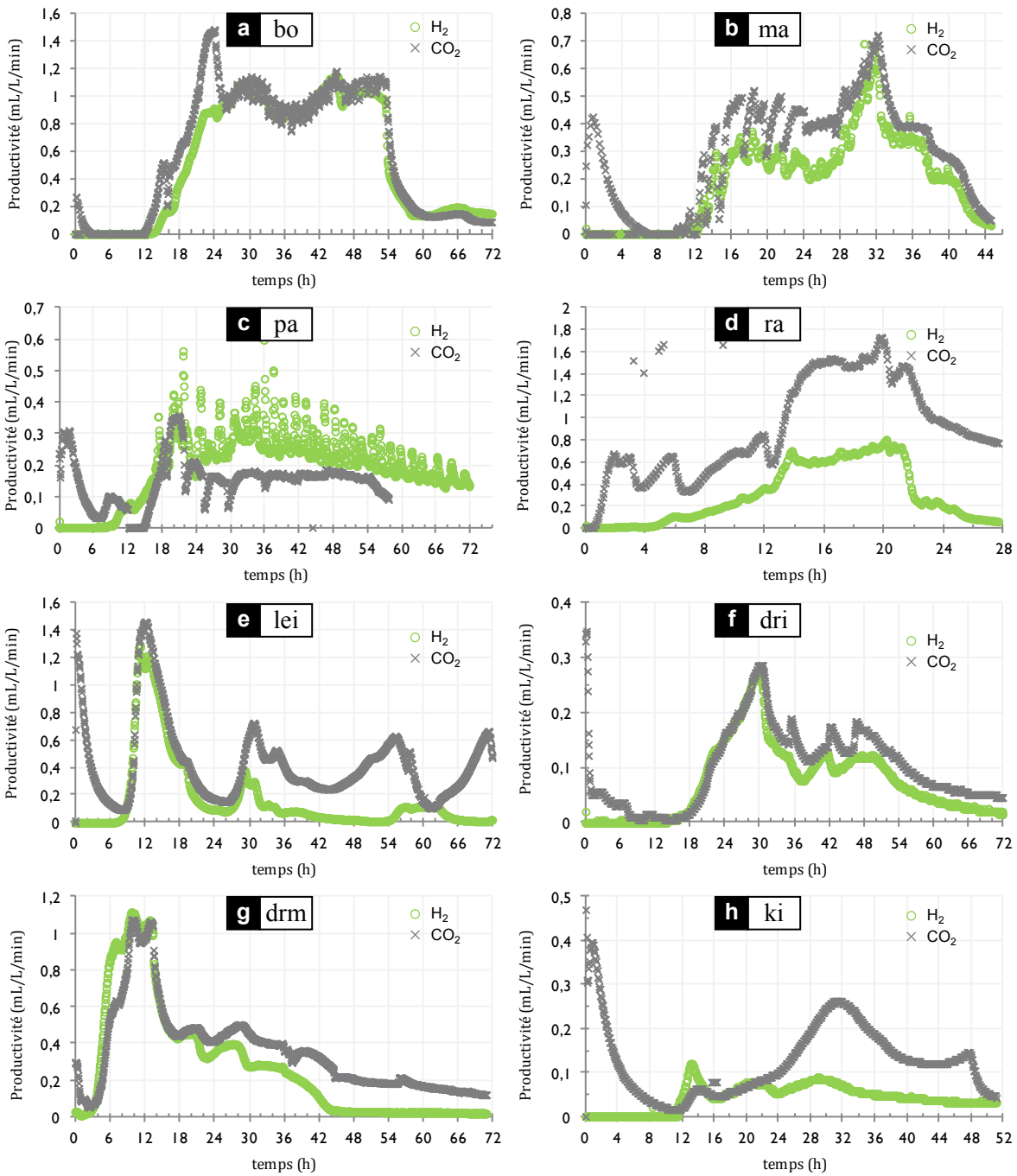
Pour cette étude, des biomasses ayant généré des performances de production d'hydrogène variées ont été retenues : bourbes vitivinicoles, marcs de raisin, pellicules argentées de café, radicules d'orge, levures, kieselguhr et drèches de brasseries industrielles et drèches de microbrasserie.

#### 3.1 Production d'hydrogène et de métabolites

Cette partie propose une comparaison des performances de production à partir des différentes biomasses selon l'évolution des débits de productions d'hydrogène et de CO<sub>2</sub>, les productions totales d'H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>, les rendements DCO et les productivités en H<sub>2</sub>.

##### 3.1.1 Productions d'hydrogène et de CO<sub>2</sub>

La figure 52 présente des profils de productions d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> des différentes biomasses en bioréacteur semibatch.



**Figure 52 : Profils de production d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> des bourbes (a), marcs (b), pellicules argentées (c), radicelles (d), levures industrielles (e), drèches industrielles (f), drèches de microbrasserie (g), kieselguhr (h)**

La durée des tests de fermentation varie entre 28 h et 72 h, avec des temps de latence compris entre 2 h et 16 h, avant une phase d'augmentation exponentielle de la productivité en hydrogène jusqu'à un débit maximum, compris entre 0,1 et 1,2 mL/L/min. Le test à partir des radicelles d'orge (d) présente un profil particulier avec une augmentation très progressive de la production des gaz dans les 14 premières heures. Un débit proche du maximum initial est conservé plusieurs heures pour les tests à partir de bourbes viticoles (a), de marcs de raisin (b), des pellicules argentées (c), de radicelles d'orge (d) et de kieselguhr (h) alors que pour les

coproduits brassicoles (levures (e) et drèches (f,g)) la durée de production d'hydrogène est plus longue et avec un débit moins régulier. Puis, avec les bourbes (a), les marcs (b) et les radiceles (d), le débit de production atteint un second maximum puis chute jusqu'à une valeur quasi nulle en fin de production, alors que cette phase de décroissance est très progressive pour le test avec les pellicules argentées (c). Pour les tests à partir de levures (e), de drèches de brasserie industrielle (f) et de microbrasserie (g), après le premier maximum de productivité, le débit de production d'hydrogène chute brusquement. A partir des levures (e), l'essentiel de la production d'hydrogène est réalisé à  $t = 24$  h (production durant 16 h environ), de faibles reprises de la production sont observées à  $t = 28$  h et  $t = 54$  h. Le débit de production à partir de kieselguhr (h) est très faible mais continu durant une longue période (40 h environ).

Les performances de productions d'hydrogène sont présentées dans le tableau 27.

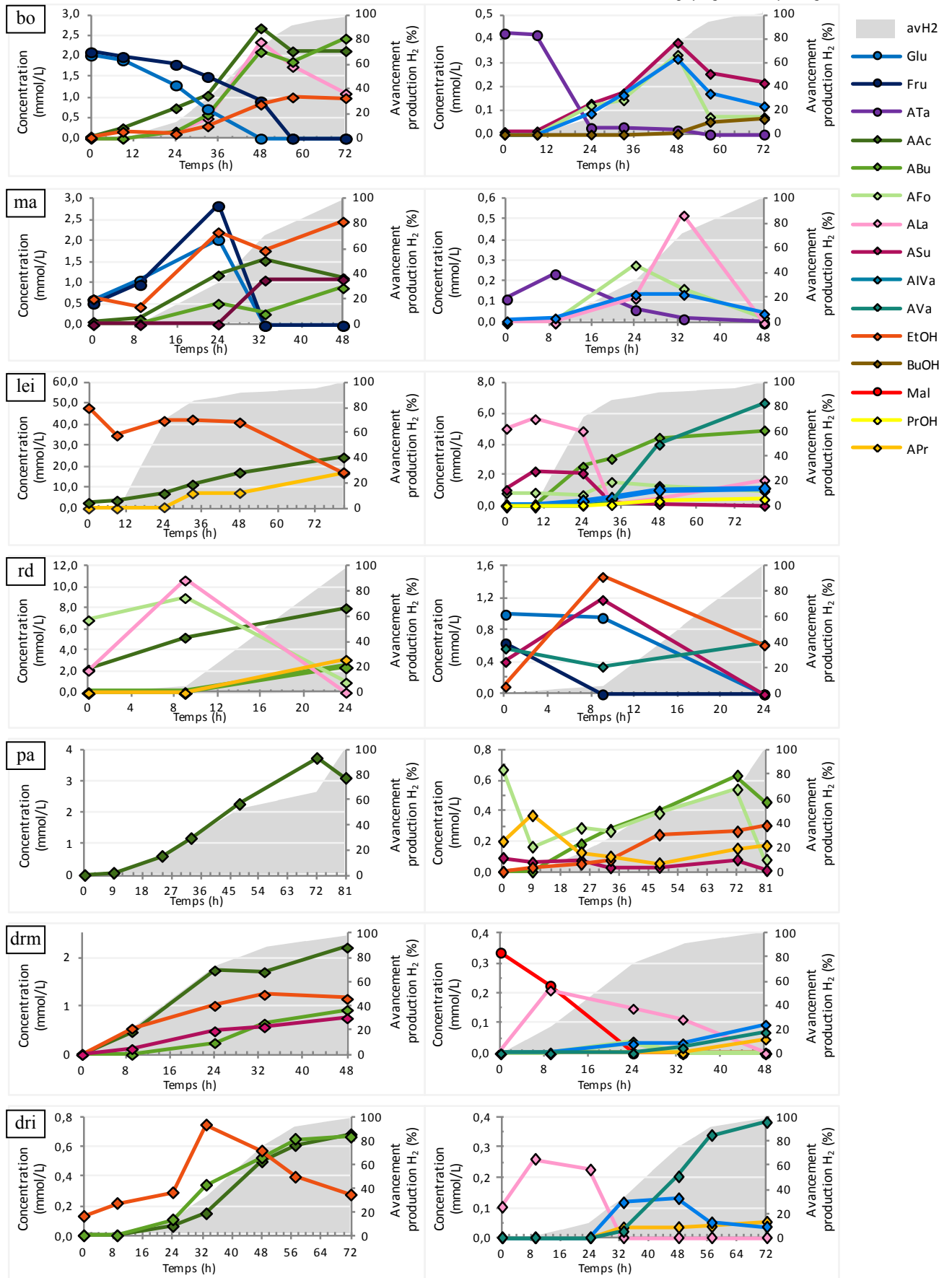
**Tableau 27 : Productions, rendements DCO, rapports  $H_2/CO_2$  générés par les différentes biomasses**

Biomasse	nombre de tests	$P_{H_2}$ (L/kg <sub>biomasse</sub> )	$R_{DCO}$ (L <sub>H<sub>2</sub></sub> /kg <sub>DCO</sub> )	$H_2/CO_2$
Bourbes viticoles	5	57 ± 8	283 ± 56	1,0 ± 0,1
Marcs de raisin	7	15 ± 3	41 ± 9	0,6 ± 0,1
Pellicules argentées de café	4	18 ± 2	21 ± 2	0,7 ± 0,0
Radicelles d'orge	3	3 ± 1	17 ± 4	0,4 ± 0,1
Levures brassicoles	5	4 ± 1	30 ± 5	0,5 ± 0,1
Drèches brassicoles	2	7 ± 0	55 ± 2	0,7 ± 0,0
Drèches de microbrasserie	2	24 ± 2	68 ± 5	0,6 ± 0,2
Kieselguhr brassicole	1	1	27	0,3

Les productions moyennes en hydrogène ( $P_{H_2}$ ) les plus élevées ont été obtenues avec les bourbes (57 L/kg), puis les drèches de microbrasserie, les pellicules argentées et les marcs de raisin (respectivement 24, 18 et 15 L/kg). Les drèches et levures brassicoles, les radiceles d'orge et le kieselguhr ont généré les plus faibles productions (7, 4 et 3 L/kg respectivement). Les bourbes génèrent les meilleurs rendements DCO (283 L/kg<sub>DCO</sub> en moyenne). Des rendements moyens (30-68 L/kg<sub>DCO</sub>) ont été obtenus à partir des marcs de raisin, des levures et des drèches. Les rendements les plus faibles ont été générés à partir des pellicules argentées et des radiceles. Les meilleurs rapports molaires  $H_2/CO_2$  ont été obtenus à partir des bourbes (1,0 en moyenne), puis le groupe marcs/pellicules argentées/drèches (0,6-0,7 en moyenne) et enfin les radiceles et les levures, ce qui suggère que le métabolisme des deux derniers groupes est peu orienté vers la production d'hydrogène. De même, le kieselguhr donne lieu à un rapport  $H_2/CO_2$  très faible (0,3).

### 3.1.2 Productions de métabolites

L'évolution des concentrations en glucides, en acides organiques et en alcools dans le milieu réactionnel ainsi que l'avancement de la production d'hydrogène ( $av_{H_2}$ ) sont présentés sur la figure 53



Abréviations : glucose (Glu), fructose (Fru), maltose (Mal), acétate (AAc), butyrate (ABu), formiate (AFo), succinate (ASu), lactate (ALa), valérate (AVa), isovalérate (AlVa), citrate (ACi), propionate (APr) éthanol (EtOH), propanol (PrOH), butanol (BuOH)

Figure 53 : Evolution au cours de temps des concentrations en métabolites lors de la fermentation pour différentes biomasses : métabolites majoritaires (à gauche) et métabolites minoritaires (à droite)

❖ Bourbes viticoles

Du glucose (2,0 mmol/L), du fructose (2,1 mmol/L) et du tartrate (0,4 mmol/L) sont présents initialement et commencent à être consommés dès  $t = 9$  h, ce qui coïncide avec le démarrage de la production d'hydrogène. Le tartrate est consommé totalement en premier, suivi par le glucose et le fructose, leur consommation est totale à 90% d'avancement de la production d'hydrogène. D'autre part, on note une teneur croissante en métabolites majoritaires (acétate, butyrate et lactate) suivant le profil d'avancement de la production d'hydrogène jusqu'à 48 h. De même, mais en quantités moindres, les teneurs en éthanol, succinate, formiate et isovalérate sont croissantes jusqu'à 48 h. A l'exception de l'éthanol, les concentrations de l'ensemble de ces métabolites chutent de  $t = 48$  h à  $t = 72$  h, ce qui coïncide avec l'atteinte du volume maximal de production d'hydrogène durant cette période. Du butanol est produit en petites quantités à partir de  $t = 48$  h.

❖ Marcs de raisin

Au début du test, du fructose (0,5 mmol/L), du glucose (0,6 mmol/L), du tartrate (0,1 mmol/L) et de l'éthanol (0,6 mmol/L) sont présents dans le milieu réactionnel. Les quantités de glucides augmentent jusqu'à  $t = 24$  h (2,8 mmol/L (fructose) et 2,0 mmol/L (glucose)). La quantité d'acide tartrique augmente jusqu'à  $t = 9$  h (0,2 mmol/L) puis, il est consommé progressivement jusqu'à  $t = 48$  h. Le glucose et le fructose sont totalement consommés entre  $t = 24$  h et  $t = 33$  h. Le démarrage de la production d'hydrogène concorde avec le démarrage des productions d'acétate et de butyrate à  $t = 9$  h avec un profil de croissance proche jusqu'à 24 h. La concentration de ces métabolites atteint un pseudo plateau à partir de  $t = 24$  h. Du formiate est également produit entre  $t = 9$  h et  $t = 24$  h et sa concentration diminue de  $t = 24$  h à la fin du test. La teneur en isovalérate suite la même tendance. Du lactate est produit jusqu'à atteindre un maximum à  $t = 33$  h. Il est ensuite consommé entre  $t = 33$  h à  $t = 48$  h. La production de succinate démarre à partir de  $t = 24$  h et atteint un plateau à  $t = 33$  h.

❖ Levures brassicoles

De l'éthanol en teneur très importante est présent initialement dans le milieu réactionnel (47,7 mmol/L), précédemment produit par les levures par fermentation éthanolique au cours de la production de bière. Du lactate (5,0 mmol/L), de l'acétate (2,7 mmol/L), du succinate (1,0 mmol/L) et du formiate (0,8 mmol/L) sont également présent dans le milieu de culture initial. La production d'hydrogène démarre dès  $t = 9$  h et atteint 84% du volume cumulé final à  $t = 33$  h. Du propionate et du butyrate sont produits dès  $t = 9$  h et progressivement jusqu'à la fin de la fermentation. Du butyrate est produit à partir de  $t = 9$  h et atteint un plateau à  $t = 48$  h. Dès  $t = 33$  h, du valérate est produit et on note que le lactate et le succinate sont totalement consommés.

❖ Radicelles d'orge

Du glucose et du fructose sont présents en faibles quantités (1,0 et 0,6 mmol/L respectivement) en début de test, de même que divers acides organiques : formiate (6,9 mmol/L),

lactate (2,1 mmol/L), acétate (2,2 mmol/L), valérate (0,6 mmol/L) et succinate (0,4 mmol/L). Le fructose est consommé totalement à  $t = 9$  h et le glucose à  $t = 24$  h. Dans le même temps, la quantité de lactate augmente de  $t = 0$  h à  $t = 9$  h pour atteindre la concentration la plus élevée parmi les métabolites produits, et chute jusqu'à  $t = 24$  h. Les concentrations de formiate d'éthanol et de succinate suivent la même cinétique, à de plus faibles teneurs. On remarque que la production d'hydrogène démarre avec la consommation de ces métabolites, et qu'une production en propionate et en butyrate dans le même temps avec un profil similaire à celui du degré d'avancement de la production d'hydrogène. De l'acétate est produit régulièrement tout au long du test de fermentation.

#### ❖ Pellicules argentées de café

Du formiate (0,7 mmol/L), du propionate (0,2 mmol/L) et du succinate (0,1 mmol/L) sont présents initialement. Le formiate est consommé en partie de  $t = 0$  h à  $t = 9$  h puis produit jusqu'à  $t = 72$  h. Le propionate, dont la concentration augmente légèrement de  $t = 0$  h à  $t = 9$  h, est consommé en partie jusqu'à  $t = 24$  h. Le démarrage de la production d'hydrogène coïncide avec le démarrage de la production d'acétate, qui est le métabolite principalement produit, de  $t = 9$  h jusqu'à  $t = 72$  h, et de butyrate, produit en plus faibles quantités. On note un saut dans l'avancement de la production d'hydrogène à 72 h, conjointe à une consommation importante de formiate.

#### ❖ Drèches de microbrasserie

Le maltose est le seul métabolite analysé présent dans le milieu liquide en début de test (0,3 mmol/L). Il est consommé de  $t = 0$  h à  $t = 24$  h. De l'acétate, métabolite majoritairement produit lors de ce test, est présent dans le milieu réactionnel à  $t = 9$  h et sa production augmente jusqu'à un plateau ( $t = 24$  h à  $t = 33$  h) et augmente à nouveau jusqu'à 48 h. Dans le même temps, de l'éthanol, du succinate et du butyrate sont produits. De l'isovalérate, du valérate et du propionate sont produits à partir de  $t = 9$  h,  $t = 24$  h et  $t = 33$  h respectivement en quantités beaucoup plus faibles. Du lactate produit ou libéré dans le milieu réactionnel entre  $t = 0$  h et  $t = 9$  h est ensuite consommé progressivement jusqu'à la fin de la fermentation.

#### ❖ Drèches de brasserie industrielles

Contrairement au test avec les drèches de microbrasserie, de l'éthanol et du lactate sont présents initialement en faibles quantités (0,1 mmol/L dans les deux cas). On note également l'absence de maltose. Du lactate est produit puis consommé de  $t = 28$  h à  $t = 33$  h. La concentration d'éthanol augmente et est maximale à  $t = 33$  h et décroît de façon linéaire jusqu'à  $t = 72$  h. De l'acétate et du butyrate sont produits à partir de  $t = 9$  h jusqu'à  $t = 72$  h, simultanément à la hausse de la production d'hydrogène ; cette même tendance est observée pour le valérate. A partir de  $t = 24$  h, de l'isovalérate et du propionate sont produits en moindres proportions.

*En conclusion du suivi de l'évolution des métabolites, on note que plusieurs phases de production/consommation de métabolites, corrélables à la production d'hydrogène,*



ont lieu pour l'ensemble des tests. Dès le début de la production d'hydrogène, une production d'acétate, de butyrate et d'éthanol, en proportions variables, a lieu, parfois accompagnée d'une production importante de lactate ou de propionate. On observe une phase, correspondant à la consommation totale en glucides, pour les tests où ceux-ci sont présents initialement dans le milieu réactionnel, où de l'hydrogène continue à être produit après l'arrêt de la production exponentielle d'acétate, butyrate ou éthanol avec une consommation concomitante de lactate, de formiate, d'éthanol, de succinate selon les cas.

La figure 54 présente les rendements de production/consommation moyens des acides organiques et alcools de l'ensemble des tests de fermentation réalisés.

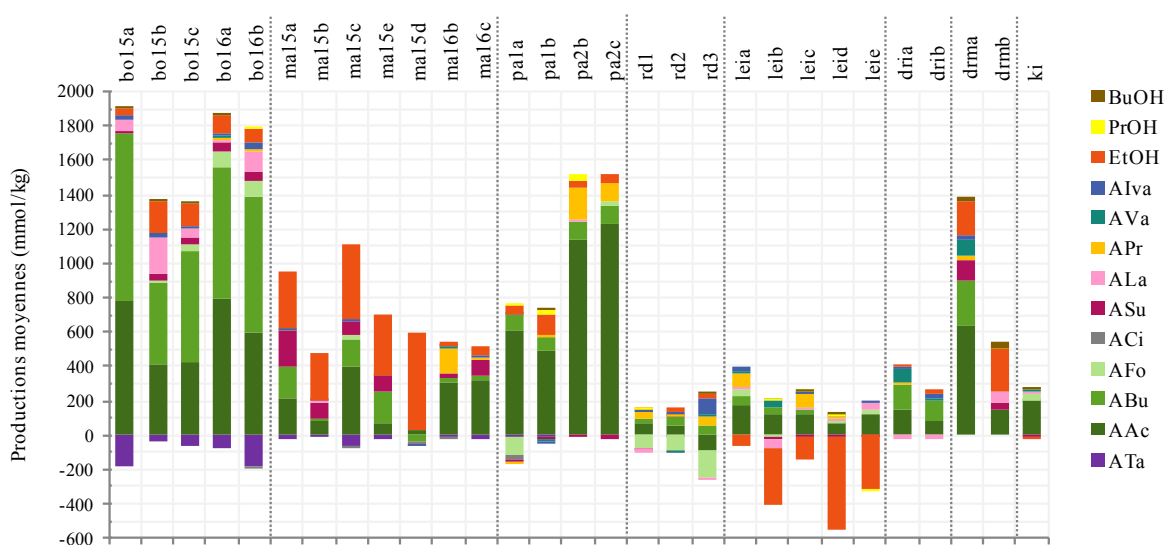
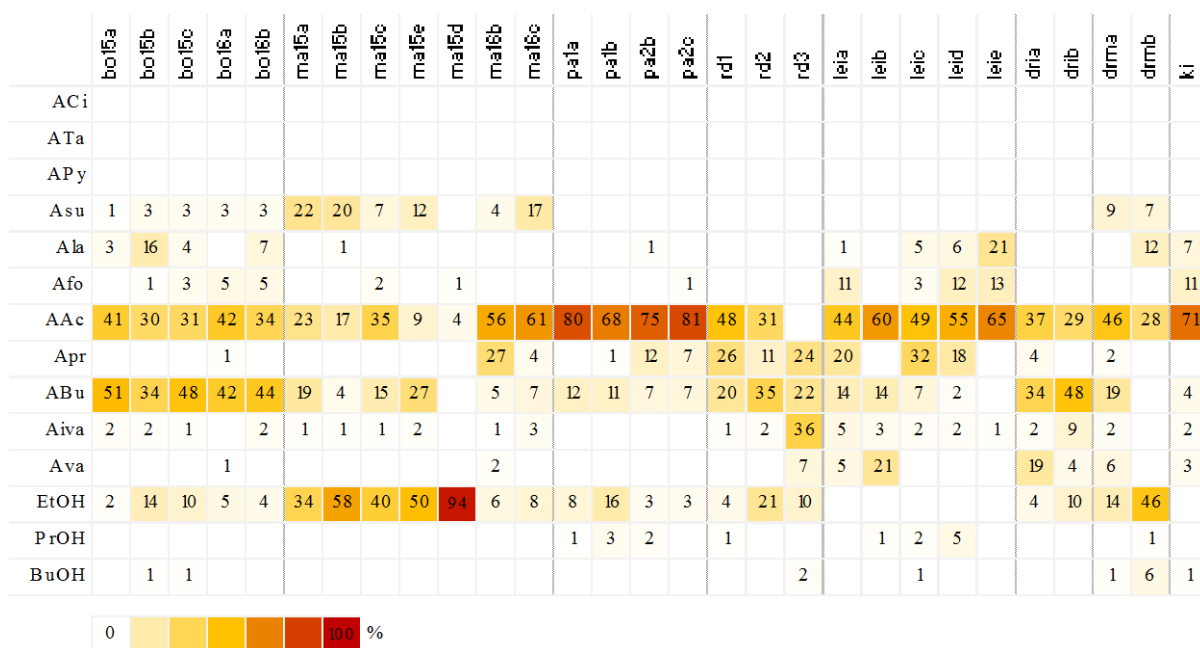


Figure 54 : Comparaison des rendements de productions de métabolites par fermentation endogène à partir de bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicelles d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drma), kieselguhr (ki)

Les rendements de production de métabolites les plus importants ont été atteints en moyenne pour les tests réalisées avec les bourbes, puis les pellicules argentées de café, les drèches de microbrasserie et les marcs de raisin (>400 mmol/kg). Des productions plus faibles ont été générées à partir des drèches brassicoles (341 mmol/kg en moyenne), des levures brassicoles (222 mmol/kg en moyenne) et des radicelles d'orge (155 mmol/kg en moyenne). On note la consommation de tartrate, ainsi que de citrate en très faible quantité principalement pour les bourbes mais aussi pour les marcs de raisin. Une quantité importante de formiate a été consommée pour les radicelles et les pellicules argentées, en proportion moindre. De l'éthanol est consommé pour les levures brassicoles.

Concernant les tests réalisés à partir des bourbes, on constate que les biomasses issues de différentes années de production (2015 et 2016) génèrent des profils de production de métabolites similaires. Les tests avec les marcs de raisin suivent une tendance semblable, avec toutefois une variation un peu plus importante dans les proportions de métabolites produits. Notons que pour le test ma15d, une quantité importante d'acétate libérée dans le milieu réactionnel en début de test est à l'origine de la faible production calculée. Pour les pellicules

argentées, les tests pa1a et pa1b ont été réalisés à partir de 7,1%(m/v) de biomasse. Cependant, il a été constaté lors des premiers tests que la quantité d'eau ajoutée était en grande partie absorbée par la biomasse, l'ajout initial de biomasse a donc été diminué à 3,6%(m/v) lors des tests pa2b et pa2c, afin de favoriser l'homogénéisation du milieu réactionnel. De meilleurs rendements de production en métabolites totaux sont associés à ce changement. Concernant les radicules d'orge, 3 lots ont été testés et ont généré des productions métaboliques proches, à l'exception du troisième test (rd3) pour lequel de l'acétate est consommé. Les rendements de productions à partir de différents tests de levures sont comparables. Notons de plus que le test leia, réalisé à partir de 7,1% (m/v) de levures, donne un rendement relativement proche des autres tests, réalisés à partir avec 28,4%(m/v) de biomasse.



**Figure 55 : Comparaison de la distribution des métabolites produits par fermentation endogène à partir de bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)**

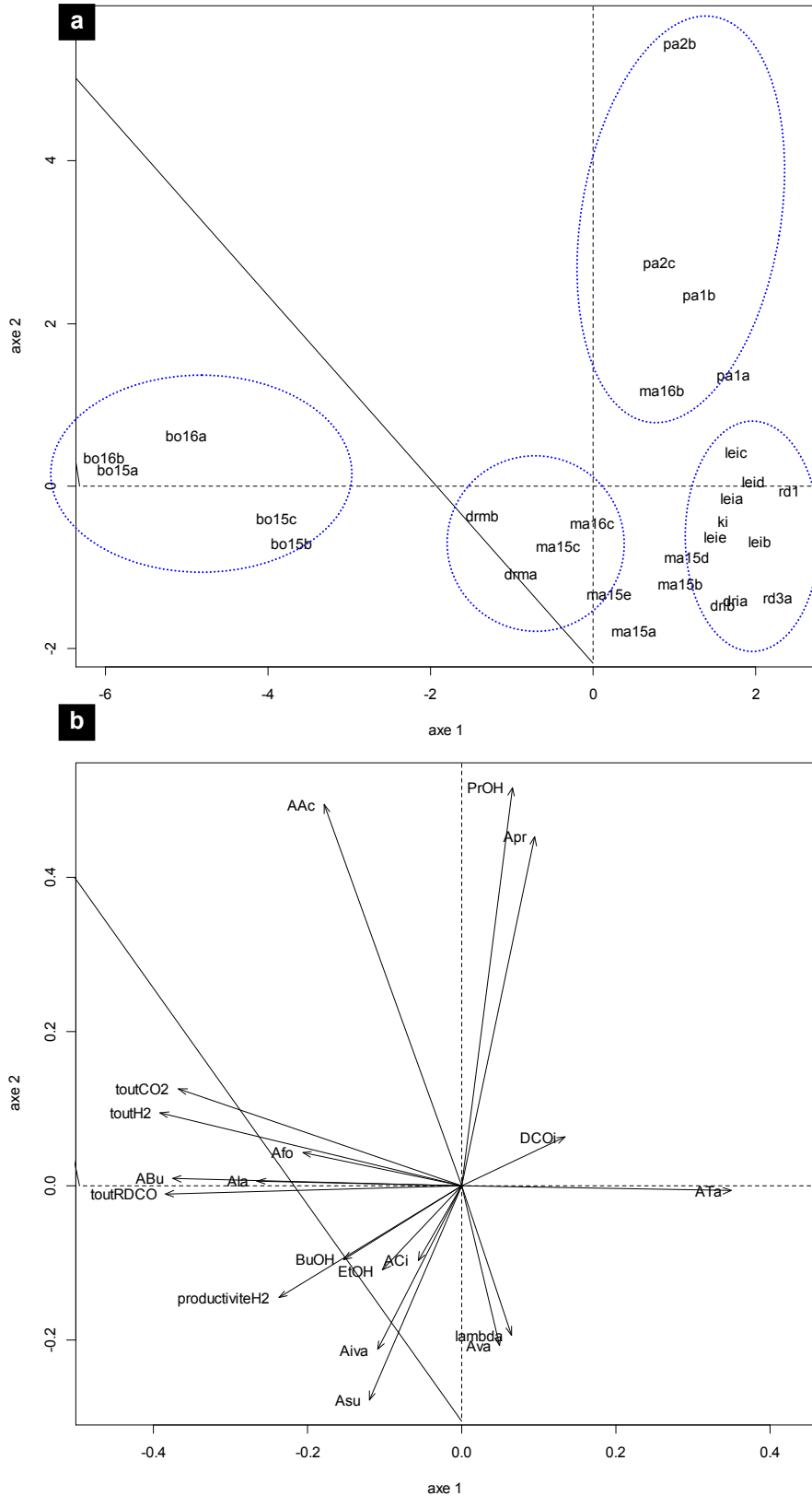
Pour l'ensemble des biomasses, la proportion d'acétate des métabolites produits analysés est importante et variable (17-81%), à l'exception des tests ma15d et 15e et rd3. La production de butyrate est importante pour les bourbes (34-51%), les drèches brassicoles (34-48%) et les radicules d'orge (22-35%) et faible pour les marcs de raisin (0-27%), pellicules argentées de café (7-12%), levures brassicoles (0-24%) et drèches de microbrasserie (0-19%). On note une proportion d'éthanol variable pour les marcs de raisin (0-94%), les drèches de microbrasserie' (14-46%) et les radicules d'orge (4-21%). Du propionate est produit pour les radicules d'orge (11-26%) et les levures brassicoles (18-32%) ainsi que du succinate pour les marcs de raisin (0-22 %) et les drèches de microbrasserie (7-9%).

*Dans l'ensemble, une empreinte métabolique générée en fin de test de fermentation de chaque biomasse est mise en évidence. La fermentation des bourbes produit le couple butyrate-acétate et consomme du tartrate ; la fermentation des marcs de raisin et des*

*drèches de microbrasserie génèrent de l'éthanol et de l'acétate ; la fermentation des pellicules argentées donne lieu principalement à de l'acétate ; la fermentation des radicules se caractérise par la consommation de formiate et la production de butyrate, propionate et isovalérate ; la fermentation des levures consomme de l'éthanol et produit de l'acétate ; la fermentation des drèches industrielles de brasserie industrielle mène à la production de butyrate et d'acétate dans les mêmes proportions que pour la fermentation des bourbes mais en quantité 5 fois moins importantes.*

### 3.1.3 Analyse statistique

Afin d'identifier d'éventuelles corrélations entre les productions d'hydrogène et les productions de métabolites, la composition ou la nature de la biomasse, une analyse des composantes principales (ACP) a été réalisée à partir des variables de production de l'ensemble des tests de fermentation endogène précédemment présentés (figure 56). L'ACP est une méthode utilisée pour résumer, dans un espace de faibles dimensions, la variance d'un nuage de points. Ce faisant, cela fournit un aperçu des relations linéaires entre les objets et les variables.



abréviations: productions H<sub>2</sub> (toutH2) et CO<sub>2</sub> (toutCO2), productivités en hydrogène (productiviteH2), rendements DCO (toutRDCO), DCO initiales (DCOi), productions acétate (AAC), butyrate (ABu), formiate (Afo), succinate (Asu), lactate (Ala), valérate (Ava), isovalérate (Aiva), citrate (ACi), tartrate (ATa), propionate (Apr), d'éthanol (EtOH), propanol (PrOH), butanol (BuOH).

**Figure 56 : ACP des tests de fermentation (a) et des variables de production (b) pour les biomasses bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)**

Dans l'ensemble, on note que les réplicats pour une même biomasse sont relativement proches, à l'exception des tests utilisant les marcs de raisin, tantôt rapprochés des tests avec les pellicules argentées (ma16b), des drèches de microbrasserie (ma15c, ma16c, ma15e). Le métabolisme des marcs de raisin est tantôt corrélé à une production plus importante de propionate, tantôt d'éthanol, de butanol, de citrate, d'isovalérate et de succinate avec une productivité élevée en hydrogène, tantôt à une production d'acide valérique et à un temps de latence élevé. Sur la composante principale 1, on voit que l'ensemble des tests réalisés avec des bourbes est groupé (figure 56a) et corrélé (figure 56b) avec les productions maximales en hydrogène et en CO<sub>2</sub>, en butyrate, le meilleur rendement DCO, et de façon moindre avec les plus fortes productions d'acétate, de lactate et de formiate et une bonne productivité en hydrogène. On note également une forte corrélation entre la consommation du tartrate et les bourbes. Sur la composante principale 2, on note qu'un second groupe de tests réalisés à partir des pellicules argentées se détache et est corrélé avec de fortes productions de propionate, de propanol et d'acétate. En combinant les composantes principales 1 et 2, on note la formation d'un groupe constitué des levures, des radicules d'orge, du kieselguhr, des drèches industrielles et ne semble corrélé à aucune des productions de métabolites présentées. Cet ensemble de biomasses était caractérisé par de faibles productions totales de métabolites.

*Selon cette analyse, on note que les tests à partir bourbes se détachent du reste des biomasses, du fait de leurs performances de production en hydrogène élevées et un métabolisme orienté vers la production de butyrate, de formiate et de lactate. Les tests utilisant des pellicules argentées se distinguent pour leurs fortes productions d'acétate, de propionate et de propanol, associées à un test à partir de marcs de raisin. Pour cette dernière biomasse, le métabolisme est variable selon les tests. Enfin, les levures, les radicules d'orge, le kieselguhr et les drèches brassicoles industrielles constitue un ensemble produisant comparativement peu de métabolites.*

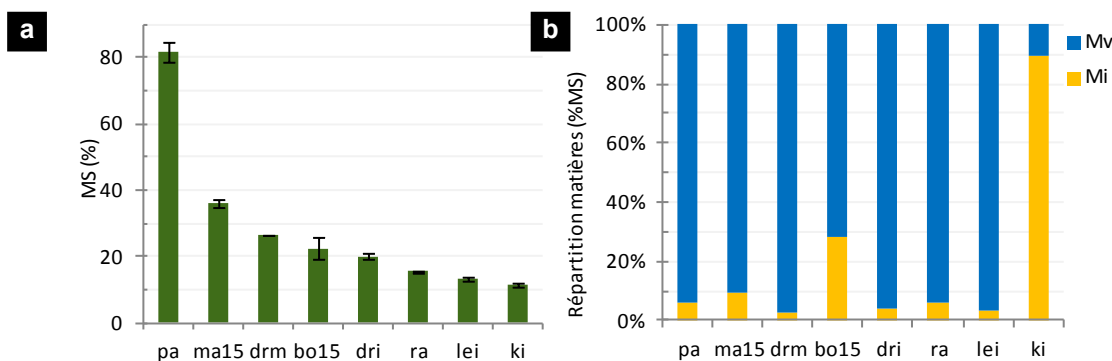
## 3.2 Caractérisation et classification des biomasses.

Les teneurs en matières sèches, volatiles et minérales, les teneurs en DCO, glucides et métabolites, les répartitions élémentaires des différentes biomasses ont été analysées. L'objectif de cette partie est d'identifier d'éventuelles corrélations entre les caractéristiques des biomasses et les performances de production d'hydrogène en bioréacteur semibatch. Ensuite, une classification statistique des biomasses selon ces éléments a été effectuée.

### 3.2.1 Analyse de la composition biochimique des biomasses

#### 3.2.1.1 Analyse des matières sèches (MS), volatiles (Mv) et minérales (Mi)

La figure 57 présente la teneur en MS (figure 57a) et les distributions en Mv et en Mi, normalisées par rapport à la MS (figure 57b) des différentes biomasses. Notons également que la Mv est assimilable à la matière organique.

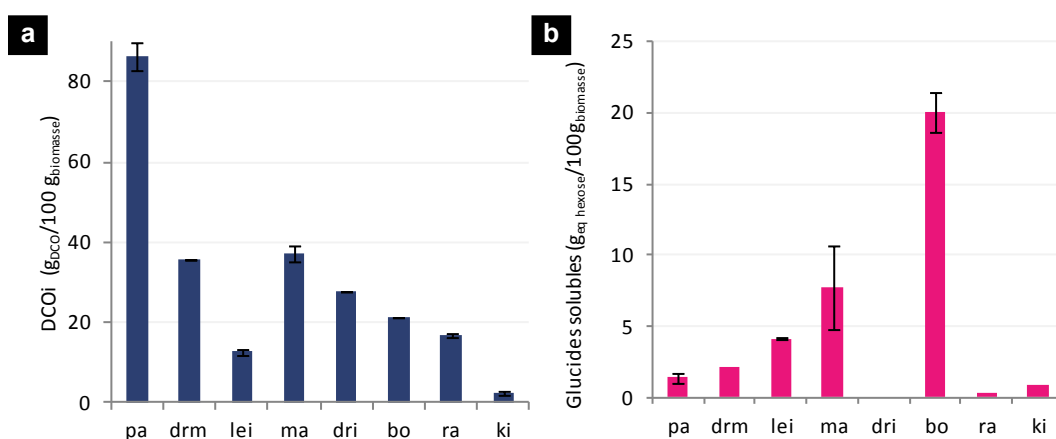


**Figure 57 : Analyse des matières sèches (a) et distribution des matières minérales et volatiles (b) des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)**

Excepté pour la valeur de MS moyenne la plus élevée, 80 % (m/m), obtenue pour les pellicules argentées de café, la teneur en matières sèches des échantillons varie entre 12 et 35% (m/m). Les valeurs les plus faibles (<20 % (m/m)) sont celles des biomasses radicales, levures et kieselguhr. Les biomasses pellicules argentées, marcs de raisin, et drèches brassicoles (industrielles et microbrasserie), radicales d'orge et levures présentent des teneurs en Mv élevées (>90%). Les biomasses kieselguhr et bourbes se distinguent avec des teneurs en Mi plus importantes, respectivement 90%MS et 24%MS. Le kieselguhr est peu chargé en MS avec une très faible proportion en Mv ; il est donc pauvre en matière métabolisable.

### 3.2.1.2 Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO) et des glucides solubles

La figure 58 présente les valeurs de DCO (a) et des teneurs en glucides solubles (b) des différentes biomasses.



**Figure 58: Dosages de la DCO (a) et des glucides solubles totaux (b) des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures (lei), drèches industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)**

Les DCO introduites dans le bioréacteur les plus élevées (figure 58a) sont celles des biomasses pellicules argentées (87%), puis marcs de raisin (37%) et drèches de microbrasserie

(36%). Un autre groupe constitué des biomasses bourbes, drèches de brasserie industrielle, radicules d'orge, levures brassicoles, kieselguhr présente des valeurs de  $DCO_i$  comprises entre 13 et 28%. La biomasse kieselguhr présente la  $DCO$  la plus faible (3%). La biomasse bourbes a la plus forte teneur en glucide soluble (200 g/kg biomasse), suivies par les biomasses marcs de raisin (75 g/kg) et levures brassicoles (41,3 g/kg). Les biomasses pellicules argentées, drèches de microbrasserie, radicules d'orge, kieselguhr ont des teneurs en glucides solubles faibles. Pour les drèches industrielles, non n'avons pas mesuré la présence de glucides.

### 3.2.1.3 Analyse élémentaire

La figure 59 présente la distribution des compositions en carbone (C), hydrogène (H) et azote (N) (figure 59a) et le ratio massique C/N (figure 59b) des différentes biomasses.

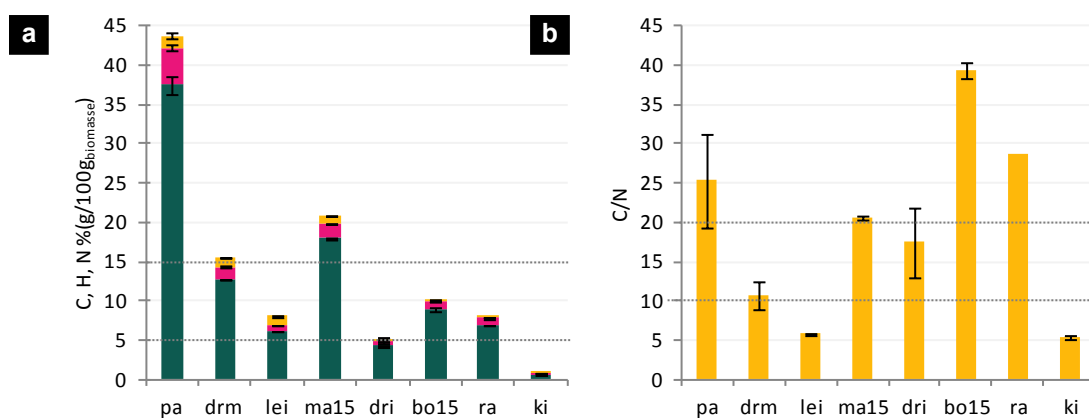


Figure 59 : Analyse CHN (a) et rapport C/N (b) des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)

Le carbone est l'élément principal pour toutes les biomasses (figure 59a), suivi par l'azote et l'hydrogène. La biomasse pellicules argentées a la teneur en carbone la plus élevée, 36%(m/m), suivie par les biomasses marcs de raisin, drèches de brasserie industrielle et drèches de microbrasserie, bourbes, radicules d'orge et levures brassicoles qui ont des teneurs en carbone proches, 5-15%(m/m). Le kieselguhr présente la teneur en carbone la plus faible, 0,6%(m/m).

Les ratios C/N les plus élevés (figure 59a) sont ceux des biomasses bourbes, radicules d'orge, pellicules argentées. Les biomasses marcs de raisin, drèches de brasserie industrielle, radicules d'orge, et levures de brasserie industrielle présentent des ratios proches (15-25). Les biomasses levures industrielles et kieselguhr présentent les ratios C/N les plus faibles (10).

La figure 60 présente la répartition élémentaire des biomasses en macro et micro nutriments dans les Mi.

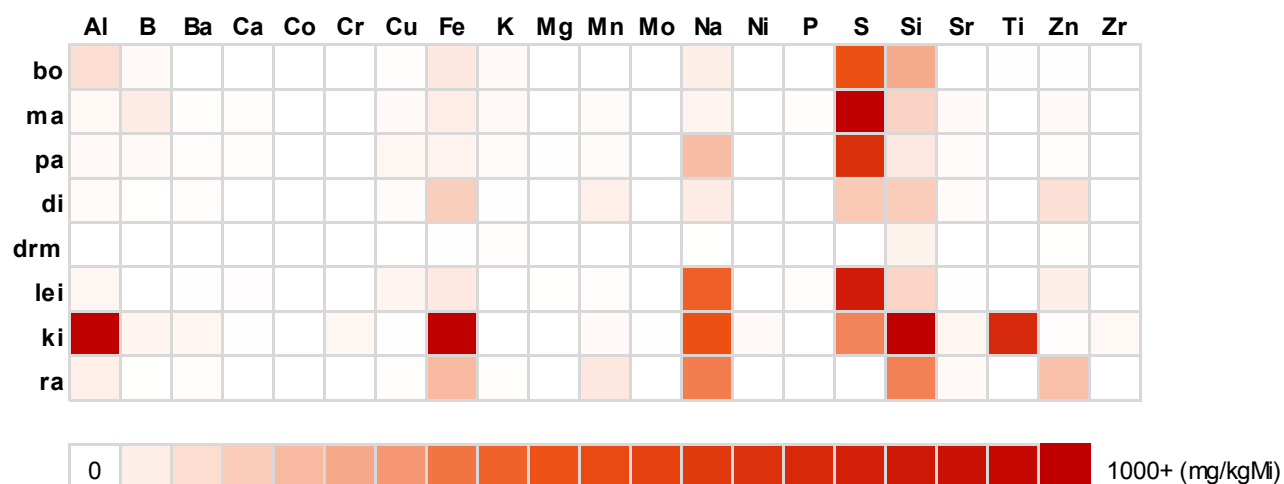


Figure 60 : Analyse élémentaire des bourbes viticoles, marcs de raisin, pellicules argentées de café, radicales d'orge, levures brassicoles, drèches brassicoles industrielles, drèches de microbrasserie, kieselguhr brassicole

Pour toutes les biomasses, les éléments principaux sont le soufre (S), le silicium (Si), le sodium (Na), et le fer (Fe). Ces éléments sont présents en très faibles quantités dans les drèches de microbrasserie (<50 mg/kg). On trouve également de fortes quantités d'aluminium (Al) et de titane (Ti) dans les cendres de la biomasse 'kieselguhr', riche en Mi.

### 3.2.1.4 Analyse des métabolites initiaux

La figure 61 présente une analyse des glucides, acides organiques et alcools dans le milieu fermentaire initial.

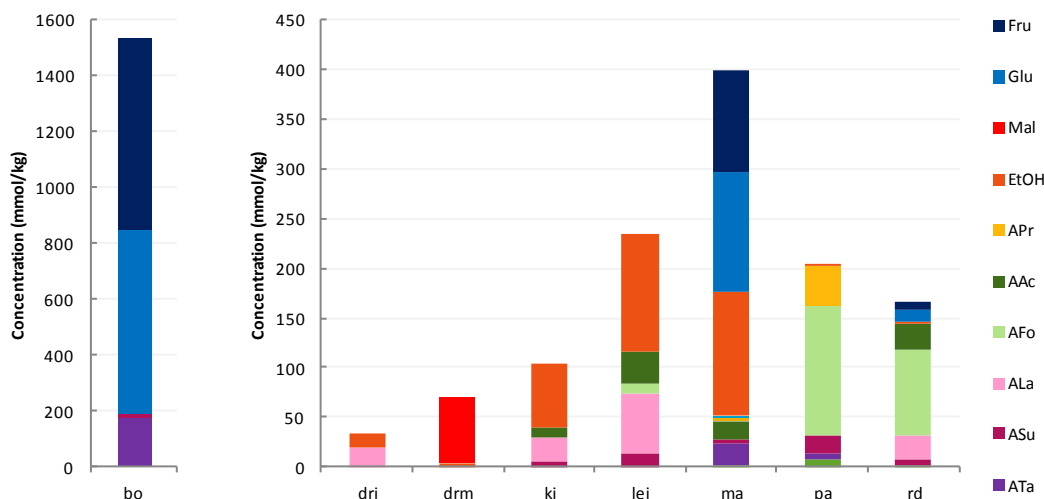


Figure 61 : Teneurs en glucides solubles (glucose, fructose, maltose), acides organiques, alcools initialement présents dans le milieu fermentaire pour les différentes biomasses

En premier lieu, on remarque que la quantité de glucose et de fructose de la biomasse bourbes est très élevée, de même pour la biomasse marcs de raisin de façon moindre. On note également la présence de tartrate dans ces biomasses. Du glucose et du fructose sont présents en



petites quantités dans la biomasse radicelles d'orge. Du maltose est présent uniquement dans la biomasse drèches de microbrasserie.

On note la présence d'éthanol dans les biomasses brassicoles kieselguhr et levures, ce qui est prévisible, étant donné qu'elles sont issues de la phase de post fermentation du procédé de fabrication de la bière. De l'éthanol est présent dans les marcs de raisin, ce qui indique que la biomasse a commencé à fermenter avant sa mise en œuvre dans le bioréacteur. Du formiate est présent en proportions non négligeables dans les pellicules argentées et les radicelles d'orge. Du lactate est présent dans les drèches industrielles, le kieselguhr, les levures, les radicelles. Du succinate en quantités plus faibles est présent principalement dans les pellicules argentées et les levures. Du propionate uniquement est présent dans les pellicules argentées.

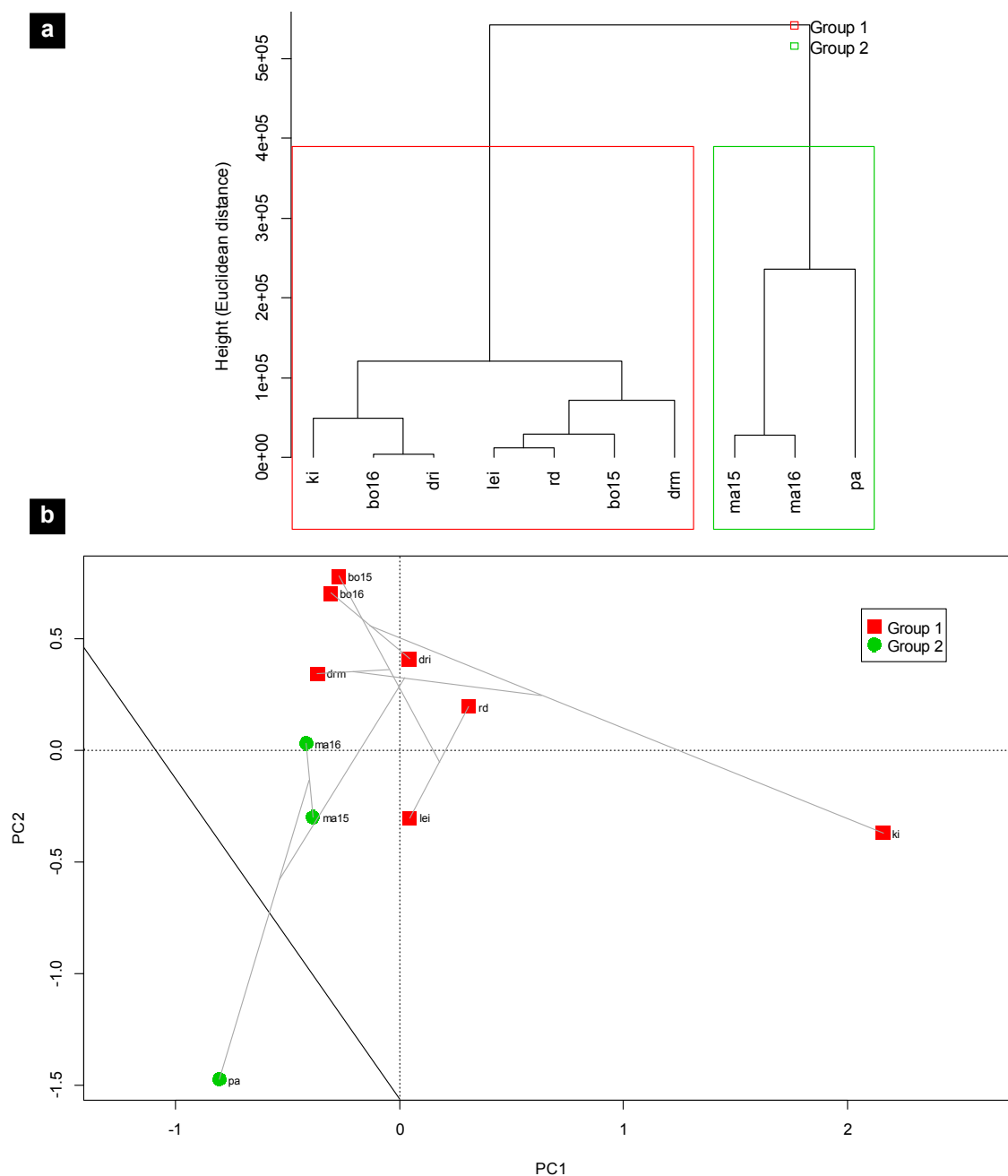
*Les différentes analyses des matières sèches, volatiles et minérales montrent la diversité des biomasses testées. Des tests statistiques multivariés sont réalisés par la suite dans la dynamique de pouvoir corrélérer la nature et la composition de la biomasse aux critères de performance de production d'hydrogène.*

### 3.2.2 Analyse statistique

#### 3.2.2.1 Classification des biomasses

Les variables retenues pour mener l'analyse sont les teneurs en matières sèches, volatiles et minérales, la DCO introduite dans le bioréacteur, les teneurs en glucides (glucides solubles totaux, maltose glucose et fructose), les teneurs en nutriments (C, H, N, Al, B, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, S, Si, Sr, Ti, Zn, Zr), les teneurs en acides organiques (citrate, tartrate, pyruvate, succinate, lactate, formiate, acétate, propionate, butyrate, isovalérate, valérate) et en alcools (éthanol, propanol, butanol).

Une matrice des distances euclidiennes des variables a été générée, puis la méthode de clustering de Ward (Ward, 1963) a été appliquée. Ensuite, une analyse en composantes principales (ACP) sur la matrice des distances a été réalisée. La figure 62a présente le résultat du clustering hiérarchique et la figure 62b présente les axes 1 et 2 de l'ACP couplée avec le résultat du clustering hiérarchique.



**Figure 62 : Cluster selon la méthode de Ward (a) et ACP (b) des différentes biomasses : bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), racinelles d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)**

Deux groupes principaux de biomasses sont définis (figure 62a) : les marcs 2015 et 2016 ainsi que les pellicules argentées d'une part, le reste des biomasses d'autre part. Dans le second groupe, on note la proximité du kieselguhr, avec les bourbes 2016 et des drèches industrielles d'une part et des levures, des racinelles d'orge, des bourbes 2015 et des drèches de microbrasserie d'autre part.

Sur la composante principale 1 (PC1) de l'ACP (figure 62b), on note que le kieselguhr (groupe 1) est très éloigné du reste des biomasses, de même que les pellicules argentées de café, opposées au kieselguhr (groupe 2). Les autres biomasses sont rassemblées vers le milieu de l'axe.

Les marcs 2015 et 2016 (groupe 2) sont très proches des bourbes 2015 et 2016 et des drèches de microbrasserie (groupe 1). Les drèches brassicoles industrielles sont proches des levures brassicoles industrielles (groupe 1) et des radicelles (groupe 1). L'éloignement des pellicules argentées et du kieselguhr du reste des biomasses peuvent être expliqués par de fortes teneurs en matières sèches, carbone, matières volatiles et DCO pour les pellicules argentées au contraire du kieselguhr, qui présente de fortes teneurs en carbone et en matières minérales. Le reste des biomasses est donc échelonné selon ces paramètres, le groupe marcs/bourbes/drèches de microbrasserie étant plus riche en carbone que le groupe drèches industrielles/levures/radicelles.

Sur la PC2, on note que les pellicules argentées de café (groupe 2) se détachent nettement du reste du groupe. Il y a relativement peu de distance entre les marcs (2015 et 2016) (groupe 2), les levures industrielles (groupe 1), et le kieselguhr (groupe 1). Un autre ensemble constitué des drèches de microbrasserie et industrielles et des radicelles est formé. Enfin, les bourbes sont à l'extrémité de la PC2. Le second élément pouvant expliquer la répartition des biomasses est la teneur en hydrogène évaluée lors de l'analyse élémentaire.

### 3.2.2.2 Paramètres différenciant les biomasses

La figure 63 présente une ACP basée sur la matrice des variables caractérisant les biomasses.

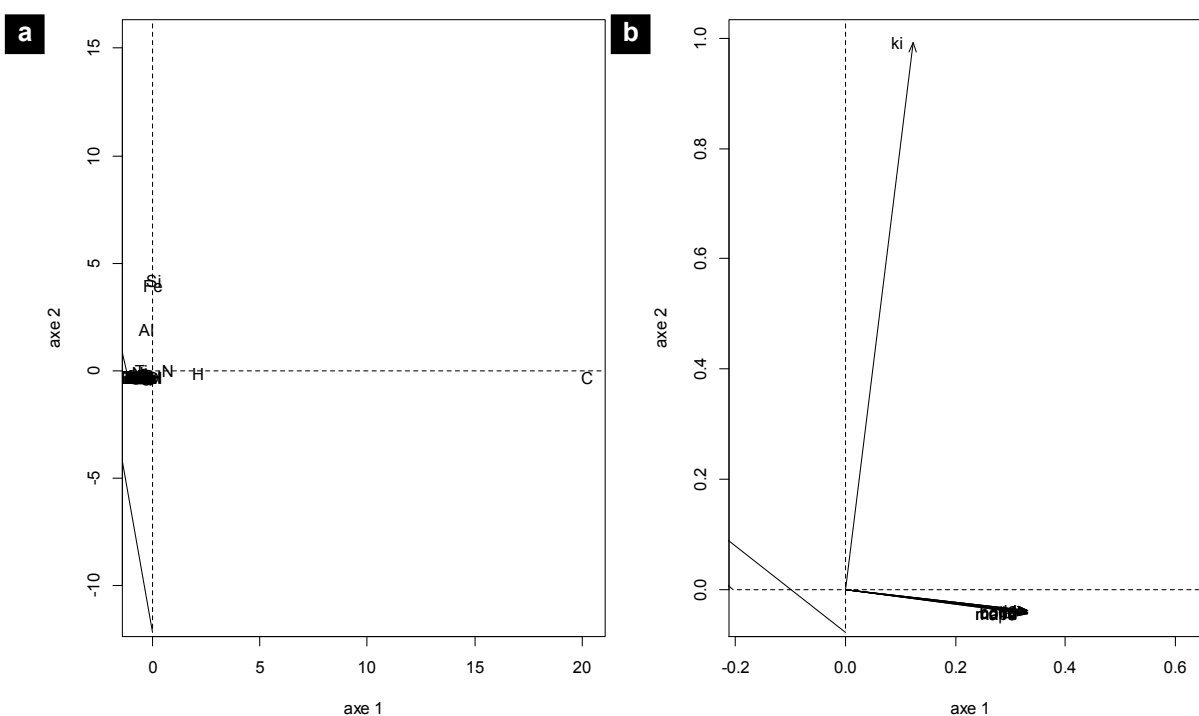


Figure 63 : ACP des variables environnementales des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicelles d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)

Différents éléments se détachent du nuage de points ( figure 63a) : C, N et H, sur l'axe 1 et Fe, Si, Al sur l'axe 2. Le kieselguhr est très nettement séparé des autres biomasses et corrélé avec

l'axe 2. En effet, sa forte teneur en matières minérales (90%) et en Si, Al et Fe sont dus à son origine (terres de diatomées).

Comme le kieselguhr est très différent des autres biomasses, et que les éléments C H et N étaient très éloignés du nuage de point, l'analyse a été effectuée sans les éléments Al, Fe, Si, afin d'identifier des paramètres pour lesquelles les variations sont moins importantes. La

figure 64a présente le clustering hiérarchique selon la méthode de Ward basé sur les distances euclidiennes des variables environnementales et la

figure 64b présente le tracé des composantes principales 1 et 2 d'une ACP couplée avec le résultat du clustering hiérarchique.

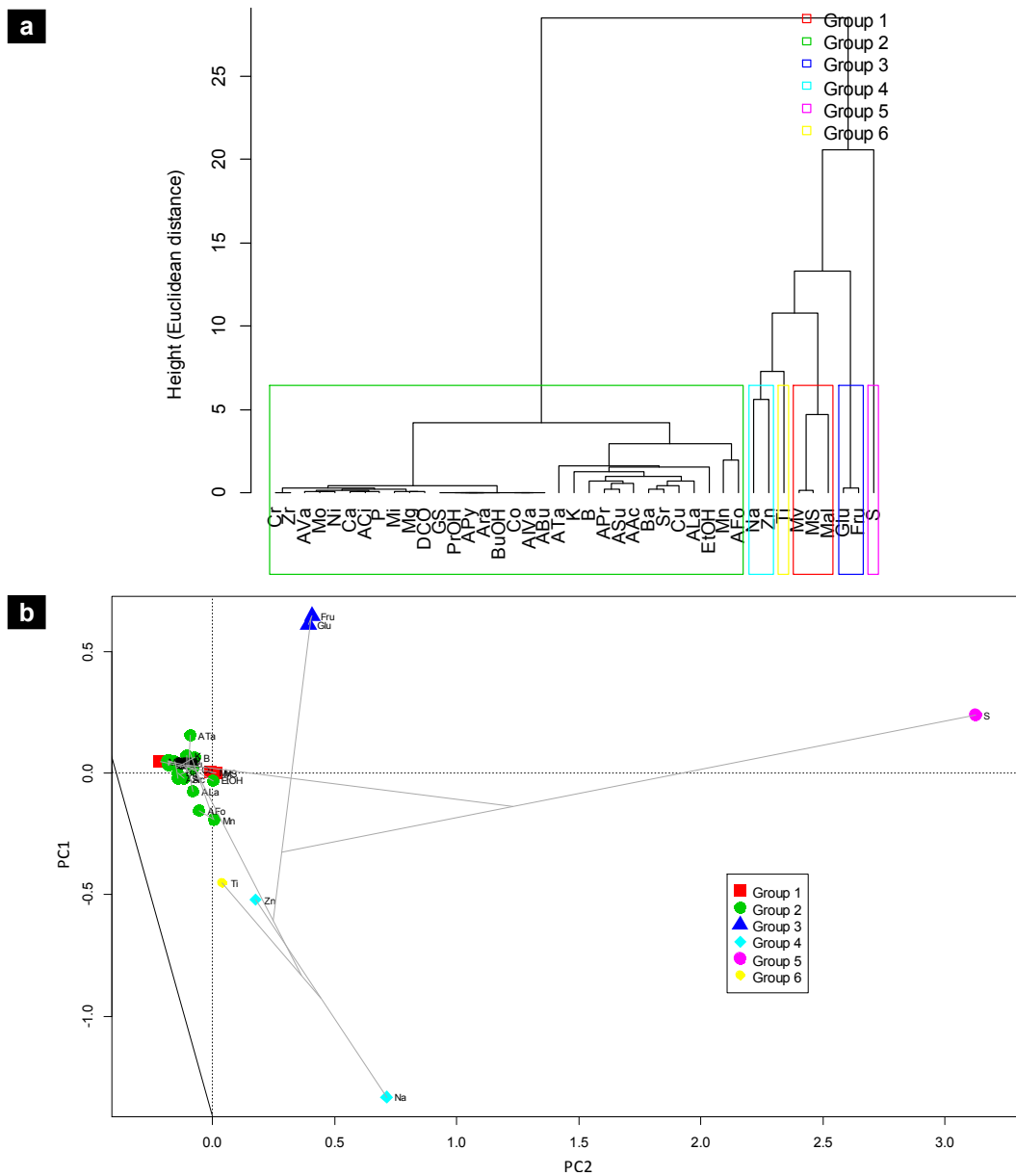


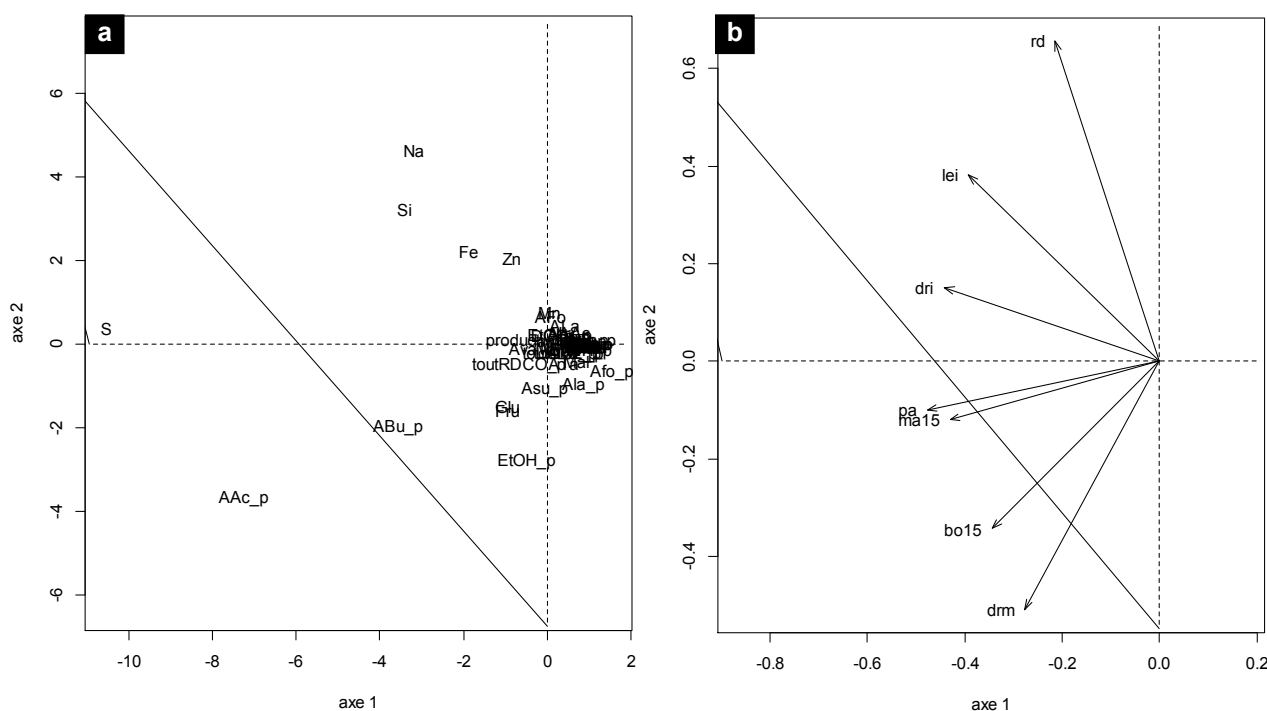
Figure 64 : Clustering hiérarchique selon la méthode de Ward (a) et ACP couplée aux clusters de Ward (b) basés sur les distances euclidiennes des variables environnementales (sans C, H, N, Al, Fe, Si)

Sur la figure 64a, on note que 6 groupes de variables sont formés : soufre ; glucose/fructose ; Mv/MS/Mal ; Ti ; Na/Zn. Le reste des variables comprenant les autres éléments, les acides organiques et les alcools, différencie peu les biomasses. Notons que la forte concentration en titane correspond au kieselguhr. Sur la figure 64b, sur l'axe 1 de l'ACP, le soufre (S) est isolé. De fortes valeurs en soufre ont été obtenues pour les marcs de raisin (1149 mmol/kg), les pellicules argentées (713 mmol/kg), les levures (836 mmol/kg) et les bourbes (507 mmol/kg). Ensuite, les variables Na, Fru, Glu, Zn sont relativement proches. Le reste des variables est regroupé au centre du graphique.

Sur l'axe 2 de l'ACP, Na est la variable la plus éloignée. Les teneurs en Na les plus élevées ont été obtenues pour le kieselguhr (506 mmol/kg), mais aussi pour les levures (459 mmol/kg), les radicelles (376 mmol/kg) et les pellicules argentées (190 mmol/kg). Ti et Zn sont regroupés. Ti caractérise le kieselguhr, mais Zn a une teneur faible dans cette biomasse et plus élevée pour les radicelles d'orge (184 mmol/kg), les drèches (90 mmol/kg) et les levures de brasserie industrielle (49 mmol/kg). S est relativement proche du reste des variables. Le fructose et le glucose sont éloignés du nuage de points, les concentrations les plus élevées ont été mesurées pour les bourbes (652 mmol/kg (2015) et 686 mmol/kg (2016)), puis les marcs (121 mmol/kg (2015) et 103 mmol/kg (2016)) et enfin de façon plus anecdotique les radicelles (8-12 mmol/kg).

### 3.2.2.3 *Corrélations entre la composition des biomasses et les productions de métabolites*

Pour déterminer si l'un des paramètres de composition d'une ou plusieurs biomasses a un effet sur la production d'un ou plusieurs métabolites, une ACP (figure 15) a été réalisée en incluant les données de composition de la biomasse, croisées avec les productions d'hydrogène et de métabolites.



**Figure 65 : ACP avec la composition de la biomasse et les données de production (a) et des biomasses (b) pour les biomasses bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicelles d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm). Ajout de « \_p » lors du métabolite est produit lors de la fermentation**

On note que la majorité des variables est regroupée au niveau du nuage de point au centre, seules quelques variables s'en détachent : S, productions d'acétate, de butyrate, d'éthanol, de lactate, de formiate, de succinate Si, Na, Fe, Zn, EtOH, Glu et Fru. Concernant les biomasses, un groupe est constitué des pellicules argentées et des marcs de raisin. Les autres biomasses sont isolées au regard des 2 dimensions. Le soufre est à l'extrémité de l'axe 1, et est principalement corrélé avec les pellicules argentées, les marcs de raisin et les drèches de brasserie industrielle. Ensuite, les productions d'acétate et de butyrate se détachent du nuage de points et sont fortement corrélées avec les bourbes, les marcs, les pellicules argentée et les drèches de microbrasserie dans une moindre mesure. Les productions de lactate et de formiate sont anticorrélées avec les radicelles, les levures et les drèches de brasserie industrielle. La production d'éthanol est corrélée avec les drèches de microbrasserie. Les levures et dans une moindre mesure les radicelles et les drèches de brasserie industrielle sont corrélées à de fortes concentrations initiales en Na, Si, Fe et Zn.

*Ainsi, selon ces deux méthodes d'analyse, en termes de composition, les pellicules argentées et les radicelles d'orge sont très différentes du reste des biomasses. Les marcs de raisin ont le plus de proximité avec les pellicules argentées. Le kieselguhr, pauvre en matières organiques, est très différent du reste des biomasses. Le groupement des biomasses riches en matières organiques a été déterminé selon les éléments suivants, forte teneur en S/C/N (marcs et pellicules argentées) et en DCO, teneurs moyennes/fortes en S et en glucose et fructose (marcs, bourbes), teneurs en zinc et sodium moyennes-élevées et faibles teneurs en MS (levures et drèches de*

*brasserie industrielle, radicelles). Malgré la diversité des biomasses sélectionnées, peu de différences liées à la DCO totale (sur la matière sèche) sont observées.*

*En conclusion de cette analyse, on peut voir que les biomasses les plus productives en hydrogène (bourbes 57 L/kg, drèches de microbrasserie 24 L/kg, puis pellicules argentées (18 L/kg), marcs de raisin (15 L/kg) sont associées à de fortes productions en acétate et en butyrate (dans une moindre mesure pour les drèches de microbrasserie).*

### 3.3 Analyse microbiologique

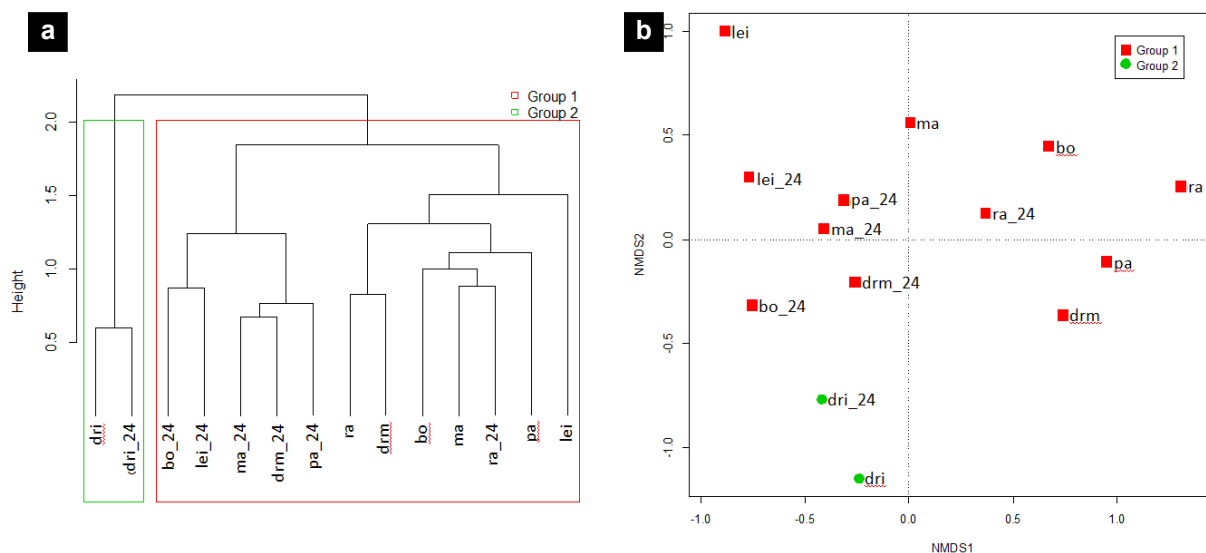
Les résultats d'analyse par séquençage des échantillons de biomasse brute et à  $t = 24$  h de fermentation en bioréacteur semibatch et ceux de l'analyse qPCR à 24 h de fermentation seront présentés. Ensuite, une analyse statistique pour tenter d'identifier des corrélations entre les résultats de microbiologie, les performances de production d'hydrogène, métabolisme et les caractéristiques des biomasses a été réalisée.

#### 3.3.1 Profils des communautés bactériennes des biomasses avant fermentation et du milieu réactionnel à $t = 24$ h de fermentation

L'ADN des culots bactériens des échantillons de biomasses avant utilisation lors des tests de fermentation et des culots bactériens issus des milieux réactionnels récoltés à  $t = 24$  h des différentes biomasses ont été extraits comme décrit précédemment. L'ADN bactérien codant l'ARN16S des 4 échantillons a été analysé par séquençage Illumina à haut débit.

##### 3.3.1.1 Classification des profils bactériens des biomasses brutes et à $t = 24$ h de fermentation

Une classification des profils bactériens des échantillons a été réalisée afin d'évaluer les proximités des différents échantillons et l'évolution de ces groupes de  $t = 0$  h à  $t = 24$  h de fermentation. Un clustering hiérarchique selon la méthode de Ward a été réalisé (figure 66a), ainsi qu'une NMDS basée sur les distances de Hellinger couplée avec le résultat du clustering hiérarchique de Ward basé sur les distances Chord des données (figure 66b).



**Figure 66 : Clustering hiérarchique selon la méthode de Ward (a) et ACP couplée aux clusters de Ward (b) basés sur les distances euclidiennes des profils des communautés bactériennes des biomasses avant et à t = 24 h de fermentation des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), racielles d'orge (ra), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki)**

Les communautés bactérienne des drèches industrielles (échantillon de biomasse et à t = 24 h de fermentation) sont séparées du reste de celles des autres biomasses (figure 66a). Ensuite, deux grands ensembles sont formés : les communautés bactériennes des biomasses brutes d'un côté, les échantillons à t = 24 h de fermentation de l'autre, à l'exception de l'échantillon de racielles à t = 24h de fermentation, associé aux profils bactériens des biomasses brutes. Avant fermentation, le groupe drèches de brasserie/levures est séparé du reste des échantillons. A 24 h de fermentation, on observe la formation de deux groupes : racielles/pellicules argentées/drèches industrielles/marcs d'une part, et bourbes/levures/drèches de microbrasserie d'autre part (figure 66d).

Sur l'axe 1 de l'ACP (figure 66b), on observe un regroupement des échantillons de biomasses brutes (racielles, pellicules argentées, drèches de microbrasserie, bourbes, marcs) et des racielles à t = 24 h ; Un second groupe rassemble l'ensemble des échantillons à t = 24 h de fermentation (sauf pour les racielles) et l'échantillon de drèches brassicoles industrielles brut.

Sur l'axe 2 de l'ACP, le profil bactérien des levures avant fermentation est isolé. Les communautés biomasses brutes bourbes, marcs, racielles, pellicules argentées, drèches de microbrasserie sont groupées avec l'ensemble des échantillons à t = 24 h de fermentation. Les drèches brassicoles (brutes et t = 24 h) sont isolées.

*En première approche, on constate que le profil bactérien des drèches brassicoles industrielles n'évolue pas comme les autres biomasses lors de la production d'hydrogène. Le profil bactérien des racielles reste proche de celui d'une biomasse non fermentée via notre procédé. Pour les autres biomasses, il y a une distinction nette entre biomasse brute et biomasse à t = 24 h. A t = 24 h, les groupes suivants sont*



*formés : radicules/pellicules argentées/marcs d'une part, et bourbes/levures/drèches de microbrasserie d'autre part. L'analyse des populations bactériennes permettra de mettre en évidence les caractéristiques de ces groupes.*

### 3.3.1.2 Analyse de la diversité bactérienne

Le tableau 28 présente les indices de diversité des échantillons, ainsi que les résultats de l'analyse qPCR réalisée exclusivement pour les échantillons d'effluent.

**Tableau 28 : Diversité bactérienne, analysés par séquençage pour les échantillons des différentes biomasses brutes et à t = 24 h de fermentation, abondance bactérienne à t = 24 h, analysée par qPCR**

Biomasse	Etat	Nombre d'OTU	Indice de Simpson	Indice de Shannon	ACE	qPCR (copies/ $\mu$ L <sub>ADN</sub> )
Bourbes viticoles	brut	185	0,47	1,03	196	na
Marcs de raisin	brut	88	0,33	1,47	97	na
Pellicules argentées	brut	421	0,04	4,04	424	na
Levures brassicoles	brut	67	0,33	1,27	72	na
Radicelles d'orge	brut	674	0,05	3,97	677	na
Drèches brassicoles	brut	97	0,49	1,42	120	na
Drèches de microbrasserie	brut	59	0,22	2,38	200	na
Bourbes viticoles	t= 24 h	59	0,34	1,39	76	9,48x10 <sup>8</sup>
Marcs de raisin	t = 24 h	30	0,69	0,69	30	1,79x10 <sup>9</sup>
Pellicules argentées	t = 24 h	44	0,38	1,25	46	1,20x10 <sup>8</sup>
Levures brassicoles	t = 24 h	39	0,47	1,09	46	1,82x10 <sup>9</sup>
Radicelles d'orge	t = 24 h	47	0,12	2,82	287	6,14x10 <sup>8</sup>
Drèches brassicoles	t = 24 h	46	0,39	1,55	130	5,51x10 <sup>8</sup>
Drèches de microbrasserie	t = 24 h	197	0,24	1,83	61	6,74x10 <sup>7</sup>

Sur les échantillons de biomasses avant fermentation (brut), le nombre d'OTU est très variable. Les indices de Simpson les plus faibles ont été obtenus pour les radicules d'orge et les pellicules argentées (0,04 et 0,05 respectivement), couplé avec les indices de Shannon (4,04 et 3,97) et ACE (424 et 677) les plus élevés, ce qui montre que la diversité est la plus élevée dans ces biomasses. Les indices de diversité de Simpson, de Shannon et les ACE suivent la même tendance de façon moins marquée pour les drèches de microbrasserie. Enfin, les bourbes viticoles, les marcs de raisin, les levures et les drèches brassicoles présentent une diversité bactérienne initiale moindre.

A t = 24 h, le nombre d'OTU est relativement comparable entre les biomasses excepté pour les drèches de microbrasserie dont le nombre d'OTU a augmenté en cours de fermentation alors qu'il a baissé pour toutes les autres biomasses. L'indice de Simpson le plus faible (0,12) a été obtenu, tout comme pour la biomasse brute, pour les radicules d'orge, ainsi que l'indice de Shannon (2,82) et l'ACE (287) les plus élevés, ce qui signifie que la diversité bactérienne est de loin la plus élevée dans cet échantillon. L'indice de Simpson le plus élevé (0,69) a été obtenu pour les marcs de raisin, ce qui va de pair avec l'indice de Shannon (0,69) et l'ACE (30) les plus faibles ; la diversité bactérienne est donc la plus faible pour cet échantillon. Pour le reste des échantillons, les indices de Simpson sont compris entre 0,24 et 0,47, de Shannon entre 1,09 et

1,83 et ACE entre 46 et 120. On note que les drèches de microbrasserie comportent également une diversité bactérienne relativement élevée.

Concernant les données obtenues par qPCR, le nombre de copies par  $\mu\text{L}$  d'ADN oscille entre  $6,74 \times 10^7$  pour les drèches de microbrasserie et  $9,48 \times 10^8$  pour les bourbes, biomasse la plus riche en ADN bactérien et présentant les meilleurs performances en production d'hydrogène.

### 3.3.1.3 Proportions des phyla, familles et genres majoritaires (>2%)

La figure 67 présente l'analyse microbiologique des biomasses brutes et à  $t = 24$  h de fermentation en bioréacteur semibatch. Un post traitement des données après le traitement bioinformatique a été réalisé afin de supprimer les *Streptophytes* et autres (plantes et mitochondries).

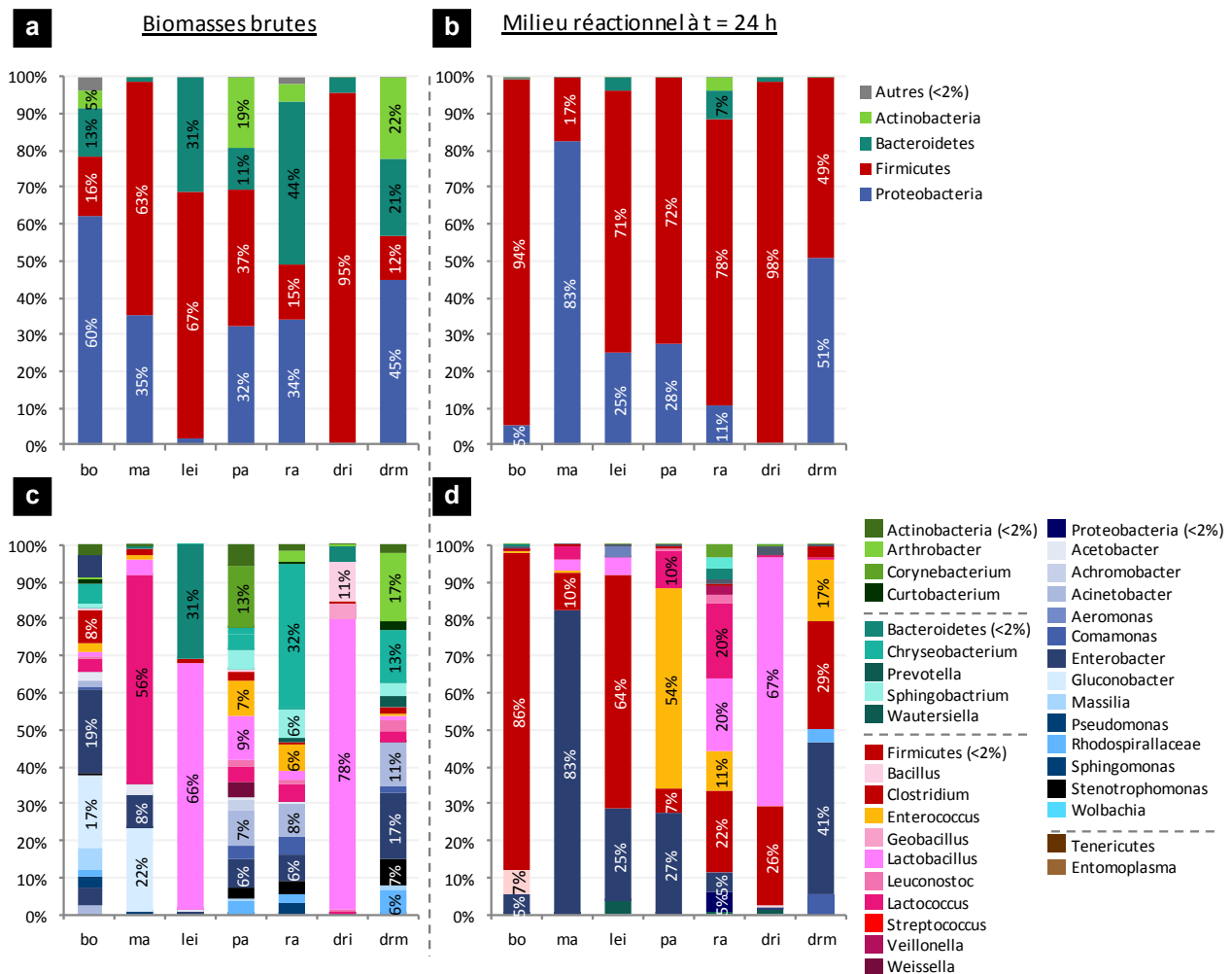


Figure 67 : Profils bactériens des biomasses brutes (à gauche), *phylum* (a) et genre(c), et du milieu réactionnel des tests à  $t = 24$  h (à droite) *phylum* (b) et genre (d)

Pour la biomasse brute (figure 67a), 4 *phyla* principaux ont été identifiés : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*. Le *phylum Firmicutes* est majoritaire dans les échantillons de drèches brassicoles industrielles (98%) et les levures brassicoles (67%), avec une majorité de *Lactobacillus* (78% et 66% respectivement) (figure 67b). Le *phylum Proteobacteria* est majoritaire dans les bourbes (60%), et est présent en proportions importantes dans les drèches de microbrasserie (45%), les marcs de raisin (39%), les radicelles d'orge (34%) et les pellicules argentées (32%). Il est composé majoritairement des genres *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Acinetobacter*. Pour les bourbes, on observe peu de diversité des genres dans ce *phylum*, avec une présence d'*Enterobacter* (19%) et de *Gluconobacter* (17%). Pour les drèches de microbrasserie, *Enterobacter* est également présent (17%), ainsi qu'*Acinetobacter* (11%), *Stenotrophomonas* (7%) et *Pseudomonas* (6%). Pour les marcs de raisin, *Gluconobacter* (22%) et *Enterobacter* sont présents (8%). Le *phylum Firmicutes* est majoritaire dans l'échantillon de marcs de raisin (63%), essentiellement représenté par *Lactococcus* (56%). Pour les drèches industrielles, les genres *Bacillus* (11%) et de *Geobacillus* (4%) sont également présents. Le *phylum Bacteroidetes* est majoritaire (44%) dans l'échantillon de radicelles d'orge, représenté par les genres *Chryseobacterium* (32%) et *Sphingobacterium* (6%).

Dans le milieu de culture à  $t = 24$  h de fermentation, les 4 *phyla* identifiés dans les biomasses brutes sont toujours présents mais dans des proportions très différentes (figure 67b). Les genres *Clostridium* et *Enterobacter* sont souvent présents ensemble, parfois avec *Enterococcus* et/ou *Lactobacillus* (figure 67d). Les proportions de *Firmicutes* sont majoritaires (71-98% des *phyla* analysés) hormis pour les culots bactériens des tests utilisant les marcs de raisin et les drèches de microbrasserie, pour lesquels le *phylum Proteobacteria* est majoritaire (83% et 51% respectivement). Le *phylum Firmicutes* est essentiellement représenté par *Clostridium* dans les échantillons issus du milieu de fermentation de bourbes (86%) et de levures (64%), ce qui peut expliquer leur proximité lors de l'analyse statistique. Il est plus diversifié pour les radicelles d'orge (*Clostridium* (22%), *Lactobacillus* (20%), *Lactococcus* (20%), *Enterococcus* (11%)), les pellicules argentées (*Enterococcus* (54%), *Lactococcus* (10%), *Clostridium* (7%)) et pour les drèches de microbrasserie, les principaux genres identifiés sont *Clostridium* (29%) et *Enterococcus* (17%). Ces dernières biomasses présentent une part non négligeable d'*Enterobacter*, tout comme les marcs.

*Dans l'ensemble, on note donc l'émergence du phylum Firmicutes pour les échantillons issus des tests de fermentation des bourbes (16% à 94%), levures (67% à 71%), pellicules argentées (37% à 72 %), radicelles d'orge (15 à 78%). Pour les marcs de raisin, le phylum Proteobacteria émerge (de 35% à 83%). Les genres principaux des différents échantillons à t = 24 h (Clostridium, Enterobacter, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus) sont présents initialement dans les échantillons de biomasse brutes.*

#### 3.3.1.4 Proportions des taxa majoritaires (>2%)

Les taxa *Clostridium beijerinckii/diolis* et *Enterobacter sp.* sont présents dans tous les échantillons, en proportions très variables (tableau 29) ; à eux deux, ils représentent 44,7% des taxa des bourbes (dans lesquels le taxon majoritaire est *Clostridium intestinale* avec 41,5%), 92,6% des taxa des marcs de raisin, 32,6% des taxa des pellicules argentées (avec *Enterococcus sp.* en taxon majoritaire (54,1%), 88,4% des taxa des levures, 25,9% des taxa des radicales, 18,6% des taxa des drèches brassicoles industrielles (*Enterobacter* présent mais inférieur à 1%) pour lesquelles un taxon de *Lactobacillus* est majoritaire (58,7%) et 55,9% des taxa des drèches de microbrasserie.

Dans l'ensemble, les échantillons sont peu diversifiés, avec une ou deux taxa majoritaires (>40%) à l'exception de l'échantillon issu du test à partir de radicales d'orge, pour lequel on observe la présence de quatre OTU en proportions comprises entre 10 et 20% environ (*Clostridium beijerinckii/diolis* (20,6%), *Enterococcus sp.* (10,0%), *Lactococcus taiwanensis/lactis* (18,7%) et *Lactobacillus wasatchensis/porcinae/camelliae* (16,3%). Pour cet échantillon, de nombreuses espèces minoritaires sont également présentes (entre 1 et 2%), et ne sont pas connues pour être productrices d'hydrogène (sauf *Clostridium sporogenes/botulinum*) (1,6%).

Dans l'échantillon de bourbes, deux taxa de *Clostridium* sont majoritaires : *Clostridium (beijerinckii/diolis)* (39,6%) et *Clostridium intestinale* (41,5%). *C. intestinale* est une souche ayant une croissance rapide, connue pour être productrice d'hydrogène, avec une coproduction d'éthanol (Ramachandran *et al.*, 2011). *Bacillus smithii* (6,7%) est une espèce anaérobie facultative, dont le produit de fermentation majoritaire est le lactate (Bosma *et al.*, 2016). D'autres bactéries du genre *Clostridium* sont présentes de façon minoritaire (*Clostridium pasteurianum* (1,5%) et *Clostridium saccharolyticum* (3,0%)).

Dans l'échantillon de marcs de raisin, *Enterobacter sp.* est largement majoritaire (82,6%), suivi par (*Clostridium beijerinckii/diolis*) (10%). *Lactobacillus satsumensis* (1,9%) et *Lactococcus (taiwanensis/lactis)* (3,7%) sont présents de façon minoritaire.

Dans l'échantillon de pellicules argentées, *Enterococcus sp.* est fortement majoritaire (54,1%). Le genre *Enterococcus* est anaérobie facultatif, mésophile, non sporulant mais capable de survivre dans des conditions environnementales inhospitalières, notamment il est tolérant au dessèchement et est capable de survivre pendant des mois sur des surfaces sèches. Ce genre produit de l'acide lactique, mais aussi de nombreux autres métabolites, dont l'acétate et le formiate. La production de lactate est favorisée en présence d'un excès de glucose. Il est capable de métaboliser de nombreux glucides, dont des glucides complexes (Ramsey *et al.*, 2014). Outre *Enterobacter sp.* (27,5%) et *Clostridium beijerinckii/diolis* (5,1%), *Clostridium intestinale* est présent en minorité (1,1%).

**Tableau 29 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des tests de différentes biomasses en bioréacteur semibatch à t = 24 h - Abondance >1% pour au moins un échantillon**

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° ordre	bo	ma	pa	lei	rd	dri	drm
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides sp.	100	/	0	0	0	1,7	0	<1	0
	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium ureilyticum	100	NR_042503.1	0	0	0	0	1,5	<1	0
	Prevotellaceae	Prevotella	Prevotella paludivivens	100	NR_113122.1	0	0	0	1,8	<1	<1	<1
	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	Sphingobacterium multivorum	100	NR_113706.1	<1	0	0	0	2,0	0	0
Firmicutes	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus smithii	100	NR_112634.1	6,7	0	0	0	0	<1	0
Firmicutes	Clostridiaceae	Clostridium	Clostridium pasteurianum	99	NR_104822.1	1,5	<1	<1	0	<1	<1	<1
			Clostridium (beijerinckii/diolis)	99	/	39,6	10,0	5,1	63,6	20,6	18,6	18,6
			Clostridium (carboxidivorans/drakei)	100	/	<1	0	<1	<1	1,7	<1	<1
			Clostridium intestinale	99		41,5	0	1,1	0	0	<1	<1
			Clostridium saccharolyticum	97		3,0	<1	<1	0	<1	4,9	5,2
			Clostridium swelfunianum	99	NR_126179.1	0	0	0	0	<1	2,5	<1
			Clostridium kogagensis	97	NR_136452.1	0	0	0	0	0	<1	4,0
			Clostridium (sporogenes/botulinum)	99	/	0	0	0	0	1,6	0	<1
	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus sp.	100	/	<1	<1	54,1	0	10,0	<1	16,6
	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus satsumensis	99	NRIC0604	<1	1,9	0	0	<1	0	0
			Lactobacillus sp.	99	/	0	<1	0	3,3	1,0	<1	<1
			Lactobacillus (leichmannii/delbrueckii/equicursoris)	98	/	0	0	0	0	0	58,7	<1
			Lactobacillus (wasatchensis/porcinae/camelliae)	99	/	<1	<1	<1	0	16,3	<1	<1
			Lactobacillus fermentum			0	0	0	0	<1	6,1	<1
			Lactobacillus (ultunensis/amylovorus)	100	/	0	0	0	<1	<1	1,6	0
	Leuconostocaceae	Leuconostoc	Leuconostoc pseudomesenteroides	/	NR_109004.1	<1	<1	<1	1,8	1,8	<1	<1
	Streptococcaceae	Lactococcus	Lactococcus (taiwanensis/lactis)	100	/	<1	3,7	10,3	<1	18,7	<1	<1
Streptococcus		Streptococcus			<1	0	0	0	2,3	<1	0	
Veillonellaceae	Megasphaera	Megasphaera elsdenii	100	NR_102980.1	0	0	0	0	0	1,2	0	
	Veillonella	Veillonella sp.			0	0	0	3,3	<1	0	0	
Proteobacteria	Aeromonadaceae	Aeromonas	Aeromonas sp.	100	/	0	0	0	0	0	0	5,6
	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter sp.	-	-	5,1	82,6	27,5	24,8	5,3	<1	41,3
	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter johnsonii	100	NR_117624.1	<1	0	0	0	1,1	<1	<1
	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp.	100	/	0	0	0	0	0	<1	3,6

Dans l'échantillon de levures, *Clostridium beijerinckii/diolis* est largement majoritaire (63,6%), suivi par *Enterobacter sp.* (24,8%). Des bactéries concurrentes à la production d'hydrogène (*Lactobacillus sp.* (3,3%) et *Veillonella sp.* (3,3%)) sont également présentes en faibles proportions, ainsi que des taxa du phylum *Bacteroidetes* (*Bacteroides sp.* et *Prevotella paludivivens*).

Dans les deux échantillons de drèches, *Clostridium beijerinckii/diolis* est présent en proportions équivalentes (18,6%). D'autres OTU attribuée au genre *Clostridium* sont présentes en plus faibles proportions: *Clostridium saccharolyticum*, présentes dans les deux échantillons (4,9% et 5,2%), *Clostridium swelfunianum* (2,5%) dans les drèches brassicoles industrielles et *Clostridium kogagensis* (4,0%) dans les drèches de microbrasserie. *Enterobacter sp.* et *Enterococcus sp.* sont fortement représentés (41,3% et 16,6% respectivement) dans l'échantillon issu des drèches de microbrasserie alors qu'il est quasiment absent de l'échantillon des drèches de brasserie industrielle pour lequel une forte présence de *Lactobacillus sp.* (58,7%) est relevée.

### 3.3.1.5 Comparaison des quantités des genres majoritaires à t = 24 h par qPCR

La figure 68 présente les genres majoritaires, dont le nombre a été obtenu en multipliant les résultats qPCR par les proportions de l'ensemble des genres des échantillons à t = 24 h des différentes biomasses.

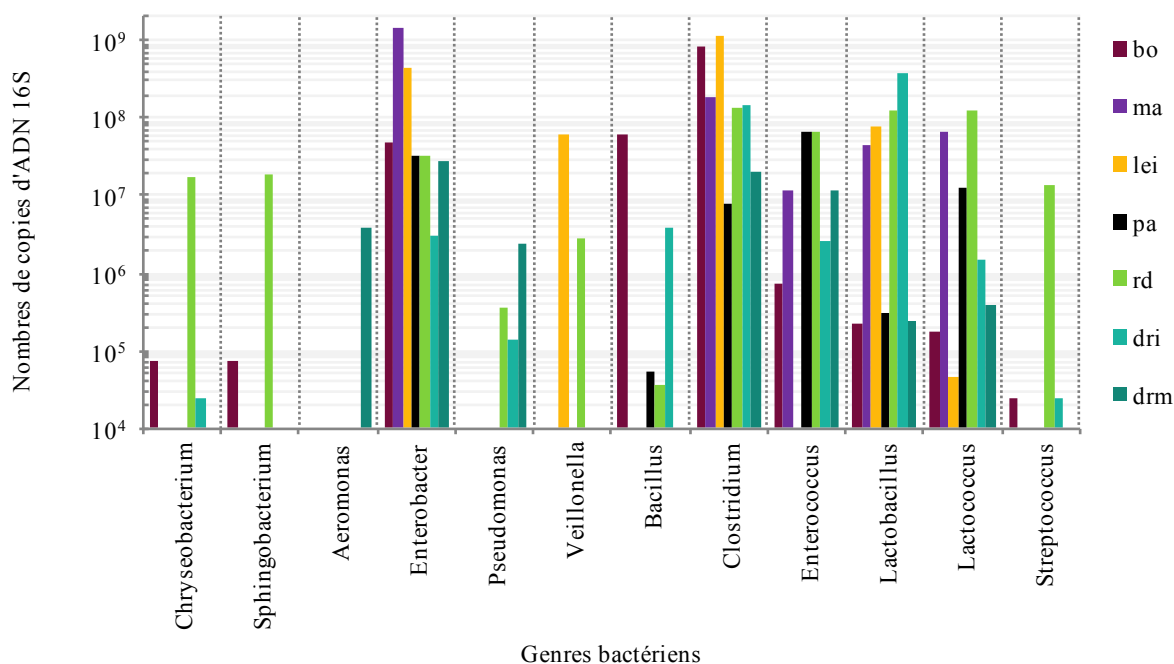


Figure 68 : Nombre de copies des genres bactériens majoritaires à 24 h de test des échantillons bactériens issus de la fermentation des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicelles d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm)

Les teneurs des genres *Enterobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, présents dans les milieux fermentaires de tous les tests, et *Enterococcus* à l'exception de l'effluent du test

réalisé à partir de levures, sont variables. Le genre *Clostridium* est maximal chez les levures ( $1 \times 10^9$ ) et les bourbes ( $8 \times 10^8$ ), puis est équivalent ( $1 \times 10^8$ ) chez les marcs, radicelles, drèches brassicoles industrielles et enfin avec des teneurs plus faibles chez drèches de microbrasserie ( $2 \times 10^7$ ) et les pellicules argentées ( $7 \times 10^7$ ). Le genre *Enterobacter* est maximal chez les marcs ( $1 \times 10^9$  nombres de copies) puis les levures ( $4 \times 10^8$ ) et est présent en quantités équivalentes ( $3 \times 10^7$ ) chez bourbes, pellicules argentées, radicelles et drèches de microbrasserie, avec des teneurs plus faibles pour les drèches de brasserie industrielle ( $3 \times 10^6$ ).

De plus, un ou plusieurs genres compétiteurs à la production d'hydrogène sont parfois présents t = 24 h : *Veillonella* (levures), *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, *Streptococcus* (radicelles), *Aeromonas* et *Pseudomonas* (drèches de microbrasserie).

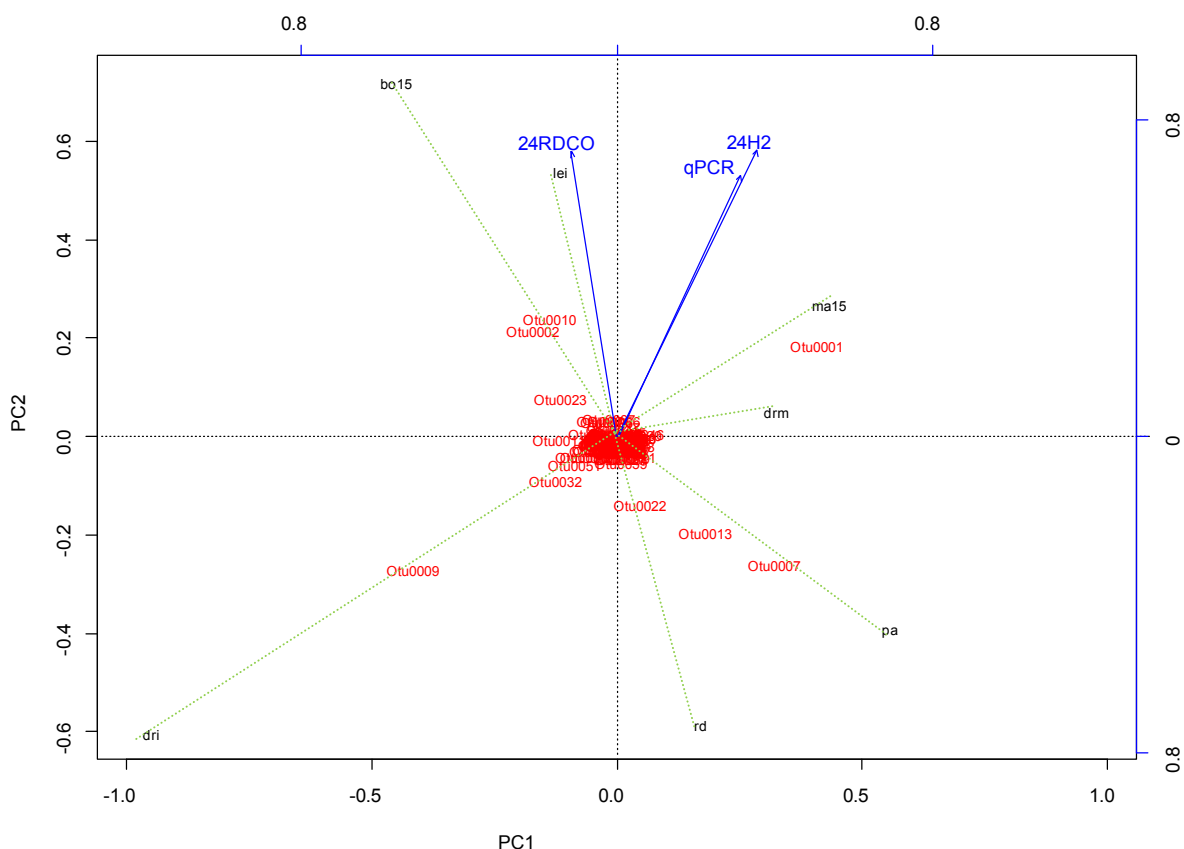
*Ainsi, Clostridium et Enterobacter, associés à la production d'hydrogène, sont présents dans tous les échantillons en proportions variables. Ils sont majoritaires dans les bourbes, les marcs, les levures industrielles et les drèches de microbrasserie. On note la présence importante d'Enterococcus dans les pellicules argentées et une diversité importante des populations bactériennes, avec une majorité de bactéries lactiques obtenu lors du test de fermentation des radicelles d'orge à t = 24 h. Une majorité de bactéries lactiques est également présente dans les drèches brassicoles. Ainsi, pour certaines biomasses, les conditions de mise en œuvre du bioréacteur ont favorisé l'émergence de bactéries productrices d'hydrogène.*

### 3.3.2 Corrélations biomasse sur la microbiologie du milieu de culture et les productions à 24 h

A l'issue des analyses microbiologiques des échantillons de biomasses brutes et des échantillons des milieux de fermentation en bioréacteur semibatch, une analyse statistique a été réalisée afin d'émettre en évidence d'éventuelles corrélations avec les performances de production d'hydrogène à t = 24 h de fermentation et les compositions des biomasses.

Cette analyse vise à déterminer si certaines biomasses favorisent un développement bactérien plus important, s'il y a un lien entre une forte production d'hydrogène et une forte quantité de bactéries à 24 h de fermentation, et si l'activité plus spécifique d'un ou plusieurs *taxa* pour la production d'hydrogène à t = 24 h peut être détectée.

La figure 69 présente le tracé des composantes principales 1 et 2 de l'ACP basée sur les distances de Hellinger des variables.



bo15 = bourbes, lei = levures, ma15 = marcs de raisin, drm = drèches de microbrasserie, pa = pellicules argentées de café, rd = radicules d'orge, dri = drèches de brasserie industrielle

**Figure 69 : ACP basée sur les distances de Hellinger des variables (biomasses, production et taxa) à t = 24 h de fermentation**

Dans un premier temps, on remarque que seule une dizaine d'OTU se détache du centre des 2 axes de l'ACP.

Sur la composante principale 1 (CP1), on note que les drèches industrielles sont isolées et fortement caractérisées par l'émergence de l'OTU 0009 (*Lactobacillus sp.*). Puis, le groupe levures/bourbes est associé en moindre mesure à l'OTU0009, puis aux OTU0010 (*Clostridium intestinale*) et OTU0002 (*Clostridium beijerinckii/diolis*) et dans une moindre mesure aux OTU 0023 (*Bacillus smithii*) et OTU32 (*Lactobacillus fermentum*). Enfin un dernier groupe est constitué des radicules/drèches de microbrasserie/marcs/pellicules argentées, caractérisé par la présence en proportions variables des OTU0022 (*Lactobacillus sp.*), OTU0013 (*Lactococcus sp.*), OTU0007 (*Enterococcus sp.*) et OTU0001 (*Enterobacter sp.*).

Sur la composante principale 2 (CP2), on distingue 2 grands groupes. L'ensemble : bourbes/levures/marcs/drèches de microbrasserie est associés de façon graduelle aux OTU0010 (*Clostridium intestinale*), OTU0002 (*Clostridium beijerinckii/diolis*), OTU0001 (*Enterobacter sp.*) et OTU0023 (*Bacillus smithii*). Ensuite, le groupe pellicules argentées/drèches industrielles/radicelles d'orge est caractérisée par les OTU0032 (*Lactobacillus fermentum*), OTU0022 (*Lactobacillus sp.*), OTU0013 OTU0013 (*Lactococcus sp.*), OTU009 (*Lactobacillus sp.*) et OTU007 (*Enterococcus sp.*).



Ainsi, le premier élément permettant de distinguer les profils bactériens des différents tests est une proportion importante du genre *Clostridium*, avec différents degrés de présence du genre *Lactobacillus* dans les échantillons à  $t = 24$  h de drèches industrielles, bourbes, levures industrielles d'une part, contre l'association *Lactobacillus/Lactococcus/Enterococcus/Enterobacter* dans les échantillons à  $t = 24$  h de radicules d'orge, drèches de microbrasserie, marcs, pellicules argentées) d'autre part. La CP2 nuance cette répartition : l'ensemble drèches/levures est également associé à la présence d'*Enterobacter* de façon moindre et les marcs et drèches de microbrasserie sont un peu caractérisés par la présence de *Clostridium*, alors que la forte présence de bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) et d'*Enterococcus* rapproche les biomasses pellicules argentées, drèches industrielles et radicules d'orge.

Les quantités bactériennes les plus élevées (qPCR) et la production de  $H_2$  à 24 h (24H<sub>2</sub>) sont étroitement liées, montrant que les productions d'hydrogène les plus élevées sont favorisées par les plus fortes concentrations en microorganismes. Les biomasses bourbes et levures sont corrélés à 24RDCO. Dans un premier temps, ce résultat semble surprenant pour la biomasse levures dont les performances de production de  $H_2$  globales sont faibles ; cependant, à 24 h, la production de  $H_2$  étant quasiment totale, la fermentation des levures permet d'obtenir de bons résultats de production de  $H_2$  à 24 h contrairement à d'autres biomasses dont la production commence à peine (telles que les drèches de brasserie industrielle). Dans une moindre mesure, ces biomasses sont corrélées à 24H<sub>2</sub> et qPCR, de même que les marcs et les drèches de microbrasserie. Ces paramètres sont anticorrélés à la biomasse drèches brassicoles qui montrent de faibles performances de production de  $H_2$  à 24 h à cause d'un temps de latence important (18 h). De son côté, la biomasse radicules d'orge, qui présente le plus faible rendement DCO global, est anticorrélée au rendement DCO à 24 h (24RDCO).

## 3.4 Discussion

### 3.4.1 Nature de la biomasse, performances de production d'hydrogène et schémas métaboliques

En premier lieu, cette étude montre que, sans surprise, la production d'hydrogène dépend surtout de la quantité de matière organique biodégradable disponible dans le bioréacteur ; en effet, la biomasse kieselguhr, pauvre en matières organiques (1,2%MS), génère une faible production massique d'hydrogène ( $0,7 L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$ ). Notons cependant que lorsque la production d'hydrogène est rapportée à la quantité de matière volatile (MV), assimilable à la quantité de matière organique, la production obtenue est de  $54,4 L_{H_2}/kg_{MV}$ , ce qui est non négligeable.

Pour les autres biomasses, la richesse en MV semble être moins influente concernant la production d'hydrogène. En effet, les productions d'hydrogène et rendements DCO des radicules, bourbes, drèches de brasserie industrielle et levures de brasserie varient grandement ( $3-57 L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$  et  $17-283 mL_{H_2}/g_{DCO}$ ) alors que leurs parts respectives de MV sont proches (12,4-

19,5%MS). L'exploitation du potentiel de production, selon leur richesse en matière organique, de chacune des biomasses est donc variable. De fortes teneurs en glucides solubles sont corrélées avec le rendement DCO total le plus élevé pour les tests réalisés avec les bourbes, ce qui correspond aux résultats largement rapportés dans la littérature (Ghimire *et al.*, 2015). En effet, les bourbes, essentiellement constituées de monosaccharides (glucose, fructose) donnent des rendements DCO ( $283 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{DCO}}$ ) bien plus élevés, que les autres biomasses ( $17\text{-}68 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{DCO}}$ ), plus riches sans doute en glucides complexes. Le dosage des glucides solubles concorde avec cette analyse et permet de dire que même si tous les glucides simples ne sont pas analysés par HPLC, leur teneur est faible dans les pellicules argentées, les drèches, les radicelles et le kieselguhr. Les polysaccharides complexes nécessitant une étape d'hydrolyse avant leur assimilation par les bactéries, il semble donc que cette étape n'ait pas lieu au sein du bioréacteur, ou de façon limitée. La mise en œuvre de prétraitements visant à hydrolyser les polysaccharides de ces biomasses est donc pertinente.

A  $t = 24 \text{ h}$ , le rendement DCO est corrélé avec les quantités de *Clostridium* les plus élevées dans le milieu réactionnel (bourbes et levures). Il semble que des teneurs en glucides solubles comparativement plus élevées que pour les autres des biomasses puissent expliquer ce résultat. Le plus faible rendement à  $t = 24 \text{ h}$  des marcs de raisin s'explique par le fait que les glucides sont relargués en cours de fermentation mais aussi par la présence majoritaire du genre *Enterobacter* dont les rendements de production en hydrogène ont été rapportés comme étant plus faibles que ceux du genre *Clostridium* en culture pure (Elsharnouby *et al.*, 2013). Néanmoins, nous constatons que de bonnes productions peuvent quand même être atteintes à  $t = 24 \text{ h}$  pour les tests ne sélectionnant pas spécifiquement *Clostridium* (marcs de raisin, drèches de microbrasserie) mais favorisant un développement bactérien avec une forte diversité.

Enfin, différents schémas métaboliques, caractéristiques des différentes biomasses, sont mis en évidence, on distingue les productions butyrate-acétate (bourbes, drèches industrielles), acétate- éthanol (marcs de raisin, drèches de microbrasserie), acétate (pellicules argentées), butyrate-propionate-isovalérate (radicelles), acétate-propionate (levures). Les répétitions de tests de fermentation endogène pour une biomasse donnée génèrent les mêmes natures de métabolites, même si leurs distributions varient un peu d'un test à l'autre. Ce résultat est obtenu quelle que soit l'année de récolte pour les biomasses vitivinicoles, le lot pour les coproduits d'industrie agroalimentaire, la durée de stockage pour l'ensemble des biomasses. Cette constance métabolique est un atout pour la mise en œuvre d'un procédé simplifié, d'autant plus que lors de la mise en œuvre en conditions réelles du procédé, le stockage des biomasses n'est pas envisagé.

### 3.4.2 Dynamique métabolique de la production d'hydrogène

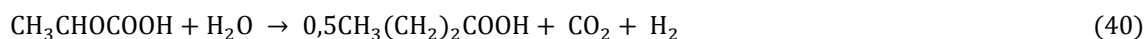
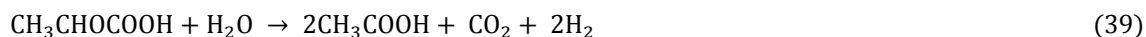
Pour l'ensemble des tests, le suivi de l'évolution des métabolites en cours de fermentation montre qu'il y a différentes étapes dans la production métabolique, dont les cinétiques dépendent des concentrations de glucides solubles dans le bioréacteur.

En effet, le début de la production d'hydrogène concorde avec une production d'acétate, de butyrate et d'éthanol, en proportions variables. Du lactate, du succinate sont également produits au cours de cette phase. Pour les biomasses riches en glucides solubles (bourbes, marcs, drèches de microbrasserie), la consommation totale des glucides solubles (glucose, fructose, maltose) analysés par HPLC-RI coïncide avec le début de la consommation de divers métabolites, dont le lactate, le formiate, le succinate et l'isovalérate. La consommation de ces métabolites intervient plus tôt pour les tests à partir de biomasses pauvres en glucides solubles (drèches industrielles, radicelles, levures), pour lesquelles la phase de production acétate-butyrates-éthanol est moindre. Dans les deux cas, la consommation du lactate ainsi que du formiate, du succinate et de l'isovalérate dans une moindre mesure coïncide avec un surplus (bourbes, marcs, pellicules argentées, levures industrielles, drèches de microbrasserie) ou même parfois le début (radicelles d'orge, drèches brassicoles) de la production d'hydrogène.

L'occurrence de phases de production métaboliques et microbiologiques en bioréacteur semibatch a été récemment rapportée dans les études d'Asunis *et al.* (2019) et de García-Depraect *et al.* (2019). Dans l'étude d'Asunis *et al.*, (2019), portant sur la fermentation obscure endogène de lactosérum, les auteurs observent une première phase dominée par la production d'acide lactique et une seconde phase où l'acide lactique est consommé et de l'acétate et du butyrate sont produits. Les auteurs n'ont pas analysé le *consortium* bactérien, mais ils suggèrent des changements de dynamiques au niveau des bactéries productrices d'acide lactique et d'hydrogène. Dans l'étude de García-Depraect *et al.* (2019), les auteurs rapportent une symbiose trophique entre les bactéries lactiques et les bactéries productrices d'hydrogène, avec l'occurrence de trois phases microbiologique : consommation des carbohydrates par des bactéries productrices d'acétate et de lactate, dominantes, puis consommation du lactate et de l'acétate par des bactéries productrices d'hydrogène et enfin émergence de bactéries non productrices d'hydrogène à la fin de la production d'hydrogène. Nos tests suggèrent qu'une telle symbiose existe, mais que l'ordre des phases et l'importance de la production de lactate pour la production d'hydrogène dépend de la richesse en carbohydrates des biomasses.

Le fait qu'il y ait plusieurs phases de production/consommation de métabolites dans le milieu réactionnel laisse à penser que les communautés microbiennes tendent à changer au cours du test de fermentation pour l'ensemble des biomasses testées, ce qui a notamment été montré pour les bourbes lors de travaux précédents au laboratoire (François-Lopez, 2016). Les analyses microbiologiques de nos tests ont été effectuées à  $t = 24$  h, ce qui correspond à différentes phases de la production de biohydrogène selon la biomasse considérée : fin de l'augmentation exponentielle de la production d'hydrogène (bourbes, drèches industrielles), fin de la première phase de production (levures), plateau de production d'hydrogène (marcs, pellicules argentées, kieselguhr, drèches de microbrasserie et fin de la production (radicelles). Ainsi, cela expliquerait la forte diversité observé dans les radicelles. Dans l'ensemble de nos tests, à  $t = 24$  h de fermentation, des bactéries lactiques sont présentes en proportions variables dans le bioréacteur, associées à la production de lactate. Le lactate est donc consommé pour produire de l'hydrogène,

ce qui a été rapporté dans différentes études (Asunis *et al.*, 2019 ; Matsumoto et Nishimura, 2007; Baghchehsaraee *et al.*, 2009). Plusieurs voies microbiologiques impliquant la transformation du lactate avec coproduction d'hydrogène ont été décrites dans la littérature (38 et 39) (McInerney et Bryant, 1981; Thauer *et al.*, 1977):



Blanco *et al.* (2019) proposent une interaction trophique entre les bactéries lactiques et les bactéries productrices d'hydrogène, capables de fermenter le lactate et l'acétate. Fuess *et al.* (2018) ont suggéré que le lactate peut être utilisé comme source de carbone de nombreuses biomasses acidogènes, incluant à la fois des bactéries productrices d'hydrogène et non productrices d'hydrogène. On note cependant, pour les tests avec les bourbes, l'acide lactique n'est pas consommé en totalité et qu'à  $t = 24$  h, il n'y a pas de bactéries lactiques prédominantes, sa consommation n'améliore que peu la production totale d'hydrogène, un tel changement n'est donc pas souhaitable pour cette biomasse. Des études rapportent que la production de biohydrogène a été sévèrement affectée en présence de bactéries lactiques (Gomes *et al.*, 2016; Noike *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2016), dû aux effets négatifs de la compétition pour le substrat entre des bactéries lactiques et les bactéries productrices d'hydrogène et la sécrétion de bactériocines par les bactéries lactiques. L'étude de Park *et al.*, (2016) rapporte notamment un effondrement de la production d'hydrogène concomitant avec l'accumulation d'acide lactique. Nous pouvons supposer que la mise en œuvre de la fermentation obscure sans prétraitement du *consortium* bactérien, préservant la diversité initiale des espèces bactériennes indigènes, permet de conserver un réservoir d'espèces pouvant émerger lorsque les conditions de fermentation deviennent défavorables aux espèces prédominantes.

L'acide tartrique, présent et consommé uniquement dans les biomasses vitivinicoles, avec une coproduction d'hydrogène comme précédemment montré dans les travaux de François-Lopez (2016). Le tartrate est spécifique du raisin et très peu de bactéries sont capables de le métaboliser. Celles ayant cette capacité sont le plus souvent des bactéries lactiques (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012). Tabachnick et Vaughn, (1948) ont mis en évidence que le tartrate pouvait être consommé par des *Clostridium butyricum*, en le convertissant préférentiellement en acétate, en hydrogène et dioxyde de carbone et en butyrate (41).



Une telle voie est donc empruntée dans notre bioréacteur, maximisant la production de biohydrogène.

### 3.4.3 Fermentation endogène et facteurs de sélection des bactéries

Une analyse de la structure des populations bactériennes a été réalisée et pour la majorité des tests, on note une sélection d'espèces bactériennes à  $t = 24$  h de fermentation, en comparaison

avec les structures des communautés bactériennes analysées sur les biomasses brutes. Les espèces majoritaires analysées sont généralement productrices d'hydrogène. Nous avons relevé l'omniprésence des genres *Clostridium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, mais en quantités variables selon les biomasses.

Pour les bourbes, la production d'hydrogène est associée à la forte présence de deux *taxa* du genre *Clostridium* au début de la phase de production stable d'hydrogène, *C. beijerinckii/diolis* et *C. intestinale*. *C. beijerinckii* est connu pour être producteur d'hydrogène et avoir une production mixte acétate-butyrates (Patakova *et al.*, 2019). *C. diolis* est plutôt associé à la production 1,3-diols (Xin *et al.*, 2016), mais ce métabolite n'a pas été détecté lors de notre étude, laissant supposer que le taxon correspond à *C. beijerinckii*. *C. intestinale* a été décrite comme aéro-tolérante, bien que croissant mieux en conditions anaérobies à 37°C, produisant majoritairement de l'acétate et du butyrates, mais aussi de petites quantités d'acides formique, lactique et succinique (Lee *et al.*, 1990). Pour les levures, la production d'hydrogène est associée à la prévalence de *C. beijerinckii/diolis*. Dans les drèches de microbrasserie, on note la présence de *Clostridium beijerinckii/diolis*, la prévalence d'*Enterobacter sp.* et la part non négligeable d'*Enterococcus sp.* au niveau du plateau de production d'hydrogène. On peut distinguer ces trois biomasses, initialement riches en glucides, par la quantité restante à t = 24 h : beaucoup pour les bourbes, plus rien pour les drèches, dont le métabolisme a évolué. Dans les marcs de raisin, au niveau du plateau de production d'hydrogène, la croissance de *C. beijerinckii/diolis* est moindre et *C. intestinale* n'émerge pas. *C. beijerinckii/diolis* est donc associé au métabolisme acétate-butyrates dans les marcs et *Enterobacter sp.* au métabolisme acétate-éthanol de cette biomasse. Concernant les drèches brassicoles, il n'y a pas de glucides solubles en début de fermentation. D'autres mécanismes sont mis en jeu. A t = 24 h, la production d'hydrogène-acétate-butyrates est expliquée par la présence de *C. beijerinckii/diolis* mais on note aussi beaucoup de lactate, absent du bilan final, associé à la présence de lactobacilles. Cette bactérie était présente avant fermentation en bioréacteur semibatch, ce qui explique sa prévalence à t = 24h.

Les pellicules argentées de café, les levures et les radicules ont en commun une production de propionate, ainsi que la présence de *Clostridium beijerinckii/diolis* et d'*Enterobacter sp.* La production de propionate intervient au moment de la consommation de lactate sauf pour les pellicules argentées. Cela peut être le résultat du métabolisme des bactéries lactiques.

Une des questions posée par cette étude est pourquoi *Clostridium beijerinckii/diolis* n'émerge pas de façon majoritaire pour les tests à partir de marcs de raisin, de pellicules argentées, de drèches et de radicules ? Quels facteurs favorisent l'apparition de *Clostridium beijerinckii/diolis* dans les tests à partir des biomasses 'bourbes' et 'levures' et limitent son développement pour les autres tests ? Sa présence initiale ne semble pas en cause, puisque la population bactérienne initiale des levures est caractérisée par un fort pourcentage de Lactobacilles. Notons que la nature du substrat est différente pour ces deux tests : glucose/fructose pour les bourbes, autres glucides solubles en moindre quantité et lactate pour les

levures. Est-ce que des phénomènes d'inhibition, notamment avec des polyphénols, seraient à l'œuvre pour les tests à partir des autres biomasses ? Le point commun des biomasses marcs de raisin et pellicules argentées peut être la présence de polyphénols (Teles *et al.*, 2019 ; Costa *et al.*, 2017).

On note également qu'*Enterobacter* coexiste avec *Clostridium* sur de nombreuses biomasses, mais *Enterococcus* a potentiellement un effet inhibiteur sur *Clostridium*. En effet, la sécrétion de bactériocines (entérocoques) par *Enterococcus faecalis*, causant l'inhibition de *Clostridium butyricum* a été rapportée (Liu *et al.*, 2011), il est possible qu'un phénomène similaire ait lieu dans notre bioréacteur. Notons également que l'effet inhibiteur via la sécrétion de nisine de *Lactococcus lactis* sur *Clostridium beijerinckii* a également été rapporté (Egan *et al.*, 2016). Dans notre étude, la présence de *Lactococcus (taiwanensis/lactis)* dans les milieux fermentaires des marcs, des pellicules argentées et des radicules d'orge est combinée à des prévalences de *Clostridium (beijerinckii/diolis)* limitées. De plus, notons que le genre *Enterococcus*, bien que non sporulant, est hautement tolérant à la dessiccation et est capable de persister pendant des mois sur des surfaces sèches. Leur métabolisme est varié, elles dégradent notamment la cellulose ce qui a été démontré. Elles produisent du formiate, ce qui peut expliquer la présence initiale de formiate pour les pellicules argentées et les radicules d'orge, chez qui elle est présente initialement en proportions non négligeables (Ramsey *et al.*, 2014). De plus, *Enterococcus* et *Lactococcus* sont présents en proportions plus faibles voire absents dans les tests à t = 24 h de bourbes et de levures et corrélés négativement avec *Clostridium*. Nous pouvons supposer qu'il n'y a donc pas d'inhibition de *Clostridium* pour ces tests.

*L'étude a porté sur l'étude des dynamiques de production d'hydrogène et de métabolites, ainsi que sur la microbiologie de biomasses diverses en termes de natures et de composition ayant des performances de production d'hydrogène variées. Les meilleures productivités sont de loin obtenues pour les bourbes, biomasse la plus riche en monomères glucidiques solubles. Néanmoins, il est possible d'obtenir des productions moyennes d'hydrogène par fermentation endogène à partir de biomasses dont la teneur en glucides solubles est plus faible. Certaines biomasses ne nécessitent aucun prétraitement, pour d'autres, il serait intéressant d'essayer d'extraire de la matière métabolisable pour exploiter au mieux leur potentiel de production. Nous avons ainsi noté qu'il y a plusieurs étapes dans la production d'hydrogène en bioréacteur semibatch, ce qui est cohérent avec des résultats rapportés dans la littérature. Il semblerait que des phénomènes d'inhibition du développement du genre Clostridium aient lieu pour les tests avec certaines biomasses, explicable par plusieurs hypothèses : inhibition par la teneur en polyphénols des biomasses ou par des bactéries lactiques (Enterococcus, Lactococcus). C'est pourquoi, l'étude du prétraitement des biomasses solides est un enjeu clé pour extraire la matière métabolisable pour une mise en œuvre en bioréacteur membranaire.*

## 4 Impact de prétraitements sur la production d'hydrogène par fermentation obscure

Deux principaux objectifs sont liés à l'emploi de prétraitements : la sélection d'un *consortium* bactérien producteur d'hydrogène et l'augmentation de la digestibilité de la biomasse par conversion des glucides complexes en monomères. Pour une production d'énergie, les critères à prendre en compte pour le choix d'un traitement sont : le rendement de saccharification, les coûts énergétique et financier du prétraitement et la libération d'inhibiteurs de fermentation. Dans le cadre de cette étude, des prétraitements mécaniques, thermiques et enzymatiques ont été testés sur différentes biomasses afin d'augmenter la biodisponibilité des glucides et favoriser ainsi la production d'hydrogène.

Notamment, les marcs de raisins sont riches en glucides solubles et également en glucides non fermentescibles (cellulose et hémicelluloses présents dans la paroi des cellules végétales). En effet, une quantité importante de sucres fermentescibles est retenue dans les marcs de raisin après pressage des grappes. Des tests ont également été effectués sur des biomasses comportant une fraction lignocellulosique élevée.

### 4.1 Effet de prétraitements physiques et enzymatiques sur la production d'hydrogène à partir de marcs de raisin

Les marcs de raisin collectés chez un producteur local de vin et stockés à  $-18^{\circ}\text{C}$  ont été testés pour la production de biohydrogène par fermentation obscure. Les marcs décongelés, utilisés en tant qu'*inoculum* et substrat avec une concentration de 7,1% (m/v) ont été mis en œuvre dans un réacteur semibatch. L'effet de différents prétraitements physiques et enzymatiques ont été testés. Dans le cas du traitement enzymatique, une optimisation de différents paramètres d'hydrolyse (rapport de quantité enzymes/marcs, température d'hydrolyse) a été réalisée au préalable.

#### 4.1.1 Optimisation des conditions d'utilisation de la cellulase de *Trichoderma reesei*

Afin d'étudier la faisabilité d'un prétraitement enzymatique, différentes conditions d'utilisation de la cellulase de *Trichoderma reesei* (enzyme commerciale) ont été testées : rapport de quantité enzymes/marcs (0, 10, 30, 50  $\text{mg}_{\text{enzyme}}/\text{g}_{\text{marcs}}$ ), masse de marcs (1, 5 et 10 g) et température d'hydrolyse ( $37^{\circ}\text{C}$  et  $55^{\circ}\text{C}$ ). Les tests ont été réalisés en triplicats. La température de  $55^{\circ}\text{C}$  se situe dans l'intervalle de température optimale d'utilisation de l'enzyme (entre  $50^{\circ}\text{C}$  et  $60^{\circ}\text{C}$ ), mais une hydrolyse à  $37^{\circ}\text{C}$  permettrait en effet de réaliser l'hydrolyse et la fermentation simultanément et de limiter l'apport d'énergie nécessaire au chauffage du réacteur. Lors des différentes expériences d'hydrolyse enzymatique, 2 mL de milieu ont été prélevés à  $t = 1$  h, afin de quantifier la libération des glucides solubles. Des tests courts ont été réalisés afin d'éviter le

développement de bactéries consommatrices du substrat. Les résultats du dosage des glucides solubles totaux (équivalents glucose) rapporté à la masse de marcs introduite, sont présentés sur la figure 70.

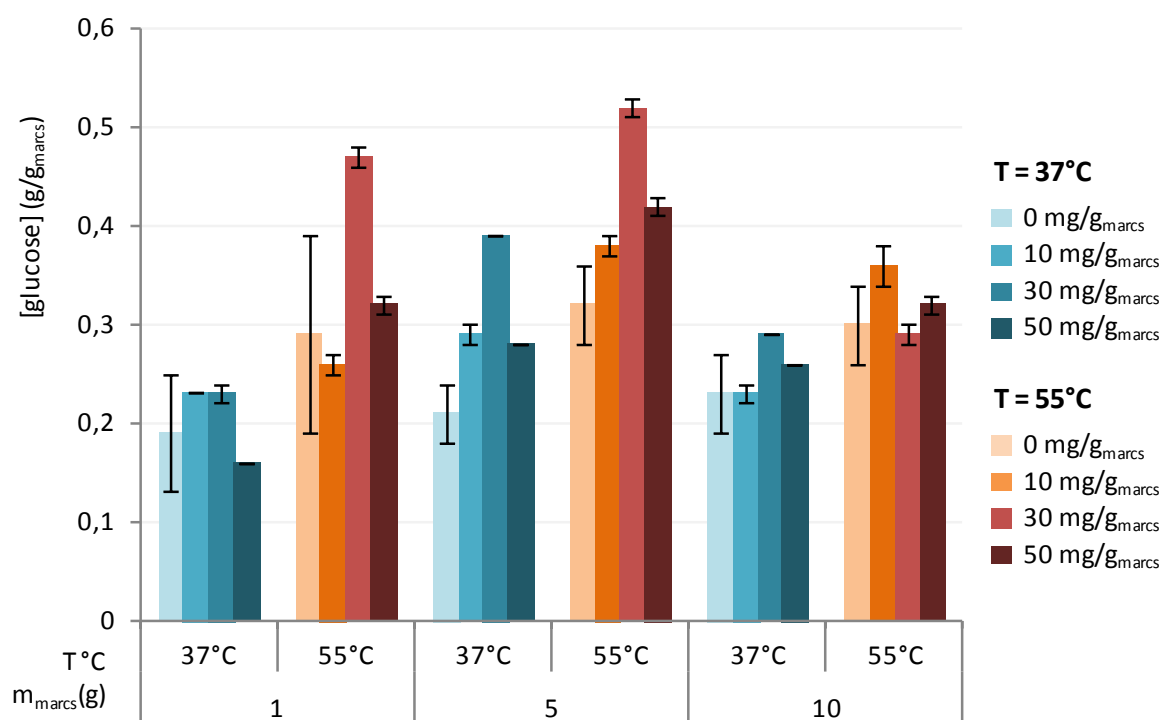


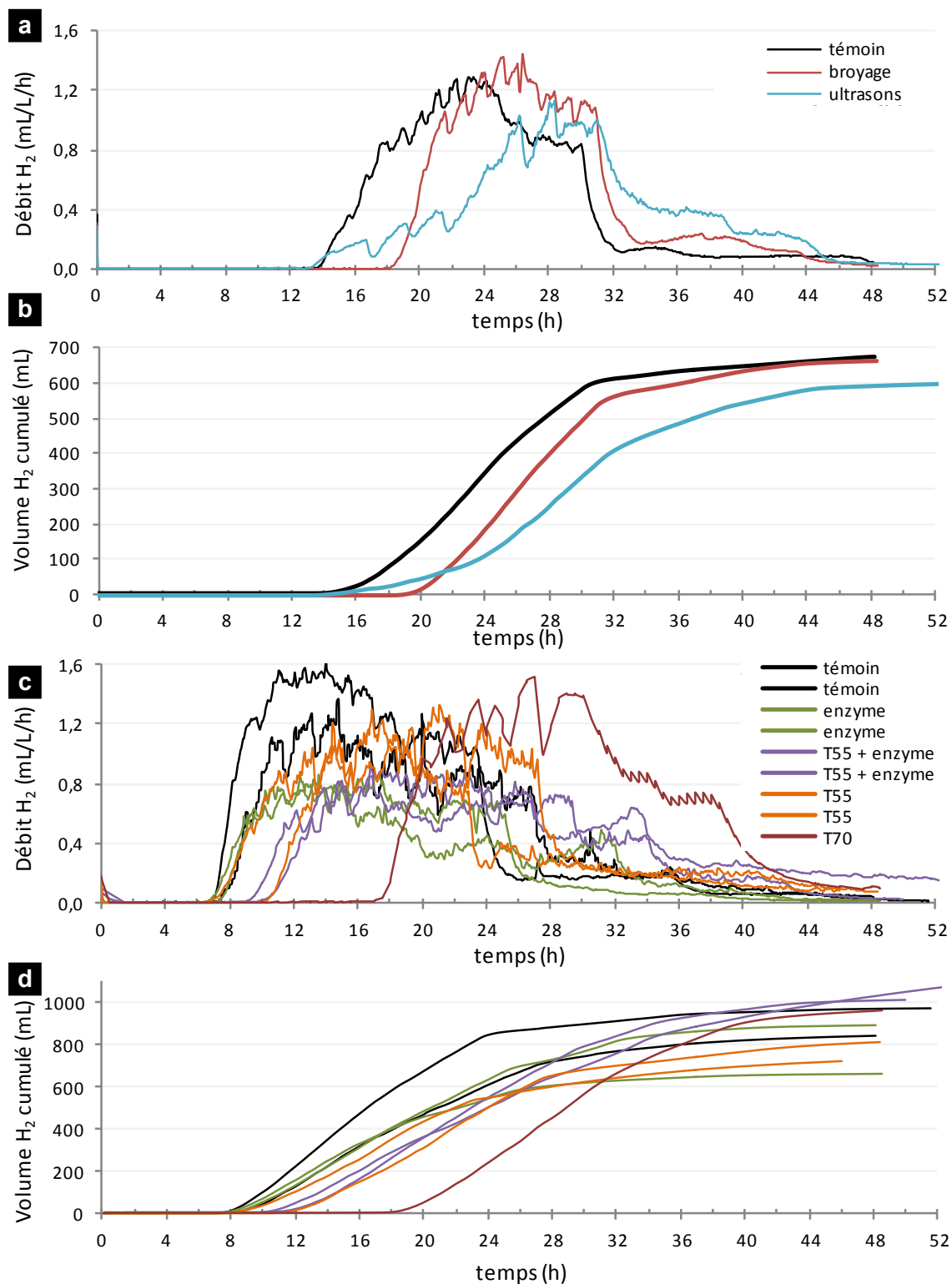
Figure 70 : Concentration en glucides solubles pour différentes conditions d'hydrolyse par la cellulase de *T. reesei* à t=1h des différentes hydrolyses des marcs de raisin

Le meilleur ratio glucose/masse de marcs a été obtenu à 55°C, à partir de 5 g de marcs et 30 mg<sub>enzyme</sub>/g<sub>marcs</sub>. Ces conditions sont aussi optimales pour la libération du glucose à 37°C. Ces conditions ont donc été sélectionnées pour la mise en œuvre dans le bioréacteur.

#### 4.1.2 Effet des prétraitements physiques et enzymatiques sur la production d'hydrogène

Deux campagnes de tests de différents prétraitements ont été menées sur les marcs de raisins récoltés en 2015 et en 2016 : ultrasonication et broyage sur la biomasse récoltée en 2015 ; prétraitements thermiques (55°C et 70°C), traitement enzymatique et fermentation simultanée à 37°C et prétraitements thermique (55°C) et enzymatique combinés (1h) sur la biomasse récoltée en 2016. Pour ces derniers tests, le début de la fermentation correspond à la mise en conditions anaérobies du test, après une heure de prétraitement. La figure 71 présente les profils de débits de production d'hydrogène et les volumes cumulés obtenus.





**Figure 71 : Profils de production de biohydrogène (a) et volumes cumulés (b) des marcs récoltés en 2015 prétraités par broyage et ultrasonication, profils de production de biohydrogène (c) et volumes cumulés (d) des marcs récoltés en 2016 prétraités thermiquement et/ou par voie enzymatique.**

Pour la première série de tests, on note que le temps de latence de production d'hydrogène est allongé avec le broyage (figure 71a). On observe que la production d'hydrogène totale est

identique pour la biomasse broyée par rapport au test de référence alors que la production de la biomasse prétraitée par ultrason est inférieure (figure 71b).

Pour la seconde série de tests, on note que les tests avec un prétraitement thermique augmentent le temps de latence (figure 71c) (à l'exception d'un test avec prétraitement thermique à 55°C (T55)) ; le temps de latence est doublé avec le prétraitement thermique à 70°C. Il n'y a pas de différence pour le temps de latence entre les tests témoins et ceux du traitement enzymatique. Lors de la phase de production d'hydrogène, les débits les plus élevés sont obtenus avec les tests témoins (1,2-1,6 mL/L/min), puis avec les prétraitements à 70°C (1,0-1,4 mL/L/min) et enfin à 55°C (0,8-1,2 mL/L/min). On observe que les débits maximaux sont moins élevés avec le traitement enzymatique seul ou combiné avec un traitement thermique (0,4-0,8 mL/L/min), mais une phase de production plus longue est mise en évidence dans le cas du traitement enzymatique couplé au prétraitement thermique à 55°C. Les volumes cumulés maximaux sont obtenus en combinant traitements enzymatique et thermique (55°C) après 48h de fermentation (figure 71d).

Le tableau 30 présente les résultats de production d'hydrogène selon les différents traitements des marcs réalisés.

**Tableau 30 : Comparaison des productions d'hydrogène des marcs 2015 et 2016 sans prétraitement et avec des prétraitements physiques et enzymatiques**

Biomasses et nombres de tests (n)	Traitement	R <sub>DCO</sub> (mL/g <sub>DCO</sub> )	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (L/kg)	P' <sub>H<sub>2</sub></sub> (L/L/j)	λ (h)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
marcs 2015						
n=3	aucun	37,0 ± 9,4	13,8 ± 3,5	0,8 ± 0,6	11,0 ± 1,7	0,8 ± 0,5
n=1	broyage	36,4	13,2	2,0	21,5	0,7
n=1	ultrasonication	33,1	12,0	1,0	19,0	0,7
marcs 2016						
n=2	aucun	50,6 ± 4,1	18,4 ± 1,5	1,2 ± 0,2	7,6 ± 0,3	0,5 ± 0,0
n=2	T55	37,6 ± 3,7	15,5 ± 1,5	1,6 ± 0,2	12,0 ± 2,8	0,5 ± 0,1
n=2	T55+ enzyme	52,0 ± 4,3	21,5 ± 1,8	1,4 ± 0,6	13,0 ± 0,7	0,6 ± 0,0
n=2	enzyme	37,8 ± 8,0	15,6 ± 3,3	2,3 ± 1,1	14,0 ± 7,1	0,5 ± 0,1
n=1	T70	46,6	19,2	2,2	21,0	0,6

Concernant les marcs de raisin 2015, les différents prétraitements physiques testés, visant à libérer plus de substrat métabolisable, ont peu d'impact et n'améliorent pas la production d'hydrogène ou le rendement DCO (33,1-37,0 mL/g<sub>DCO</sub>). La production d'hydrogène est la plus faible avec l'ultrasonication (-10%), avec une augmentation du débit d'hydrogène produit plus progressive dans le temps. Les rapports molaires H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> avec les prétraitements physiques sont dans la gamme des valeurs obtenues pour les tests de référence. La productivité est doublée avec le broyage.

Concernant les marcs 2016, les différents traitements testés donnent des productions d'hydrogène proches, à l'exception de la combinaison prétraitement thermique à 55°C et traitement enzymatique qui a permis d'obtenir des productions en hydrogène légèrement

supérieures (21,5 L/kg en moyenne). Le prétraitement thermique à 55°C et le traitement enzymatique seul ont mené à une diminution de la production d'hydrogène et à un rendement en DCO identique (38 mL/g<sub>DCO</sub>), inférieur de 26% de celui obtenu sans aucun traitement et de 38% de celui avec un prétraitement thermique à 55°C conjugué au traitement enzymatique. La production d'hydrogène avec prétraitement thermique à 70°C est proche du test de référence.

#### 4.1.3 Discussion

Les prétraitements physiques variés des marcs de raisin testés, visant à libérer plus de substrat métabolisable, ont peu d'effet sur la production d'hydrogène. Les meilleures productions d'hydrogène ( $P_{H_2}$ ) sont quasi similaires aux tests sans prétraitements, suggérant que les prétraitements d'extraction des monomères glucidiques testées ne sont pas efficaces pour la biomasse marcs de raisins.

Les résultats de production observés lors des tests en bioréacteur semibatch mettent en évidence que l'utilisation de l'enzyme à 37°C, dont la teneur a été optimisée au préalable, ne semble pas favoriser la production d'hydrogène. En effet, la concentration en glucides solubles sur les tests préalables mettait en évidence un ratio concentration en glucides/masse de marcs augmenté de 45% au bout d'1h, ce qui aurait pu induire une production d'hydrogène plus importante. Les meilleurs rendements d'hydrolyse enzymatique ont été obtenus à 55°C explicable par une température optimale de fonctionnement de cette enzyme à cette température. Une augmentation significative de la production et du rendement en hydrogène est obtenue (+38%) en comparaison avec le traitement thermique seul.

*Ainsi, plus que les prétraitements physiques, la mise en œuvre d'un traitement enzymatique peut-être prometteuse pour la production d'hydrogène par fermentation obscure, même s'il semble, dans notre cas, que pour les biomasses riches en sucres fermentescibles, le relargage progressif des sucres supplémentaires en cours de fermentation a un impact suffisant comparativement au traitement enzymatique avec l'enzyme commerciale. De plus, le coût financier d'utilisation d'enzymes commerciales et non spécifiques à la biomasse est un verrou à l'utilisation de ce traitement pour la production d'hydrogène énergétique. Ainsi, l'objectif de la prochaine étude est double et consiste à explorer le potentiel de mise en œuvre d'un traitement enzymatique via un cocktail produit à partir de la biomasse, moins coûteux qu'un cocktail commercial et potentiellement plus efficace pour l'hydrolyse de la biomasse (notamment s'il est endogène à celle-ci) et tester ces traitements sur des biomasses lignocellulosiques diversifiées et ayant des teneurs initiales en glucides solubles moins élevées.*

## 4.2 Production et mise en œuvre d'un cocktail enzymatique substrat spécifique.

L'exploitation de l'aptitude des champignons saprophytes à synthétiser et à sécréter des enzymes d'hydrolyse des tissus végétaux est une stratégie prometteuse pour la production de cocktails enzymatiques pour la saccharification de diverses biomasses lignocellulosiques (González-Fernández *et al.*, 2014 ; Farinas *et al.*, 2015). La technique de production d'enzymes la plus répandue est la fermentation en milieu solide (FMS) (Farinas *et al.*, 2015), c'est-à-dire la culture des microorganismes sur des solides humides en absence partielle ou quasi totale d'eau libre. Une stratégie de mise en œuvre de la FMS est la culture d'une souche fongique sur un échantillon de la biomasse à hydrolyser, ce qui va induire la sécrétion d'enzymes hydrolytiques spécifiques à la biomasse, plus adaptées que les cocktails enzymatiques commerciaux (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016). La FMS est réalisée dans des conditions proches de l'habitat naturel des champignons, qui ont la capacité de coloniser des matières solides avec une faible activité de l'eau, et donc adaptées à leur développement (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014). En comparaison avec une fermentation en milieu liquide, la FMS permet d'obtenir des concentrations et des productivités d'enzymes plus élevées avec des techniques et équipements de fermentations plus simples, tout en générant moins d'effluents (Mrudula, 2011 ; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014).

Ainsi, l'objectif de cette étude est de mettre en œuvre dans le bioréacteur semibatch une production d'hydrogène par fermentation obscure simultanée à un traitement par un cocktail enzymatique substrat-spécifique produit par fermentation fongique en milieu solide. Deux catégories de biomasses sont choisis pour tester la production de cocktails enzymatiques : riche en glucides solubles (marcs de raisin) et riche en glucides complexes (radicelles d'orge, les pellicules argentées de café).

Des souches d'*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor sp.*, *Cladosporium sp.* ont été utilisées pour la production des cocktails enzymatiques. *Aspergillus* et *Penicillium* font partie des genres les plus étudiés pour la production d'enzymes pour l'hydrolyse de biomasses lignocellulosiques (de França Passos *et al.*, 2018). Une étude montre que *Cladosporium* et *Penicillium chrysogenum* ont également de bonnes activités enzymatiques (Andersen, *et al.*, 2016). Dans une étude, *Mucor* a été utilisé avec succès pour la saccharification et la fermentation simultanée de biomasse pour la production de bioéthanol (Molaverdi *et al.*, 2019).

Plusieurs souches ont également été isolées à partir d'échantillons de biomasse et cultivées pour récolter des spores. Ainsi, 2 solutions de spores ont été obtenues à partir des souches isolées sur les radicelles d'orge (O2 et O3) et 2 à partir de pellicules argentées de café (C1 et C2). Différentes biomasses vitivinicoles ont également été utilisées pour obtenir des souches : 1 à partir de bourbes (B1), 2 à partir des marcs de raisin (M1 et M2), 1 à partir de raisins contaminés par des moisissures (R+M1) et 3 à partir de gâteau des bourbes (G1, G2 et G3).

Le tableau 31 présente les combinaisons souches/biomasses utilisées pour la production des cocktails enzymatiques. Les solutions de spores obtenues à partir des souches « modèles » (A, P, M et C) ont été utilisées pour ensemercer l'ensemble des biomasses broyées et séchées. Les solutions de spores obtenues à partir des souches isolées à partir des biomasses brutes (B1, M1, M2, G1, G2, G3, R+M1, O2, O3) ont été utilisées pour ensemercer les biomasses à partir desquelles elles ont été isolées et de la même famille, dans le cas des marcs de raisin.

**Tableau 31 : Combinaisons souches fongiques/biomasses testées pour la production de cocktails enzymatiques par fermentation en milieu solide (FMS). Le code « biomasse x solution de spores fongiques » a été utilisé pour nommer les cocktails enzymatiques obtenus.**

Solutions de spores fongiques	Biomasses broyées et séchées			
	marcs de raisin (M)	radicelles d'orge (O)	pellicules argentées de café (C)	kieselguhr (K)
<i>Aspergillus niger</i> (A)	MA	OA	CA	KA
<i>Penicillium chrysogenum</i> (P)	MP	OP	CP	KP
<i>Mucor sp</i> (M)	MM	OM	CM	KM
<i>Cladosporium sp.</i> (C)	MC	OC	CC	KC
B1	MB1	nt	nt	nt
M1	MM1	nt	nt	nt
M2	MM2	nt	nt	nt
G1	MG1	nt	nt	nt
G2	MG2	nt	nt	nt
G3	MG3	nt	nt	nt
R+M1	MR+M1	nt	nt	nt
O2	nt	OO2	nt	nt
O3	nt	OO3	nt	nt
C1	nt	nt	CC1	nt
C2	nt	nt	CC2	nt

\*nt : non testé

Les activités cellulase, arabinoxylanase, xylanase et xyloglucanase ont été analysés. Il a été choisi d'analyser ces activités car elles sont représentatives des enzymes nécessaires pour dégrader les polymères glucidiques (cellulose et hémicellulose) des parois végétales. En effet, la cellulose est le principal constituant des parois des cellules végétales, le xylane est un composant principal des hémicelluloses et est le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant après le xyloglucane. Les xylanes sont des polymères de xylose (Sudesh Kumar Yadav, 2017).

Cette étude propose donc un criblage de différentes combinaisons biomasses/souches fongiques pour la production de cocktails enzymatiques et le *scale-up* de la production des cocktails présentant les activités enzymatiques les plus élevées. La mise en œuvre d'une saccharification et d'une fermentation simultanée en bioréacteur semibatch sera également présentée.

#### 4.2.1 Production des cocktails enzymatiques et analyse des activités enzymatiques

Le tableau 32 présente les résultats de croissance des souches de champignons après 5 jours de culture. Le code suivant est utilisé : croissance très importante du mycélium (+++), croissance intermédiaire (++), croissance faible, peu visible à l'œil nu (+), pas de croissance observable à l'œil nu (-).

**Tableau 32 : Croissance des souches de champignons après 5 jours de culture en FMS**

Solutions de spores fongiques	Biomasses broyées et séchées			
	marcs de raisin (M)	radicelles d'orge (O)	pellicules argentées de café (C)	kieselguhr (K)
<i>Aspergillus niger</i> (A)	+++	+/-	++	++ (en surface)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (P)	+++	+/-	++	++ (en surface)
<i>Mucor sp</i> (M)	+++	+	+++	++ (en surface)
<i>Cladosporium sp.</i> (C)	+++	+/-	++	++ (en surface)
B1	+++	nt	nt	nt
M1	+++	nt	nt	nt
M2	+++	nt	nt	nt
G1	+++	nt	nt	nt
G2	+/-	nt	nt	nt
G3	+++	nt	nt	nt
R+M1	+/-	nt	nt	nt
O2	nt	++	nt	nt
O3	nt	++	-	nt
C1	nt	nt	++	nt
C2	nt	nt	++	nt

\*non testé

Pour les souches modèles (A, P, M, C), la croissance dépend du substrat et est similaire quel que soit la souche pour une biomasse donnée. Les croissances les plus importantes ont été obtenues à partir des cultures sur les marcs de raisin (les plus riches en sucres simples) puis des pellicules argentées de café, pour lesquelles on observe une croissance élevée de *Mucor sp.*. Le développement du champignon sur le kieselguhr a eu lieu en surface du substrat. Concernant les radicelles d'orge, le développement des souches est peu visible, voire invisible pour certains réplicats à l'œil nu.

Pour les souches isolées à partir de biomasses vitivinicoles, le développement sur les marcs de raisin est inégal selon les souches. Une croissance importante des champignons est observée à partir des solutions de spores B1, M1, M2 et G1. Un développement faible voir inexistant pour certains réplicats est observé pour les solutions G2 (aspect levure sur boîte de Pétri) et R+M1. Pour les souches isolées à partir de radicelles d'orge (O2 et O3), le développement est moyen mais cependant, plus important que pour les souches modèles sur cette même biomasse. La

croissance des souches isolées à partir de pellicules argentées de café est moyenne et comparable à la croissance des souches modèles sur cette biomasse.

A l'issue des 5 jours de culture des champignons dans les piluliers, les cocktails enzymatiques ont été récoltés et les activités cellulase, arabinoxylanase, xylanase et xyloglucanase ont été analysées au moyen de substrats modèles chromogènes. La figure 72 présente les activités cumulées des différents cocktails et la répartition des activités enzymatiques analysées.

Le cocktail enzymatique OA (radicelles d'orge + *Aspergillus niger*) présente la plus importante activité enzymatique cumulée ( $76 \pm 18 \Delta\text{DO/h/mL}$ ) (figure 72a), suivi par les cocktails OM (radicelles d'orge + *Mucor sp.*) ( $17 \pm 4 \Delta\text{DO/h/mL}$ ) et CM (pellicules argentées de café + *Mucor sp.*) ( $11 \pm 3 \Delta\text{DO/h/mL}$ ). Les cocktails KA et KM présentent des activités enzymatiques réduites (environ  $3 \Delta\text{DO/h/mL}$ ). Le reste des cocktails présente de faibles activités enzymatiques cumulées, comprises entre 0 et  $2 \Delta\text{DO/h/mL}$ . Les activités enzymatiques des cocktails produits à partir de marcs sont comparativement les plus faibles (maximum  $1 \pm 0 \Delta\text{DO/h/mL}$ ). On note également que pour l'ensemble des substrats, les activités enzymatiques des souches isolées à partir de la biomasse brute sont peu productives pour les activités enzymatiques analysées. Une série de tests a été réalisée sur des marcs de raisin « lavés » (trempés dans de l'eau puis séchés), afin de limiter la croissance de biomasse fongique et stimuler la sécrétion d'enzymes lignocellulosiques, mais ce test a donné des résultats similaires à ceux présentés sur la figure 72 (résultats non présentés).

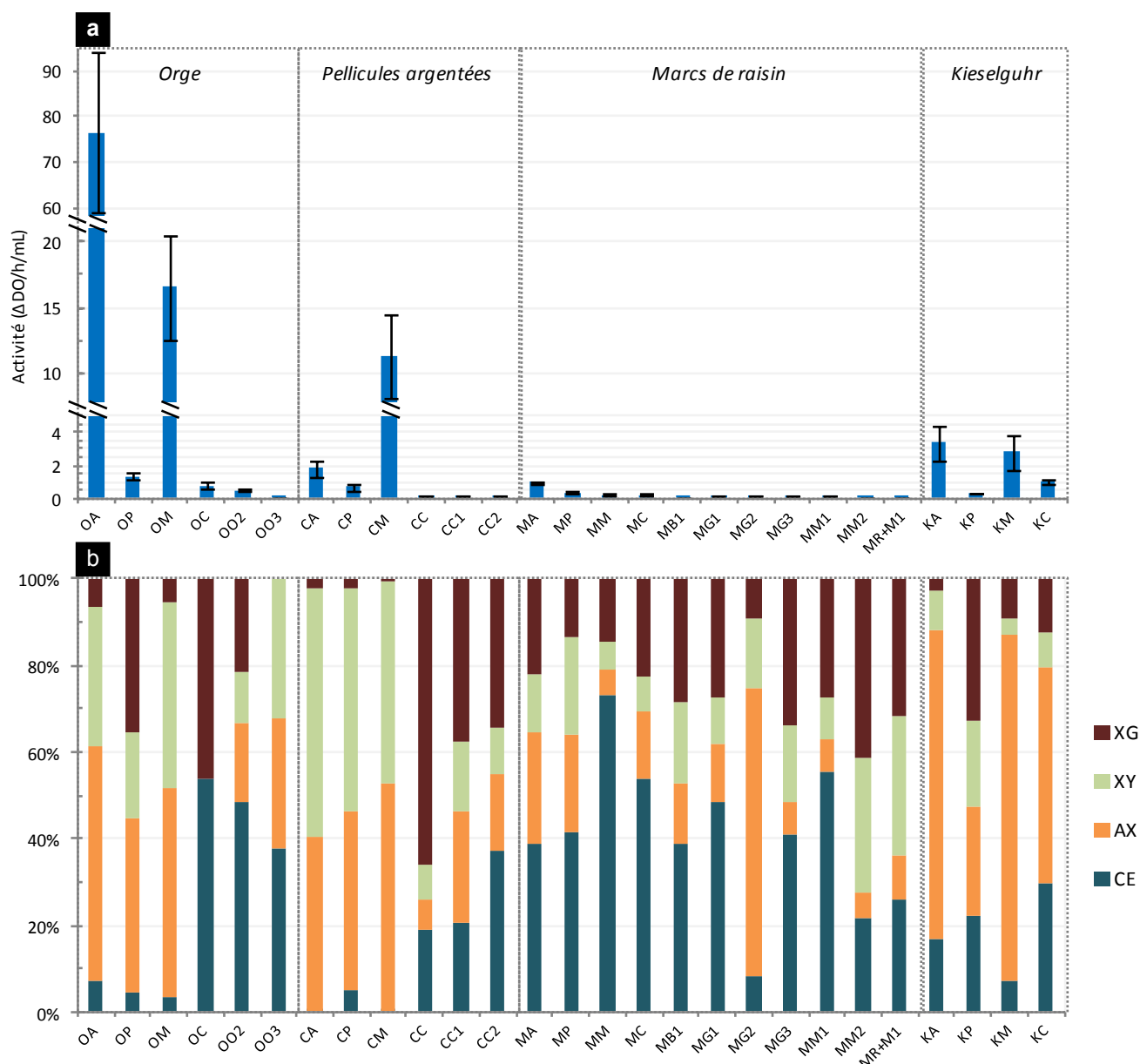


Figure 72 : Activités enzymatiques cumulées (cellulase (CE), arabinoxylanase (AX), xylanase (XY) et xyloglucanase (XG)) (a) et répartition des activités enzymatiques (b) des cocktails crus d'enzymes

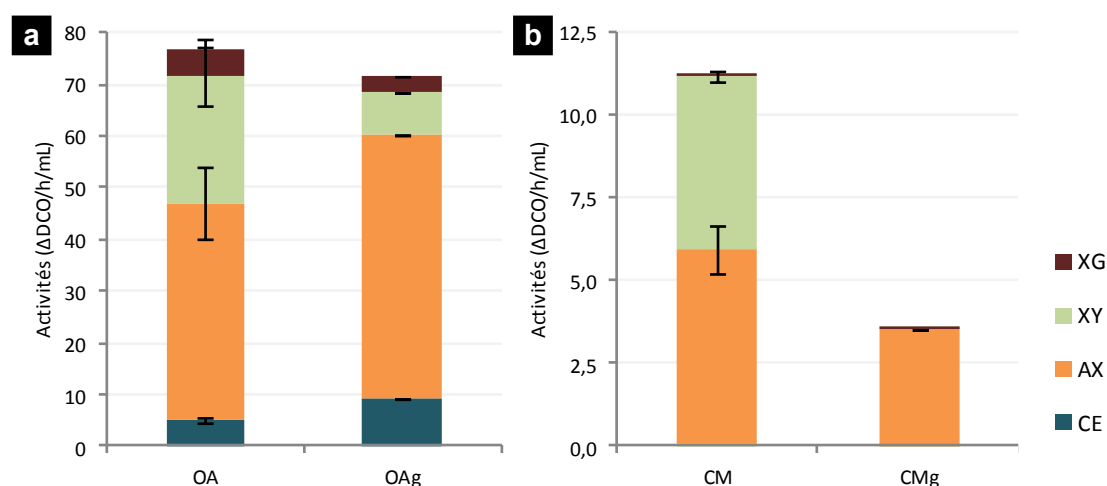
Pour les trois cocktails enzymatiques présentant les activités cumulées les plus élevées (OA, OM et CM), les activités xylanase et arabinoxylanase sont majoritaires (figure 72b). Pour OA et OM, les activités xyloglucanase et cellulase sont également présentes en plus faibles proportions, alors qu'elles sont quasiment absentes pour le cocktail CM. On remarque que pour les cocktails enzymatiques présentant les plus faibles activités, l'activité cellulase est souvent plus présente en proportion (OC, OO2, OO3, CC, CC1, CC2, MB1, MG1, MG3, MM1, MM2, MR+M1), de même que l'activité xyloglucanase, comme observé sur les cocktails OC et CC. Enfin, on remarque que pour le cocktail enzymatique OA, la croissance fongique était une des plus faibles et qu'il s'agit du cocktail présentant les activités enzymatiques cumulées les plus élevées, ce qui montre que la croissance fongique n'est pas forcément corrélée à l'activité des



cocktails enzymatiques produits. Pour les cocktails produits à partir de *Mucor sp.* sur les radicelles d'orge et les pellicules argentées de café (OM et CM), on note que la croissance du champignon était comparativement plus importante que la croissance des autres souches modèles sur ces substrats et ils présentent de plus une forte activité enzymatique.

*Par la suite, un scale-up (x20) a été réalisé pour la production des cocktails sélectionnée OA et CM., dans l'objectif de tester leur performances hydrolytiques sur deux biomasses différentes (radicelles d'orge et pellicules argentées de café) Un scale-up des productions des cocktails sélectionnés (x20) a été réalisé et les activités enzymatiques ont été analysées.*

Les cocktails enzymatiques OA et CM ont été produits à plus grande échelle (x20), la figure 73 compare le cumul des activités moyennes XG, XY, AX et CE des tests à petite échelle (OA, CM) et au cumul des activités des tests à grande échelle (OAg, CMg).



**Figure 73 : Comparaison des productions d'enzyme à petite échelle (OA et CM) et grande échelle (OAg et CMg).**

Les cocktails enzymatiques OA (figure 73a) présentent les activités XG, XY, AX et CE à petite et à grande échelle. Les activités cellulase et arabinosylase ont augmenté avec le scale-up (+74% et + 22% respectivement) et les activités xylanase et xyloglucanase ont diminué (-67% et - 36% respectivement). Le cocktail enzymatique CM à grande échelle diffère du cocktail enzymatique à petite échelle. En effet, l'activité AX reste présente mais diminue de 41% et l'activité XY est quasiment supprimée.

*La suite de l'étude a été réalisée sur le cocktail OAg, pour lequel les activités enzymatiques sur les différents substrats ont été retrouvées suite au scale-up. Pour sa conservation, le cocktail OAg a été lyophilisé.*

#### 4.2.2 Optimisation des conditions d'utilisation du cocktail enzymatique

Deux séries de tests à petite échelle (V=1 mL puis V = 50 mL) ont été réalisés pour déterminer les conditions optimales d'utilisation du cocktail enzymatique OAg. Le critère de

performance utilisé est la concentration de glucose libérée dans le surnageant établie par HPLC-RI.

#### 4.2.2.1 incubation pendant 7h ( $V = 1 \text{ mL}$ )

Des radicelles broyées et séchées ont été incubées avec agitation durant 7h en présence ou non du cocktail enzymatique dans un volume de 1mL d'eau. Plusieurs paramètres ont été testés : masse de biomasse (10 mg/mL et 100 mg/mL), concentration du cocktail enzymatique OAg (10, 30 et 50  $\text{mg}_{\text{enzyme}}/\text{g}_{\text{MS}}$ ) et température (37 et 55°C). La figure 74 présente la quantité de glucose dosée ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{MS}}$ ) après 7h d'incubation en fonction des différentes conditions opératoires.

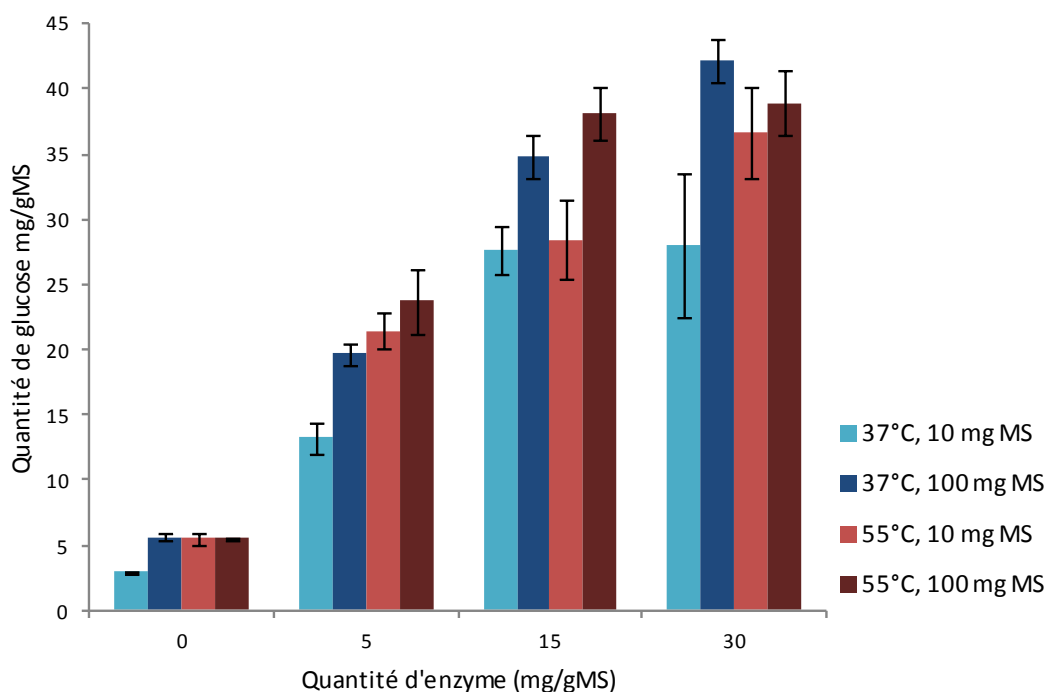


Figure 74 : Quantité de glucose après 7h d'hydrolyse selon différentes conditions de température, de quantité d'enzymes et de masse de radicelles

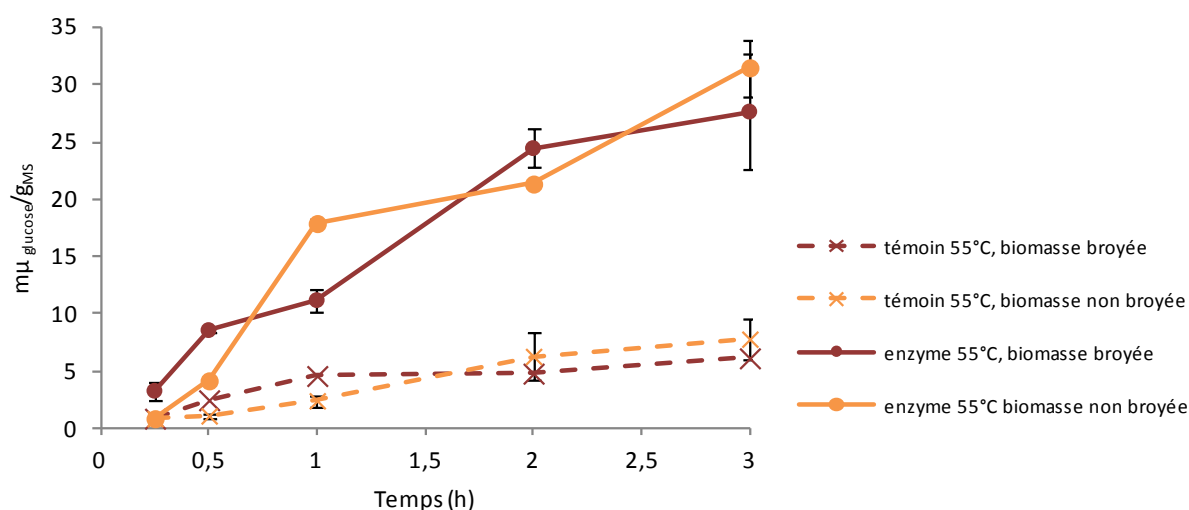
En comparaison avec les expériences témoins (0  $\text{mg}_{\text{enzyme}}/\text{g}_{\text{MS}}$ ), la quantité de glucose est multipliée en moyenne par 4,0, 6,8 et 7,6 selon la quantité de cocktail enzymatique introduite (5, 15 et 30  $\text{mg}_{\text{enzyme}}/\text{g}_{\text{MS}}$ ). L'ajout de trois fois plus de cocktail enzymatique (de 5 à 15  $\text{mg}_{\text{enzyme}}/\text{g}_{\text{MS}}$ ) n'entraîne toutefois pas un triplement de la concentration en glucose dans le milieu et il y a peu de différences concernant la libération du glucose avec l'ajout de 15 et 30  $\text{mg}_{\text{enzyme}}/\text{g}_{\text{MS}}$ . De plus, avec l'augmentation d'un facteur 10 de la quantité de matières sèches ajoutée, les proportions sont relativement conservées, avec un bénéfice légèrement en faveur de la quantité de matières sèches la plus élevée. Enfin, les quantités de glucose obtenues pour 37°C et 55°C sont du même ordre de grandeur.

*Afin d'optimiser la teneur en glucose, sans consommer en quantité trop importante du cocktail enzymatique synthétisé biologiquement, un ratio de 15mg enzyme/g<sub>MS</sub> a été retenu.*

#### 4.2.2.2 Cinétique de libération du glucose pendant 3h d'incubation ( $V = 50 \text{ mL}$ )

Dans cette partie, afin de réaliser les tests dans des conditions proches de la mise en œuvre en bioréacteur semibatch, la biomasse n'a pas été séchée au préalable. Ainsi, cette série d'expériences a été menée dans un volume de 50 mL avec une quantité de radicelles d'orge humides de 3,22 g correspondante à une teneur équivalente en matières sèches de 10 mg<sub>MS</sub>/mL et en présence du cocktail enzymatique (15mg<sub>enzyme</sub>/g<sub>MS</sub>).

L'effet de l'ajout d'un prétraitement physique (broyage) a été testé sur des radicelles humides incubées ou non 3 h en présence du cocktail enzymatique à 55°C. Les cinétiques de production de glucose ont été obtenues par dosage du glucose par HPLC-RI de  $t = 0,25\text{h}$  à  $t = 3\text{h}$ . L'ensemble des tests a été réalisé en triplicats. Les cinétiques de libération du glucose sont présentées sur la figure 75.



**Figure 75 : Effet du traitement enzymatique à 55°C sur des radicelles humides broyées ou non : évolution de la concentration en glucose en fonction du temps**

A l'issue des 3 heures de traitement, la quantité maximale de glucose obtenue par traitement enzymatique à 55°C est proche pour les tests réalisés avec ou sans broyage préalable de la biomasse. Il est à noter que la teneur en glucose ainsi obtenue d'environ 30 mg glucose/g<sub>MS</sub> est équivalente à celle observée sur la série de tests précédents effectués sur la biomasse séchée (28,5 mg glucose/g<sub>MS</sub>).

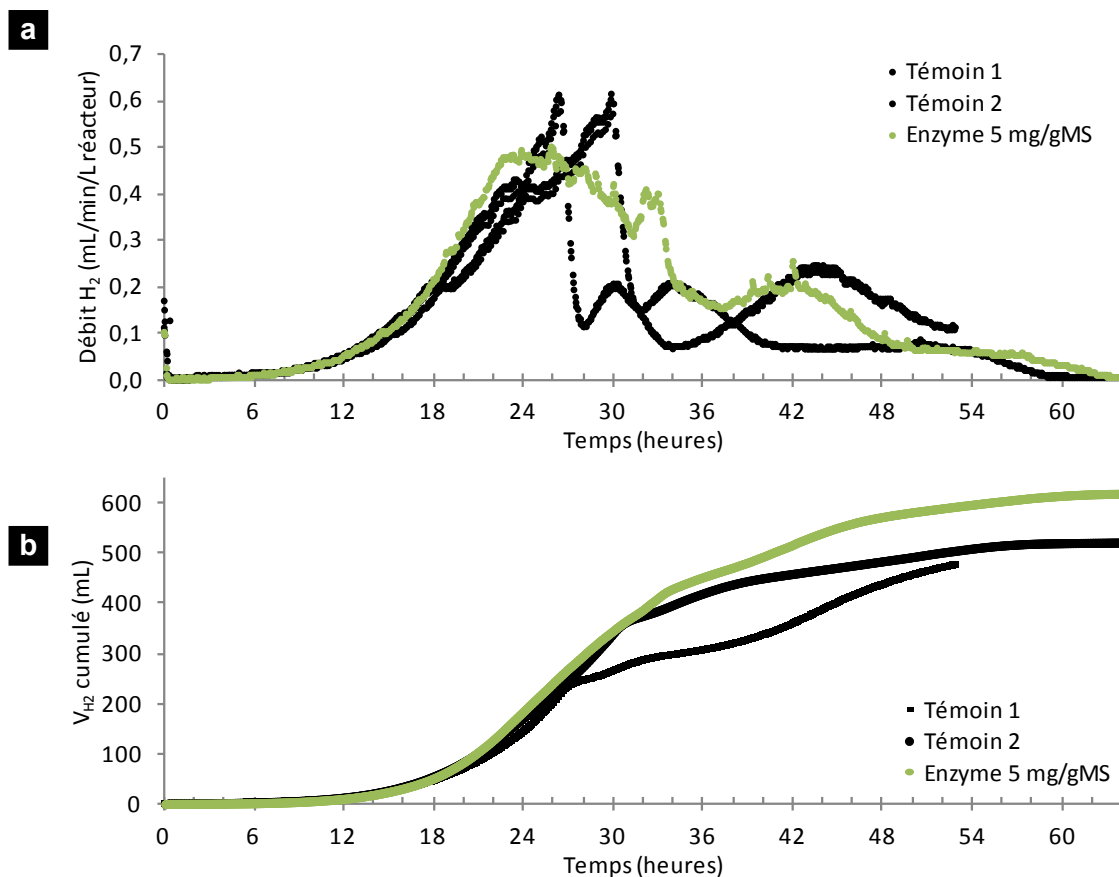
De plus, deux tests complémentaires d'incubation du cocktail enzymatique en présence de seul glucose montrent que la concentration en glucose reste constante sur 4 heures (résultats non présentés), le cocktail n'a donc pas d'effet de dégradation du glucose sur cette durée.

*L'augmentation de la surface de mise en contact de la biomasse avec les enzymes par le traitement physique de broyage n'a pas montré d'efficacité particulière. Ainsi, la*

*mise en œuvre des radicules non broyées a été choisie pour l'étude en réacteur semibatch pour la production d'hydrogène.*

#### 4.2.2.3 Tests de fermentation en semibatch

La production d'hydrogène par fermentation obscure dans le bioréacteur semibatch à partir de radicules humides à 37°C couplée ou non à un traitement enzymatique à 5 mg/g<sub>MS</sub> afin de limiter la consommation du cocktail enzymatique, été testée. Les débits de production d'hydrogène et les volumes de production cumulés des trois tests sont présentés sur la figure 76.



**Figure 76 : Débit de production d'hydrogène (a) et volume d'hydrogène cumulé (b) en bioréacteur semibatch avec ou sans traitement enzymatique simultané**

On note que jusqu'à 18h de fermentation, les profils de production d'hydrogène sont proches (figure 76a) pour les trois tests. Un pic du débit de production d'hydrogène est observé pour les tests témoins à 26 et 30h, suivi d'une chute du débit de production d'hydrogène. Ce phénomène n'est pas présent pour le test réalisé avec ajout du cocktail enzymatique dans le milieu réactionnel, pour lequel le débit de production d'hydrogène atteint un maximum et reste stable de 23 à 33 h. Le volume cumulé en hydrogène produit est supérieur pour le test avec traitement enzymatique simultané dès 30 h de fermentation par rapport aux deux tests témoins (figure 76b). Les performances de production d'hydrogène sont présentées dans le tableau 33.

**Tableau 33: Productions d'hydrogène avec et sans cocktail enzymatique**

Quantité d'enzyme ajoutée (mg <sub>enzyme</sub> /g <sub>MS</sub> )	Production (mL <sub>H<sub>2</sub></sub> /kg <sub>radicelles</sub> )	Productivité (mL <sub>H<sub>2</sub></sub> /L/h)	Rendement (mL/g <sub>DCO</sub> )	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
0	504 ± 38	2,5 ± 0,2	3,0 ± 0,2	0,31 ± 0,02
5	636	3,11	3,8	0,46

Avec l'ajout du cocktail enzymatique, on observe un gain de 26% en production d'hydrogène, ainsi qu'une meilleure capacité de production avec le cocktail enzymatique. Le rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> est également plus élevé, montrant une amélioration du métabolisme bactérien.

#### 4.2.3 Discussion

Dans cette étude, plusieurs cocktails enzymatiques substrat-spécifiques ont été produits dans des conditions non optimisées et un effet de la biomasse a été observé sur la production des cocktails enzymatiques. La production d'enzymes chez les champignons est affectée par plusieurs facteurs environnementaux, pouvant faire l'objet d'une optimisation pour la production des cocktails enzymatiques. La nature des substrats solides, la température, le pH et l'humidité, les sources de carbone et d'azote, les minéraux, la taille des particules, l'aération, le prétraitement de résidus lignocellulosiques et de nombreux auteurs ont étudié les conditions pour améliorer la production d'enzymes (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016).

On observe une corrélation négative entre la croissance des souches fongiques et les activités cellulase, xylanase, xyloglucanase et arabinoxylanase des cocktails enzymatiques récoltés. Ceci peut s'expliquer par le fait que des monomères glucidiques sont accessibles en plus grande quantité dans la biomasse marcs de raisin, riches en glucides solubles, comparativement aux radicelles d'orge. Une autre explication pourrait être que les enzymes sécrétées présentent une activité autre que celle analysée comme par exemple la dégradation de lignines ou de polyphénols, comme observé dans l'étude de Teles *et al.*, 2019. En effet, dans cette étude, lors de tests en présence de marcs de raisin et de son de blé, il a été observé que les enzymes produites avaient une activité d'extraction des composés polyphénoliques.

L'impact hydrolytique du cocktail enzymatique OAg issu de la fermentation fongique en milieu solide de la biomasse correspondant aux radicelles d'orge a ensuite été étudié à différentes échelles. A petite échelle (1 mL), sur la biomasse broyée et séchée, la tendance asymptotique de la quantité de glucose en fonction de la quantité d'enzyme a permis d'obtenir un optimum du ratio entre le cocktail enzymatique et la quantité de radicelle broyée et séchée dont la valeur a été retenue à 15mg/g<sub>MS</sub>. L'étude de la température (37°C et 55°C) a mis en évidence qu'il y avait peu d'incidence sur l'effet hydrolytique. Une seconde mise en échelle (50 mL) a ensuite permis de corrélérer directement les résultats obtenus sur la biomasse broyée et séchée à cette même biomasse humide mais cela exclusivement sur le traitement enzymatique à 55°C. En effet, la quantité de glucose extraite de la biomasse s'élève à environ 30 mg/g<sub>MS</sub>. Par ailleurs, cette montée en volume permet de démontrer que le cocktail enzymatique possède une activité hydrolytique comparable

que la biomasse soit humide (brute) ou séchée et broyée car le ratio enzyme/témoin est similaire aux résultats obtenus à petite échelle (environ 6). De plus, il a été montré que le cocktail enzymatique ne consommait pas le glucose présent dans le milieu à 37°C et 55°C.

Les études de production d'hydrogène par fermentation obscure ont finalement permis, en partie, de confirmer un impact positif de l'ajout d'enzyme, avec un gain de 26% de production d'hydrogène. La production d'hydrogène à partir de déchets alimentaires avec un processus combiné de fermentation en milieu solide et de fermentation obscure a été testée dans l'étude de Han *et al.*, (2016), mais aucun témoin (sans utilisation du cocktail) n'a été réalisé. Une étude mélangeant une portion de rafles et tiges de maïs prétraitées par fermentation fongique à une portion de la même biomasse brute montre l'augmentation de l'activité cellulase couplée à un fort taux d'hydrolyse des composés lignocellulosiques, générant une production d'hydrogène environ 2 fois plus élevée que celle obtenue par fermentation directe des rafles brutes (Cheng et Liu, 2012). Ainsi, l'utilisation d'un cocktail enzymatique substrat-spécifique est une piste prometteuse pour l'amélioration des performances de production d'hydrogène de biomasses riches en carbohydrates complexes et pauvres en glucides solubles.

La problématique de cette étude était d'augmenter la quantité en glucides solubles pour améliorer la production d'hydrogène. L'utilisation d'un cocktail enzymatique produit par fermentation solide permet d'obtenir une augmentation de la production d'hydrogène relative, sans optimisation des paramètres de production ni des conditions de mise en œuvre du cocktail enzymatique. Ainsi, une perspective de ce travail est l'optimisation de ces deux derniers points. De plus, une simplification des étapes de production du cocktail enzymatiques sont à envisager pour une mise en œuvre à l'échelle industrielle. Une autre perspective de ces travaux est l'optimisation de la production du cocktail enzymatique puis le prétraitement enzymatique de la biomasse, afin de produire un extrait riche en glucides solubles, pouvant servir d'alimentation à un bioréacteur continu.

Enfin, la production du cocktail enzymatique en fermentation solide sur la biomasse d'intérêt permet d'envisager une facilité de production et un plus faible coût pour une transposition à plus grande échelle. L'utilisation d'une biomasse non broyée humide permet également d'utiliser la biomasse telle que fourni par l'industriel.

## 5 Conclusion

Ainsi, la fermentation obscure endogène, peut s'appliquer à un panel varié de biomasses issues de différentes filières de production. Les meilleures productivités sont de loin obtenues pour les bourbes, biomasse la plus riche en monomères glucidiques solubles. Néanmoins, il est possible d'obtenir des productions intéressantes d'hydrogène par fermentation endogène à partir de biomasses dont la teneur en glucides solubles est plus faible. Certaines

biomasses ne nécessitent aucun prétraitement, pour d'autres, il serait intéressant d'essayer d'extraire de la matière métabolisable pour exploiter au mieux leur potentiel de production.

L'étude des dynamiques de production d'hydrogène et de métabolites, ainsi que sur la microbiologie de biomasses diverses en termes de natures et de composition ayant des performances de production d'hydrogène variées. Nous avons ainsi noté qu'il y a plusieurs étapes dans la production d'hydrogène en bioréacteur semibatch, ce qui est cohérent avec des résultats rapportés dans la littérature. Il semblerait que des phénomènes d'inhibition du développement du genre *Clostridium* aient lieu pour les tests avec certaines biomasses, explicable par plusieurs hypothèses : inhibition par la teneur en polyphénols des biomasses ou par des bactéries lactiques (*Enterococcus*, *Lactococcus*).

La production et la mise en œuvre d'un cocktail enzymatique substrat spécifique des radicules d'orge a été testée. Une perspective de ces travaux est l'optimisation de la production du cocktail enzymatique puis le prétraitement enzymatique de la biomasse, afin de produire un extrait riche en glucides solubles, pouvant servir d'alimentation à un bioréacteur membranaire en fonctionnement continu.





## Chapitre V

# Mise en œuvre du BRM L/G avec des biomasses vitivinicoles et caféicole

## 1 Introduction

Dans le chapitre III, la robustesse du procédé développé dans la thèse de Clion (2016) a été éprouvée. Il a été montré que les performances de production d'hydrogène en BRM (extraction liquide/gaz) sont stables jusqu'à 1,2 ans après le dernier ensemencement du module membranaire avec un *consortium* bactérien ayant subi au préalable un prétraitement thermique. La faisabilité du procédé sans utiliser de gaz de balayage a également été prouvée. Il a de plus été établi qu'une gamme de TSH entre 2 et 14 h pouvait être appliquée et de DAS entre 0,7 et 2 g/L/h et que la teneur en glucides dans le BRM avait une importance primordiale dans la sélection des espèces bactériennes se développant au sein du module membranaire. Un *optimum* en termes de productivité et de rendement a été obtenu pour une teneur en glucose de 12-14 g/L, ce qui correspond à TSH de 8-10 h et un DAS de 1,4 g/L/h. Suite aux résultats de ces études réalisées avec un substrat modèle (glucose + nutriments), l'objectif principal de ce chapitre est de tester la faisabilité de mise en œuvre du BRM avec des substrats réels. Des valeurs proches des optima de teneurs en glucides obtenues avec le substrat modèle ont été conservées dans un premier temps. De plus, comme la majorité des tests précédents a été réalisée avec l'utilisation d'un gaz de balayage, les tests de ce chapitre seront réalisés dans ces mêmes conditions.

Dans le chapitre IV, il a été montré que des biomasses variées en termes de compositions biochimiques et structurelles peuvent être utilisées pour une production d'hydrogène par fermentation endogène, sans prétraitement visant à inhiber les microorganismes méthanogènes. Des signatures en termes de *consortium* bactérien émergent et de métabolique du milieu réactionnel ont été observées pour ces tests en bioréacteur semibatch avec différentes biomasses. Ainsi, plusieurs biomasses présentant un potentiel de production d'hydrogène élevé ont été identifiées.

Pour la première mise en œuvre du BRM avec une biomasse ayant le double rôle d'*inoculum* et de substrat, notre choix s'est porté sur la biomasse la plus aisément transposable à plus grande échelle : la biomasse bourbes issue de la filière vitivinicole. Les atouts de cette biomasse sont sa teneur élevée en sucres simples (glucose et fructose), le fait qu'elle soit liquide

et la prévalence du genre *Clostridium* et d'un métabolisme butyrate-acétate en cours de fermentation en RASB.

Pour tester la valorisation de différents coproduits de la vigne avec un même dispositif, la biomasse marcs de raisin, ressource en coproduits vitivinicoles la plus élevée en tonnage, sera testée comme substrat du BRM. Néanmoins, la production viticole est saisonnière, il apparaît donc nécessaire d'envisager l'utilisation de biomasses soit produites tout au long de l'année, soit ayant une grande durée de conservation. Pour ces raisons, pour le fait qu'elle ne soit pas valorisée actuellement et pour ses performances élevées de production d'hydrogène en bioréacteur semibatch, la biomasse pellicules argentées de café a également été choisie pour un test de production d'hydrogène en BRM.

Les objectifs de ce chapitre sont donc les suivants :

- tester la faisabilité de mise en œuvre du BRM avec la biomasse bourbes utilisée comme substrat et *inoculum* bactérien, sans prétraitement thermique,
- étudier l'effet de la nature de l'*inoculum* bactérien sur les performances de production d'hydrogène et les signatures bactériennes et métaboliques du BRM, en utilisant un même substrat modèle (glucose+nutriments) pour alimenter les BRM,
- tester la faisabilité de mise en œuvre du BRM avec les biomasses bourbes, marcs de raisin et pellicules d'argent de café, sans réensemencement du module membranaire.

## 2 Ensemencement du module membranaire avec du digestat de fermentation de bourbes viticoles

Une fermentation de bourbes diluées a été initiée en bioréacteur semibatch. A  $t = 24$  h de fermentation, correspondant à l'optimum du débit de production d' $H_2$  et à la présence majoritaire du genre *Clostridium* selon les résultats du chapitre IV, la sortie liquide d'échantillonnage du bioréacteur semibatch a été connectée avec l'entrée liquide du module membranaire. Le milieu liquide (digestat) a ainsi été transféré dans le module membranaire en conditions anaérobies, à l'aide d'une pompe péristaltique.

Puis, la biomasse bourbes, utilisée en tant que substrat, a été diluée (1/25) dans l'eau du réseau de Strasbourg afin d'obtenir une concentration en glucides solubles d'environ 12 g/L, et stockée dans le réservoir d'alimentation à une température de 4°C, afin de limiter le développement microbien. De plus, un balayage à l'azote du réservoir est réalisé afin de désoxygéner le substrat.

Dès la fin du transfert du digestat, l'alimentation liquide en substrat du BRM a été mise en route, ce qui correspond au démarrage du test BRM-EB (« Ensemencement-Bourbes »). Aucun

*inoculum* bactérien supplémentaire n'a été ajouté au cours de ce test et aucun traitement thermique n'a été réalisé. Les paramètres du test BRM-EB sont présentés dans le tableau 34.

**Tableau 34 : Conditions de mise en œuvre du test BRM-EB**

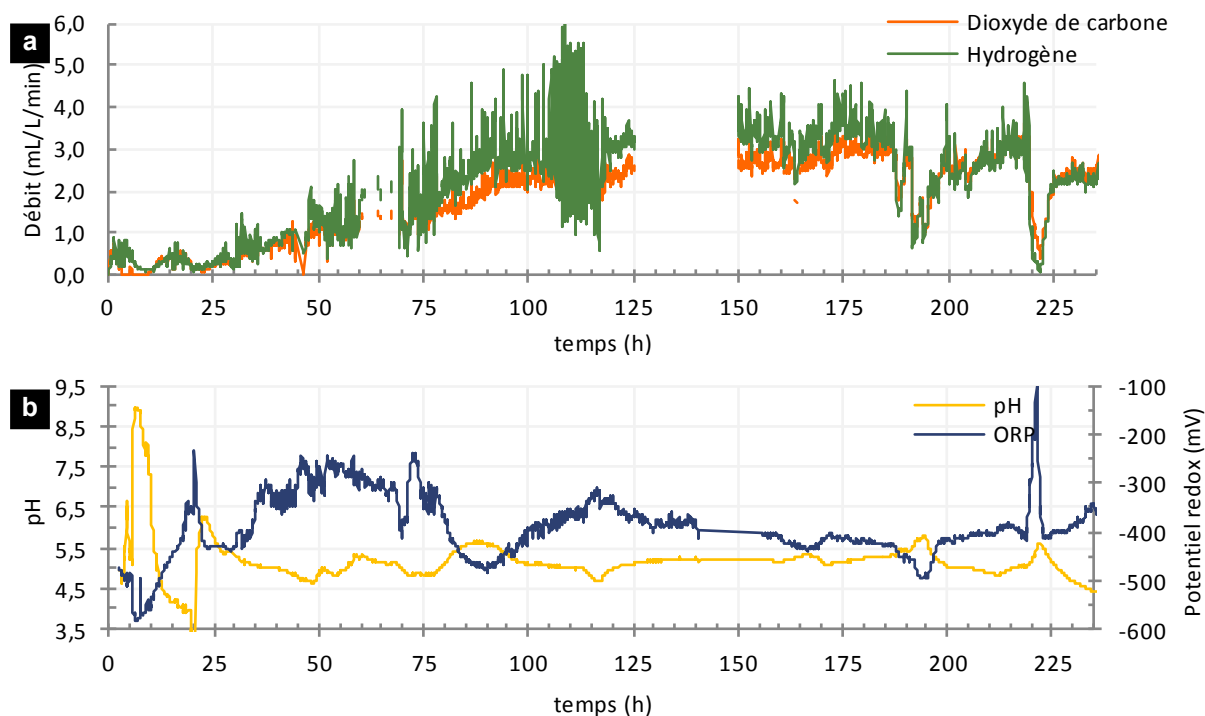
Durée depuis dernier ensemencement (j)	TSH (h)	DAS (g/L/h)	pH moyen	ORP moyen (mV)	Régime pseudo-stable
0	7,7	1,4	5,1	-393	De 96h à 188h

Les conditions de fermentation sont identiques à celles des études présentées dans le chapitre III, permettant de comparer directement le potentiel de production d'hydrogène de cette biomasse en mode de fonctionnement continu avec le BRM fonctionnant avec un substrat modèle.

Les performances de production d'hydrogène seront présentées, ainsi que l'analyse des productivités en métabolites et des communautés bactériennes du milieu réactionnel.

## 2.1 Analyse des gaz

La figure 77a présente le suivi de la production de gaz en sortie des fibres creuses, et la figure 77b l'évolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction au niveau de l'effluent liquide du module membranaire du test BRM-EB.



**Figure 77 : Profils de production de gaz (a), pH et potentiel d'oxydoréduction (b) du test BRM-EB**

Les productivités d'hydrogène et de dioxyde de carbone sont proches et augmentent lentement de  $t = 0$  h à  $t = 120$  h, puis se stabilisent pour atteindre une productivité d'environ 3 mL/L/min jusqu'à  $t = 188$  h. Des variations importantes du débit d'hydrogène sont observées de  $t$

= 100 h à t = 118 h. Les débits de gaz n'ont pas pu être mesurés de t = 124h à t = 152h, mais on peut supposer que les productivités en gaz sont restées stables durant cette période (pas de variations notables du pH ni du potentiel d'oxydoréduction). Une chute brusque des productivités en hydrogène et en dioxyde de carbone est observée de t = 188h à t = 192h, due à la formation d'un bouchon au niveau de l'alimentation en substrat (bourbes) ; celle-ci contenant de la matière en suspension. Ce dysfonctionnement induit des variations du pH et du potentiel d'oxydoréduction relativement faibles. Après débouchage et remise en route de l'alimentation, les productivités en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> remontent jusqu'à t = 216 h, à 3 mL/L/min. Une seconde chute est observée entre t = 219 h et t = 224 h, avec un impact important sur le potentiel d'oxydoréduction. Après débouchage et remise en route de l'alimentation, les productivités réaugmentent, sans atteindre les performances de production obtenues jusqu'alors (2,3 mL/L/h).

Un pic de la valeur pH est observé entre t = 4 h et t = 8 h, avec un maximum à pH = 9, lié à une quantité de soude injectée en trop grande quantité. Ensuite, le pH chute à 3,5 à t = 20 h. A t = 24 h, la valeur du pH est remontée entre 5,0 ± 0,2. Le potentiel d'oxydoréduction est de -500 mV à t = 0 h. Il augmente à -350 mV à t = 30 h pour rester stable jusqu'à t = 72 h et diminuer légèrement de t = 72 h à t = 120 h.

Le tableau 35 présente les performances moyennes de production d'hydrogène du test BRM-EB lors la phase de mise en régime (0-96 h), puis du régime de fonctionnement pseudo-stable (96-188 h).

**Tableau 35 : Performances de production d'hydrogène du test BRM-EB**

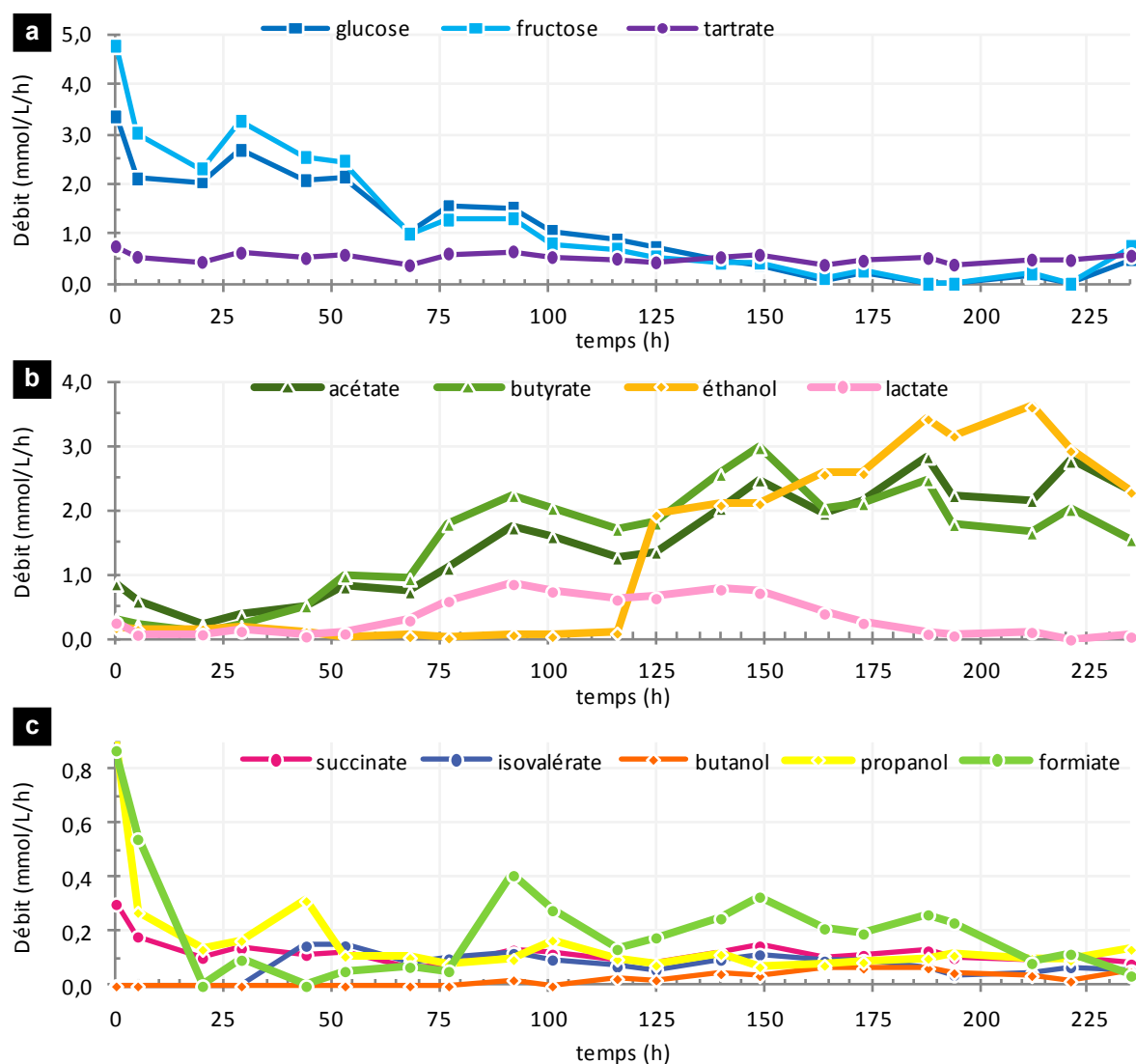
Période	Consommation hexose (%)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol) (Hexose* ajouté)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol) (Hexose* consommé)	R <sub>DCO</sub> (mL/g) (DCO initiale)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
0-96	43,9	0,4	0,9	35,5	70,8	1,3
96-188	98,7	1,3	1,3	94,3	188,7	1,2

\*hexose = glucose+fructose

La consommation en hexoses augmente jusqu'à être quasiment totale lors de la phase de production pseudo-stable. Un rendement de 1,3 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>hexose</sub> et une productivité moyenne de 188,7 mL/L/h sont atteints. Le rapport molaire H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> reste constant et relativement élevé.

## 2.2 Analyse des métabolites

La figure 78a montre le suivi du débit des glucides (glucose et fructose) et du tartrate en sortie du module membranaire. Le tartrate est présent initialement dans la biomasse bourbes. La figure 78b montre le suivi du débit des métabolites majoritaires (>0,4 mmol/L/h pour au moins un temps de prélèvement) et la figure 78c présente le suivi du débit des métabolites minoritaires (<0,4 mmol/L/h).



**Figure 78 : Evolution de la concentration des glucides (glucose et fructose) et de tartrate (a), et des productivités de métabolites majoritaires (b) et minoritaires (c) du test BRM-EB**

Sur la figure 78a, on constate que les débits de glucose et fructose diminuent au cours du temps. La consommation est quasi-totale à  $t = 164$  h. Le débit de tartrate en sortie du module membranaire reste constant, il n'est donc pas consommé dans ces conditions.

Sur la figure 78b, à  $t = 0$  h (heure d'ensemencement du BRM), on observe la présence d'acétate et de butyrate, de formiate et de propanol (environ  $0,8$  mL/L/h), et de façon moindre, de lactate, d'éthanol, et de succinate. Ceci est dû au fait que le digestat du bioréacteur semibatch a été utilisé pour alimenter le module membranaire.

Les métabolites majoritairement produits (figure 78b) sont le butyrate, l'acétate et le lactate et l'éthanol à partir de  $t = 125$  h. La production de lactate diminue à partir de  $t = 148$  h et s'arrête à  $t = 188$  h. Une faible production de formiate est observée à partir de  $t = 92$  h. Les métabolites minoritaires ( $<0,5$  mmol/L/h) (figure 78c) sont le formiate, le succinate, l'isovalérate, le propanol et le butanol. La production de butanol démarre avec la production d'éthanol à  $t = 116$  h, ce qui

montre un transfert métabolique vers les voies de la solvantogénèse. La figure 79 présente un bilan DCO de ce test.

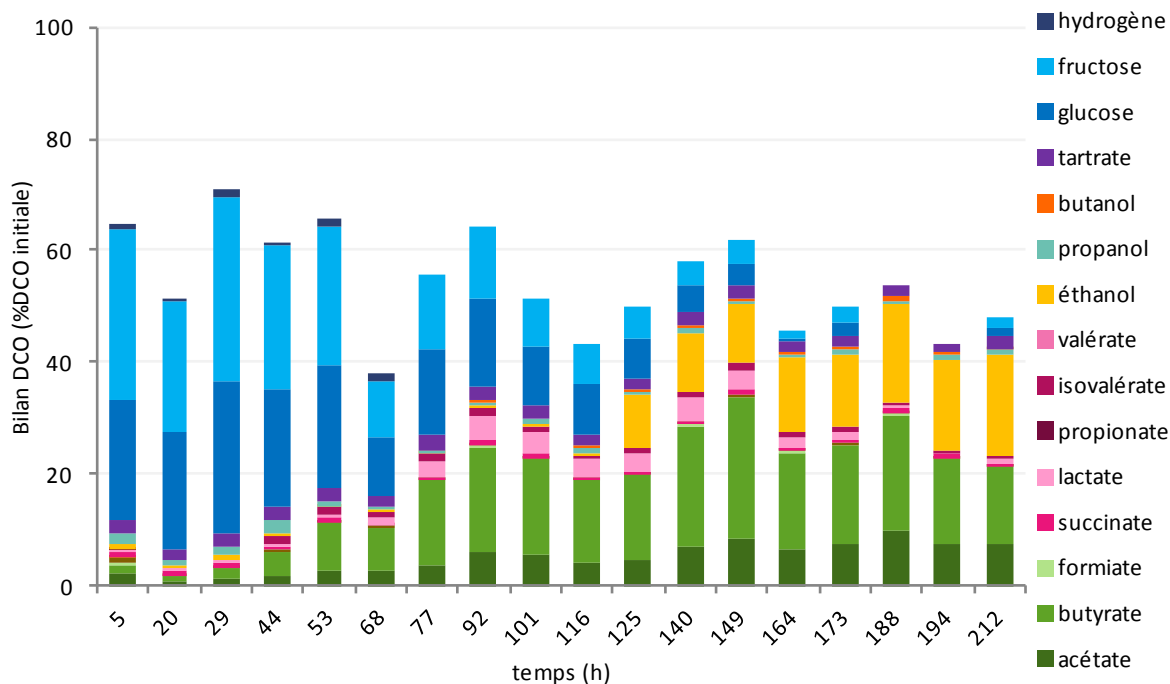


Figure 79 : Bilan DCO du test d'ensemencement module membranaire avec du digestat de bourbes.

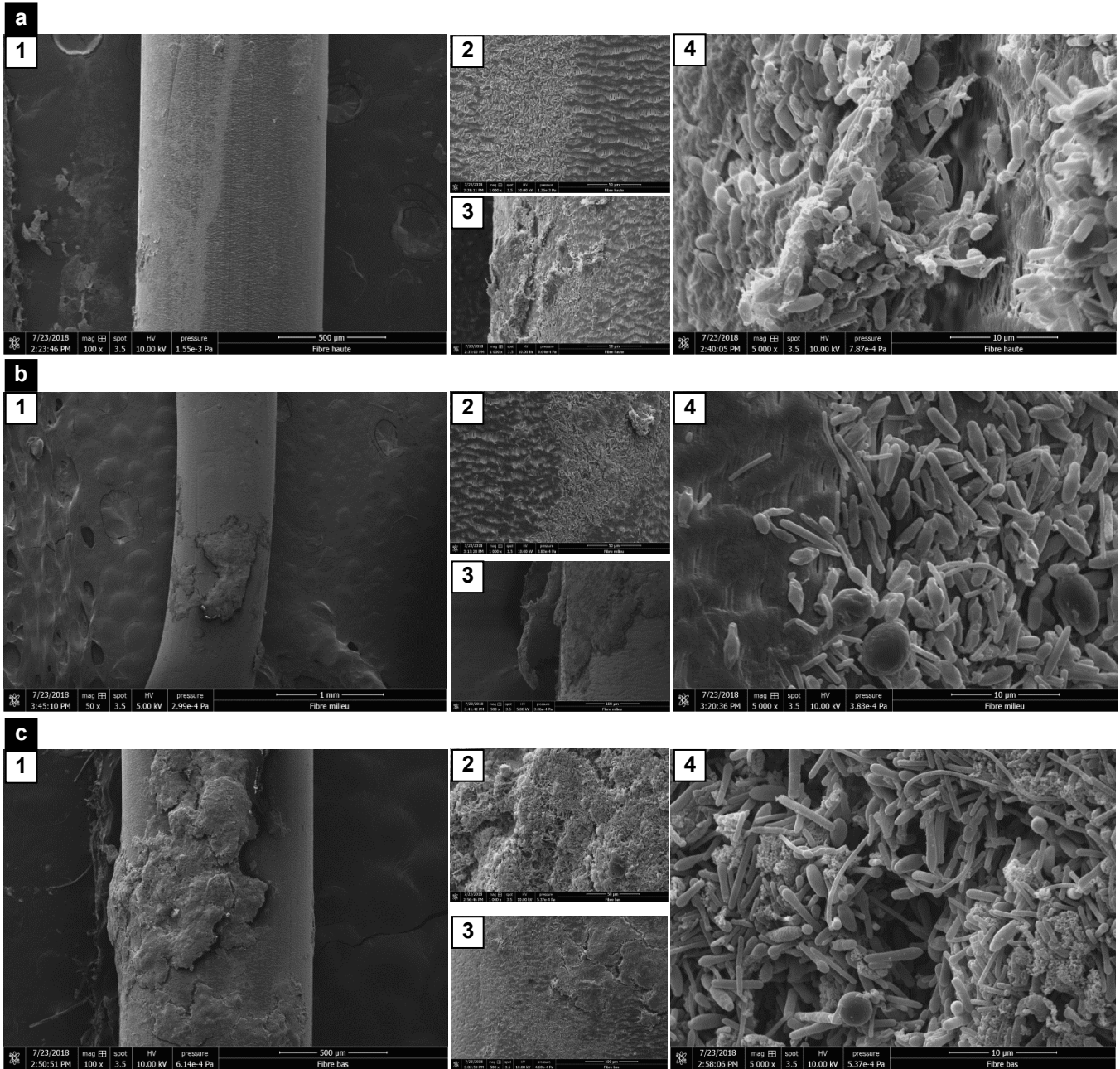
Le bilan DCO est incomplet (entre 40% et 70%). De même qu'expliqué dans le chapitre III, la production de biomasse bactérienne n'est pas mesurée et peut expliquer en partie le fait que le bilan soit incomplet (10% environ, potentiellement un peu plus en phase d'inoculation du BRM). Le reste correspond à des métabolites non analysés. Une autre hypothèse est la transformation d'une partie des glucides au niveau de l'alimentation liquide du module membranaire, qui correspond à l'entrée de NaOH et est une zone dont le pH est plus élevé.

### 2.3 Analyse microbiologique

Des échantillons de l'effluent ont été prélevés à différents temps de fermentation : 92 h correspondant à la première phase de production, 149 h, à la seconde phase et 235 h, à l'arrêt du BRM. De plus, des échantillons de différentes zones du module membranaire (effluent liquide, flocs, surface de la fibre en haut et en bas du module) ont été prélevés à 235 h de fermentation. Après prélèvement de 7 mL d'effluent selon le même protocole qu'usuellement, le module a été vidangé par la sortie liquide basse et les flocs ont été recueillis. La fibre supplémentaire a été coupée au niveau de ses deux extrémités d'emportage et retirée par le haut du module ; elle a ensuite été sectionnée en trois tronçons de 6 cm.

### 2.3.1 Observation MEB

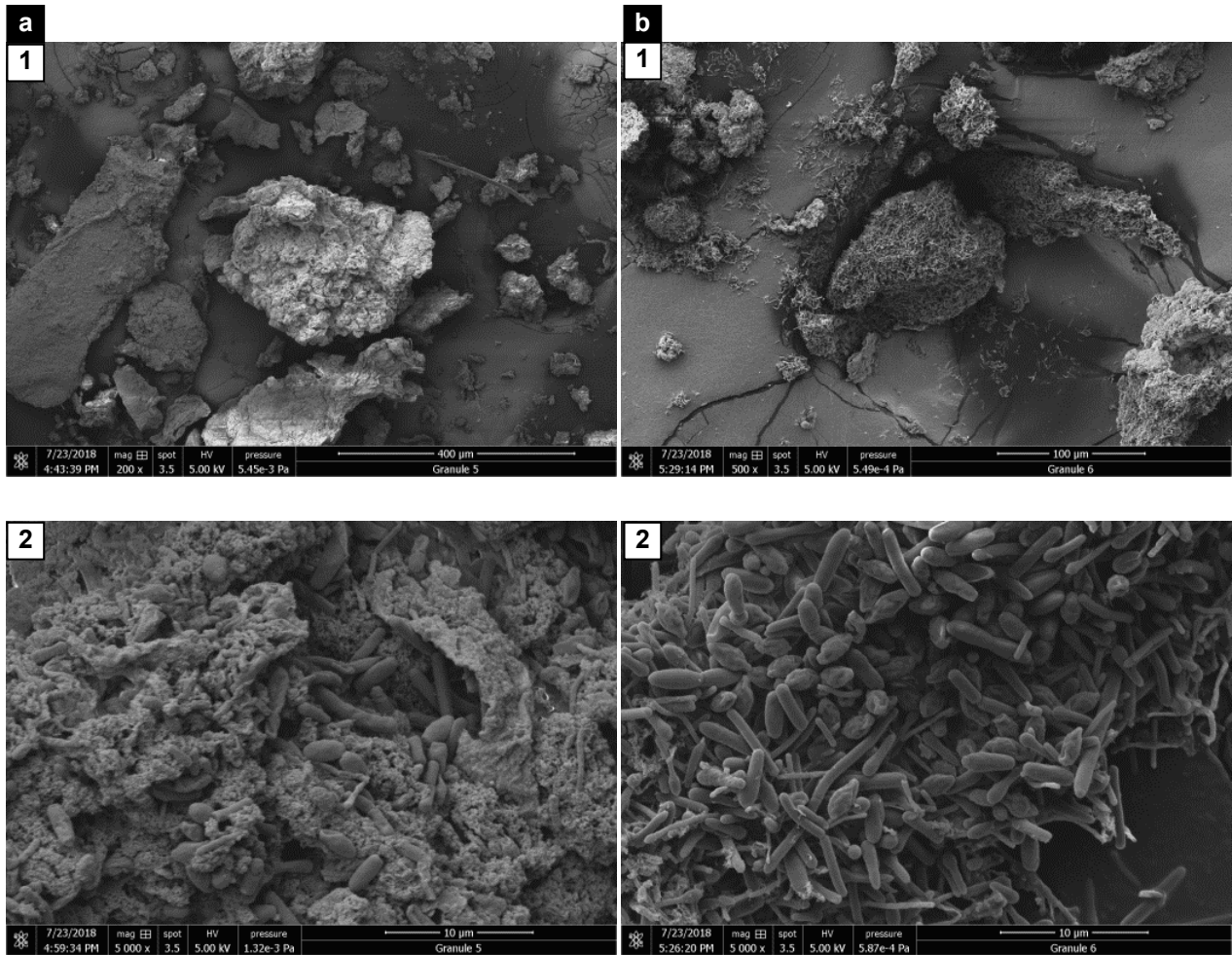
La figure 80 présente des micrographies obtenues au MEB des différentes parties de la fibre (haut (a), milieu (b) et bas de module (c)) extraite du module membranaire à la fin de test BRM-EB, correspondant donc au test d'ensemencement. Pour chaque échantillon, des agrandissements croissants sont présentés.



**Figure 80 : Micrographies MEB de la fibre supplémentaire du test BRM-EB : haut de la fibre (a) : x100 (1), x1000 (2 et 3), x5000 (4) ; milieu de la fibre (b) : x50 (1), x500 (2), x1000 (3), x5000(4) ; bas de la fibre (c) : x100(1), x1000(2), x500(3), x5000(4).**

Sur la partie haute de la fibre (figure 4a), un film bactérien est déposé sur la longueur de la surface extérieure gauche seulement (figure 4a-1). La figure 80a-2 montre un agrandissement de cette séparation. La partie gauche de la surface est occupée par une faible épaisseur de bactéries, contrastant avec une zone exempte de microorganismes, à droite, et sur laquelle on peut apercevoir les pores de la surface de la fibre. De plus, des agrégats sont présents à différentes hauteurs de la fibre, dont la figure 80a-3 présente un agrandissement (x1000). Il s'agit d'un biofilm bactérien, peu épais, se détachant de sa surface. Sur la figure 80a-4, présentant un agrandissement supérieur de la même zone (x5000), on voit qu'il s'agit de différentes morphologies bactériennes (coques et bâtonnets) enchâssées dans une matrice de polymères extracellulaires. La densité de la population bactérienne est largement supérieure sur les parties médianes (figure 80b) et basses (figure 80c) de la fibre. Deux agrégats se décollent de la surface de la fibre, visibles à faible agrandissement (b-1 et c-1). Des grossissements plus importants (b-2, b-3, c-2, c-3) révèlent des zones où le biofilm est multicouche et craquelé en contraste avec d'autres zones peu occupées. Des agrandissements supérieurs (b-4 et c-4) montrent la présence de microorganismes sous forme de bâtonnets, plus ou moins longs, ainsi qu'à quelques endroits des microorganismes de forme sphérique et de tailles plus importantes, correspondant potentiellement à des levures. Ces images confirment donc l'existence d'un biofilm réparti de façon hétérogène le long des fibres du bioréacteur. La figure 81 présente des micrographies MEB de plusieurs flocons, récupérés dans le fond du BRM à la fin du test BRM-EB, d'aspect différents à l'œil nu (noir et compact (a) contre jaunâtre et peu dense (b)). Les structures prélevées se sont légèrement dissociées lorsque placées dans l'agent fixateur, leurs tailles étaient supérieures à celles visibles sur les images MEB obtenues.





**Figure 81 : Micrographies MEB des granules collectés en fin de test BRM-EB : structure compacte (a) 200x (1) et 5000x (2), structure peu dense (b) 500x (1) et 5000x (2)**

La figure 81a-1 montre plusieurs structures compactes (granules noirs à l'œil nu), de différentes tailles, dont les surfaces ont des aspects granuleux. Un agrandissement de la structure au centre de la micrographie (figure 81a-2) révèle la présence de bactéries au sein d'une matrice de polymères extracellulaires présents en proportion très importante. La figure 81b-1 montre plusieurs structures poreuses (granules jaunes à l'œil nu), également de tailles variées. Un agrandissement de la structure au centre de la micrographie (figure 81b-2) révèle la présence d'un nombre important de cellules bactériennes, avec des morphologies très diverses mais le plus souvent en forme de bâtonnet avec peu, voire pas de polymères extracellulaires.

### 2.3.2 Analyse microbiologique par séquençage

L'ADN des culots bactériens des échantillons d'effluent liquide, des flocs et des biofilms de la surface des segments de fibres issues du haut et du bas du module ont été extraits comme décrit précédemment. L'ADN bactérien codant l'ARN 16S a été analysé par séquençage Illumina à haut débit. Le tableau 36 présente la diversité et l'abondance des OTU.

**Tableau 36 : Diversité et richesse des échantillons du test BRM-EB à différents temps de fermentation et localisations dans le module membranaire, analysés par séquençage et qPCR**

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson	Indice de Shannon	ACE	qPCR (copies/ $\mu$ L)
t=96 h – effluent	63	0,20	1,87	67,6	3,78x10 <sup>7</sup>
t=149 h- effluent	49	0,19	2,05	51,1	1,11x10 <sup>7</sup>
t=235 h -effluent	77	0,18	2,12	81,6	1,81x10 <sup>5</sup>
t=235 h -fibre haut	54	0,16	2,17	55,6	na
t=235 h -fibre bas	37	0,15	2,21	38,1	na
t=235 h -fibre floc	57	0,14	2,34	60,3	na

\*non analysé

De t = 96 h à t = 253 h, les indices de Simpson diminuent et les indices de Shannon augmentent. Ceci montre une augmentation de la diversité bactérienne. Cependant, selon, l'indice ACE, la richesse en espèces bactériennes diminue pour augmenter à nouveau. Le nombre d'individus diminue au cours du temps.

Concernant les différentes zones du module membranaire étudiées, selon les indices de Simpson et de Shannon, la diversité est la plus élevée dans les flocs, puis sur les parties basse et haute des fibres, puis sur l'effluent avec cependant une variation faible. Selon l'ACE, la richesse en espèces bactériennes est plus élevée dans l'effluent du module, puis dans le floc et en haut de la fibre qu'en bas de la fibre.

La figure 82 présente la répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux et le tableau 37 les espèces de différents échantillons de fermentation du test d'ensemencement du module membranaire avec du digestat de bourbes.

#### ❖ Evolution du *consortium* bactérien dans l'effluent en fonction du temps

A t = 96 h, le *phylum Firmicutes* est largement majoritaire (90,5%) (figure 82a). Son abondance diminue à t = 149 h (85,7%) puis augmente à t = 235 h (96,0%). Le *phylum Proteobacteria* est également présent à t = 96 h (8,9%), son abondance augmente à 149 h (14,0%) puis chute à 2,4% à 235 h où d'autres *phyla* émergent. Les familles des *Clostridiaceae* et *Sporolactobacillaceae* (famille essentiellement représentée par le genre *Sporolactobacillus*) sont majoritaires dans tous les échantillons (figure 82b). La proportion de la famille *Clostridiceae*, essentiellement représentée par le genre *Clostridium* (figure 82c), reste la plus importante (>45%) au cours du temps, et est nettement majoritaire (74%) à t = 235 h. L'abondance des *Sporolactobacillaceae* est importante (34-35%) et diminue à 235 h (11,6%). L'abondance de la famille des *Enterobacteriaceae* (essentiellement *Enterobacter*) constituant l'essentiel du *phylum*

*Proteobacteria*, suit la même tendance avec une présence marquée (8,7% à 96 h et 13,9% à 149 h) avant de chuter à moins de 2% à 235 h. Les *Ruminococcaceae*, essentiellement représentées par le genre *Ethanoligenens*, sont présentes en proportions faibles à 96 h puis plus élevées à t = 96 h (2%) puis à t = 235 h (6,5%).

De t = 96 h à t = 235 h, *Sporolactobacillus laevolacticus* est le taxon majoritaire (tableau 37) avec une abondance stable de t = 96 h (35,5%), à t = 149 h (33,7%) et en baisse à t = 235 h (11,6%) (tableau 37). *Sporolactobacillus laevolacticus* est un microorganisme homofermentaire convertissant complètement le glucose en lactate. *Sporolactobacillus laevolacticus* a été utilisé dans une étude de production de lactate à partir d'hydrolysats de tourteaux de coton dans un réacteur en configuration fed-batch à 37°C à pH 5,5, permettant de générer jusqu'à 4,1 g/L/h de lactate (Li *et al.*, 2013).

La famille des *Clostridiaceae* est abondante et diversifiée : pas moins de 9 taxa sont présents. L'abondance d'un premier groupe (*A. polyendosporus*, *C. saccharobutyricum*, *C. beijerinckii/diolis*) diminue fortement au cours du temps alors que celle d'un second groupe augmente (*C. kogasensis*, *C. pasteurianum*, *C. punense/huakuii/tunisiense*). *A. polyendosporus* produit de l'énergie par fermentation de glucides, produisant de l'hydrogène et du butyrate, et a la capacité de former des spores endogènes. Cette espèce a été retrouvée dans des granules producteurs d'hydrogène d'un UASB (Jung *et al.*, 2013). Notons enfin l'émergence d'*E. harbinense* au cours du temps (6,5% à t = 235 h).

#### ❖ Commentaire sur les consortia bactériens dans la zone du module membranaire

À t = 235h, le *phylum Firmicutes* est majoritaire, de façon plus importante sur la surface des fibres creuses en haut du module et dans l'effluent (96%) (figure 82a). La composition des flocs et de la surface des fibres creuses en bas du module est similaire avec environ 88% de *Firmicutes* et une part de *Proteobacteria* plus importante (12% contre 3%).

Le *phylum Firmicutes* est plus diversifié sur la fibre et dans les flocs que dans l'effluent au même temps de fermentation. Il est composé des familles *Clostridaceae*, *Ruminococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, et de façon moindre d'*Enterococcaceae* (figure 82b). Les *Clostridiaceae*, représentées majoritairement par *Clostridium* puis *Caloramator* en plus faibles proportions, sont majoritaires dans tous les échantillons (fibres et flocs), mais plus abondantes dans l'effluent (74%) et moins présentes sur la fibre, en bas du module (39%). La composition est similaire dans les flocs et sur la fibre en haut du module (respectivement 48% et 46%). Les familles *Sporolactobacillaceae* et *Ruminococcaceae*, représentées essentiellement par *Sporolactobacillus* et *Ethanoligenens*, représentent 47% des familles en haut et en bas de la fibre avec une majorité de *Ruminococcaceae*. Dans les flocs, ces 2 familles sont présentes en proportion plus faible (35%) et avec une représentation inversée (majorité de *Sporolactobacillaceae*). Dans l'effluent, ces 2 familles ne représentent que 18,5% avec une prédominance des *Sporolactobacillaceae*. Saraphirom et Reungsang (2011) ont rapporté que *Sporolactobacillus*, produit des bactériocines,

qui peuvent avoir un effet négatif sur les bactéries productrices d'hydrogène. Chaque famille est peu diversifiée (figure 82c).

Les profils d'abondance du biofilm présent sur la surface des fibres creuses sont similaires entre le haut et la bas : *Ethanoligenens harbinense* est majoritaire (29,8% et 26,0% respectivement en haut et en bas de la fibre), suivi par *Sporolactobacillus laevolacticus* (17,2% et 18,9%) et *Clostridium pasteurianum* (14,9% et 13,3%) (tableau 37). L'abondance de taxa minoritaires est également comparable, notamment *Clostridium (punense/huakuii/tunisiense)* (12,2% et 9,3%), *Clostridium (beijerinckii/diolis)* (3,4% et 2,5%), *Clostridium saccharobutylicum* (2,5% et 1,4%). Notons qu'*Enterobacter sp.* est 3,4 fois plus abondant en bas du module (11,7%).

L'abondance de *Clostridium pasteurianum* est comparable dans l'effluent et dans les floes (25,7% et 21,0% respectivement), soit 1,5 à 2 fois plus que sur la surface de la fibre. *Clostridium kogasensis* et *Clostridium (punense/huakuii/tunisiense)* sont fortement représentés (18, 8% et 22,4% respectivement) dans l'effluent.

*Sporolactobacillus laevolacticus* est présente dans toutes les zones du module considérées, majoritairement dans les floes (22,5%), puis sur la surface de la fibre (18%) puis dans l'effluent (12%). *Enterobacter sp.* émerge uniquement dans la partie basse du module (11,7% dans les floes et en bas des fibres creuses).

Un ensemble de taxa du phylum *Firmicutes* (*Clostridiaceae* et *Enterococcaceae*) a une présence ubiquitaire et minoritaire (<6%) à t = 235 h dans les floes et sur la surface des fibres creuses : *Anaerobacter polyendosporus*, *Caloramator quimbayensis*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium kogasensis*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium (beijerinckii/diolis)* et *Clostridium (carboxidivorans/drakei)*. Outre les bactéries du genre *Clostridium* et *Anaerobacter polyendosporus*, productrices d'hydrogène, *Caloramator quimbayensis* est une bactérie anaérobie, motile, modérément thermophile, sporulante et fermentant des glucides pour produire essentiellement du formiate, de l'acétate, de l'éthanol et du lactate (Rubiano-Labrador *et al.*, 2013).

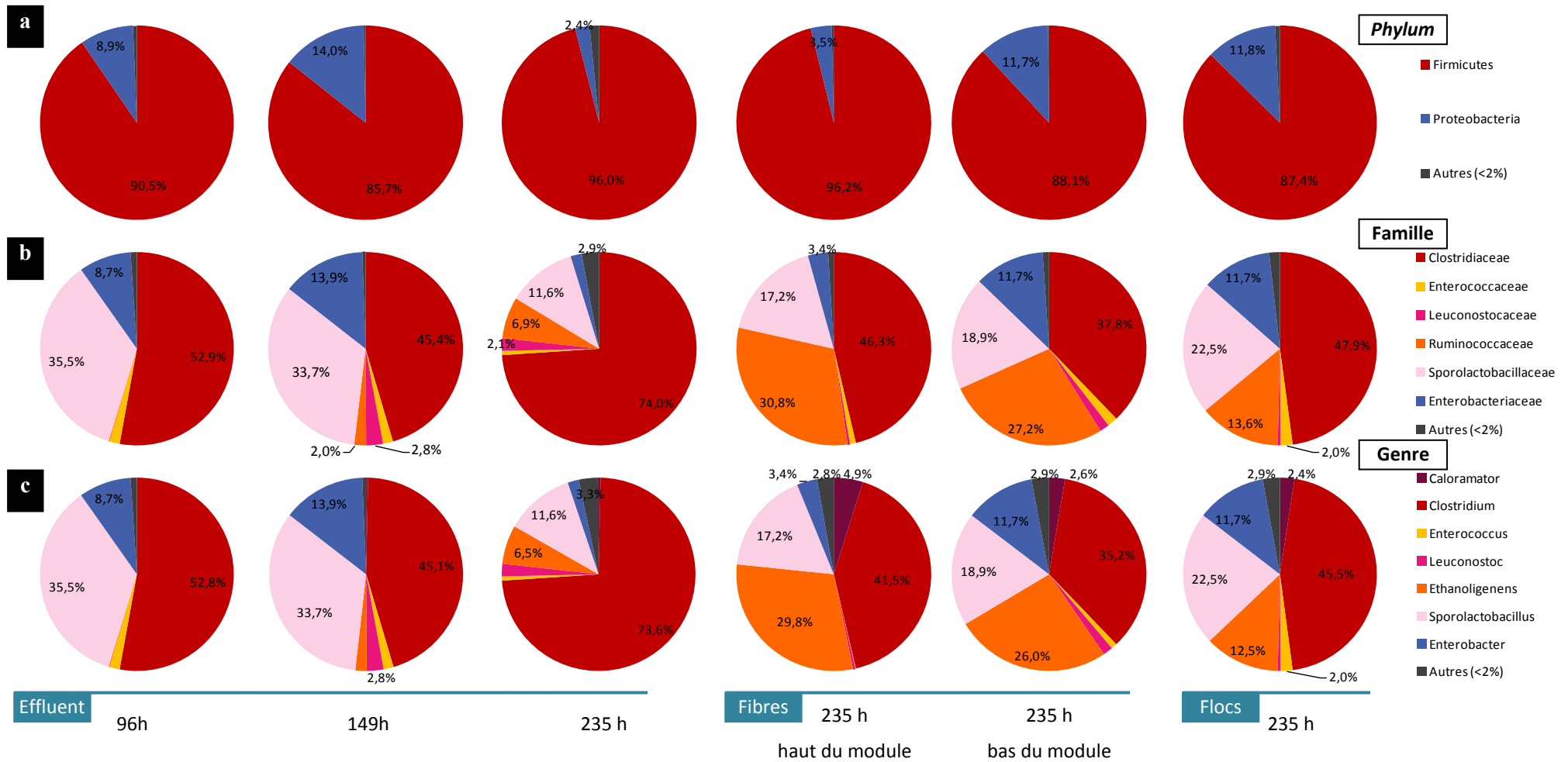


Figure 82 : Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux de différents échantillons de fermentation du test d'ensemencement du module membranaire avec du digestat des bourbes : effluent à différents temps de fermentation (96 h, 149 h et 235 h), surface des fibres en fin de test (bas et haut du module), floc en fin de test - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

**Tableau 37 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons du test de fermentation du BRM ensemencé avec du digestat de fermentation de bourbes**  
**Abondance >1% pour au moins un échantillon**

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° ordre	96h	149h	235 h	Fibre haut	Fibre bas	Floc	
Cyanobacteria	Symphyonemataceae	Loriellopsis	Loriellopsis cavernicola	<97	NR_113122.1	0,5	0,3	1,5	0,3	0,2	0,7	
Firmicutes	Clostridiaceae	Anaerobacter	Anaerobacter polyendosporus	100	NR_026496.1	8,3	3,0	0,5	0,8	0,6	1,6	
		Caloramator	Caloramator quimbayensis	95	NR_109502	<0,1	0,3	0,3	4,9	2,6	2,4	
		Clostridium	Clostridium kogasensis	100		<0,1	6,6	18,8	4,3	5,4	7,5	
		Clostridium	Clostridium intestinale	99	NR_029263.1	1,8	0,3	0,1	0,2	0,1	0,7	
		Clostridium	Clostridium pasteurianum	99	NR_104822.1	13,2	19,0	25,7	14,9	13,3	21,0	
		Clostridium	Clostridium saccharobutylicum	97	NR_122061.1	17,0	6,2	2,3	2,5	1,4	3,2	
		Clostridium	Clostridium (beijerinckii/diolis)	99	/	12,1	7,5	1,0	3,4	2,5	4,7	
		Clostridium	Clostridium (punense/huakuii/tunisiense)	96	/	0,1	0,5	22,4	12,2	9,3	3,0	
		Clostridium	Clostridium (carboxidivorans/drakei)	100	/	0,2	1,2	1,5	2,6	2,2	2,8	
		Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus (hirae/ratti/faecium/mundtii/durans)	100	/	1,7	1,7	0,7	1,0	1,7	2,0
		Leuconostocaceae	Leuconostoc	Leuconostoc pseudomesenteroides	99	NR_109004.1	0,0	2,8	2,1	0,4	1,6	0,5
		Ruminococcaceae	Caproiciproducens	Caproiciproducens galactitolivorans	98	NR_145929.1	0,0	0,1	0,4	1,0	1,1	1,1
Ethanoligenens	Ethanoligenens harbinense		98	NR_074333.1	0,1	1,9	6,5	29,8	26,0	12,5		
Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillus	Sporolactobacillus laevolacticus	99	NR_112769.1	35,5	33,7	11,6	17,2	18,9	22,5		
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter			8,7	13,9	1,8	3,4	11,7	11,7	

## 2.4 Discussion

La production d'hydrogène dans le BRM avec une extraction liquide/gaz à partir de bourbes vitivinicoles a été démontrée. Il s'agit de la première étude, en mode de fonctionnement continu où la biomasse a le rôle double de substrat et d'*inoculum* de bactéries productrices d'hydrogène.

### 2.4.1 Comparaison des performances de production d'hydrogène du BRM L/G et du bioréacteur semibatch

Le tableau 38 propose une comparaison des performances de production d'hydrogène du test BRM-EB aux performances moyennes des tests de fermentation endogène réalisés en bioréacteur semibatch.

**Tableau 38: Comparaison des performances de production d'hydrogène du BRM L/G et du bioréacteur semibatch en utilisant des bourbes comme substrat et *inoculum***

Bioréacteur	pH	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/g) (DCO ajoutée)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mol/mol) (hexoses* ajouté)	Conso. hexoses (%)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
BRM-EB	4,9-5,4	189 ± 44	94 ± 22	1,3 ± 0,3	98,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Semibatch	>5,8	80 ± 30*	283 ± 56*	2,1 ± 0,3*	95,9 ± 0,5*	1,0 ± 0,1*

\*moyenne de l'ensemble des tests de fermentation de bourbes en bioréacteur semibatch

La productivité est plus de deux fois supérieure pour le test BRM-EB, en comparaison avec la moyenne des tests réalisés en semibatch. Le rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> est aussi amélioré. Toutefois, les rendements en hydrogène par quantité initiale de DCO et d'hexoses ajoutés sont plus faibles en BRM, malgré une consommation en hexose tout aussi élevée.

Ceci peut être expliqué par une part d'éthanol produite supérieure dans le BRM par rapport au semibatch en terme de rendement en hydrogène. Notons aussi que dans le BRM, le tartrate n'est pas consommé. Ce substrat complémentaire peut aussi expliquer en partie les meilleurs rendements observés en semibatch. Le fait que plus d'éthanol soit produit en BRM peut être lié au développement d'*Ethanoligenens harbinense* dans l'effluent et d'*Enterobacter* sur le biofilm.

Du lactate et du formiate sont également produits dans les deux réacteurs de façon minoritaire. La part de lactate est supérieure dans le BRM, ce qui peut être lié au développement de *Sporolactobacillus* dans le biofilm du module membranaire (floc et surface des fibres). Saraphirom et Reungsang (2011) ont rapporté que *Sporolactobacillus*, produit des bactériocines, qui peuvent avoir un effet négatif sur les bactéries productrices d'hydrogène. A partir de t = 190 h, on note que le lactate est consommé, ce qui coïncide avec un arrêt de l'alimentation liquide (colmatage du tube d'alimentation). Cet épisode de colmatage correspond à une augmentation du TSH, à une baisse de la proportion de *Sporolactobacillus*, potentiellement liée à une inhibition par l'augmentation de la concentration en lactate, et à une augmentation des proportions des *taxa* du genre *Clostridium*, consommant éventuellement le lactate.

Dans les deux configurations, on note un changement du métabolisme du milieu fermentaire, à  $t = 153-164$  h en BRM et  $t = 60-72$  h en bioréacteur semibatch, correspondant à l'atteinte d'une consommation quasi-totale des glucides. En effet, dans le BRM, la production de butyrate reste supérieure à la production d'acétate jusqu'à  $t = 164$  h, la productivité en butyrate baisse ensuite. Dans la configuration semibatch, la production en acétate est supérieure à celle du butyrate et s'inverse entre  $t = 60$  et  $72$  h. Dans le BRM-B, la productivité en lactate commence à diminuer entre  $t = 153$  h et  $t = 164$  h. Dans le semibatch, cette baisse a lieu entre  $t = 48$  h et  $t = 57$  h et est accompagné d'une baisse de concentration en succinate, en isovalérate et en formiate, ce qui n'est pas observé dans le BRM. On peut donc supposer que le lactate est consommé, pour potentiellement produire de l'hydrogène. L'étude de Ziara *et al.*, 2019 rapporte notamment la production d'hydrogène par fermentation obscure à partir d'eaux résiduelles d'industrie de production animale, riches en lactate, avec un rendement maximal de  $0,85 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{lactate}}$ , dans des conditions proches notamment en température de notre étude ( $T = 35-45^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5-8,5$ ). Toutefois, dans notre étude, on note également une baisse de la quantité de *Sporolactobacillus* de  $t = 149$ h à  $t = 235$  h. Ainsi, à partir de  $t = 153-163$  h, le BRM a un comportement proche de celui d'un bioréacteur sans alimentation continue, ce qui laisse penser que la capacité de production du BRM pourrait être améliorée avec un apport en substrat augmenté à partir de cette période.

Notons de plus que la configuration continue a pour avantage de nécessiter des opérations de montage/démontage du bioréacteur moins fréquentes que la configuration en semibatch.

#### 2.4.2 Comparaison avec d'autres études en BRM

A ce jour, peu d'études de production d'hydrogène par fermentation obscure avec un substrat réel ont été réalisées en BRM continu et portent sur la valorisation d'effluents de production de tofu (Kim *et al.*, 2011), de déchets alimentaires (Lee *et al.*, 2014) et de paille de blé (Trad *et al.*, 2015). Le tableau 39 propose une comparaison des performances de production de notre étude et de ces tests.

**Tableau 39 : Exemples de systèmes de production intégrant des membranes avec des biomasses réelles**

Configuration membrane	Objectifs	Source de carbone	T°C	DAS (g/L/h)	TSH (h)	R <sub>H2</sub> (mol/mol) (glucides aj.)	P <sub>H2</sub> (L/L/j)	Réf.
FC, PTFE	Extraire l'H <sub>2</sub> in situ	Bourbes diluées	37	1,4 g <sub>glucides</sub> /L/h 2,0 g <sub>DCCO</sub> /L/h	8,0	1,3	4,5	Notre étude
FC, nd* immergée	Augmenter le TSS** des substrats et les BPH***	Effluents de production de tofu	60	0,9-3,6 g <sub>glucides</sub> /L/h 3,3-13,3 g <sub>DCCO</sub> /L/h	2,0-8,0	1,0-1,9	8,1-19,9	Kim <i>et al.</i> , 2011
Plane, PE immergée	Augmenter le des TSS** des substrats et les BPH***	Déchets alimentaires	55	1,0-1,7 g <sub>glucides</sub> /L/h 2,9-5,2 g <sub>DCCO</sub> /L/h	10,5-18,7	1,2-2,2	3,4-10,7	Lee <i>et al.</i> , 2014
Fibres creuses PVDF externe	Extraire les acides gras volatils	Paille de blé + nutriments	35	-	-	-	0,20-0,25L/g <sub>substrat</sub> /j	Trad <i>et al.</i> , 2015

\*nd = non disponible

\*\*Temps de Séjour des Solides

\*\*\*Bactéries Productrices d'Hydrogène



Notre étude est la seule dans laquelle le BRM est utilisé dans une configuration d'extraction liquide/gaz. En effet, dans la littérature, les modules membranaires sont utilisés de façon immergée dans un objectif de concentrer la biomasse bactérienne (configuration solide/liquide) ou placés de façon externe au bioréacteur pour extraire efficacement les acides gras volatils produits en cours de fermentation (configuration liquide/liquide). Dans notre étude, les rendements en hydrogène atteints se situent dans la même fourchette que les rendements obtenus avec des BRM S/L fonctionnant avec une augmentation du TSS (Kim *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014). Après optimisation, les auteurs de ces études parviennent à des augmentations substantielles du rendement de production en hydrogène. Les meilleurs rendements sont obtenus pour un TSH de 8 h et un DAS de 5,4 g<sub>DCO</sub>/L/h (2,3 g<sub>glucides</sub>/L/h) (Kim *et al.*, 2011) et un TSH de 10,5 h et un DAS de 5,2 g<sub>DCO</sub>/L/h (1,7 g<sub>glucides</sub>/L/h), soit des conditions de TSH comparables à celles de notre étude et de DAS supérieures, avec une teneur plus importante en hexoses dans la littérature. De plus, la concentration microbienne étant supérieure dans les BRM S/L, la dégradation du substrat et la consommation des acides gras organiques pouvant mener à la production d'hydrogène est améliorée.

Lors du test BRM-EB, nous avons noté un transfert des voies métaboliques vers la solvantogénèse, pouvant justifier en partie le rendement de production en hydrogène inférieur. Hormis pour l'étude de Trad *et al.* (2015), des productivités plus faibles sont atteintes, en comparaison avec les systèmes d'augmentation du TSS, liées à un débit d'alimentation en substrat (DAS) plus faible pour notre étude. En effet, les maxima de productivités pour les études de Kim *et al.* (2011) et de Lee *et al.* (2014) ont été obtenus avec les DAS les plus élevés. Néanmoins, nous avons observé en croisant les résultats de l'analyse MEB et le séquençage des floccs collectés dans le bioréacteur en fin de test qu'il s'agit de granules microbiens producteurs d'hydrogène.

L'utilisation de membranes de séparation S/L ou L/L entraîne une consommation énergétique supplémentaire, du fait d'un rétrolavage (Kim *et al.*, 2011 ; Trad *et al.*, 2015) ou de l'utilisation d'une pompe à vide (Lee *et al.*, 2014) pour limiter le colmatage de la membrane. L'intérêt de cette configuration est de permettre un fonctionnement à faible TSH (2h) (Kim *et al.*, 2011). Cependant, le colmatage de la membrane limite le fonctionnement en régime stable du BRM avec un DAS très élevé, ou un nombre élevé de particules solides (floccs bactériens ou matières en suspension) (Lee *et al.*, 2014). En outre, la configuration en BRM L/G permet également un fonctionnement à faible TSH (2h) (*cf.* §III.5).

Une perspective de notre étude pourrait donc être de favoriser la formation de tels granules, augmentant ainsi substantiellement la concentration en microorganismes producteurs d'hydrogène sans risque de lessivage, ni nécessité de mise en œuvre d'une membrane S/L. Le DAS pourra ainsi être augmenté afin de s'approcher un peu plus des teneurs en substrat utilisées dans la littérature.

Enfin, dans notre étude, des performances comparables aux autres tests ont été obtenues avec une culture mixte sans prétraitement thermique de l'*inoculum*, au contraire des études de Trad *et al.*, 2015 et de Kim *et al.*, 2011 (*inocula* ayant subi un prétraitement thermique). Le *consortium* de l'étude

de Lee *et al.* (2014) a été prélevé dans un CSTR fonctionnement depuis plus de deux ans, alors que notre test génère de l'hydrogène dès la phase d'ensemencement avec un temps de mise en régime court.

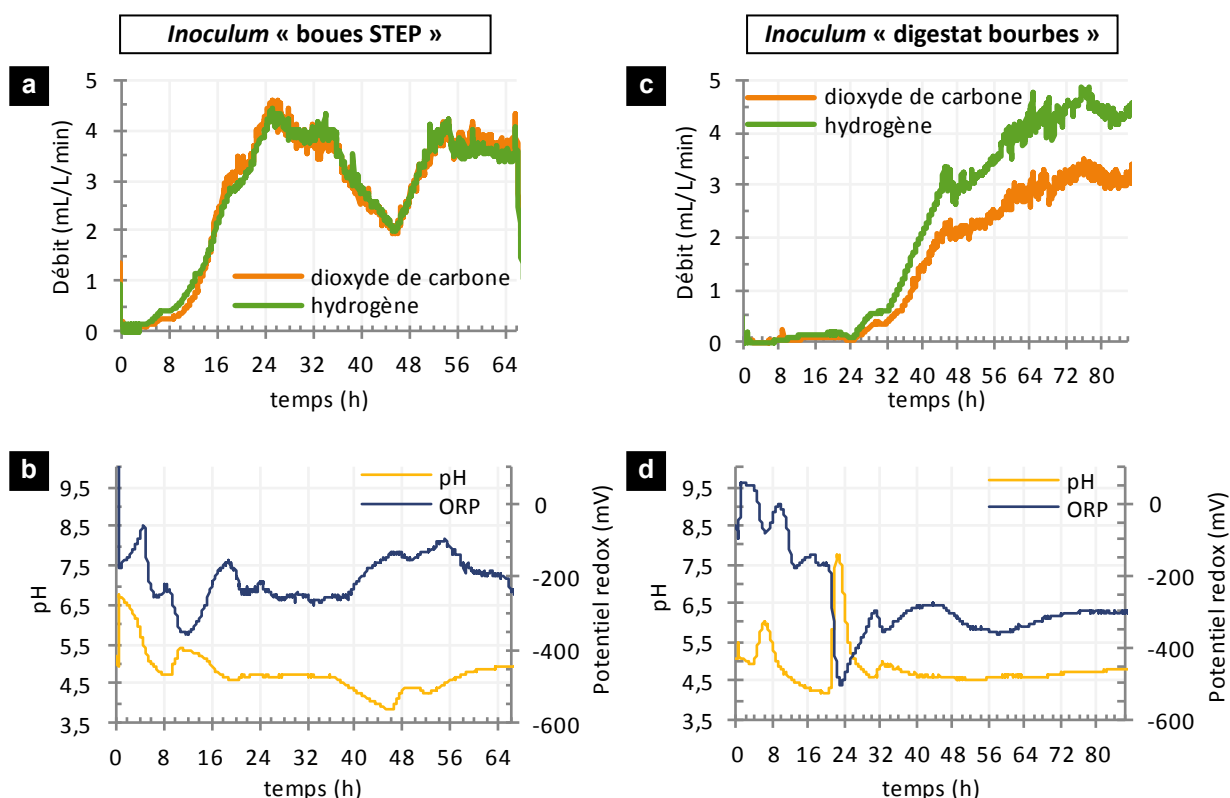
*Ce test a montré pour la première fois la faisabilité de la production d'hydrogène en BRM à partir d'une biomasse complexe remplissant à la fois le rôle de substrat et d'inoculum. Afin de proposer l'utilisation de ce système pour la production d'hydrogène à partir de biomasses, il est nécessaire de tester d'autres biomasses complexes. Mais auparavant, puisque l'inoculation première a de l'importance sur les résultats obtenus, il est intéressant d'inoculer le BRM et de comparer son fonctionnement avec deux inocula différents. Ainsi, une étude comparant les performances de production des inocula bourbes et boues STEP dans deux bioréacteurs membranaires différents est proposée avec l'utilisation d'un même substrat modèle.*

### 3 Fonctionnement sans réensemencement. Comparaison du fonctionnement du bioréacteur membranaire : *inoculum* « bourbes » et *inoculum* « boues de STEP »

L'objectif de cette étude est de comparer les performances de production de deux tests avec deux modules membranaires identiques, présentant les mêmes caractéristiques, l'un ensemencé avec des bourbes et l'autre avec des boues de STEP traitées thermiquement. Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions opératoires (TSH = 8h, DAS = 1,4 g/L/h) et alimentés avec un substrat modèle (glucose et nutriments).

#### 3.1 Production des gaz

Les figure 83a et c présentent le suivi de la production des gaz en sortie des fibres creuses pour les deux tests et les figure 83b et d, l'évolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction au niveau de l'effluent liquide du module membranaire.



\*un arrêt du bain thermostaté a eu lieu de  $t = 39$  à  $t = 46$  h pour le test BRM-STEP

**Figure 83 : Comparaison de la production d'hydrogène (a et c) et de l'évolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction (b et d) des tests avec ensemencement boues de STEP (BRM-STEP) ou digestat de fermentation de bourbes (BRM-B) avec une alimentation en substrat modèle**

On remarque que le temps de latence de production d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> est plus faible pour le test BRM-STEP. En effet, le test BRM-STEP atteint son maximum de productivité à  $t = 24$  h, alors que le test BRM-B atteint son maximum de productivité à  $t = 72$  h. Notons pour ce dernier test, un ralentissement de l'augmentation de la productivité à  $t = 44$  h.

Enfin, en période de fonctionnement pseudo-stable, le potentiel d'oxydoréduction du test BRM-STEP est globalement plus élevé (-350 à -150 mV) que celui du test BRM-B (-550 à -450 mV).

Le tableau 40 présente les performances de production d'hydrogène en BRM inoculé soit avec des boues de STEP, soit avec du digestat de fermentation des bourbes.

**Tableau 40 : Performances de production d'hydrogène en BRM inoculé soit avec des boues de STEP, soit avec du digestat de fermentation des bourbes**

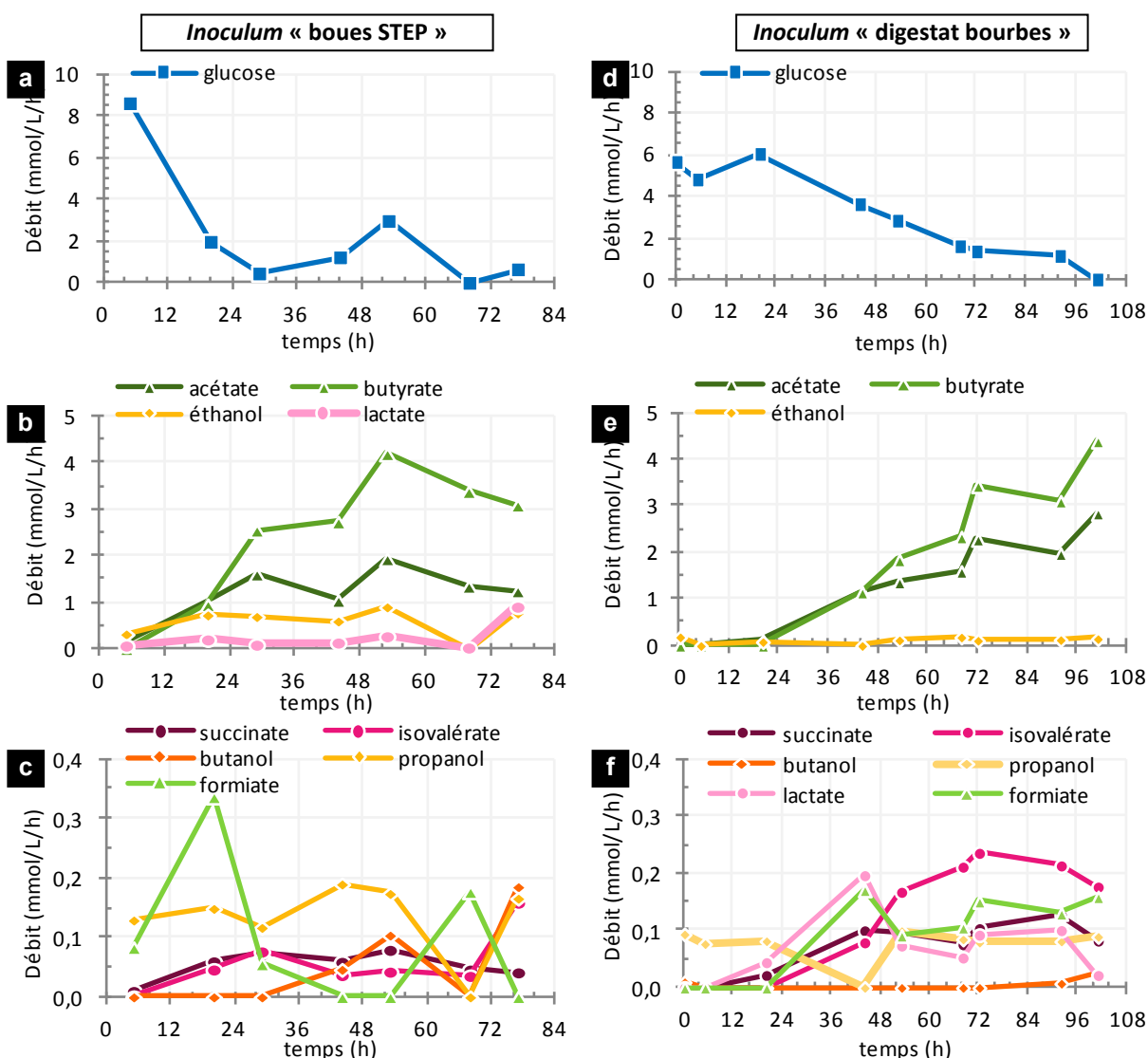
Test	Période étudiée	Productivité (L/L/j)	R <sub>H2</sub> (mol/mol) (Hexose ajouté)	Hexose consommé (%)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
BRM-STEP	20-36h/ 52-66 h	5,6	1,17	97	1,0
BRM-B	48-84 h	6,3	1,44	82	1,3

Avec des conditions opératoires (TSH =8h, DAS = 1,4 g/L/h) et un substrat similaires, un rendement de production en hydrogène par mole d'hexose ajouté plus élevé a été obtenu pour le test BRM-B que pour le test BRM-STEP, alors que tout le glucose n'est pas consommé pour le test BRM-

B. Le moduleensemencé avec des boures génère la meilleure productivité (6,3 L/L/j) et rapport H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (1,3) malgré une consommation plus faible du substrat (82% contre 97%), mettant en évidence que des bactéries endogènes efficaces pour la production d'hydrogène se sont installées dans le module membranaire, sans étape de prétraitement thermique.

### 3.2 Production de métabolites

La figure 84 présente une comparaison des débits de métabolites des tests BRM-STEP et BRM-B.



**Figure 84 :** Evolutions des concentrations de glucides et des productivités de métabolites majoritaires et mineurs des tests avec ensemencement avec des boues de STEP (BRM-STEP) (BRM-B) (respectivement a, b et c) et du digestat de bourbes (respectivement d, e et f)

On note une différence de débit de glucose (figure 84a et 8d) au niveau de l'effluent liquide du module membranaire, potentiellement dû à un ajout trop important de soude au début du test. La consommation de glucose est totale de 101 h pour le test BRM-B, elle est fluctuante pour le test BRM-STEP (hausse due à la coupure du bain thermostaté). Notons une reprise de la consommation de glucose après la remise en route du bain thermostaté.

Les métabolites majoritaires (figure 84c et 8e) sont le butyrate et l'acétate pour les deux tests. Du lactate et de l'éthanol sont également produits en quantité non négligeable pour le test BRM-STEP. On note également pour ce test, une variation des débits de métabolites liée à la coupure du bain thermostaté. Les productions d'acétate et de butyrate sont croissantes pour le test BRM-B jusqu'à 101 h, elles atteignent un plateau dès 29 h pour le test BRM-STEP. Les maxima d'acétate sont de 2,5 et 2 mmol/L/h respectivement pour les tests BRM-B et BRM-STEP. Les maxima de butyrate sont de 4,4 mmol/L/h pour le test BRM-B et de 3,4 mmol/L/h pour le test BRM-STEP. Le maximum de capacité est atteint plus rapidement pour le test BRM-STEP.

Sur les périodes de fonctionnement pseudo-stables (20-36h et 52-66h pour BRM-STEP et 48-84 h pour BRM-B), les rapports B/A sont respectivement de  $1,81 \pm 0,68$  et de  $1,44 \pm 0,08$ .

Les principaux métabolites minoritaires (figure 84 c et f) sont l'isovalérate, le lactate, le formiate, le propanol, le succinate pour les deux tests. Pour le test BRM-B, la production d'isovalérate coïncide avec celle d'acétate et de butyrate, de même que la production de succinate, de lactate et de formiate. Diverses voies secondaires sont activées.

### 3.3 Discussion

L'objectif de cette étude était de comparer les productions d'hydrogène et de métabolites dans deux BRM mis en fonctionnement avec deux inocula différents, toutes autres conditions opératoires identiques. A partir de glucose, les deux tests ont généré de l'hydrogène, avec de meilleures productivités (6,3 L/L/j, +12,5%), rendements en hydrogène ( $1,44 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ , +23%) et rapport molaire  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (1,3, +30%) avec un ensemencement à partir de digestat de fermentation des bourbes et ce malgré une moins bonne consommation moyenne de substrat sur les périodes de fonctionnement comparées (-15%). Cependant, la consommation totale de glucose a été atteinte pour le test BRM-B à  $t = 96$  h de fermentation, on peut donc supposer qu'il s'agisse du réel début de fonctionnement en régime pseudo-stable, comme cela pouvait être le cas pour le test BRM-EB, test d'ensemencement du module membranaire avec du digestat de bourbes.

On observe une différence de cinétique de production d'hydrogène avec les deux *inocula*. En effet, le temps de latence est supérieur pour le test BRM-B, mais cela est peut-être dû aux conditions de pH initiales. Notons que le régime de fonctionnement pseudo-stable semble atteint tôt pour le test BRM-STEP, et plus tard pour le test BRM-B. On observe une différence de potentiel

d'oxydoréduction à pH comparable, en régime de fonctionnement pseudo-stable. Les rapports B/A diffèrent, plus élevé avec les STEP, ainsi qu'une production de lactate et d'éthanol plus importantes. Plus d'isovalérate est produit en BRM-B. Au vu de ces différences, il semble que l'optimum de TSH et de DAS défini précédemment sur le BRM inoculé par les boues de STEP ne soit pas applicable à ce nouveau *consortium* bactérien.

Ainsi, le test BRM-STEP est caractérisé par un temps de latence faible, un potentiel d'oxydoréduction de -200 mV en moyenne, et est caractérisé par un métabolisme butyrate-acétate, avec peu d'éthanol. Le test BRM-B est caractérisé par un temps de latence élevé, un potentiel d'oxydoréduction de -400 mV en moyenne, et est caractérisé par un métabolisme butyrate-acétate.

Pour les deux tests, il a été observé la formation de granules bactériens dans le bas du module membranaire. Ces granules sont similaires à ceux observés lors de tests plus longs, en réacteur UASB (Jung *et al.*, 2013). La forte concentration en bactéries autorise l'application de charges volumiques plus importantes et ainsi une réduction du volume et de la surface des réacteurs (Ning *et al.*, 2013). Ainsi, il pourrait être pertinent de comparer la composition des communautés bactériennes de granules se formant en BRM sur une durée de fonctionnement plus longue à partir de différents ensemencements.

## 4 Fonctionnement du BRM avec différentes biomasses

L'objectif de cette partie est de déterminer si le module membranaire ensemencé avec du digestat de bourbes vitivinicoles peut être mis en œuvre avec différentes biomasses. En effet, la biomasse bourbes présente un excellent potentiel pour la production d'hydrogène, mais n'est disponible que de façon saisonnière (après les vendanges). La possibilité de faire fonctionner le même bioréacteur, sans nouvel ensemencement, avec d'autres types de biomasses est donc une perspective à explorer. La mise en œuvre du BRM avec la biomasse marcs de raisin, autre biomasse vitivinicole, sera donc testée, ainsi que la biomasse pellicules argentées. En effet, dans le chapitre IV, nous avons observé que ces biomasses génèrent de bonnes performances de production d'hydrogène par fermentation obscure. En outre, la biomasse pellicules argentée peut être conservée sur de longues périodes à température ambiante, du fait de sa teneur en matières sèches élevées (86%). Elle peut ainsi être mobilisée lorsque les biomasses saisonnières ne sont pas disponibles.

De plus, cette étude vise à déterminer si les performances de production d'hydrogène obtenues en configuration semibatch peuvent être retrouvées en configuration BRM. La signature métabolique et microbiologique sera-t-elle comparable à celle obtenue en configuration semibatch pour les biomasses marcs de raisin et pellicules argentées ? Ou bien est-ce que la signature du *consortium* ayant permis d'ensemencer le BRM (digestat de fermentation des bourbes) prédominera ?

Comme les deux biomasses sélectionnées sont sous forme solide et que le bioréacteur membranaire développé à échelle laboratoire ne permet que l'utilisation des substrats liquides, les

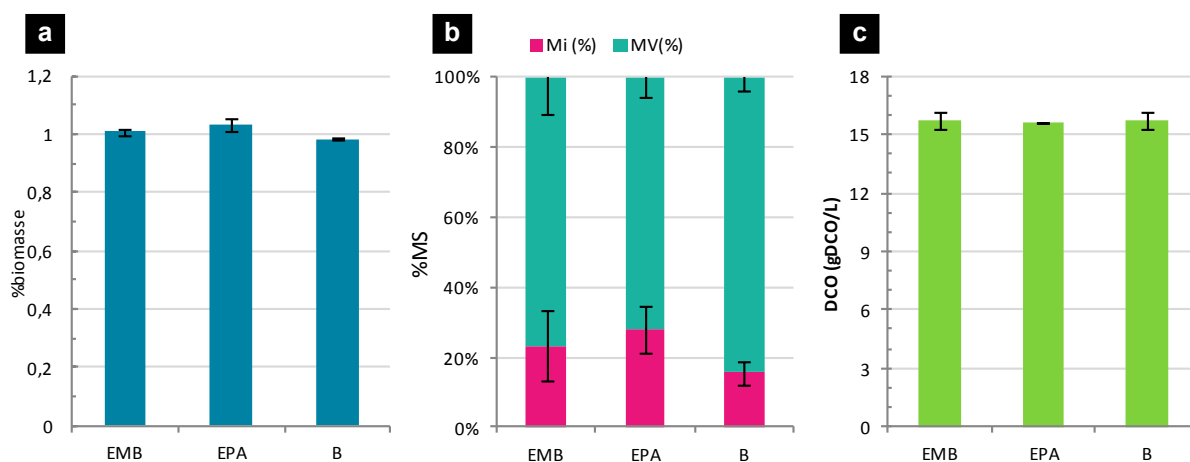
biomasses marcs de raisin et pellicules argentées ont été préparées pour extraire un maximum de substrats métabolisables dans une phase aqueuse.

Ainsi, les marcs de raisin 2016 ont été broyés (1kg de marcs) et mélangés avec de l'eau du réseau de l'Eurométropole de Strasbourg. La préparation a été diluée (pour obtenir une concentration en glucides solubles comparable à celle des bourbes. Les pellicules argentées ont simplement été mélangées avec l'eau. Les extraits obtenus notés EMB pour 'Extrait de Marcs de raisin Broyés' et EPA pour 'Extrait de Pellicules Argentées' ont été filtrés (1mm puis 40 $\mu$ m) pour retirer les particules en suspension pouvant entraîner un colmatage du système. Les bourbes ont été préparées comme pour le test précédent (dilution 1/25) et seront donc notées B.

Le BRM a été mis en œuvre avec les substrats à un TSH de 8h et un DAS de 1,4 g/L/h. La caractérisation des matières des substrats sera présentée, suivie par les performances de production d'hydrogène, l'analyse du métabolisme et des communautés bactériennes de l'effluent.

#### 4.1 Caractérisation des matières des substrats : extrait de marcs broyés (EMB), extrait de pellicules argentées (EPA) et bourbes (B)

La figure 85 présente la distribution des matières sèches (MS), des matières volatiles (MV) et des matières inorganiques (Mi) des biomasses EMB, EPA et B.



**Figure 85 : Analyse des matières sèches (MS) (a), distribution des matières volatiles (MV) et des matières inorganiques (Mi) (b) et DCO (c) de l'extrait de marcs broyés (EMB), de l'extrait de pellicules argentées (EPA) et des bourbes diluées (B)**

Les biomasses EMB, EPA et B présentent des teneurs en matières sèches similaires, soit environ 1%(w/v). Les répartitions des matières inorganiques et des matières volatiles sont également proches (respectivement 18-23% et 77-82%). La DCO est similaire pour tous les échantillons (environ 15 g<sub>DCO</sub>/L), ce qui permettra de se placer dans des conditions similaires d'alimentation en DCO du BRM.

La figure 86 présente la répartition élémentaire des cendres de biomasses EMB, EPA et B, c'est-à-dire après minéralisation à 550°C.

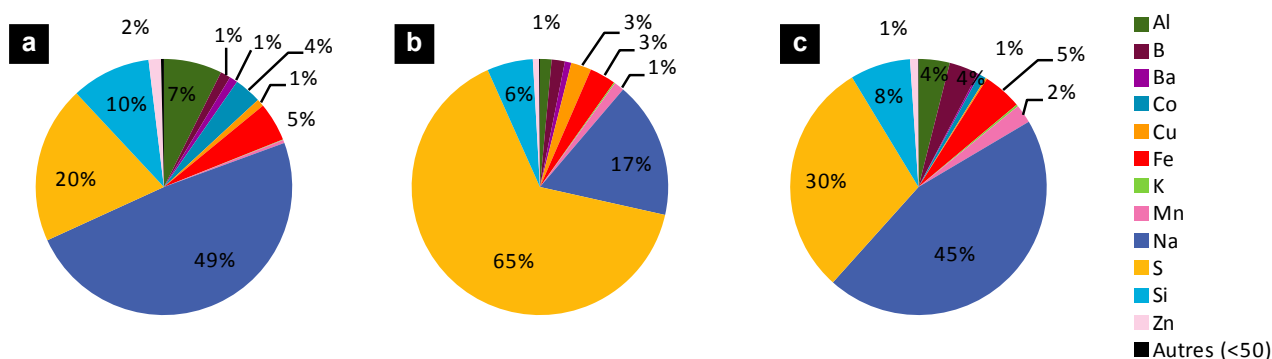


Figure 86 : Comparaison des répartitions des micronutriments majoritaires de l'extrait de marcs broyés (EMB) (a), de l'extrait de pellicules argentées (EPA) (b) et des bourbes diluées (B) (c)

Les répartitions élémentaires de l'EMB (figure 86a) et de B (figure 86c) sont proches. Pour toutes les biomasses, les éléments principaux sont le sodium (Na) et le soufre (S) : 69% des Mi de l'extrait de marcs broyés (EMB), 82% des Mi de l'extrait de pellicules argentées (EPA), 75% des bourbes (B) diluées. Le sodium est l'élément majoritaire dans les biomasses vitivinciales, suivi par le soufre ; la tendance inverse est observée dans l'EPA. Les autres éléments présents sont le silicium (Si), l'aluminium (Al) et le fer (Fe). Le cuivre (Cu) est présent en proportions plus importantes dans l'EPA (3%). Du cobalt (Co) est présent uniquement dans les biomasses viticoles (4% dans l'EMB et 1% dans B).

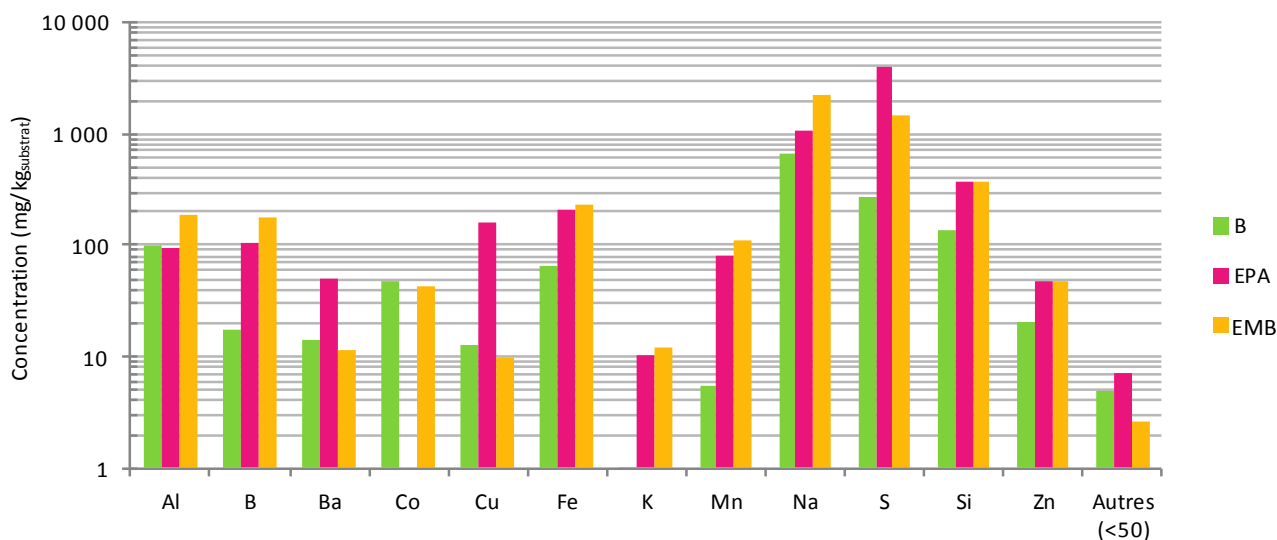


Figure 87 : Principaux micronutriments de l'extrait de marcs broyés (EMB), de l'extrait de pellicules argentées (EPA) et des bourbes diluées (B)

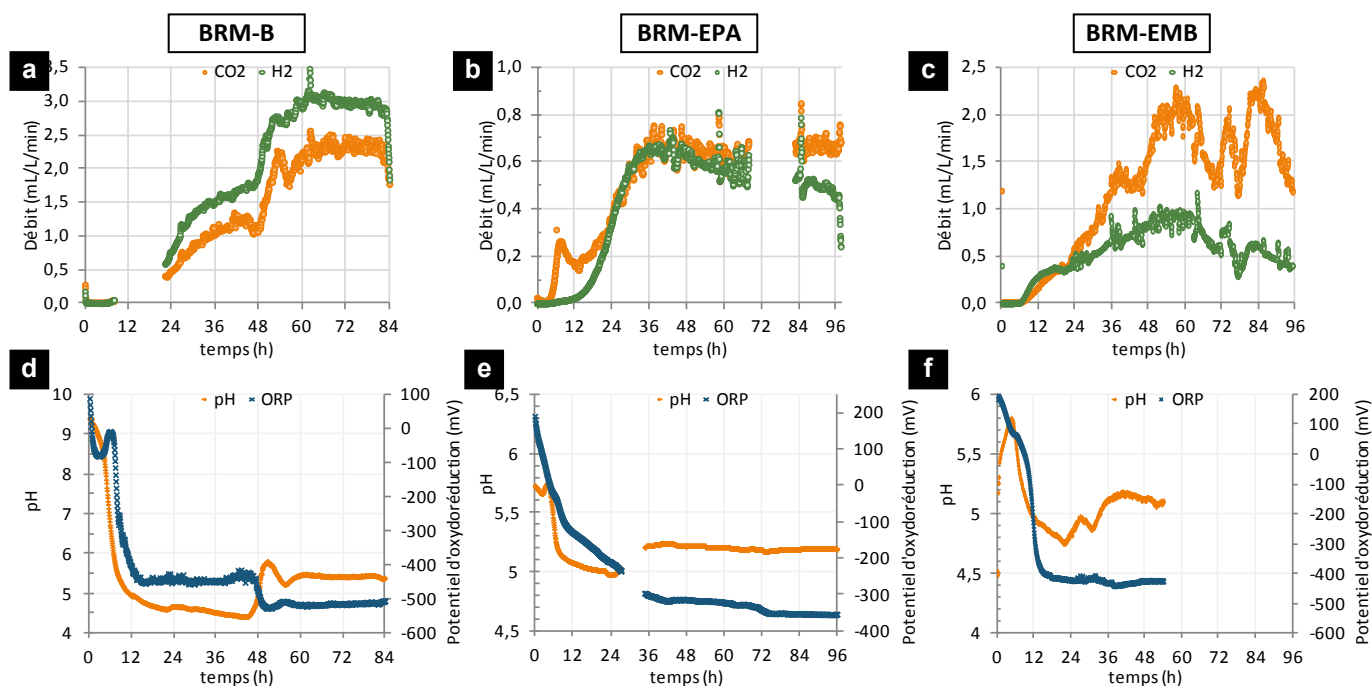


La concentration en soufre la plus élevée est celle de l'EPA. L'ensemble des biomasses contient des micronutriments essentiels pour la croissance bactérienne : Cu, Fe et Mn. Du fer est présent en quantité similaires dans l'extrait de pellicules d'argent et dans les bourbes (206 et 236 mg/kg respectivement), un peu moins dans l'extrait de marc broyé (66 mg/kg).

*Les trois substrats présentent des quantités de matières sèches, volatiles et minérales ainsi qu'une DCO similaires. Notons également qu'elles contiennent toutes d'importantes quantités de soufre ainsi que d'autres micronutriments (Mn, Fe, Cu) favorisant la croissance bactérienne.*

## 4.2 Analyse des gaz extraits

La figure 88 propose une comparaison de la production de gaz (hydrogène et dioxyde de carbone) et le suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction. Rappelons que le bioréacteur membranaire a été ensemencé par le digestat de fermentation des bourbes puis testé avec substrat modèle avant d'être mis en œuvre par ordre chronologique avec les biomasses bourbes diluées (test BRM-B), extrait de pellicules argentées (test BRM-EPA) et extrait de marcs de raisin broyés (test BRM-EMB).



**Figure 88 :** Comparaison des productivités en hydrogène et en CO<sub>2</sub> du BRM (a, b et c), ainsi que du suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction (d, e et f) avec différents substrats : bourbes diluées (BRM-B) (a et d), extrait de pellicules argentées (BRM-EPA) (b et e) et extrait de marcs broyés (BRM-EMB) (c et f).

La meilleure productivité en hydrogène en régime de fonctionnement pseudo-stable a été atteinte avec le test BRM-B (3,0 mL/L/min). Le débit maximal de production du test BRM-EPA est de 1,0 mL/L/min et celui du test BRM-EMB de 0,6 mL/L/min.

On observe des différences concernant le rapport  $H_2/CO_2$  : en régime pseudo-stable, la productivité en  $CO_2$  de l'échantillon BRM-EMB est près de deux fois supérieure à celle de l'hydrogène, alors que pour le test BRM-EPA, les productivités en  $H_2$  et en  $CO_2$  sont proches la productivité en hydrogène du test BRM-B est supérieure à celle du  $CO_2$ .

Pour les tests BRM-EMB et BRM-EPA, le pH est resté compris entre 5 et 5,5. Le potentiel d'oxydoréduction s'est stabilisé à -400 mV et -350 mV respectivement. Pour le test BRM-B, le pH, initialement de 9, reste compris entre 4,5 et 6 par la suite. Le potentiel d'oxydoréduction est compris entre -400 et -500 mV. Notons que pour le test BRM-B, une remontée du pH de 4,5 à 5,5, conjointe à une baisse du potentiel d'oxydoréduction de -400 mV à -500 mV, a conduit à une remontée de la production d'hydrogène, de 1,5 à 3 mL/L/min, pour atteindre un plateau à 3 mL/L/min.

Le tableau 41 présente les performances de production d'hydrogène de ces tests.

**Tableau 41 : Comparaison des performances de production du BRM avec différents substrats : extrait de marc de raisin broyé, extrait de pellicules argentées de café, bourbes diluées.**

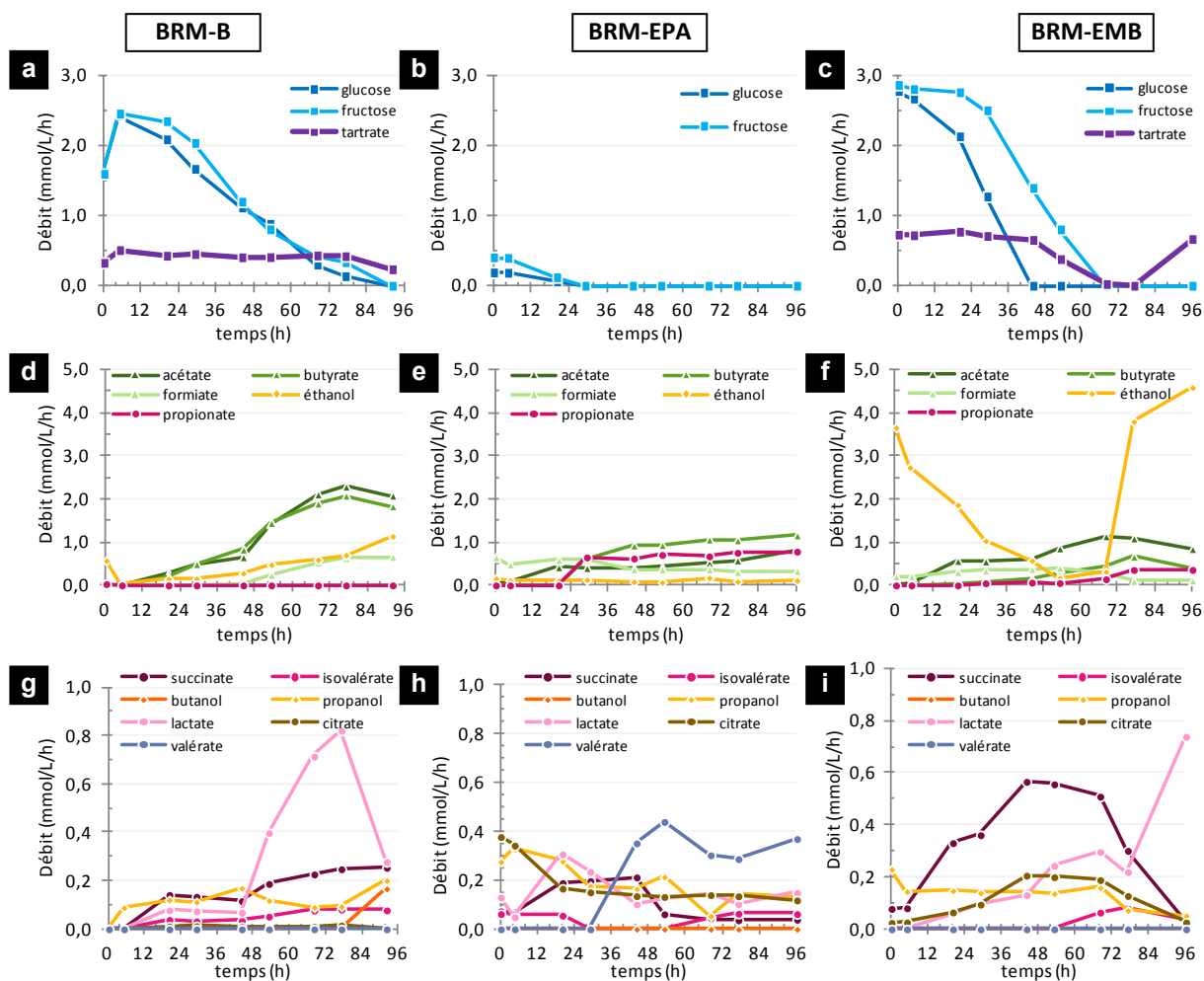
Test	Période de calcul	DCOi (g <sub>DCO</sub> /L/h)	pH moyen	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/L/h)	R <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL/g) (DCO ajoutée)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
BRM-EMB	24-96 h	2,0	4,9-5,4	39,9 ± 10,7	20,0	0,43
BRM-EPA	36-96 h	2,0	5,2	36,5 ± 2,8	18,3	0,94
BRM-B	48-84 h	2,0	5,4	171,6 ± 15,7	85,8	1,33

Ainsi, les valeurs maximales de productivité, rendement DCO en hydrogène (4,5 fois supérieurs) et rapport molaire  $H_2/CO_2$  ont été obtenues pour le test BRM -B. Des productivités proches ont été obtenues pour les tests BRM- EPA et BRM-EMB, mais avec un rapport molaire  $H_2/CO_2$  plus élevé pour le test BRM-EPA. Pour tous les tests, le pH moyen est similaire (5,2-5,4) et il est à noter que lorsque l'extrait de pellicules argentées a été utilisé comme substrat, aucun ajout de NaOH n'a été nécessaire pour réguler le pH.

*L'ensemble des substrats a permis de générer de l'hydrogène en BRM ensemencé au préalable avec un consortium correspondant au digestat de fermentation des bourbes. Néanmoins, des rendements DCO plus faibles ont été observés pour les tests réalisés avec les substrats EMB et EPA.*

### 4.3 Analyse des métabolites

La figure 89 présente une comparaison des concentrations de glucides et des productions de métabolites majoritaires et minoritaires des tests BRM- B (respectivement figure 89a, 14d et 14g), BRM- EPA (respectivement figure 89b, 14e et 14h) et BRM- EMB (respectivement figure 89c, 14f et 14i).



**Figure 89 : Evolution de la concentration en glucides et en tartrate et des productivités de métabolites majoritaires et minoritaires des tests BRM-B (a, d et g), BRM- EPA (b, e et h) et BRM- B (c, f et i)**

Tout d'abord, on constate que les concentrations initiales en glucose et fructose sont supérieures pour le test BRM-EMB, puis pour le test-BRM-B. La consommation en glucose et fructose est totale dès  $t = 29$ h pour le test BRM-EPA, le plus faiblement chargé en sucres simples. Le glucose est consommé en premier pour le test BRM-EMB ( $t = 44$ h) puis le fructose ( $t = 68$ h). Pour le test BRM-EMB, la consommation de ces deux glucides est plus lente ( $t = 77$ h) et a lieu de façon simultanée.

Tout comme pour la production d'hydrogène, un régime permanent de production de métabolites n'est pas atteint. L'éthanol est le métabolite majoritaire du test BRM-EMB (figure 89f). Produit en début de test, sa production diminue, est quasiment nulle à  $t = 68$  h et augmente à nouveau à partir de  $t = 77$  h. De l'acétate, du butyrate et du succinate sont également produits. Notons que la baisse de concentration d'éthanol au cours du temps est conjointe à l'augmentation des productions d'acétate et de butyrate, mais aussi de succinate. De même, l'augmentation de la production d'éthanol (figure 89f) est conjointe à celle lactate en fin de test (figure 89i). De l'isovalérate est produit à partir de 24 h ; la production d'autres métabolites (butanol, citrate, propanol) reste très minoritaire ( $< 0,2$  mmol/L/h).

Le butyrate est le métabolite majoritaire du test BRM- EPA (figure 89e) suivi par le propionate et l'acétate, dont la quantité est croissante. Du formiate est présent dans l'effluent du BRM L/G dès  $t = 0$  h et sa concentration reste constante au cours du temps. Du valérate (figure 14h) est produit à  $t > 40$  h (environ 0,4 mmol/L/h). Du lactate et du succinate (figure 89h) sont produits en faibles quantités ( $< 0,2$  mmol/L/h).

De l'acétate et du butyrate sont produits majoritairement, en proportions équivalentes, pour le test BRM-B (figure 89d). De l'éthanol et du formiate (figure 89d) sont également produits, ainsi que du lactate (figure 89g).

*Malgré une consommation de glucides solubles beaucoup plus importante, le test à partir de l'EMB ne génère que peu de métabolites associés à la production d'hydrogène (acétate, butyrate), potentiellement à cause de la présence d'inhibiteurs libérés dans le milieu réactionnel suite au broyage. Les tests utilisant l'EPA et B génèrent essentiellement ces métabolites, avec un rapport B/A plus élevé pour le test BRM- EPA avec également pour ce test une production de propionate.*

#### 4.4 Analyse microbiologique

Des échantillons de l'effluent du BRM alimenté avec différents substrats (BRM-EMB, BRM-EPA) ont été prélevés. L'ADN des culots bactériens de ces échantillons a été extrait comme décrit précédemment. L'ADN bactérien codant l'ARN 16S a été analysé par séquençage Illumina à haut débit. Pour comparaison, l'échantillon du test BRM-EB  $t = 96$  h a été ajouté à ces données. Le tableau 42 présente les indices de diversité et de richesses de ces échantillons.

**Tableau 42 : Diversité et richesse des échantillons des tests BRM-B, BRM-EPA et BRM-EMB analysés par séquençage**

Echantillon	Nombre d'OTU	Indice de Simpson	Indice de Shannon	Indice ACE
BRM-B, $t = 96$ h	63	0,20	1,87	67,6
BRM-EPA, $t = 68$ h	74	0,55	1,17	75,7
BRM-EMB, $t = 68$ h	48	0,54	1,00	49,7

Le nombre d'OTU est similaire pour les échantillons d'effluent des tests BRM-EPA et BRM-B, il est plus faible pour le test BRM-EMB. Les indices de Simpson sont proches pour les tests BRM-EMB et BRM -EPA, de même que les indices de Shannon l'indice de Simpson du test BRM-EB est plus faible et son indice de Shannon est le plus élevé, ce qui signifie que la diversité bactérienne est plus élevée dans cet échantillon, correspondant à l'effluent issu du test. L'ACE du test BRM-EMB est le plus faible, ceux des tests BRM-EPA et BRM-B sont relativement comparables, ce qui signifie que la richesse en espèces est la plus élevée dans ces échantillons.

La figure 90 présente la répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux.

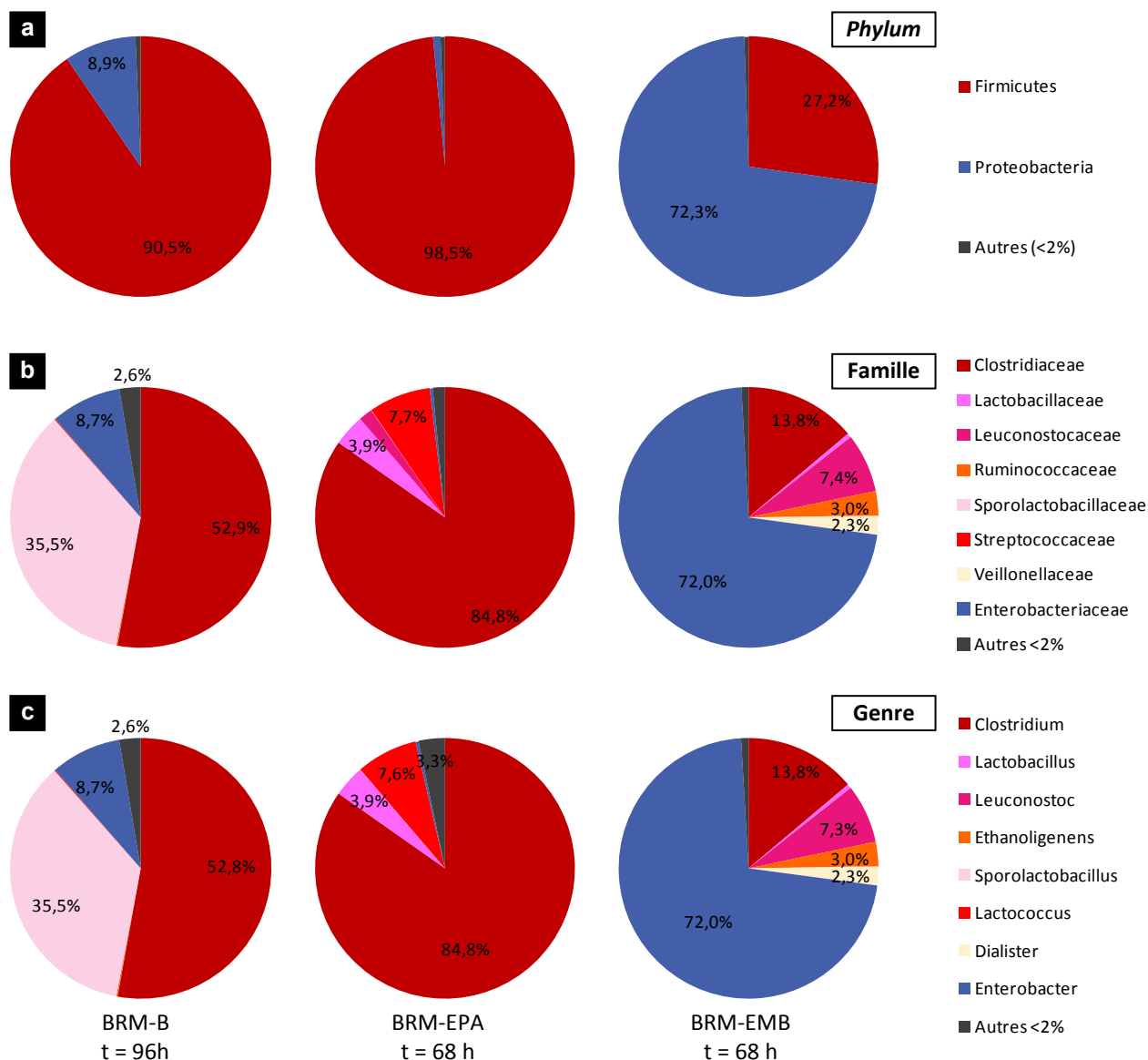


Figure 90 : Répartition des *phyla* (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation du BRM ensemencé avec du digestat de fermentation de bourbes et alimenté avec les substrats EMB, EPA ou B - Abondance > 2% pour au moins un échantillon

Les trois échantillons sont essentiellement composés des *phyla* *Firmicutes* et *Proteobacteria* (figure 90a), avec une abondance cumulée des deux *phyla* de 99,4% pour les trois tests. Néanmoins, les *Proteobacteria* sont majoritaires (72,3%) dans le test BRM-EMB alors que les *Firmicutes* prédominent dans les tests BRM-EPA et BRM-B (98,5% et 90,5% respectivement).

Le *phylum* *Proteobacteria* est essentiellement composé de la famille des *Enterobacteriaceae*, elle-même représentée par le genre *Enterobacter* (figure 90b et figure 90c). Le *phylum* *Firmicutes* est plus diversifié, avec une prédominance de la famille des *Clostridiaceae*. On remarque ainsi que, d'autres familles du *phylum* *Firmicutes* sont fortement représentées pour les tests BRM-EMB (7,3% de *Leuconostocaceae*, soit le genre *Leuconostoc*) et BRM-EB (35,5% de *Sporolactobacillaceae*, soit

le genre *Sporolactobacillus*). Notons que *Leuconostoc* et *Sporolactobacillus* sont des bactéries non productrices d'hydrogène.

Le tableau 43 présente les résultats d'identification obtenus pour les OTUs dont l'abondance est supérieure à 1% pour au moins un des tests.

Le taxon *Clostridium beijerinckii/diolis* est présent dans tous les échantillons et de façon très majoritaire dans l'échantillon du test BRM-EPA (73,6%), de même qu'*Enterobacter sp.* qui est majoritaire dans BRM-EMA (72,0%). Aucune OTU n'est présente de façon aussi marquée pour BRM-EB, pour lequel *Sporolactobacillus laevolacticus* (35,5%), *Clostridium saccharobutylicum* (17,0%), *Clostridium pasteurianum* (13,2%) et *Clostridium beijerinckii/diolis* (12,1%) émergent. Ainsi, le test BRM-EMA se démarque par la prévalence d'*Enterobacter sp.* dans le culot bactérien de l'échantillon à t = 68 h, alors que les deux autres tests favorisent majoritairement la croissance de différents *taxa* du genre *Clostridium*.

**Tableau 43 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des tests avec différentes biomasses - Abondance >1% pour au moins un échantillon - code couleur**

Phylum	Famille	Genre	Meilleure correspondance dans la base de données NCBI	Homologie (%)	n° ordre	B (96h)	EPA (68h)	EMB (68h)	
Firmicutes	Clostridiaceae	<i>Anaerobacter</i>	<i>Anaerobacter polyendosporus</i>	100	NR_026496.1	8,3	<0,1	0,0	
		<i>Clostridium</i>		<i>Clostridium intestinale</i>	99	NR_029263.1	1,8	0,0	<0,1
				<i>Clostridium pasteurianum</i>	99	NR_104822.1	13,2	2,6	<0,1
				<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	97	NR_122061.1	17,0	<0,1	0,0
				<i>Clostridium (autoethanogenum/ljungdahlii)</i>	100	/	0,0	1,8	<0,1
				<i>Clostridium (beijerinckii/diolis)</i>	99	/	12,1	73,6	13,8
				<i>Clostridium (carboxidivorans/drakei)</i>	100		0,2	5,9	<0,1
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus (hirae/ratti/faecium/mundtii/durans)</i>	100	/	1,7	0,3	<0,1	
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus (wasatchensis/porcinae/camelliae )</i>	99	/	<0,1	3,7	<0,1	
	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99	NR_109004.1	<0,1	0,0	7,2	
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ethanoligenens</i>	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	98	NR_074333.1	0,1	0,0	3,0	
	<i>Sporolactobacillaceae</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	99	NR_112769.1	35,5	<0,1	<0,1	
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus (taiwanensis/lactis)</i>	100	/	0,0	7,6	<0,1	
<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister</i>	<i>Dialister (pneumosintes/succinatiphilus)</i>	96	/	<0,1	0,0	2,3		
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	-		8,7	0,4	72,0	

## 4.5 Discussion

Cette étude a validé la possibilité de faire fonctionner le BRM L/G avec différentes biomasses pour la production d'hydrogène par fermentation obscure. L'ensemencement avec une autre biomasse que les bourbes et le fonctionnement avec différents substrats selon leurs disponibilités paraissent envisageables, conférant une flexibilité avantageuse au procédé.

Le tableau 44 propose un résumé des performances de production des tests réalisées en BRM L/G utilisant les biomasses bourbes, marcs de raisin ou pellicules argentées de café, des métabolites et genres bactériens principaux ainsi qu'une comparaison avec ces mêmes paramètres générés par les tests en bioréacteur semibatch. On observe que les biomasses utilisées ont généré des performances de production variées.

**Tableau 44 : Comparaison des performances de production en semibatch et BRM L/G avec les biomasses bourbes, marcs de raisin et pellicules argentées de café**

Bioréacteur	Biomasse	P' <sub>H2</sub> (L/L/j)	R <sub>DCO</sub> (mL/g)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Distribution moyenne des métabolites	Genres majoritaires du milieu réactionnel
BRM	bourbes	4,1 ± 0,4	86 ± 8	1,2	acétate (33%), butyrate (31%), lactate (11%), éthanol (10%), formiate (8%), succinate (4%)	<i>Clostridium</i> (53%) <i>Sporolactobacillus</i> (35%) <i>Enterobacter</i> (9%)
Semibatch	bourbes	1,9 ± 0,5	283 ± 56	1,0±0,1	butyrate (44%), acétate (36%), lactate (5%), éthanol (6%)	<i>Clostridium</i> (94%) <i>Enterobacter</i> (5%)
BRM	extrait de marcs broyés	0,9 ± 0,3	20 ± 5	0,43	éthanol (24%), acétate (24%), succinate (14%), formiate (10%), butyrate (8%), lactate (6%)	<i>Enterobacter</i> (72%) <i>Clostridium</i> (14%) <i>Leuconostoc</i> (7%) <i>Ethanoligenens</i> (3%)
Semibatch	marcs	1,2 ± 0,5	41 ± 9	0,6 ± 0,1	éthanol (42%), acétate (29%), butyrate (12%), succinate (12%), propionate (3%)	<i>Enterobacter</i> (83%) <i>Clostridium</i> (10%) <i>Lactococcus</i> (3%) <i>Lactobacillus</i> (2%)
BRM	extrait de pellicules argentées	1,0 ± 0,1	18 ± 1	1,33	butyrate (28%), propionate (19%), acétate (14%), formiate (10%), éthanol (3%), lactate (3%), succinate (3%)	<i>Clostridium</i> (85%) <i>Lactococcus</i> (8%) <i>Lactobacillus</i> (4%)
Semibatch	pellicules argentées	0,3 ± 0,1	21 ± 2	0,7 ± 0,0	acétate (77%), butyrate (8%), propionate (6%), éthanol (6%), propanol (1%)	<i>Enterococcus</i> (54%) <i>Enterobacter</i> (27%) <i>Clostridium</i> (7%) <i>Lactococcus</i> (10%)

Le test réalisé avec des bourbes diluées (BRM-B) a généré la meilleure productivité en hydrogène et le rendement le plus élevé par rapport à la quantité initiale de DCO introduite. Ces performances sont corrélables à un métabolisme globalement orienté vers la production d'hydrogène (acétate-butyrate et dans une moindre mesure acétate-éthanol et acétate-lactate), associé à la présence probable de diverses espèces du genre *Clostridium* dans le module membranaire, selon les résultats de séquençage de l'ADN codant l'ARN 16S du culot bactérien de l'effluent du test BRM-EB, réalisé dans des conditions proches (*cf.* §2.4.2).



Le test de production utilisant les marcs de raisin (BRM-EMB), malgré des teneurs en glucose et en fructose de l'alimentation liquide proches de celles des bourbes, génère des productivités moindres. Le profil métabolique et microbiologique est très proche de celui généré en configuration semibatch (tableau 44), avec une productivité moyenne générant principalement le couple de métabolites éthanol-acétate et une majorité d'*Enterobacter* dans le milieu réactionnel. Le *consortium* bactérien se développant au cours du test est donc sélectionné par la biomasse, prenant le pas sur le *consortium* s'étant installé dans le module membranaire. Comme discuté précédemment (cf. § IV.3.4), il semble ainsi que des composés présents dans les marcs de raisin, broyés ou non, soient libérés dans le milieu liquide et aient une action inhibitrice sur la croissance de *Clostridium*, favorisant la croissance d'*Enterobacter*. Les marcs de raisins sont riches en polyphénols (Beres *et al.*, 2017), substances pouvant inhiber *Clostridium* (Duda-Chodak *et al.*, 2015).

Concernant le test réalisé à partir d'un extrait de pellicules argentées de café (BRM-EPA), des performances de production prometteuses, équivalentes à l'extrait de marcs broyés, ont été atteintes, malgré une teneur en glucose et en fructose plus faible que pour les autres substrats. Ceci pourrait être expliqué par le fait que des glucides plus complexes sont solubilisés lors de l'extraction et hydrolysés au cours de la fermentation par des enzymes bactériennes extracellulaires. De plus, on note la prévalence du genre *Clostridium* et d'un métabolisme butyrate-acétate-formiate bien orienté pour la production d'hydrogène. Contrairement aux tests en bioréacteur semibatch, le métabolisme du test avec l'extrait de pellicules argentées génère dans le BRM L/G une quantité importante de butyrate, et *Clostridium beijerinckii/diolis* est majoritaire, alors que dans la configuration semibatch, l'acétate était majoritaire, associé la forte présence d'*Enterococcus* et *Lactococcus*. Nous avons supposé dans la discussion du § IV.3.4 que la présence de ces espèces pourrait avoir un effet inhibiteur sur la croissance de *Clostridium*. Lors de la mise en œuvre en BRM L/G, il semble donc que la biomasse EPA n'ait pas influencé le développement bactérien et se soit seulement comporté comme substrat.

Globalement, les rendements de production en hydrogène rapportés à la DCO sont plus faibles en BRM qu'en bioréacteur semibatch. Il est possible que les productions de lactate, de succinate et de formiate supérieures, ainsi que l'absence de consommation du tartrate en BRM L/G (spécifiquement pour les bourbes) contribuent à cet écart. En effet, leur consommation en bioréacteur semibatch permet d'augmenter la production d'hydrogène. Pour le test avec les marcs de raisin, les métabolites qui pourraient être ainsi consommés représentent 30% de la production en métabolites analysés contre 12% en bioréacteur semibatch. Pour le test en BRM avec les bourbes, une production plus faible de butyrate, causée par la présence plus élevée de *Sporolactobacillus* qu'en bioréacteur semibatch, est un facteur additionnel. *Sporolactobacillus* inhibe peut-être partiellement la croissance de *Clostridium*. Seuls les tests avec les pellicules argentées présentent des performances comparables en termes de rendement DCO, ce qui est dû à la sélection de *Clostridium* au détriment d'*Enterococcus*.

Au regard des productivités en hydrogène (productivité maximale en réacteur semibatch comparée à la productivité moyenne en régime pseudo-stable en BRM L/G), excepté pour l'EMB, test pour lequel on suppose une libération d'inhibiteurs liée au broyage de la biomasse, la mise en œuvre

en BRM est très favorable. En effet, la mise en œuvre dans le BRM L/G permet d'obtenir une productivité doublée avec les bourbes et triplée avec les pellicules argentées.

Ainsi, cette étude montre que même si l'étape d'ensemencement est importante, le fonctionnement du BRM L/G avec une biomasse réelle peut malgré tout favoriser le développement d'un *consortium* bactérien endogène à la biomasse et adapté au substrat. Pour les biomasses induisant un tel fonctionnement, il serait alors inutile d'ensemencer avec des souches pures ou en co-culture car celles-ci seraient potentiellement à terme supplantées par les consortia endogènes aux biomasses se développant dans le milieu réactionnel. Pour d'autres biomasses se limitant à leur rôle de substrat, un tel mode de fonctionnement pourrait être envisageable.

## 5 Conclusion

La faisabilité de la production d'hydrogène dans le bioréacteur membranaire (BRM) avec une extraction liquide/gaz (L/G) en mode continu, où la biomasse (bourbes viticoles) agit comme *inoculum* de bactéries productrices d'hydrogène et substrat a été démontrée. Le fonctionnement du système sans réensemencement bactérien avec cette même biomasse et d'autres biomasses complexes (marcs de raisin, pellicules argentées de café) a généré des performances de production comprises entre 0,9 et 4,1  $L_{H_2}/L_{réacteur}/j$ , avec des rendements DCO compris entre 18 et 86  $L_{H_2}/kg_{DCO}$ .

Dans ce système, les performances de production de l'*inoculum* issu du digestat de bourbes sont légèrement supérieures à celles d'un *inoculum* de boues de station de STEP lors du test de fermentation d'une même solution de glucose et de nutriments. Une piste d'amélioration pourrait ainsi être d'optimiser l'ensemencement du module membranaire, en utilisant des bactéries très productrices d'hydrogène. Néanmoins, l'intérêt d'une telle manipulation ne sera préservé que si la biomasse n'exerce pas une action de sélection de ses bactéries indigènes, au détriment de l'*inoculum* du module membranaire, ce qui fut le cas lors du test avec les pellicules argentées de café, au contraire du test utilisant des marcs de raisin.

# Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse reposent sur les solides bases de deux études antérieures au laboratoire, ayant porté d'une part sur le développement d'un procédé continu en bioréacteur membranaire (BRM) avec une extraction liquide/gaz (L/G), utilisant un substrat modèle, et d'autre part sur l'étude de la mise en œuvre d'une fermentation obscure endogène à partir de biomasses vitivinicoles. L'objectif de nos travaux était d'approfondir ces deux approches d'amélioration du procédé de fermentation obscure : les résultats associés ont été présentés dans les chapitres III et IV. La finalité de notre étude était le couplage de ces deux notions : faire la preuve de concept d'une fermentation endogène dans un BRM L/G à partir de biomasses, ce qui a été réalisé avec succès et est présenté dans le chapitre V.

Les travaux du chapitre III ont montré la robustesse du procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure en BRM L/G. Jusqu'à 432 jours après le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP, dans des conditions similaires (TSH = 13-14h, DAS = 0,8 g/L/h,  $C_{\text{alim}} = 12 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$ ), les performances de production d'hydrogène ont été conservées. Sans ensemencement, une baisse de la diversité des communautés bactériennes se développant dans le module membranaire, au profit du développement de bactéries productrices d'hydrogène (*Clostridium*, *Enterobacter*, *Ethanoligenens*) a été observée. La possibilité d'extraire les gaz de façon efficace sans gaz de balayage, en maintenant les performances de production d'hydrogène, a été validée et constitue une amélioration notable du procédé. L'étude des communautés bactériennes dans ces conditions montre qu'une majorité de *Clostridium* est installée dans le module membranaire et tend à former des granules producteurs d'hydrogène. Le développement d'un biofilm à la surface des fibres creuses offre la possibilité de faire fonctionner le BRM L/G sans ensemencement, et ce même après l'arrêt de fonctionnement du bioréacteur pendant de longues périodes, assurant une mise en œuvre simplifiée présentant un intérêt non négligeable du procédé à l'échelle industrielle ou sur une exploitation agricole. L'optimisation du couple temps de séjour hydraulique (TSH) et débit d'alimentation en substrat (DAS) a été effectuée. Une gamme de TSH de 2-14h a été testée à DAS fixe (1,4 g/L/h). Une gamme de DAS de 0,7 à 2 g/L/h a été testée à TSH fixe (8 h). Il s'avère que la combinaison du TSH et du DAS, soit la concentration en glucose, est le paramètre ayant le plus d'impact sur les performances de production du BRM. Un optimum de rendement et de productivité en hydrogène a été obtenu à une concentration en glucose proche de 12-14 g/L en consommant 80% du substrat. De plus, avec cette concentration en substrat, 4 *taxa* qui semblent efficaces pour la production d'hydrogène sont sélectionnés: *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii/diolis*, *Ethanoligenens harbinense* et *Enterobacter sp.*

L'étude du chapitre IV a permis de rassembler un panel varié de coproduits issus de différentes filières de production (vitiviniculture, brasserie, malterie, torréfaction de café vert) et de démontrer que la production d'hydrogène par fermentation obscure endogène peut s'appliquer à des biomasses diverses en termes de structure et de composition. Des productions en hydrogène comprises entre (0,7 et 55  $L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$ ) ont été obtenues. Même si les meilleures productions ( $56,7 \pm 8$ ,  $L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$ ) sont de loin obtenues pour la biomasse la plus riche en monomères glucidiques solubles (bourbes viticoles), il est possible d'obtenir des productions moyennes d'hydrogène (15-24  $L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$ ) par fermentation endogène à partir de biomasses dont la teneur en glucides solubles est plus faible (drèches de microbrasserie, pellicules argentées de café, raisin « moisi », marcs de raisin). Pour ces dernières, et pour les biomasses ayant généré des productions en hydrogène plus faibles, une saccharification préalable permettrait d'exploiter au mieux leur potentiel de production. Une étude approfondie des dynamiques de production d'hydrogène et de métabolites et de la microbiologie du milieu réactionnel de tests de biomasses diverses en termes de natures et de composition et ayant des performances de production d'hydrogène variées a été présentée. Cette étude a montré qu'il y a plusieurs étapes dans la production d'hydrogène en bioréacteur semibatch, ce qui est cohérent avec des résultats récents rapportés dans la littérature. Il semblerait que des phénomènes d'inhibition du développement du genre *Clostridium* aient lieu pour les tests avec certaines biomasses, explicable par plusieurs hypothèses : inhibition par la teneur en polyphénols des biomasses ou par des bactéries lactiques (*Enterococcus*, *Lactococcus*). Dans deux études plus exploratoires, les effets de prétraitements physiques et enzymatiques sur deux biomasses ont été testés. Peu d'améliorations du potentiel de production de marcs de raisins ont été obtenus. La production et la mise en œuvre d'un cocktail enzymatique substrat spécifique des radicules d'orge a été testée sur cette même biomasse, générant une légère augmentation de la production en hydrogène (+26%, soit 0,64  $L_{H_2}/kg_{\text{biomasse}}$ ), sans optimisation des conditions de production du cocktail enzymatique ni des conditions de mise en œuvre du prétraitement, qui sont des perspectives de ces travaux, pour des biomasses riches en glucides complexes. Un autre mode de mise en œuvre de la biomasse ainsi saccharifiée serait l'utilisation en tant que substrat dans le BRM L/G, en mode de fonctionnement continu.

Enfin, lors des travaux du chapitre V, l'ensemencement du BRM L/G avec du digestat issu de la fermentation des bourbes a eu lieu avec succès, ainsi que son fonctionnement sans réensemencement avec cette même biomasse. Ce test a montré pour la première fois la faisabilité de la production d'hydrogène en BRM L/G en mode de fonctionnement continu à partir d'une biomasse remplissant à la fois le rôle d'*inoculum* et de substrat. Nous avons également observé que la diminution du TSH a favorisé une répartition plus homogène des communautés bactériennes sur toute la hauteur du module membranaire, améliorant l'exploitation de sa capacité volumique. De plus, l'étude a montré que son fonctionnement est possible à partir de deux autres biomasses (extrait de marcs de raisin, extrait de pellicules argentées de café). De façon

intéressante, il est à souligner l'absence d'ajout de soude pour le test utilisant les pellicules argentées de café. De bonnes performances ont été obtenues à partir des bourbes ( $4,1 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{j}$ ,  $86,8 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{DCO}}$ ). Les performances de cet *inoculum*, en comparaison avec un *inoculum* de boues de station de STEP, sont légèrement supérieures. Une piste d'amélioration pourrait être d'optimiser l'ensemencement du module membranaire en utilisant des bactéries très productrices d'hydrogène, mais seule la mise en œuvre expérimentale pourra dire si le *consortium* endogène au module membranaire émerge, comme ce fut le cas pour le test avec les bourbes et les pellicules argentées, ou si la biomasse a une action de sélection des bactéries émergentes, comme ce fut le cas pour les marcs de raisin.

Les perspectives de ce travail portent sur plusieurs points.

Une série d'améliorations technologiques du fonctionnement en BRM L/G sont encore à envisager. Le mode d'ensemencement du module membranaire peut encore être simplifié, soit en faisant fonctionner le BRM L/G en mode batch jusqu'à la mise en route de la production d'hydrogène, soit en l'alimentant directement en mode continu avec une biomasse. L'augmentation de la surface occupée par les fibres creuses permettrait une meilleure extraction des gaz produits et une stabilisation accrue des bactéries. L'ajout de base séparée de l'alimentation en substrat et située à différentes hauteurs du module membranaire permettrait une meilleure homogénéisation du milieu dans le module. Notons que le fonctionnement du bioréacteur sans ajout de base pourrait être testé, de même que l'application de différentes températures ou l'absence de chauffage, pour évaluer l'apport du chauffage du module membranaire.

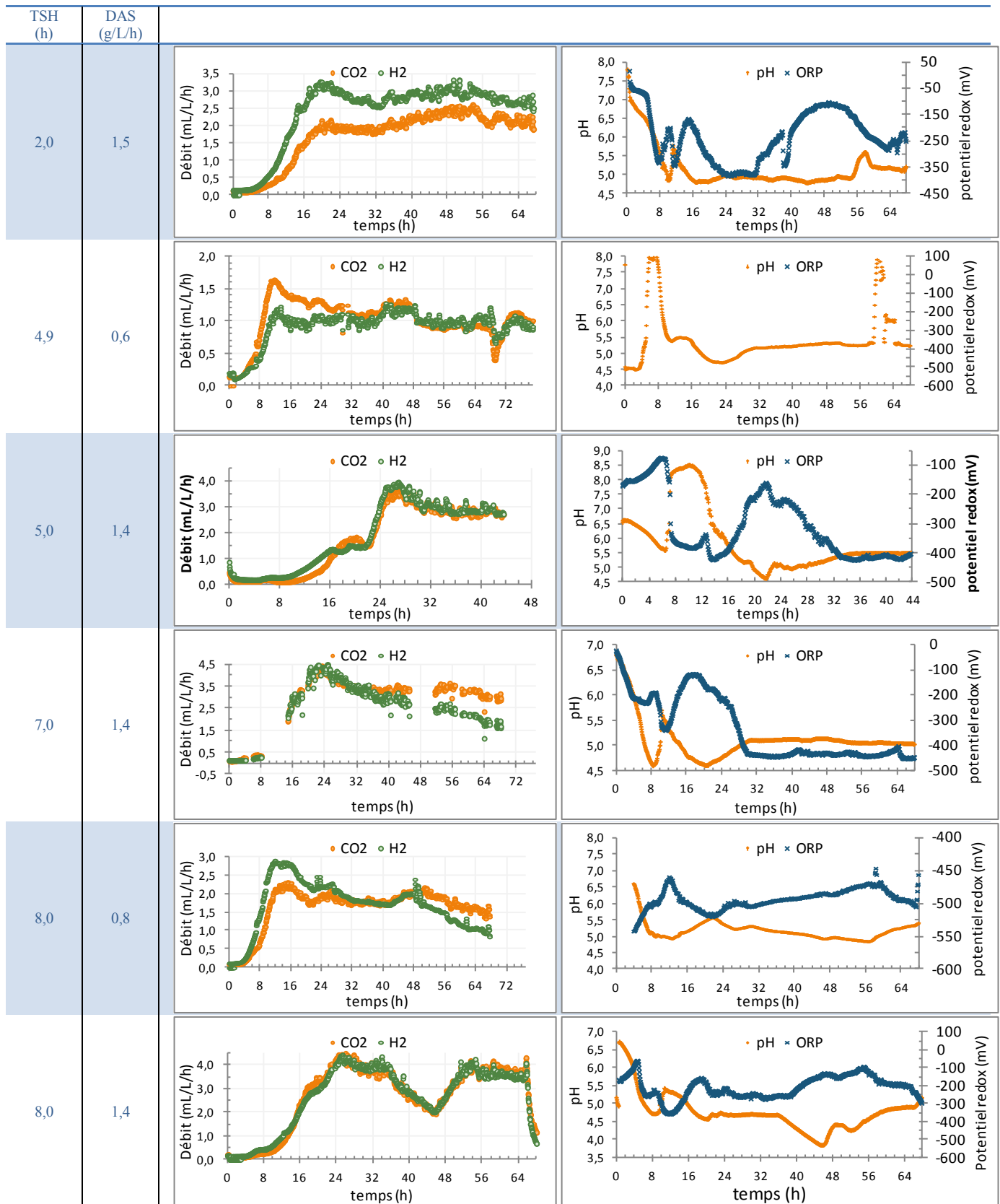
L'étude approfondie des performances de production d'hydrogène et de l'évolution des communautés bactériennes dans le module membranaire sur une période de temps plus longue apportera des informations précieuses, permettant de diminuer les opérations de réglage à effectuer sur le module membranaire tout en conservant une production maximale. Cette étude sera permise en automatisant la régulation du pH de l'effluent du module membranaire.

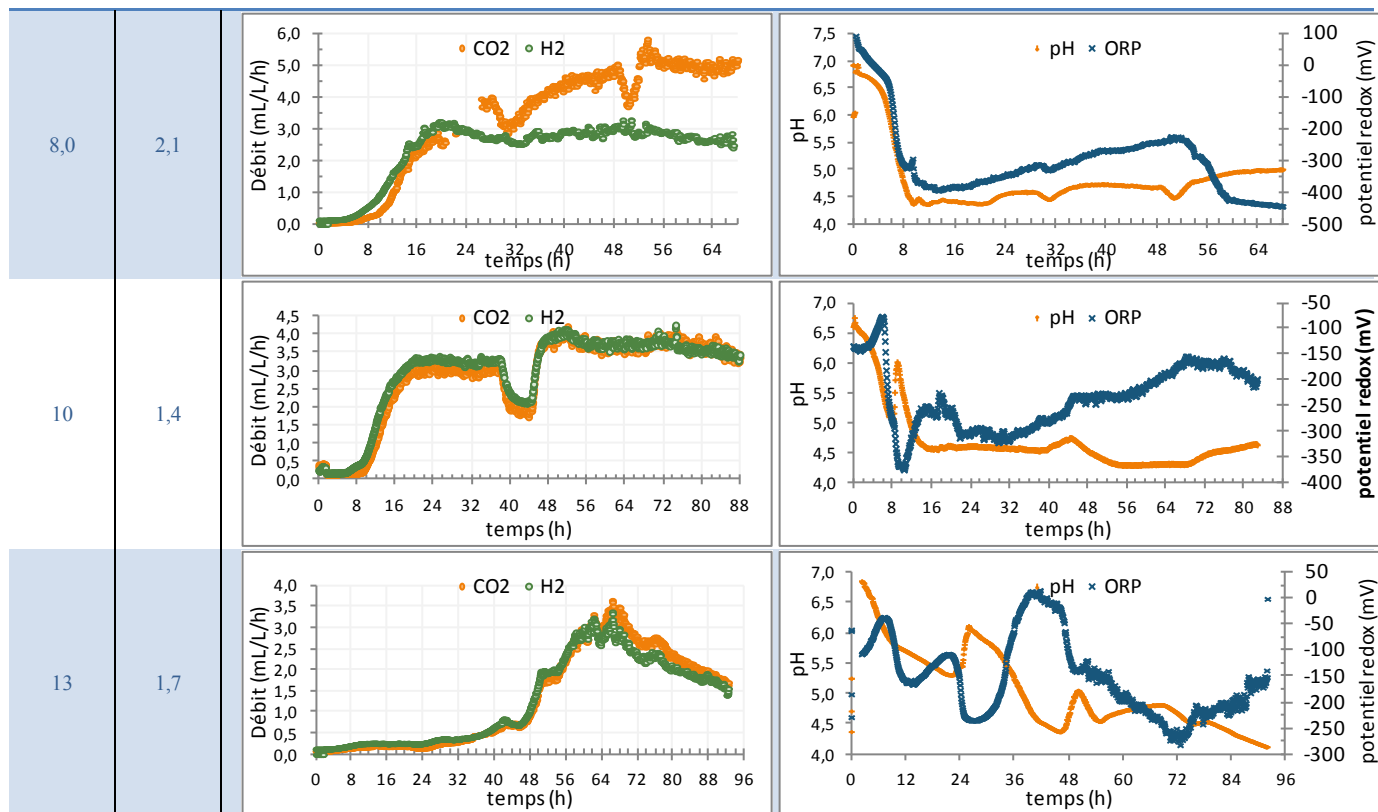
La compréhension des interactions bactériennes, trophiques et d'inhibition, lors du processus de fermentation obscure pourra être affinée, grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire tendant à être démocratisées ces dernières années.

Le mode de saccharification des biomasses lignocellulosiques, utilisant des cocktails enzymatiques substrat-spécifique, reste à explorer. La simplification, l'optimisation et l'étude de la mise en œuvre de cette technique pour la production de substrat pour le BRM L/G permettrait de maximiser l'exploitation de biomasses complexes avec des procédés biologiques ayant un faible impact environnemental.

Enfin, une montée en échelle du BRM L/G utilisant des biomasses saccharifiées semble être une étape incontournable du transfert de cette technologie de production d'hydrogène vert à l'industrie.

# Annexe





# Liste des figures

Figure 1 : Schéma de principe d'une pile à combustible à membrane échangeuse de protons (AFHYPAC, 2018) .....	17
Figure 2 : Exemples de véhicules utilisant l'hydrogène comme carburant .....	19
Figure 3 : Comparaison des matières premières de production d'hydrogène .....	23
Figure 4 : Répartition des déchets et coproduits agroalimentaires (a) et voies de valorisation (b) (en % de tonne de matières sèches) en 2016 (RESEDA, 2017) .....	31
Figure 5 : Procédé de production du vin blanc (adapté de François-Lopez, 2016) .....	32
Figure 6 : Procédé de production du malt (d'après Société MALTEUROP (2000) et une source industrielle) .....	33
Figure 7 : Procédé de production de bière (adapté de Faiveley, 2010) .....	33
Figure 8 : Schéma simplifié de la torréfaction du café vert (d'après Barrel, 2008) .....	34
Figure 9 : Possibilités de couplage du procédé de fermentation obscure avec divers procédés .....	35
Figure 10 : Voies générales de dégradation de la matière organique en conditions anaérobies (d'après Trably <i>et al.</i> , 2018) .....	37
Figure 11 : Exemple de cycle de sporulation : <i>Clostridium acetobutylicum</i> (Dürre, 2014) .....	40
Figure 12 : Formation d'un biofilm (Madigan <i>et al.</i> , 2012) .....	40
Figure 13 : Micrographies MEB de la structure poreuse de bioparticules productrices d'hydrogène (a) et morphologie bactérienne de la surface (b) (adapté de Zhang <i>et al.</i> , 2007) .....	41
Figure 14 : Voies de la glycolyse et génération de transporteurs d'électrons réduits (adapté de Akinterinwa et Cirino, 2010) .....	44
Figure 15 : Flux de carbone, flux d'électrons et génération d'hydrogène (adapté de Lo <i>et al.</i> , 2017 ; Cabrol <i>et al.</i> , 2017) .....	45
Figure 16 : Effet du pH et des acides gras sur les cellules bactériennes (adapté de Elbeshbishy <i>et al.</i> , 2017) .....	47
Figure 17 : Exemple de CSTR (adapté de Clion, 2016) .....	62
Figure 18 : Exemples de bioréacteurs à biomasse immobilisée (adapté de Muri <i>et al.</i> , 2018 ; Khan <i>et al.</i> , 2016, Barros <i>et al.</i> , 2010 ; Li <i>et al.</i> , 2018) .....	64
Figure 19 : Exemples de bioréacteurs membranaires (adapté de Park <i>et al.</i> , 2017 ; Lee <i>et al.</i> , 2014 ; Trad <i>et al.</i> , 2015 ; Bakonyi <i>et al.</i> , 2017 ; Clion, 2016) .....	66
Figure 20 : Gamme de développement de divers groupes microbiens selon le pH et le potentiel rédox .....	71
Figure 21 : Photographie (a) et schéma (b) du bioréacteur en configuration semibatch (adapté de Clion, 2016) .....	83
Figure 22 : Photographie et schéma de fonctionnement du BRM L/G dans les conditions de référence (adapté de Clion, 2016) .....	85
Figure 23 : Photographie du module membranaire avec circulation des fluides .....	86
Figure 24 : Schéma simplifié du fonctionnement du BRM sans gaz de balayage .....	87
Figure 25 : Schéma simplifié du fonctionnement du BRM avec des fibres creuses supplémentaires, sans gaz de balayage (cf chapitre III) (a) et avec gaz de balayage (cf chapitre V) (b) .....	87
Figure 26 : Configuration des tests sans réensemencement initial .....	98
Figure 27 : Production d'hydrogène, lors du dernier ensemencement et de 6 jours à 432 jours après le dernier ensemencement du module membranaire. Débits d'hydrogène (a), débits de CO <sub>2</sub> (b), pH (c), potentiel d'oxydoréduction (d). Pour les tests BRM-E*, BRM-418j et BRM-432j, le potentiel d'oxydoréduction n'a pas été enregistré .....	100
Figure 28 : Comparaison du débit de production des métabolites lors du régime pseudo-stable des tests de production d'hydrogène en BRM en fonction du temps écoulé depuis le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP. Pour BRM-365j, l'éthanol n'a pas été analysé .....	102
Figure 29 : Comparaison des bilans DCO lors du régime pseudo-stable des tests de production d'hydrogène en BRM en fonction du temps écoulé depuis le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP. Pour BRM-365j, l'éthanol n'a pas été analysé .....	103



Figure 30 : Répartition des <i>phyla</i> (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation des tests BRM-E* et BRM-418j à t = 68 h- Abondance >2% pour au moins un échantillon.....	105
Figure 31 : Débits de production d'hydrogène en fonction de la variation du débit de gaz de balayage, tests complets de 0 à 132 h (a) et de 25 à 80 h (b) .....	110
Figure 32 : Profil de production avec différents gaz de balayage (a) et suivi des pH correspondants (b), sans gaz de balayage (c) et suivi des pH correspondants (d) .....	112
Figure 33 : Distribution des métabolites produits et productivité totale en métabolites pour les tests avec balayage à l'azote, au CO <sub>2</sub> , ou avec une extraction libre des gaz .....	114
Figure 34 : Répartition des <i>phyla</i> (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation des tests avec différentes extractions des gaz (balayage N <sub>2</sub> et balayage CO <sub>2</sub> à 68 h, extraction libre à 53 h) - Abondance >2% pour au moins un échantillon .....	116
Figure 35 : Configuration du test BRM-551j-EL .....	120
Figure 36 : Profils de production d'H <sub>2</sub> et de CO <sub>2</sub> (a) et suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction. Test sans gaz de balayage, TSH = 13h, DAS = 0,8 g/L/h .....	121
Figure 37 : Débits de glucose et des métabolites majoritaires (acétate et de butyrate) (a), des métabolites minoritaires (b) et bilan DCO (c) lors du test de fermentation sans gaz de balayage (BRM-551j-EL) .....	122
Figure 38 : Micrographie d'une fibre PTFE avant test de fermentation en BRM (MEB x500) .....	123
Figure 39: Segments de fibre en différents points du module membranaire (haut, milieu et bas) et floccs à l'issue du test BRM-551J-EL. Fibre, partie haute du module. a :MEB 1000X, b : MEB 2500X . Fibre, partie centrale du module. c : MEB 500X , d : MEB 2500X . Fibre, partie basse du module. e : MEB 350X , f : MEB 1000X ). Flocc. g :MEB 100X, h : MEB 5000X .....	125
Figure 40 : Répartition des <i>phyla</i> (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation à différents temps de fermentation et à différents points du module membranaire à t = 96h pour le test BRM-551j-EL .....	128
Figure 41 : Corrélations entre la concentration en glucose dans le bioréacteur et le pourcentage de glucose consommé (a) et entre le pH du milieu réactionnel et le pourcentage de glucose consommé (b).....	134
Figure 42 Corrélations entre la concentration en glucose et le rendement en hydrogène .....	135
Figure 43 : Corrélations entre la productivité en hydrogène et le DAS pour différents TSH .....	135
Figure 44 : Corrélations entre le rapport molaire H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> et le TSH.....	136
Figure 45 : Bilans DCO avec différentes combinaisons TSH/DAS .....	137
Figure 46 : Débits de métabolites majoritaires (>0,1 mmol/L/h) et de glucose dans l'effluent du module membranaire avec différentes combinaisons TSH/DAS et corrélations entre la productivité en hydrogène et le débit de métabolites pour un TSH de 8 h (b), et entre le rapport molaire B/A et le DAS (c).....	138
Figure 47 : Corrélations entre la productivité en hydrogène et le débit acétate (a), entre la productivité en hydrogène et le débit butyrate (b), entre le rapport molaire B/A et le pH (c) et entre le rapport molaire B/A et la productivité en hydrogène (d). En bleu, les points exclus des corrélations. ....	139
Figure 48 : Corrélations DAS-N (a) et TSH-N (b).....	140
Figure 49 Répartition des <i>phyla</i> (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation des tests de fermentation à 68 h avec différentes combinaisons de TSH et DAS - Abondance >2% pour au moins un échantillon .....	141
Figure 50 : Corrélations identifiées entre la concentration en glucose et l'abondance des <i>taxa</i> et la concentration en glucose (a), l'abondance cumulée (S) et le rendement en hydrogène (R <sub>H2</sub> ) de <i>C. pasteurianum</i> , <i>C. beijerinckii/diolis</i> et <i>Enterobacter sp.</i> , <i>E. harbinense</i> (b).....	142
Figure 51 : Comparaison des performances de l'ensemble des tests ayant généré de l'hydrogène : production (L/kg) (a), productivité maximale (mL/L/h) (b), temps de latence (h) (c), rapport molaire H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (d).....	151
Figure 52 : Profils de production d'hydrogène et de CO <sub>2</sub> des bourbes (a), marcs (b), pellicules argentées (c), radicelles (d), levures industrielles (e), drèches industrielles (f), drèches de microbrasserie (g), kieselguhr (h) .....	156
Figure 53 : Evolution au cours de temps des concentrations en métabolites lors de la fermentation pour différentes biomasses : métabolites majoritaires (à gauche) et métabolites minoritaires (à droite) ...	158

Figure 54 : Comparaison des rendements de productions de métabolites par fermentation endogène à partir de bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki) .....	161
Figure 55 : Comparaison de la distribution des métabolites produits par fermentation endogène à partir de bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki).....	162
Figure 56 : ACP des tests de fermentation (a) et des variables de production (b) pour les biomasses bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki).....	164
Figure 57 : Analyse des matières sèches (a) et distribution des matières minérales et volatiles (b) des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki) .....	166
Figure 58: Dosages de la DCO (a) et des glucides solubles totaux (b) des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures (lei), drèches industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki) .....	166
Figure 59 : Analyse CHN (a) et rapport C/N (b) des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki) .....	167
Figure 60 : Analyse élémentaire des bourbes viticoles, marcs de raisin, pellicules argentées de café, radicules d'orge, levures brassicoles, drèches brassicoles industrielles, drèches de microbrasserie, kieselguhr brassicole .....	168
Figure 61 : Teneurs en glucides solubles (glucose, fructose, maltose), acides organiques, alcools initialement présents dans le milieu fermentaire pour les différentes biomasses .....	168
Figure 62 : Cluster selon la méthode de Ward (a) et ACP (b) des différentes biomasses : bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki).....	170
Figure 63 : ACP des variables environnementales des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki).....	171
Figure 64 : Clustering hiérarchique selon la méthode de Ward (a) et ACP couplée aux clusters de Ward (b) basés sur les distances euclidiennes des variables environnementales (sans C, H, N, Al, Fe, Si).....	172
Figure 65 : ACP avec la composition de la biomasse et les données de production (a) et des biomasses (b) pour les biomasses bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm). Ajout de « _p » lorsque le métabolite est produit lors de la fermentation .....	174
Figure 66 : Clustering hiérarchique selon la méthode de Ward (a) et ACP couplée aux clusters de Ward (b) basés sur les distances euclidiennes des profils des communautés bactériennes des biomasses avant et à t = 24 h de fermentation des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (ra), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm), kieselguhr brassicole (ki) .....	176
Figure 67 : Profils bactériens des biomasses brutes (à gauche), <i>phylum</i> (a) et genre(c), et du milieu réactionnel des tests à t = 24 h (à droite) <i>phylum</i> (b) et genre (d) .....	178
Figure 68 : Nombre de copies des genres bactériens majoritaires à 24 h de test des échantillons bactériens issus de la fermentation des bourbes viticoles (bo), marcs de raisin (ma), pellicules argentées de café (pa), radicules d'orge (rd), levures brassicoles (lei), drèches brassicoles industrielles (dri), drèches de microbrasserie (drm) .....	182
Figure 69 : ACP basée sur les distances de Hellinger des variables (biomasses, production et <i>taxa</i> ) à t = 24 h de fermentation .....	184
Figure 70 : Concentration en glucides solubles pour différentes conditions d'hydrolyse par la cellulase de <i>T. reesei</i> à t=1h des différentes hydrolyses des marcs de raisin .....	192

Figure 71 : Profils de production de biohydrogène (a) et volumes cumulés (b) des marcs récoltés en 2015 prétraités par broyage et ultrasonication, profils de production de biohydrogène (c) et volumes cumulés (d) des marcs récoltés en 2016 prétraités thermiquement et/ou par voie enzymatique. ....	193
Figure 72 : Activités enzymatiques cumulées (cellulase (CE), arabinoxylanase (AX), xylanase (XY) et xyloglucanase (XG)) (a) et répartition des activités enzymatiques (b) des cocktails crus d'enzymes	200
Figure 73 : Comparaison des productions d'enzyme à petite échelle (OA et CM) et grande échelle (OAg et CMg).....	201
Figure 74 : Quantité de glucose après 7h d'hydrolyse selon différentes conditions de température, de quantité d'enzymes et de masse de radicelles.....	202
Figure 75 : Effet du traitement enzymatique à 55°C sur des radicelles humides broyées ou non : évolution de la concentration en glucose en fonction du temps.....	203
Figure 76 : Débit de production d'hydrogène (a) et volume d'hydrogène cumulé (b) en bioréacteur semibatch avec ou sans traitement enzymatique simultané .....	204
Figure 77 : Profils de production de gaz (a), pH et potentiel d'oxydoréduction (b) du test BRM-EB.....	211
Figure 78 : Evolution de la concentration des glucides (glucose et fructose) et de tartrate (a), et des productivités de métabolites majoritaires (b) et minoritaires (c) du test BRM-EB.....	213
Figure 79 : Bilan DCO du test d'ensemencement module membranaire avec du digestat de bourbes.....	214
Figure 80 : Micrographies MEB de la fibre supplémentaire du test BRM-EB : haut de la fibre (a) : x100 (1), x1000 (2 et 3), x5000 (4) ; milieu de la fibre (b) : x50 (1), x500 (2), x1000 (3), x5000(4) ; bas de la fibre (c) : x100(1), x1000(2), x500(3), x5000(4).....	215
Figure 81 : Micrographies MEB des granules collectés en fin de test BRM-EB : structure compacte (a) 200x (1) et 5000x (2), structure peu dense (b) 500x (1) et 5000x (2).....	217
Figure 82 : Répartition des phyla (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux de différents échantillons de fermentation du test d'ensemencement du module membranaire avec du digestat des bourbes : effluent à différents temps de fermentation (96 h, 149 h et 235 h), surface des fibres en fin de test (bas et haut du module), floc en fin de test - Abondance > 2% pour au moins un échantillon	221
Figure 83 : Comparaison de la production d'hydrogène (a et c) et de l'évolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction (b et d) des tests avec ensemencement boues de STEP (BRM-STEP) ou digestat de fermentation de bourbes (BRM-B) avec une alimentation en substrat modèle.....	227
Figure 84 : Evolutions des concentrations de glucides et des productivités de métabolites majoritaires et minoritaires des tests avec ensemencement avec des boues de STEP (BRM-STEP) (BRM-B) (respectivement a, b et c) et du digestat de bourbes (respectivement d, e et f).....	228
Figure 85 : Analyse des matières sèches (MS) (a), distribution des matières volatiles (MV) et des matières inorganiques (Mi) (b) et DCO (c) de l'extrait de marcs broyés (EMB), de l'extrait de pellicules argentées (EPA) et des bourbes diluées (B).....	231
Figure 86 : Comparaison des répartitions des micronutriments majoritaires de l'extrait de marcs broyés (EMB) (a), de l'extrait de pellicules argentées (EPA) (b) et des bourbes diluées (B) (c).....	232
Figure 87 : Principaux micronutriments de l'extrait de marcs broyés (EMB), de l'extrait de pellicules argentées (EPA) et des bourbes diluées (B).....	232
Figure 88 : Comparaison des productivités en hydrogène et en CO <sub>2</sub> du BRM (a, b et c), ainsi que du suivi du pH et du potentiel d'oxydoréduction (d, e et f) avec différents substrats : bourbes diluées (BRM-B) (a et d), extrait de pellicules argentées (BRM-EPA) (b et e) et extrait de marcs broyés (BRM-EMB) (c et f).....	233
Figure 89 : Evolution de la concentration en glucides et en tartrate et des productivités de métabolites majoritaires et minoritaires des tests BRM-B (a, d et g), BRM- EPA (b, e et h) et BRM- B (c, f et i).....	235
Figure 90 : Répartition des <i>phyla</i> (a), familles (b) et genres (c) bactériens principaux des échantillons de fermentation du BRM ensemencé avec du digestat de fermentation de bourbes et alimenté avec l'EMB, l'EPA) ou B - Abondance > 2% pour au moins un échantillon.....	237

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de projets hydrogène en France .....	18
Tableau 2 : Modes de production d'hydrogène (adapté de Demirci et Miele, 2010).....	22
Tableau 3 : Classification des gisements de biomasses en fonction de leur provenance (adapté de Megret <i>et al.</i> , 2015).....	29
Tableau 4 : Réactions principales du métabolisme microbien lié à la production d'hydrogène .....	48
Tableau 5 : Prétraitements pour l'hydrolyse de biomasses lignocellulosiques (d'après Kumar <i>et al.</i> , 2017) .....	57
Tableau 6 : Exemples de bioréacteurs membranaires en fermentation obscure : objectifs de la séparation membranaire, conditions opératoires et performances .....	67
Tableau 7 : Pilotes de fermentation obscure .....	75
Tableau 8 : Exemples de stratégies de diminution de la pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel .....	96
Tableau 9 : Conditions des tests suivant le dernier réensemencement du module membranaire .....	99
Tableau 10 : Consommation du substrat, rendement en hydrogène par rapport à la quantité de glucose ajoutée et à la quantité de glucose consommée, productivité en hydrogène, rapport H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , en fonction du temps écoulé depuis le dernier ensemencement du module membranaire avec des boues de STEP traitées thermiquement.....	101
Tableau 11 : Paramètres des échantillons analysés par séquençage, tests BRM-E* et le BRM-418j, à t=68h ...	104
Tableau 12 : Comparaison des performances de bioréacteurs membranaires de production d'hydrogène par fermentation obscure avec extraction d'inhibiteurs de la fermentation obscure (hydrogène ou AGV) et découplage TSS/TSH .....	107
Tableau 13 : Performances de production d'hydrogène avec différents débits de gaz de balayage .....	110
Tableau 14 : Performances de production avec balayage N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , dégazage N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> et extraction libre.....	113
Tableau 15 : Diversité des échantillons analysés par séquençage, tests BRM-432j-N <sub>2</sub> , BRM-439j-CO <sub>2</sub> , BRM-551j-EL.....	115
Tableau 16 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des test avec différentes extractions des gaz (balayage N <sub>2</sub> , balayage CO <sub>2</sub> , extraction libre) Abondance >1% pour au moins un échantillon.....	118
Tableau 17 : Diversité et abondance bactérienne des échantillons analysés par séquençage et qPCR à différents temps de fermentation et différentes zones du module membranaire à t = 96h pour le test BRM-551j-EL .....	126
Tableau 18 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons du test BRM-551j-EL sans gaz de balayage - Abondance >1% pour au moins un échantillon .....	129
Tableau 19 : Performances moyennes de production d'hydrogène pour différentes combinaisons de TSH et de DAS.....	134
Tableau 20 : Diversité bactérienne des échantillons avec différents TSH/DAS analysés par séquençage et qPCR .....	140
Tableau 21 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des tests avec différentes combinaisons DAS/TSH - Abondance >1% pour au moins un échantillon .....	143
Tableau 22 : Origine et tonnages de production en France des biomasses de notre étude (IVV, 2013 ; sources industrielles) .....	148
Tableau 23 : Paramètres des tests de fermentation.....	150
Tableau 24 : Récapitulatif des biomasses testées pour la production d'H <sub>2</sub> par fermentation obscure .....	150
Tableau 25 : Estimation du potentiel de production d'hydrogène des biomasses testées .....	153
Tableau 26 : Comparaison des performances de nos tests avec celles issues de la littérature .....	154
Tableau 27 : Productions, rendements DCO, rapports H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> générés par les différentes biomasses .....	157
Tableau 28 : Diversité bactérienne, analysés par séquençage pour les échantillons des différentes biomasses brutes et à t = 24 h de fermentation, abondance bactérienne à t = 24 h, analysée par qPCR.....	177
Tableau 29 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des tests de différentes biomasses en bioréacteur semibatch à t = 24 h - Abondance >1% pour au moins un échantillon.....	181
Tableau 30 : Comparaison des productions d'hydrogène des marcs 2015 et 2016 sans prétraitement et avec des prétraitements physiques et enzymatiques.....	194

Tableau 31 : Combinaisons souches fongiques/biomasses testées pour la production de cocktails enzymatiques par fermentation en milieu solide (FMS). Le code « biomasse x solution de spores fongiques » a été utilisé pour nommer les cocktails enzymatiques obtenus.....	197
Tableau 32 : Croissance des souches de champignons après 5 jours de culture en FMS.....	198
Tableau 33: Productions d'hydrogène avec et sans cocktail enzymatique.....	205
Tableau 34 : Conditions de mise en œuvre du test BRM-EB.....	211
Tableau 35 : Performances de production d'hydrogène du test BRM-EB.....	212
Tableau 36 : Diversité et richesse des échantillons du test BRM-EB à différents temps de fermentation et localisations dans le module membranaire, analysés par séquençage et qPCR.....	218
Tableau 37 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons du test de fermentation du BRM ensemencé avec du digestat de fermentation de bourbes Abondance >1% pour au moins un échantillon.....	222
Tableau 38: Comparaison des performances de production d'hydrogène du BRM L/G et du bioréacteur semibatch en utilisant des bourbes comme substrat et <i>inoculum</i> .....	223
Tableau 39 : Exemples de systèmes de production intégrant des membranes avec des biomasses réelles.....	224
Tableau 40 : Performances de production d'hydrogène en BRM inoculé soit avec des boues de STEP, soit avec du digestat de fermentation des bourbes.....	227
Tableau 41 : Comparaison des performances de production du BRM avec différents substrats : extrait de marc de raisin broyé, extrait de pellicules argentées de café, bourbes diluées.....	234
Tableau 42 : Diversité et richesse des échantillons des tests BRM-B, BRM-EPA et BRM-EMB analysés par séquençage.....	236
Tableau 43 : Résultats obtenus par séquençage des échantillons des tests avec différentes biomasses - Abondance >1% pour au moins un échantillon - code couleur.....	239
Tableau 44 : Comparaison des performances de production en semibatch et BRM L/G avec les biomasses bourbes, marcs de raisin et pellicules argentées de café.....	240

# Bibliographie

- Abbasi T., Abbasi S.A., 2012. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Renew Sust Enrg Rev*, 16 (3), pp: 1696-1708.
- Abdalla A. M., 2018. Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. *Energy Convers Manage*, 165, pp : 602-627
- Adams M. W., 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *BBA-Bioenergetics*, 1020, pp: 115-45.
- Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), 2016a. L'hydrogène dans la transition énergétique.
- Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), 2016b. Gérer les déchets organiques sur un territoire. Fiche technique. 2016 Août (mise à jour) 2014 Février.
- Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), 2017. Actualisation du scénario énergie-climat. ADEME 2035-2050. *ADEME Éditions*, Octobre 2017
- Akinterinwa O., Cirino P. C., 2010. Catabolism and Metabolic Fueling Processes. *The metabolic pathway engineering handbook*. Edited by Christina D. Smolke. *CRC Press, Boca Raton*
- Alliance Nationale de Coordination de la Recherche pour l'Energie (ANCRE). Scénarios de l'ANCRE pour la transition énergétique - Rapport 2013
- Aimar P., Daufin G., 2004. Séparations par membrane dans l'industrie alimentaire. *Techniques de l'ingénieur*, 2(F3250)
- Alves R. C., Rodrigues F., Nunes M. A., Oliveira M. B. P. P., 2017. Chapter 1 - State of the art in coffee processing by-products, Handbook of Coffee Processing By-Products. *Sustainable Applications*, pp : 1-26
- Amos W. A., 2004. Biological Water-Gas Shift Conversion of Carbon Monoxide to Hydrogen Milestone Completion Report. *NREL/MP-560-35592 National Renewable Energy Laboratory*
- An S.-Q. et Gerg G., 2018. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends Microbiol.* 26, 7, pp: 637-638
- Anburajan P., Park, J.-H., Sivagurunathan P., Pugazhendhi A., Kumar G., Choi C.-S., Kim S.-H., 2017. Mixed-culture H<sub>2</sub> fermentation performance and the relation between microbial community composition and hydraulic retention times for a fixed bed reactor fed with galactose/glucose mixtures. *J Biosci Bioeng.* 124(3), pp: 339-345
- Andersen B., Poulsen R., Hansen G.H., 2016. Cellulolytic and xylanolytic activities of common indoor fungi. *Int Biodeter Biodegr*, 107, pp : 111-116
- Angelidaki I. et Sanders W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 3, pp : 117-129.
- Arimi M. M., Knodel J., Kiprop A., Namango S. S., Zhang Y., Geißens S.-U., 2015. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass Bioenerg*, 75, pp : 101-118
- Association Française pour l'HYdrogène et les Piles A Combustible (AFHYPAC), 2016. Production et consommation d'hydrogène aujourd'hui.
- Association Française pour l'HYdrogène et les Piles A Combustible (AFHYPAC), 2017. L'hydrogène, une réalité dans les territoires. Juin 2017.
- Association Française pour l'HYdrogène et les Piles A Combustible (AFHYPAC), 2018. <http://www.afhypac.org/mobilite-hydrogene-france/>
- Association Française pour l'HYdrogène et les Piles A Combustible (AFHYPAC), 2018. Fiches « Tout savoir sur... » <http://www.afhypac.org/documentation/tout-savoir/>
- Asunis F., De Gioannis G., Isipato M., Muntoni A., Poletini A., Pomi R., Rossi A., Spiga D., 2019. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Biores Technol*, 289
- Ates G., Elmaci Y., 2018. Coffee silverskin as fat replacer in cake formulations and its effect on physical, chemical and sensory attributes of cake. *LWT-Food Sci Technol*, 90, pp : 519-525
- Badieï M., Jahim J. M., Anuar N., Abdullah S. R. S., 2011. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production from palm oil mill effluent in anaerobic sequencing batch reactor. *Int J Hydrogen Energ*, 36, pp : 5912-5919
- Baghchehsaraee B., Nakhla G., Karamanev D., Margaritis A., 2009. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energ*, 34, pp : 2573-2579
- Bakonyi P., Kumar G., Nemestóthy N., Lin C.Y., Bélafi-Bakó K., 2013. Biohydrogen purification using a commercial polyimide membrane module: studying the effects of some process variables. *Int J Hydrogen Energ*, 38, pp : 15092-15099
- Bakonyi P., Nemestóthy N., Lank J., Rivera I., Buitr G., Belafi-Bako K., 2015. Simultaneous biohydrogen production and purification in a double membrane bioreactor system. *Int J Hydrogen Energ*, 40, pp : 1690-1697
- Bakonyi P., Buitrón G., Nemestóthy N., Valdez-Vasquez I., Bélafi-Bakó K., 2017. A novel gas separation integrated membrane bioreactor to evaluate the impact of self-generated biogas recycling on continuous hydrogen fermentation. *Appl Energy*, 190, pp : 813-823
- Ballesteros L. F., Teixeira J. A., Mussatto S. I., 2014. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), pp : 3493-3503
- Bando Y., Fujimoto N., Suzuki M., Ohnishi A., 2013. A microbiological study of biohydrogen production from beer lees. *Int J Hydrogen Energ*, 38, pp : 2709-2718
- Banu J.R., Kannah R.Y., Kumar M.D., Gunasekaran M., Sivagurunathan P., Park J.H., Kumar G., 2018. Recent advances on biogranules formation in dark hydrogen fermentation system: Mechanism of formation and microbial characteristics. *Biores Technol*, 268, pp : 787-796

- Bao M.D., Su H.J., Tan T.W., 2013. Dark fermentative bio-hydrogen production: effects of substrate pre-treatment and addition of metal ions or L-cysteine. *Fuel*, 112, pp : 38–44.
- Barca C., Soric A., Ranava D., Giudici-Orticoni M.-T., Ferrasse J.-H., 2015. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. *Biores Technol*, 185, pp : 386-398
- Barrel M., 2008. Café: de la cerise à la tasse. *Techniques de l'Ingénieur*
- Barros A. R., Cavalcante de Amorim E. L., Reis C. M., Shida G. M., Silva E. L., 2010. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *Int J Hydrogen Energ*, 35, 3379–3388
- Battista F., Mancini G., Ruggeri B., Fino D., 2016. Selection of the best pretreatment for hydrogen and bioethanol production from olive oil waste products. *Renew Energ*, 88, pp : 401-407
- Bauer F., Coenen L., Hansen T., McCormick K., Voytenko Palgan Y., 2017. Technological innovation systems for biorefineries: a review of the literature. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 11(3), pp : 534-548
- Belafi-Bakó K., Búcsú D., Bálint B., Herbel Z., Kovács K. L., Wessling M., 2006. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *Int J Hydrogen Energ*, 31, pp : 1490–1495
- Beres C., Costa G.N.S., Cabezudo I., Silva-James N.K., Teles A.S.C., Cruz A.P.G., Mellinger-Silva C., Tonon R.V., Cabral L.M.C., Freitas S.P., 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process : A review. *Waste Manage*, 68, pp : 581-594
- Bernier J.-C., 2014. Et revoilà l'hydrogène. *L'actualité chimique*, 386, pp : 5-6
- Bettayeb K., 2017. Les ambitions de la voiture à hydrogène. *CNRS Le journal*, 228, pp : 46-47
- Blanco V. M. C., Fuess L. T., Zaiat M., 2017. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. *Int J Hydrogen Energ*, 42, (17), pp : 12181-12196
- Blanco V.M.C., Oliveira H.H.D, Zaiat M., 2019. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor : Performance evaluation and kinetic modeling. *Renew Energ*, 139, pp : 1310-1319
- Bosma E. F., Koehorst J. J., van Hijum S. A., Renckens B., Vriesendorp B., van de Weijer A. H., van Kranenburg R., 2016. Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii* type strain DSM 4216 T. *Standards in genomic sciences*, 11, pp : 52
- Boyer, C. 2012. Hydrogène. *Techniques de l'Ingénieur*, J 6, pp : 368
- Buffet P., 2001. Propulsion spatiale : l'hydrogène, un carburant léger pour lanceurs lourds. *L'actualité chimique*, 252, pp : 74-80
- Bundhoo M. Z., Mohee R., Hassan M. A., 2015. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review. *J Environ Manage*, 157, pp : 20-48
- Cabrol L., Marone A., Tapia-Venegas E., Steyer J.-P., Ruiz-Filippi G., Trably E., 2017. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiol Rev*, 41, pp : 158–181
- Cao X. Y. et Zhao Y. C., 2009. The influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation. *J Mater Cycles Waste*, 11, pp : 244–50.
- Cavinato C., Giuliano A., Bolzonella D., Pavan P., Cecchi F. 2012. Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: a long-term pilot scale experience. *Int J Hydrogen Energ*, 37, pp : 11549-11555
- CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique), 2016. Mémento sur l'énergie.
- Chang A.C.C., Tu Y.-H., Huang M.-H., Lay C.-H., Lin C.-Y., 2011. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *Int J Hydrogen Energ*, 36(21), pp : 14280-14288
- Chatellard L., Trably E., Carrère H., 2016. The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Biores Technol*, 221, pp : 541–549
- Chen H., Chang S., Guo Q., Hong Y., Wu P., 2016. Brewery wastewater treatment using an anaerobic membrane bioreactor. *Biochem Eng J*, 105, pp : 321-331
- Chen R., Jiang H., Li Y.Y., 2018. Caffeine degradation by methanogenesis: Efficiency in anaerobic membrane bioreactor and analysis of kinetic behavior. *Chem Eng J*, 334, pp : 444-452
- Cheng X.-Y., Liu C.-Z., 2012. Fungal pretreatment enhances hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstark. *Appl Energ*, 91(1), pp : 1-6
- Clark D. P., Cronan J. E., 2005. Two carbon compounds and fatty acids as carbon sources. *EcoSal Plus*, 1(2). doi: 10.1128/ecosalplus.3.4.4.
- Clion V., 2016. Production d'hydrogène par fermentation obscure : intensification du procédé par extraction des gaz et développement d'un bioréacteur à membranes. *Université de Strasbourg*. Thèse.
- Clion V., Dumas C., Collin S., Ernst B., 2015. Key factors for biohydrogen production by dark fermentation. *Can. J. Chem. Eng.*, 93(2), pp : 309-16
- Cofré O., Ramírez M., Gómez J. M., Cantero D., 2016. Pilot scale fed-batch fermentation in a closed loop mixed reactor for the biotransformation of crude glycerol into ethanol and hydrogen by *Escherichia coli* MG1655. *Biomass and Bioenergy*, 91, pp : 37-47
- Contreras-Dávila C. A., Méndez-Acosta H. O., Arellano-García L., Alatrisme-Mondragón F., Razo-Flores E., 2017. Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chem Eng J*, 313, pp : 671-679
- Costa A. S. G., Alves R. C., Vinha A. F., Costa E., Costa C. S. G., Nunes M. A., Almeida A. A., Santos-Silva A., Oliveira B. P. P., 2017. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chem*, 267, pp : 28-35
- Cui M., Yuan Z., Zhi X., Shen J., 2009. Optimization of biohydrogen production from beer lees using anaerobic mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 34(19), pp : 7971-7978
- Cui M., Yuan Z., Zhi X., Wei L., Shen J., 2010. Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 35, pp : 4041-4047
- Del Pilar Anzola-Rojas M., Zaiat M., De Wever H., 2015. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. *Bioresour Technol*, 202, pp : 42-49

- Delville E., Prinzhofer A., 2015. Hydrogène naturel. La prochaine révolution énergétique ? Une énergie inépuisable et non polluante. *Belin Collection essais*
- Demirci U.B., Miele P., 2010. Les méthodes de production d'hydrogène sont-elles vertes ? *L'actualité chimique*, 341, pp : 5-12
- Deutscher J., 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 11(2), pp : 87-93
- Ding L., Cheng J., Lu H., Yue L., Zhou J., Cen K. *et al.*, 2017 Three-stage gaseous biofuel production combining dark hydrogen, photo hydrogen, and methane fermentation using wet *Arthrospira platensis* cultivated under high CO<sub>2</sub> and sodium stress. *Energ. Convers. Manage.*, 148, pp : 394-404
- Dormont D., 2000. Rapport du groupe de travail « alimentation animale et sécurité sanitaire des aliments ». *Agence française de sécurité sanitaire des aliments*.
- Dos Santos Mathias T.R., de Melho P. P. M., Servulo E. F. C., 2014. Solid wastes in brewing process. *J. Brew. Distilling*, 5(1), pp : 1-9.
- Dos Santos Polidoro A., Scapin E., Lazzari E., Silva A. N., Loreiro dos Santos A., Bastos Camarao E., Jacques R. A., 2018. Valorisation of coffee silverskin industrial waste by pyrolysis: from optimization of bio-oil production to chemical characterization by GC x GC/qMS. *J Anal Appl Pyrol*, 129, pp : 43-52
- Duda-Chodak A., Tarko T., Satora P., Sroka P., 2015. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr*, 54(3), pp : 325-341.
- Dumergues L., Favier B., Alvaro Claver R., 2014. Les filières de valorisation du CO<sub>2</sub>. Etat de l'art et avis d'experts. Cas des activités de traitement et valorisation des déchets, *RECORD* 246, 12-0237/1A
- Dupre J. Y., Rodriguez O. Y., 2013. Method for producing hydrocarbides. *US Patent US20160068866A1*.
- Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D., 2016. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems. *Front Microbiol*, 7, pp : 461
- Elbeshbishy E., Dhar B. R., Nakhla G., Lee H.-S., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew Sust Energ Rev*, 79, pp : 656-668
- Elsharnouby O., Hafez H., Nakhlaac G., El Naggara M. H., 2013. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures *Int J Hydrogen Energy*, 38(12), pp : 4945-4966
- Ernst B., Gougeon R., François-Lopez E., Dumas C., Vuilleumier S., Alexandre H., 2016. Method for producing hydrogen by means of dark fermentation from biomass from the wine-producing industry, without using a microbial consortium. *Brevet FR2015/052256*.
- Ernst, B., Gougeon, R., François-Lopez, E., Dumas, C., Vuilleumier, S., Alexandre, H. 2014. Procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure à partir de biomasses issues de la filière vitivinicole, sans apport de consortium microbien. *Brevet européen du 25/08/14 EP15760224.4*
- Ernst, B., Clion, V., Dumas, C. 2015. Dispositif de production d'hydrogène. Brevet d'invention BNT219799FR00 du 25/09/15. *Brevet français du 25/09/15 n°3041657*.
- Eroglu E. et Melis A., 2011. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresour Technol*, 102(18), pp : 8403-8413
- Etchebehere C., Castelló E., Wenzel J., del Pilar Anzola-Rojas M., Borzacconi L., Buitrón G., Fuentes L., 2016. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), pp : 3371-3384
- Faiveley M., 2010. Fabrication des bières. *Techniques de l'ingénieur*. Réf : f6205
- Fang H. H., Liu H., 2002a. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Biores Technol*, 82(1), pp : 87-93
- Fang H.H.P., Liu H., Zhang T., 2002b. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.*, 78(1) pp : 44-52
- FAOSTAT, 2017. [En ligne le 27/09/2018] <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Farinas C. S., 2015. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew Sust Energ Rev*, 52, pp : 179-188
- Fernandez-Gomez B., Lezama A., Amigo-Benavent M., Ullate M., Herrero M., Martin M. A., Mesa M. D., Del Castillo D., 2016. Insights on the health benefits of the bioactive compounds of coffee silverskin extract. *J Funct Foods*, 25, pp : 197-207.
- França Passos (de) D., Pereira Jr N., de Castro A. M., 2018. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, pp : 60-66
- François-Lopez E., 2016. Production de biohydrogène par fermentation obscure: potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne. *Université de Strasbourg*. Thèse.
- Fu L., Ding J., Lu Y.Z., Ding Z.W., Bai Y.N., Zeng R.J., 2017. Hollow fiber membrane bioreactor affects microbial community and morphology of the DAMO and Anammox co-culture system. *Biores Technol*, 232, pp : 247-253
- Fuess L.T., Ferraz Junior A.D.N., Machado C.B., Zaiat M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation : The key role of lactate. *Biores Technol*, 2018, pp : 426-433
- Gadhamshetty V., Johnson D. C., Nirmalakhandan N., Smith G.B., Deng S. 2009. Feasibility of biohydrogen production at low temperatures in unbuffered reactors. *Int J Hydrogen Energy*, 34(3), pp : 1233-1243
- García-Depraect O., Valdez-Vázquez I., Rene E. R., Gómez-Romero J., López-López A., León-Becerril E., 2019. Lactate-and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Biores Technol*, 282, pp : 236-244
- Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably E., Escudie R., Lens P.N.L., Esposito G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy*, 144, pp : 73-95
- Gibson A. M., Bratchell N., Robertz T. A., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int J Food Microbiol*, 6(2), pp :155-78
- Goldammer T., 2008. Wastewater and Solid Waste Management. *Brew. Handb. Second Edition, Apex Publishers*, pp : 496



- Gomes S.D., Fuess L.T., Mañunga T., de Lima Gomes P.C.F., Zaiat M., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *Int J Hydrogen Energy*, 41 pp : 8120-8131
- González-Fernández R., Aloria K., Valero-Galván J., Redondo I., Arizmendi J. M., Jorrín-Novo J. V., 2014. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *Journal of proteomics*, 97, pp : 195-221
- Gottardo M., Micolucci F., Bolzonella D., Uellendahl H., Pavan P., 2017. Pilot scale fermentation coupled with anaerobic digestion of food waste-effect of dynamic digestate recirculation. *Renew Energy*, 114, pp : 455-463
- Gou CY, Guo JB, Lian J, Guo YK, Jiang ZS, Yue L, Yang JL., 2015. Characteristics and kinetics of biohydrogen production with Ni<sup>2+</sup> using hydrogen-producing bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 40(1), pp : 161-167
- Guo X. M., Trably E., Latrille E., Carrère H., Steyer J.-P., 2014. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *Int J Hydrogen Energy*, 39(14), pp : 7476-7485
- Guwy A. J., Dinsdale R. M., Kim J. R., Massanet-Nicolau J., Premier G., 2011. Fermentative biohydrogen production systems integration. *Biores technol*, 102(18), pp :8534-8542
- Halan B., Buehler, Schmid A., 2012. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol*, 30(9), pp : 453-465
- Hallenbeck P. C. et Benneman J. R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*, 27(11-12), pp : 1185-1193
- Hamilton C., Calusinska M., Baptiste S., Masset J., Beckers L., Thonart P., Hiligsmann S., 2018. Effect of the nitrogen source on the hydrogen production metabolism and hydrogenases of *Clostridium butyricum* CWB11009. *Int J Hydrogen Energy*, 43(11), pp : 5451-5462
- Han W., Ye M., Zhu, A. J., Huang J. G., Li Y. F., 2016. A combined bioprocess based on solid-state fermentation for dark fermentative hydrogen production from food waste. *J Clean Prod*, 12(5), pp : 3744-3749
- Hawkes F., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R., Hawkes D., 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrog. Energy*, 32(2) 172-84.
- Hellinger E, 1909. Neue Begründung der Theorie quadratischer Formen von unendlichvielen Veränderlichen. *J Reine Angew Math*, 136, pp : 210-271
- Hung C. H., Chang Y. T., Chang Y. J., 2011a. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems—a review. *Biores Technol*, 102(18), pp : 8437-8444
- Hung C. H., Cheng C. H., Guan D. W., Wang S. T., Hsu S. C., Liang C. M., Lin C. Y., 2011b. Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a selfformed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*, 36, pp : 8704–8711.
- Hungate R. E., 1974. Potentials and limitations of microbial methanogenesis. *ASM News* 40, pp : 833-838
- Hwang J.-H., Choi J.-A., Abou-Shanab R.A.I., Min B., Song H., Kim Y., Lee E.S., Jeon B.-H., 2011. Feasibility of hydrogen production from ripened fruits by a combined two-stage (dark/dark) fermentation system. *Biores Technol*, 102, pp : 1051-1058
- Hydrogen Council, 2017. Hydrogen scaling up. A sustainable pathway for the global energy transition. *Hydrogen Council*
- HyTIME project 2015. Low temperature hydrogen production from second generation biomass project. *Hydrogen Europe*
- IFPEN, 2015. Biocarburants de deuxième génération : une nouvelle étape est franchie. Panorama 2015
- IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin), 2013. Marcs de raisins, lies de vin et bourbes : Quelle gestion des sous-produits vinicoles ? Itinéraires n°25. Expérimentation nationale sur la valorisation des sous-produits vinicoles
- Iriondo DeHond A., Fernandez-Gomez B., Martinez-Saez N., Martirosyan D. M., Garcia M. D. M. and Del Castillo M. D., 2017. Coffee silverskin: a low-cost substrate for bioproduction of high-value health promoting products. *Annals of nutrition & food science*, 1, pp;1-6.
- Jones D.T., Woods D.R., 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev.*, pp : 484-524
- Jones R. J., Massanet-Nicolau J., Guwy A., Premier G. C., Dinsdale R. M., Reilly M. 2015. Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional electro dialysis. *Biores Technol*, 189, pp : 279-284
- Jung K.-W., Cho S.-K., Yun Y.-M., Shin H.-S., Kim D.-H., 2013. Rapid formation of hydrogen-producing granules in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor coupled with high-rate recirculation. *Int J Hydrog Energy*, 39, pp : 9097-9103
- Jung K.-W., Kim D.-H., Kim S.-H., Shin H.-S., 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol*, 102(18), pp : 8612-20.
- Kanchanasuta S., Pisutpaisal N., 2017. Improvement of glycerol waste utilization by co-feedstock with palm oil decanter cake on biohydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy*, 42(5), pp : 3447-3453
- Karla M. Muñoz-Páez K M.,Alvarado-Michi E. L., Buitón G., Valdez-Vazquez I., 2016. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. *Int J Hydrogen Energy*, In press, corrected proof, Available online 30 May 2018
- Kato M.T., Florencio L., Arantes R.F.M., 2003. Post-treatment of UASB effluent in an expanded granular sludge bed reactor type using flocculent sludge. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res*, 48(6), pp : 279-84
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 2018. <https://www.kegg.jp>
- Kerčmar J., Pintar A., 2017. Support material dictates the attached biomass characteristics during the immobilization process in anaerobic continuous-flow packed-bed bioreactor. *Anaerobe*, 48, pp : 194-202
- Keskin T., Giusti L., Azbar N., 2012. Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture. *Int J Hydrogen Energy*, 37(2), pp : 1418-1424
- Khan M. H., Kana E. G., 2016. Design, implementation and assessment of a novel bioreactor for fermentative biohydrogen process development. *Int J Hydrogen Energy*, 41(24), pp : 10136-10144
- Kim D.-H., Han S.-K., Kim S.-H., Shin H.-S., 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int J Hydrog Energy*, 31, pp : 2158-2169
- Kim D.-H., Kim S.-H., K.-Y. Kim, Shin H.-S., 2010. Experience of a pilot scale hydrogen-producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste. *Int J of Hydrog Energy*, 35, pp : 1590-1594

- Kim D.-H., Kim S.-H., Shin H.-S., 2009. Hydrogen fermentation of food waste without *inoculum* addition. *Enzyme Microb Technol.* 45, pp : 181-187
- Kim M.-S., Lee D.-Y., Kim D.-H., 2011. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. *Int J of Hydrog Energy*, 36, pp : 8712-8718
- Kim D.-H., Shin H.-S., Kim S.-H., 2012. Enhanced H<sub>2</sub> fermentation of organic waste by CO<sub>2</sub> sparging. *Int J of Hydrog Energy*, 37, pp : 15563-15568
- Kim B.-R., Shin J., Guevarra R. B., Lee J. H., Kim D. W., Seol K.-H., Lee J.-H., Kim H. B., Isaacson R. E., 2017. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J Microbiol Biotechnol.* 27 (12), pp : 2089-2093
- Klimek P., Wimmer R., Kumar Mishra P. Kúdela J., 2017 Utilizing brewer's-spent-grain in wood-based particleboard manufacturing. *Journal of Cleaner Production*, 141, pp : 812-817
- Koskinen PEP, Kaksonen AH, Puhakka JA., 2007. The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 97, pp : 742–58.
- Kumar G., Park J. H., Kim M. S., Kim D. H., Kim S. H., 2014. Hydrogen fermentation of different galactose–glucose compositions during various hydraulic retention times (HRTs). *Int J Hydrogen Energy*, 39(35), pp : 20625-20631
- Kumar G., Mudhoo A, Sivagurunathan P, Nagarajand D., Ghimire A., Lay C.-H., Ling C.-Y., Lee D.-J., Chang J.-S., 2016. Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. *Biores Technol*, 219, pp : 725-737
- Kumar G., Sivagurunathan P., Sen B., Mudhoo A., Davila-Vazquez G., Wang G., Kim S.-H., 2017. Research and development perspectives of lignocellulose-based biohydrogen production. *Int Biodeter Biodeg*, 119, pp : 225-238
- Kumari S. et Das D., 2017. Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *Int J Hydrogen Energy*, 42(17), pp : 4083-4094
- Latrille E., Trabaly E., Larroche C., 2011. Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. *Techniques de l'Ingénieur*.
- Lay C.-H., Huang C.-Y., Chen C.-C., Lin C.-Y., 2016. Biohydrogen production in an anaerobic baffled stacking reactor: Recirculation strategy and substrate concentration effects. *Biochem Eng J*, 109, pp : 59–64
- Lay J. J., Fan K. S., Hwang J. I., Chang J. I., Hsu P.C., 2005. Factors affecting hydrogen production from food wastes by *Clostridium*-rich composts. *J Environ Eng*, 131, pp : 595–602
- Lee W.-Y., Fujisawa T., Kawamura S., Itoh K., Mitsuoka T., 1990. *Clostridium intestinalis* sp. nov., an aerotolerant species isolated from the feces of cattle and pigs. *International journal of systematic bacteriology*, 39, pp : 334-336
- Lee K.-S., Lin P.-J., Fangchiang K., Chang J.-S., 2007. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*, 32, pp : 950 – 957
- Lee D. Y., Li Y. Y., Noike T. 2009. Continuous H<sub>2</sub> production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor. *Biores Technol*, 100(2), pp : 690-695
- Lee D.-Y., Li Y.-Y., Noike T., 2010. Influence of solids retention time on continuous H<sub>2</sub> production using membrane bioreactor. *Int J of Hydrog Energy*, 35, pp : 52– 60
- Lee K. S., Tseng T. S., Liu Y. W., Hsiao Y. D., 2012. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *Int J of Hydrog Energy*, 37(20), pp : 15556-15562
- Lee D. Y., Xu K. Q., Kobayashi T., Li Y. Y., Inamori Y. 2014. Effect of organic loading rate on continuous hydrogen production from food waste in submerged anaerobic membrane bioreactor. *Int J of Hydrog Energy*, 39(30), pp : 16863-16871
- Legendre P. et Gallagher E.D., 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129, pp : 271-280
- Li C., Fang H.H.P., 2007. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Rev Environ Sci Technol*, 37(1), pp : 1-39.
- Li Y., Wang L., Ju J., Yu B., Ma Y., 2013. Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source. *Biores Technol*, 142, pp : 186-191
- Li P., Wang Z., Qiao Z., Liu Y., Cao X., Li W., Wang S. 2015. Recent developments in membranes for efficient hydrogen purification. *J Membrane Sci*, 495, pp : 130-168
- Li H., Han K., Li Z., Zhang J., Li H., Huang Y., Wang Y. 2018. Performance, granule conductivity and microbial community analysis of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors from mesophilic to thermophilic operation. *Biochem Eng J*, 133, pp : 59-65
- Liang T., 2002. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int. J. Hydrog. Energy*, 27(11-12), pp : 1157-65.
- Lin C. Y., Wu S. Y., Lin P. J., Chang J. S., Hung C. H., Lee K. S., Wu J. H., 2011. A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*, 36(14), pp : 8758-8764
- Lin R., Cheng J., Ding L., Song W., Zhou J., Cen K., 2015. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. *Biores Technol*, 196, pp : 250–255
- Lin C. Y., Lay C. H., Sung I. Y., Sen B., Chen C. C., 2017. Anaerobic hydrogen production from unhydrolyzed mushroom farm waste by indigenous microbiota. *J Biosci Bioeng*, 124(4), pp : 425-429.
- Liu X., Vederas J. C., Whittall R., Zheng J. Stiles M. E., Carlson D., 2011. Identification of a N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J Agric Food Chem*, 59, pp : 5602-5608
- Liu C.-M., Chu C.-Y., Lee W.-Y., Li Y.-C., Wu S.-Y., Chou Y.-P., 2013. Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pre-treatment in both batch and continuous systems. *Int J Hydrogen Energy*, 38(35), pp : 15823-15829
- Liu C. M., Wu S. Y., Chu C. Y., Chou Y. P., 2014. Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*, 39(33), pp : 19317-19322
- Liu Y., Wang Y. 2017. Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. *Int J Hydrogen Energy*, 42(7), pp : 4095-4101

- Lo J., Olson D. G., Murphy S. J.-L., Tian L., Hon S., Lanahan A., Guss A., Lynd L. R., 2017. Engineering electron metabolism to increase ethanol production in *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng Commun*, 39, pp : 71–79
- Luo H., Yang R., Zhao Y., Wang Z., Liu Z., Huang M., 2018. Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. *Biores Technol*, 253, pp : 343-354
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P., 2012. Brock - Biology of Microorganisms - Thirteenth Edition. Pearson Education, San Francisco
- Maina S., Kachrimanidou V., Koutinas A., 2017. A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 8 pp:18–23
- Maintinguer S, Fernandes B, Duarte I *et al.*, 2008. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *Int J Hydrogen Energy*, 33, pp: 4309–4317.
- MALTEUROPE, 2000. Élaboration des malts utilisés en brasserie. *Techniques de l'ingénieur. Réf: F6200 v1*
- Marone A., Izzo G., Mentuccia L., Massini G., Paganin P., Rosa S., Varrone C., Signorini A., 2014. Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. *Renew Energy*, 68, pp : 6-13
- Matsumoto M., Nishimura, Y., 2007. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J Biosci Bioeng*, 103(3), pp : 236-241
- McCarthy A. L., O'Callaghan Y. C., Neugart S., Piggott C. O., Connolly A., Jansen M. A. K., Krumbein A., Schreiner M., FitzGerald R. J., O'Brien N. M., 2013. The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. *Food chemistry*, 141(3), pp : 2567-2574
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., 1981. Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of methanosarcina barkeri and desulfovibrio species and effect of H<sub>2</sub> on acetate degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 346–354.
- McKinlay J.B. et Harwood C.S., 2010. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(26), pp : 11669-11675
- Megret O., Hubert L., Calbrytrably M., Carrere H., Garcia-Bernet D., Bernet N., 2015. Production d'hydrogène à partir de déchets. Etat de l'art et potentiel d'émergence. *RECORD*
- Ministère de l'Action et des Comptes publics. 2017. Chiffres annuels : stocks / récolte. Récupéré sur douanes.gouv.fr : <http://www.douane.gouv.fr/datadouane/c805-chiffres-annuels-stock-recolte>
- Mitchell W. J., 2016. Sugar uptake by the solventogenic clostridia. *World J Microbiol Biotechnol*, pp : 32.
- Mizuno O., Dinsdale R., Hawkes F., Hawkes D., Noike T., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Biores Technol*, 73, pp : 59-65
- Modigell M., Schumacher M., Teplyakov V. V., Zenkevich V. B., 2008. A membrane contactor for efficient CO<sub>2</sub> removal in biohydrogen production. *Desalination*, 224, pp : 186–190
- Molaverdi M., Karimi K., Mirmohamadsadeghi S., Galbe M., 2019. High titer ethanol production from rice straw via solid-state simultaneous saccharification and fermentation by *Mucor indicus* at low enzyme loading. *Energ Convers Manage*, 182, pp : 520-529
- Moletta R., 2009. La méthanisation. *Lavoisier*, Paris, 2015
- Moncada J., Aristizábal V. 2016. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biocheml Engineering J*, 116, pp :122-134
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Ladisch M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores Technol*, 96(6), 673-686
- Mota V. T., Júnior A. F., Trably E., Zaiat, M., 2018. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible?. *Water research*, 128, pp : 350-361
- Motte J. C., Trably E., Hamelin J., Escudé R., Bonnafous A., Steyer J. P., Dumas C. 2014. Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. *Biores Technol*, 166, pp : 610–615
- Mouillot D. et Leprêtre A., 1999. A comparison of species diversity estimators. *Res Popul Ecol*. 41, pp: 203-215
- Mrudula S., Murugammal R., 2011. Production of cellulase. *Braz J Microbiol*, 42, pp : 673-686.
- Muhlack R. Potumarthi R. Jeffery D. W., 2018. Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management*, 72, pp : 99–118
- Muñoz-Páez K. M., Alvarado-Michi E. L., Buitrón G., Valdez-Vasquez I., 2018. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. *Int J Hydrogen Energy*, 44(4)1, pp : 2289-2297
- Muri P., Črnivec I. G. O., Djinović P., Pintar A., 2016. Biohydrogen production from simple carbohydrates with optimization of operating parameters. *Acta Chimica Slovenica*, 63(1), pp : 154-164
- Muri P., Marinšek-Logar R., Djinović P., Pintar A., 2018. Influence of support materials on continuous hydrogen production in anaerobic packed-bed reactor with immobilized hydrogen producing bacteria at acidic conditions. *Enzyme and microbial technology*, 111, pp:87-96
- Mussatto S. I., Machado E. M. S., Carneiro L., Teixeira J. A., 2012. Sugars metabolism and ethanol production by different yeasts strains from coffee industry wastes hydrolyzates. *Applied Energy*, 92, pp : 763-768.
- Nasr N., Velayutham P., Elbeshbishy E., Nakhla G., El Naggat M. H., Khafipour E., Hafez H., 2015. Effect of headspace carbon dioxide sequestration on microbial biohydrogen communities. *Int J Hydrogen Energy*, 40(32), pp : 9966-9976
- National Aeronautics and Space Administration (NASA), 2017. Space Applications of Hydrogen and Fuel Cells <https://www.nasa.gov/content/space-applications-of-hydrogen-and-fuel-cells>
- NEGAWatt, 2017. Réussir la transition énergétique en France. L'essentiel du scénario négaWatt 2017-2050.
- Ni M., Leung D. Y. C., Leung M. K. H., Sumathy K., 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Process Technol*, 87(5), pp : 461-472
- Nielsen A. T., Amandusson H., Bjorklund R., Dannetun H. Ejlertsson J., Ekedahl L.-G., Lundström I., Svensson B. H., 2001. Hydrogen production from organic waste. *Int J Hydrogen Energy*. 26, pp : 547–550

- Ning Y. Y., Wang S. F., Jin D. W., Harada H., Shi X. Y. 2013. Formation of hydrogen-producing granules and microbial community analysis in a UASB reactor. *Renew Energ*, 53, pp : 12-17
- Nizami A.S., Rehan M., Waqas M., Naqvi M., Ouda O.K.M, Shahzad K., Miandad R., Khan M.Z., Syamsiro M., Ismail I.M.I., Pant D., 2017. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Biores Technol*, 241, pp : 1101-1117
- Noblecourt A., Christophe G., Larroche C., Santa-Catalina G., Trably E., Fontanille P., 2017. High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *Int J Hydrogen Energ*, 42, pp : 24656-24666
- Noike T., Takabatake H., Mizuno O., Ohba M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int J Hydrogen Energ*, 27(11-12), pp : 1367-1371
- Nouaille R., Pessiot J., Thieulin M., 2015. Procédé de production de polyhydroxyalcanoates à partir de précurseurs obtenus par fermentation anaérobie à partir de biomasse fermentescible. US2016251474 A1 ; WO/2016/135396 ; FR3033168 A1
- Oh Y. K., Kim S. H., Kim M. S., Park S. 2004. Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. *Biotechnol Bioeng*, 88(6), pp : 690-698
- Olajire A. A., 2012. The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*
- Ozkan L., Erguder T.H. , Demirel G.N., 2011. Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield. *Int J Hydrogen Energ*, 36(1), pp: 382-389
- Pachapur V. L., Sarma S. J., Brar S. K., Le Bihan Y., Buelna G., Verma M., 2015. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Biores Technol*, 193, pp : 297-306
- Pantaléon V., Bouttier S., Soavelomandrose A. P., Janoir C., Candela T., 2014. Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe*, 30, pp : 193-198
- Parajuli R., Dalgaard T., Jørgensen U., Adamsen A. P. S., Knudsen M. T., Birkved M., Schjørring J. K., 2015. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis : a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, pp :244-263
- Park W., Hyun S., Oh S., Logan B., Kim I, 2005. Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases biological hydrogen production. *Environ Sci Technol*, 39
- Park J.-H., Lee S.-H., Ju H.-J., Kim S.-H., Yoon J.-J., Park H.-D., 2016. Failure of biohydrogen production by low levels of substrate and lactic acid accumulation. *Renew Energ*, 86 , pp : 889-894
- Park J.-H., Anburajan P., Kumar G., Park H.-D., Kim S.-H., 2017. Biohydrogen production integrated with an external dynamic membrane: A novel approach. *Int J Hydrogen Energ*, 42, pp : 27543-27549
- Park J.-H., Kim D.-H., Kim S.-H., Yoon J.-J., Park H.-D., 2018a. Effect of substrate concentration on the competition between *Clostridium* and *Lactobacillus* during biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energ*, 43(25), pp : 11460-11469
- Park J.-H., Sim Y. B., Kumar G., Anburajan P., Park J.-H., Park H.-D., Kim S.-H., 2018b. Kinetic modeling and microbial community analysis for high-rate biohydrogen production using a dynamic membrane. *Biores Technol*, 262, pp : 59-64
- Passebon E., 2016. L'hydrogène naturel : future source d'énergie ? [En ligne le 27/09/2018]
- Pasupuleti S. B., Sarkar O., Mohan S. V., 2014. Upscaling of biohydrogen production process in semi-pilot scale biofilm reactor: evaluation with food waste at variable organic loads. *Int J Hydrogen Energ*, 39(14), pp : 7587-7596
- Patakova P., Branska B., Vasylikivska M., Jureckova K., Kolek J., Koscova K. , Provaznik I., 2019. Acidogenesis, solventogenesis, metabolic stress response and life cycle changes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 at the transcriptomic level. *Scientific reports*, 9(1), 1371
- Pérez-Rodríguez N, Oliveira F., Pérez-Bibbins B., Belo I., Torrado-Agrasar A., Dominguez J. M., 2014. optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 173, pp : 803-825.
- Pérez-Rodríguez N., Torrado-Agrasar A., Dominguez J. M. 2016. Use of *Aspergillus niger* Extracts Obtained by Solid-State Fermentation. *Mushroom Biotechnology*, pp : 173-190
- Pierra M., 2013. Couplage de la fermentation sombre et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène : formation et maintenance du biofilm électro-actif. *Thèse Montpellier 2*
- Plumbridge J., Deutscher J., 2014. Regulation of Carbon Assimilation in Bacteria. Reference Module in Biomedical Sciences. *Elsevier*, doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02454-5.
- Pratchett T., 2001. Les tribulations d'un mage en Aurient. *Les annales du Disque Monde. Pocket*
- Printzhofer A. et Deville E., 2015. L'hydrogène naturel, la prochaine révolution énergétique ? *Belin*,
- Pugazhendhi A., Anburajan P., Park J. H., Kumar G., Sivagurunathan P., Kim S. H., 2017. Process performance of biohydrogen production using glucose at various HRTs and assessment of microbial dynamics variation via q-PCR. *Int J Hydrogen Energ*, 42(45), pp : 27550-27557
- Puhulwella R. G., Beckers L., Delvigne F., Grigorescu A. S., Thonart P., Hilgsmann S., 2014. Mesophilic biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWB11009 in trickling biofilter reactor. *Int J Hydrogen Energ*, 39(30), pp : 16902-16913
- Quémeneur M., Hamelin J., Benomar S., Guidici-Ortoni M.-T., Latrille E., Steyer J.-P., Trably E., 2011. Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-culture dark fermentation of mono-, di- and tri-saccharides. *Int J of Hydro Energ*, 36, pp : 11654 -11665
- Ramachandran U., Wrana N., Cicek N., Sparling R., Levin D. B., 2011. Isolation and characterization of a hydrogen-and ethanol-producing *Clostridium* sp. strain URNW. *Can J Microbiol*, 57, pp : 236-243.
- Ramsey M., Hartke A., Huycke M., 2014. The physiology and metabolism of enterococci. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet], Massachusetts Eye and Ear Infirmary*
- Rebecchi S., Pinelli D., Bertin L., Zama F., Fava F., Frascari D. 2016. Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by adsorption on ion exchange resins. *Chem Eng J*, 306, pp : 629-639
- Reitzer L., 2005. Catabolism of Amino Acids and Related Compounds. *EcoSal Plus*, 1(2),

- Ren N., Li J., Li B., Wang Y., Liu S., 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot scale bioreactor system. *Int J Hydrogen Energy*, 31, pp : 2147-2157
- Ren, Xie et Xing, 2009 Composition of extracellular polymeric substances influences the autoaggregation capability of hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense*. *Biores Technol*, 100, pp : 509-513.
- Réseau pour la qualité et la sécurité des denrées animales (RESEDA), 2017. Gisements et valorisations des coproduits des industries agroalimentaires. Enquête 2017.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujeau A., Dubourdieu D., 2012. Traité d'œnologie - Tome 2 : Chimie du vin ; stabilisation et traitements. *Collections Pratiques vitivinicoles*.
- Rubiano-Labrador C., Diaz-Cardenas C., Patel B. K., 2013. Caloramator quimbayensis sp. nov., an anerobic, moderately thermophilic bacterium isolated from a terrestrial hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, pp : 1396-1402
- Saad N. M. C. 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *Int J Hydrogen Energy*, 38(30), pp : 13172-13191
- Saleem M., Lavagnolo M. C., Spagni A., 2018. Biological hydrogen production via dark fermentation by using a sidestream dynamic membrane bioreactor: Effect of substrate concentration. *Chem Eng J*, 349, pp : 719-727
- Saraphimov, P. Reungsang A. 2011. Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Int J Hydrogen Energy*, 36(14), 8765-8773
- Shen L., Bagley D. M., Liss S. N., 2009. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *Int J Hydrogen Energy*, 34, pp : 3689-3696
- Shen L., Zhou Y., Mahendran B., Bagley D. M., Liss S. N., 2010. Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. *J Membrane Sci*, 360, pp : 226-233
- Shimizu S., Fujisawa A., Mizuno O., Kameda T., Yoshioka T., 2008. Fermentative hydrogen production from food waste without inocula. *AIP Conference Proceedings*, 987(1), pp : 171-174
- Si B., Liu Z., Zhang Y., Li J., Xing X. H., Li, B., Lu H., 2015. Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity. *Int J Hydrogen Energy*, 40(8), pp : 3191-3200
- Singhania R. R., Christophe G., Perchet G., Troquet J., Larroche C., 2012. Immersed membrane bioreactors: An overview with special emphasis on anaerobic bioprocesses. *Biores Technol*, 122, pp : 171-180
- Sittijunda S., Reungsang A., Sompong O. T., 2010. Biohydrogen production from dual digestion pretreatment of poultry slaughterhouse sludge by anaerobic self-fermentation. *Int J Hydrogen Energy*, 35(24), pp : 13427-13434
- Sivagurunathan P., Kumar G., Bakonyi P., Kim S.-H., Kobayashi T., Xu K.Q., Lakner G., Toth G., Nemestothy N., Belafi-Bako K., 2016. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *Int J Hydrogen Energy*, 41, pp : 3820-3836
- Sørensen H. R., Pedersen S., Meyer A. S., 2007. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme Microb Technol*, 40(4, 5), pp : 908-918
- Spasiano D., Luongo V., Petrella A., Alfè M., Pirozzi F., Fratino U., Piccinni A.F., 2018. Preliminary study on the adoption of dark fermentation as pretreatment for a sustainable hydrothermal denaturation of cement-asbestos composites. *Journal of cleaner production*, 166, pp : 172-180
- Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J., 2017. Principles of fermentation technology, third edition. Elsevier, United kingdom.
- Sung H. S., Chag Y., Han J., 2017. Development of polylactic acid nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals derived from coffee silverskin. *Carbohydrate Polymers*, 169, pp : 495-503.
- Tabachnick J., Vaughn R. H., 1948. Characteristics of tartrate-fermenting species of *Clostridium*. *J Bacteriology*, 56(4), pp : 435
- Taherdanek M, Zilouei H, Karimi K, 2016. The effects of Fe<sup>0</sup> and Ni<sup>0</sup> nanoparticles versus Fe<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ions on dark hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy*, 41(1, 5), pp: 167-173
- Tangney M. Mitchell , W.J. Characterisation of a glucose phosphotransferase system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74 (2), pp: 398-405
- Teles A. S., Chávez D. W., Oliveira R. A., Bon, E. P. Terzi S. C., Souza E. F., Tonon R. V., 2019. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food research international*, 120, pp : 441-448
- Thauer R., 1976. Limitations of microbial H<sub>2</sub>-formation via fermentation. *Microbial Energy Conversion*. The Proceedings of a Seminar Sponsored by the UN Institute for Training and Research (UNITAR) and the Ministry for Research and Technology of the Federal Republic of Germany Held in Göttingen, pp : 201-204
- Thauer R. K., Jungermann K., Decker K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*, 41, 100
- The Brewers of Europe. The contribution made by beer to the European Economy, 2016. The Brewers of Europe.
- Thiery L., 2016. La filière hydrogène s'industrialise. *L'Usine Nouvelle* [En ligne le 27/09/2018] <https://www.usinenouvelle.com/article/la-filiere-hydrogene-s-industrialise.N379493>
- Tippmer K., Tippmer S., 1994. Verfahren zur Gewinnung von Wasserstoff und Carbonsäuren aus Biomassenhydrolysat, Brevet européen du 04/02/1994 EP0666319A1
- Tolvanen K.E.S., Santala V.P., Karp M.T., 2010. [FeFe]-hydrogenase gene quantification and melting curve analysis from hydrogen-fermenting bioreactor samples. *Int J Hydrogen Energy*, 35, pp : 3433-3439.
- Trably E., Christophe G., Latrille E., Larroche C., 2018. Production de biohydrogène – Voie fermentation sombre. *Techniques de l'ingénieur*, BIO3351V2
- Trad Z., Akimbomi J., Vial C., Larroche C., Taherzadeh M.J., Fontaine J.-P., 2015. Development of a submerged anaerobic membrane bioreactor for concurrent extraction of volatile fatty acids and biohydrogen production. *Biores Technol*, 196, pp :290-300
- Turon V., Trably E., Fouilland E., Steyer J. P. 2016. Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: a review. *Process Biochemistry*, 51(11), pp : 1843-1854

- Ueno Y., Haruta S., Ishii M., 2001. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl Microbiol Biot*, 57, pp :555–562
- Van Dyk J.S., Pletschke B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv*, 30(6), pp : 1458-1480
- Van Ginkel S.W., Logan B., 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, 39(16), pp : 3819-3826
- Vatsala T. M., Raj S. M., Manimaran, A., 2008. A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture. *Int J Hydrogen Energ*, 33(20), pp : 5404-5415
- Vieira E., Rocha M., Coelho E., Pinho O., Saraiva J., Ferreira I., Coimbra M.A., 2014. Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products*, 52, pp : 136-143
- Vignais P.M., Colbeau A., 2004 . Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol*, 6(2), pp: 159-88
- Villiermaux, 1994. Réacteurs chimiques : Principes. *Techniques de l'Ingénieur*.
- Wang J. L. et Wan W., 2008. Influence of Ni<sup>2+</sup> concentration on biohydrogen production. *Biores Technol*, 99, pp: 8864–8868
- Wang H., Wang J., Fang Z., Wang X., Bub H., 2010. Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. *Int J Hydrogen Energ*, 35(15), pp: 8303-8309
- Wang Y. Q., Zhang F., Zhang W., Dai K., Wang H. J., Li X., Zeng R. J., 2018. Hydrogen and carbon dioxide mixed culture fermentation in a hollow-fiber membrane biofilm reactor at 25 C. *Biores Technol*, 249, pp : 659-665
- Ward J. H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Statist Assoc*, 48, pp : 236-244.
- Won S. G., Lau A. K. 2011. Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Biores Technol*, 102(13), pp : 6876-6883
- Wong Y.M., Wu T.Y., Juan J.C., 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev*, 34, pp: 471-482.
- Wu S.-Y., Chu C.-Y., Shen Y.-C., 2012. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. *Int J Hydrogen Energy*, 37(20), pp : 15496-15502
- Xin B., Wang Y., Tao F., Li L., Ma C., Xu P. 2016. Co-utilization of glycerol and lignocellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1, 3-propanediol production by *Clostridium diolis*. *Scientific reports*, 6, pp : 19044
- Xing D., Ren N., Rittmann B.E., 2008. Genetic diversity of hydrogenproducing bacteria in an acidophilic ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Appl Environ Microb*, 74, pp: 1232–1239
- Yang G. et Wang J., 2018. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review *Renew Sust Energ Rev*, 95, pp: 130–146
- Yokoyama H., Waki M., Ogino A., Ohmori H., Tanaka Y. 2007a. Hydrogen fermentation properties of undiluted cow dung. *J Biosci Bioeng*, 104(1), pp : 82-85
- Yokoyama H., Waki M., Moriya N., Yasuda T., Tanaka Y., Haga K. 2007b. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(2), pp : 474-483
- Zanetti G. Pandini V., 2013. Ferredoxin. Reference Module in Biomedical Sciences. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. pp : 296-298
- Zhang Z.-P., Show K.Y., Tay J.H., Liang D.T., Lee D.J., Jiang W.-H., 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, 41, pp : 2118-2123
- Zhang Z.-P., Tay J.-H., Show K.-Y., Yan R., Liang D. T., Lee D.-J., Jiang W.-J., 2007. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *Int J Hydrogen Energ*, 32(2), pp : 185-191
- Zhang Z.-P., Show K.Y., Tay J.H., Liang D.T., Lee D.J., 2008. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors – A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *Int J Hydrogen Energ*, 33; pp : 1559-1564
- Zhang F., Ding J., Shen N., Zhang Y., Ding Z., Dai K., Zeng R. J., 2013. In situ hydrogen utilization for high fraction acetate production in mixed culture hollow-fiber membrane biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(23) 10233-10240
- Zhang K., Ren N.-Q., Wang A.-J. 2015. Fermentative hydrogen production from corn stover hydrolyzate by two typical seed sludges : effect of temperature. *Int J Hydrogen Energ*, 40, pp : 3838-3848
- Zhang J., Zang L., 2016. Enhancement of biohydrogen production from brewers spent grains by calcined-red mud pretreatment. *Biores Technol*, 209, pp : 73-79
- Zhang Q., Zhang Z., Wang Y., Lee D.-J., Ge X., 2018. Sequential dark and photo fermentation hydrogen production from hydrolyzed corn stover: A pilot test using 11 m<sup>3</sup> reactor. *Biores Technol*, 253, pp : 382-386
- Zhao X., Xing D.F., Liu B.F., Lu L., Zhao J., Ren N.Q., 2012. The effects of metal ions and Lcysteine on hydA gene expression and hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. *Int J Hydrogen Energ*, 37, pp: 13711–13717.
- Zheng H., O'Sullivan C., Mereddy R., Zeng R.J., Duke M., Clarke W.P., 2010. Experimental and theoretical investigation of diffusion processes in a membrane anaerobic reactor for bio-hydrogen production. *Int J Hydrogen Energ*, 35(11) 5301-5311
- Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog Energy Combust Sci*, 42, pp: 35-53
- Zhou M., Yan B., Wong J.W.C., Zhang Y., 2018. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste : a mini-review focusin on acidogenic metabolic pathways. *Biores Technol*, 248, pp : 68-78
- Ziara R. ; M. M., Miller D. N., Subbiah J. S., Dvorak B. I., 2019. Lactate wastewater dark fermentation : the effect of temperature and initial pH on biohydrogène production and microbial community. *Int J of Hydrogen Technol*. 44, pp : 661-673
- Zoutberg G. R., Willemsberg R., Smit G., de Mattos M. T., Neijssel O. M., 1989. Aggregate-formation by *Clostridium butyricum*. *App Microbiol Biotechnol*, 32(1), 17-21



# Intensification du procédé de production d'hydrogène par fermentation obscure en bioréacteur membranaire : valorisation énergétique de biomasses

## Résumé

Cette étude porte sur l'intensification de la production d'hydrogène par fermentation obscure en bioréacteur membranaire liquide/gaz (BRM L/G) à fibres creuses et la valorisation de coproduits agricoles et agroalimentaires. A partir d'une solution modèle, sans réensemencement bactérien, des productions d'hydrogène stables ( $2,6 \pm 0,2 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{réacteur}}/\text{j}$  et  $1,0 \pm 0,1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ ) ont été obtenues pendant plus d'un an, en favorisant l'émergence répétée de bactéries productrices d'hydrogène (*Clostridium*, *Enterobacter*), ayant colonisé le module membranaire. L'extraction efficace de l'hydrogène via la lumière des fibres creuses a été montrée et un optimum de concentration en glucides a été atteint (14 g/L). En bioréacteur semibatch, des biomasses variées ont généré par fermentation endogène ( $0,7\text{-}55 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomasse}}$ ), caractérisées par une identité métabolique et microbiologique et parfois l'inhibition de bactéries productrices d'hydrogène. Enfin, la mise en œuvre de la fermentation obscure endogène en BRM L/G utilisant des biomasses diversifiées a été démontrée, avec des performances de production élevées ( $4,1 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{j}$ ,  $86,8 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{DCO}}$ ).

Mots-clés : bioproduction, fermentation obscure, hydrogène, bioréacteur membranaire, endogène, biomasse

## Abstract

This work focuses on the intensification of hydrogen production by dark fermentation in a liquid/gas hollow fiber membrane bioreactor (MBR L/G) and the valorization of coproducts from the agriculture and the food industry. Using a model substrate, without bacterial reseeded, stable hydrogen productions ( $2.6 \pm 0.2 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$  et  $1.0 \pm 0.1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$ ) were achieved during more than a year, selecting repeatedly hydrogen producing bacteria (*Clostridium*, *Enterobacter*), which have colonized the membrane module. The efficient extraction of hydrogen via the hollow fiber lumen was performed and an optimum of the concentration of sugars in the MBR was achieved (14 g/L). In a semibatch bioreactor, hydrogen production from various biomasses ( $0.7$  and  $55 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{biomass}}$ ) was possible and was characterized by a metabolic and microbiologic identity and, for some of the tests, the inhibition of hydrogen producing bacteria. Finally, the endogenous dark fermentation in the MBR L/G, using biomasses, was implemented, with high hydrogen production ( $4,1 \text{ L}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{d}$ ,  $86,8 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{DCO}}$ ).

Key words: bioproduction, dark fermentation, hydrogen, membrane bioreactor, endogeneous, biomass