

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES DSA IPHC UMR CNRS 7178

Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM)



Paul ZANONI

Soutenue le 05 avril 2022

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

Discipline/ Spécialité : Chimie - Génie des procédés

Fermentation obscure de biomasses ensilées : stratégies d'amélioration de la bioproduction d'hydrogène et optimisation de la mise en œuvre en bioréacteur membranaire

THÈSE dirigée par :	
Mme ERNST Barbara	Professeur, IPHC, Université de Strasbourg
RAPPORTEURS :	
M. FONTANILLE Pierre	Professeur, Institut Pascal, Université Clermont Auvergne
M. WILLISON John	Chargé de Recherche, HDR, CNRS - CEA Grenoble
AUTRES MEMBRES DU JURY :	
M. BROSSE Nicolas	Professeur, LERMAB, Université de lorraine
Mme DUMAS Christine	Maître de Conférences, IPHC, Université de Strasbourg
M. BREMOND Ulysse	Docteur ingénieur R&D, Air Liquide

M. THEOBALD Olivier

Ingénieur, ADEME (invité)

« Il n'y a pas de vent favorable à celui qui ne sait où il va »

Sénèque

IV

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du groupe de reconnaissance et procédés de séparation moléculaire (RePSeM) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (Université de Strasbourg), dans le cadre du programme « thèses de l'ADEME » avec le concours financier de l'entreprise Air Liquide.

Le professeur Barbara ERNST m'a patiemment accompagné dans la réalisation de cette recherche et guidé au cours de mon parcours initiatique dans le monde des procédés et de l'hydrogène. Ses conseils inspirants, son expertise scientifique, son regard toujours bienveillant, sa confiance et sa présence motivante m'ont été très précieux.

Je remercie très chaleureusement le docteur Christine Dumas, ma co-encadrante, qui m'a transmis son savoir-faire expérimental, son pragmatisme pour les présentations et les compétences de patience et de délicatesse propres aux analyticiens.

Je tiens ensuite à exprimer mes remerciements à Mesdames et Messieurs les Membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail, en particulier le professeur Pierre Fontanille et le docteur John Willison qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse.

Air Liquide a confié au docteur Aude Bertrandias le suivi de cette thèse. Son niveau d'exigence, son intérêt et son écoute attentive au fil de nos rencontres m'ont permis de progresser et d'appréhender les spécificités de la R&D. Elle a été remarquablement relayée par le docteur Ulysse Brémond, au cours des derniers mois. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude.

Un grand merci à mon ingénieur référent, Olivier Théobald, et à Mesdames Pineau et Favrelière de la cellule thèse de l'ADEME pour l'accompagnement et la disponibilité.

Je souhaite remercier les membres du comité de suivi de cette thèse, le professeur Nicolas Brosse et le docteur Gwenaël Imfeld pour leurs conseils avisés et leurs encouragements.

Cette thèse n'aurait pu aller aussi loin sans le concours des personnes suivantes :

- Le professeur Nicolas Brosse pour son accueil au sein du LERMAB à l'Université de Lorraine et son aide déterminante pour le prétraitement d'explosion à la vapeur, le docteur Laurent Chrusciel pour la conduite du pilote d'explosion à la vapeur et le docteur Isabelle Ziegler-Devin pour l'analyse et les échanges sur les sucres monomériques ;
- Le professeur Stéphane Vuilleumier, le docteur Emilie Muller pour leur accueil au sein du laboratoire de génétique moléculaire, génomique, microbiologie (GMGM) et Christelle Gruffaz qui a supervisé les opérations de biologie moléculaire ;
- Le docteur Anne Boos, Pascale Ronot et Islah El-Masoudi de la plate-forme d'analyse du RePSeM pour leurs analyses CHN et la mise à disposition du microoonde ;

- Pascal Schall et Dominique Tscheiller de l'IUT Louis Pasteur pour leur appui sur les prétraitements de broyage et d'autoclavage ;
- Jérémy Ollier pour l'approvisionnement en ensilage.

Je souhaite leur dire ici toute ma gratitude pour leur aide et leurs conseils au cours de cette recherche.

Je n'oublie pas :

- Les docteurs Jean Marc Strub et Jérémy Brandel pour leur expertise en chromatographie à haute pression ;
- Le personnel technique et d'ingénierie, Sylvia Michel, Anne-Clémence Aun, Sébastien Brauchi,
 Alexandre Lecointre dont l'aide et le dévouement nous permettent tous les jours de travailler dans les meilleures conditions et en toute sécurité ;
- Maxime Collette pour son support en électronique ;
- Chaïma et Cléophée qui m'ont prêté leur chaussette de filtration ;
- Les Alumni du biohydrogène strasbourgeois, Valentin, Emilie, et Marie pour le travail réalisé ;
- Lucie et Thomas pour ce qu'ils ont accompli au cours de leur stage respectif.

Je vous suis, à toutes et à tous, très reconnaissant.

J'ai une pensée pour les doctorants dynamiques et autres brasseurs de sciences de Cronenbourg et d'Esplanade, les lyonnais de l'INSA, les marins d'eau dure, les cruciverbistes, les petits loubards, les petits renards, les poussins du parlement, les doctorants confédérés, la maison Kirn et Hop'la, les étoiles montantes de la méthanisation, les éminences grises et autres forces obscures qui ont été parties prenantes de ces trois années. Merci pour ces bons moments.

J'ai beaucoup apprécié de travailler avec les membres de l'équipe du RePSeM et souhaite leur rendre hommage pour leur accueil et l'ambiance créative, bienveillante et familiale qui a régné au sein du laboratoire.

Je pense aussi à mes parents et à ma sœur qui sont toujours très présents dans ma vie.

Enfin, je n'oublierai jamais la brise au sommet des Ballons des Vosges, le contact râpeux du grès rose d'Alsace, la vallée de la Bruche et ses milles sentiers, la sérénité du Mont Sainte-Odile et l'hospitalité schiltigheiméenne !

LISTE DES PRESENTATIONS

Communications orales :

Zanoni, P.; Dumas, C.; Bertrandias, A.; Ernst, B. **Improving biohydrogen production in a membrane bioreactor: effect of the substrate loading rate**. The International Workshop on Innovative Hydrogen Energy Systems and Technologies 15 - 16 Septembre 2020, Conférence en distanciel.

Zanoni, P.; Dumas, C.; Aun, A.C.; Ernst, B. **Production d'hydrogène par voie biologique : intensification du procédé**. Séminaire Scientifique de l'Observatoire Homme Milieu (OHM) de Fessenheim, 9 Octobre 2020, Strasbourg (France).

Zanoni, P.; Dumas, C.; Bertrandias, A.; Ernst, B. **Corn silage aeration reveals unexpected variation of hydrogen production by endogenous dark fermentation**. 3rd International Conference for Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability, 17 - 19 mai 2021, Conférence en distanciel.

Zanoni, P.; Dumas, C.; Bertrandias, A.; Ernst, B. Efficient biohydrogen production in a membrane bioreactor with corn silage hydrolysate: effect of the substrate loading rate. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology, 20 - 23 Septembre 2021, Conférence en distanciel.

SOMMAIRE

 Chapitre I : Revue de la littérature. 1. Contexte	5 7 14 19 44 53 57 61 65 68
 Contexte	5 14 19 44 53 57 61 65 68
 L'hydrogène au 21^{ème} siècle	7 14 44 53 57 61 65 68
 Production d'hydrogène par fermentation obscure : métabolisme et microbiologie Utilisation de l'ensilage de maïs et de seigle pour la production d'H₂ par fermentation obscure Ingénierie des procédés continus de fermentation pour l'amélioration de la production d'H₂ Conclusion et objectifs de la thèse 	14 44 53 57 61 65 68
 Utilisation de l'ensilage de maïs et de seigle pour la production d'H₂ par fermentation obscure Ingénierie des procédés continus de fermentation pour l'amélioration de la production d'H₂ Conclusion et objectifs de la thèse 	19 53 57 57 61 65 68
 Ingénierie des procédés continus de fermentation pour l'amélioration de la production d'H₂ Conclusion et objectifs de la thèse 	44 53 57 61 65 68
6. Conclusion et objectifs de la thèse	53 57 61 65 68
	57 61 65 68
Chapitre II : Matériels et Méthodes	57 61 65 68
1. Substrat de fermentation et prétraitements	61 65 68
2. Dispositifs et procédés de fermentation	65 68
3. Méthodes analytiques pour la caractérisation des biomasses, des gaz et des fermentâts	68
4. Analyse microbiologique	
5. Analyse des données	69
6. Conclusion	71
Chapitre III : Caractérisation des biomasses	73
1. Introduction	73
2. Caractérisation des lots de biomasses ensilées	75
3. Potentiel de production d'H ₂ en fermentation endogène des biomasses « fraîches »	81
4. Rôle du lactate dans la production d'H ₂	86
5. Conclusion	118
Chapitre IV : Impact de l'aération passive et active de l'ensilage de maïs sur la production d'H2	121
1. La dégradation aérobie de l'ensilage de maïs	121
2. Prétraitement d'aération forcée de l'ensilage de maïs et augmentation de la production d'H ₂	133
3. Analyses des corrélations entre les données issues des fermentations	140
4. Conclusion	141
Chapitre V : Fermentation de substrat modèle en BRM	145
1. Introduction	145
2. Effet du TSH à une concentration d'alimentation en sucres de 14 g/L	146
3. Effet de la surface des fibres dans le BRM	153
4. Effet de l'ajout de lactate dans l'alimentation du BRM	157
5. Analyse des corrélations	159
6. Positionnement par rapport à la littérature	161
7. Conclusion	164
Chapitre VI : Prétraitement pour le fractionnement de la biomasse	167
1. Introduction	167

Sommaire

2.	Utilisation du broyage comme prétraitement mécanique pour la fermentation obscure	168
3.	Effet du broyage sur la fermentation endogène de l'ensilage de maïs frais et congelés	170
4.	Effet du broyage sur le fractionnement de la biomasse d'ensilage de maïs congelé	180
5.	Potentiel de production d' H_2 d'ensilage de seigle fractionné et effet du broyage de la biomasse	186
6.	Conclusion sur le fractionnement et sur l'impact du broyage de la biomasse	189
Char	pitre VII : Intensification du fractionnement de la biomasse d'ensilage par prétraitements	
hydr	rothermiques – Fermentation par voie exogène	. 191
1.	Introduction	191
2.	Production et caractérisation des inocula bactériens	193
3	Prétraitement de l'ensilage de maïs par explosion à la vapeur	197
4	Prétraitement de l'ensilage de maïs par autoclavage	214
5	Prétraitement du seigle congelé	219
6	Positionnement par rapport à la littérature	221
7	Conclusion	224
Chap	pitre VIII : Optimisation de la production d'H2 en bioréacteur membranaire (BRM) à partir de	
l'ens	silage de maïs	. 227
1.	Introduction	227
2.	Opérations préalables	230
3. ď	Effet du TSH sur la production en H2 en BRM à partir des filtrats d'hydrolysat de la biomasse ensilage de maïs	233
4.	Effet de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation sur la production d'H ₂	242
5.	Analyses microbiologiques	251
6.	Analyse des corrélations	261
7.	, Positionnement par rapport à la littérature	263
8.	Analyse technico-économique de la valorisation énergétique de l'ensilage de maïs par voie	
fe	rmentaire	266
9.	Conclusion	274
Con	clusion et perspectives	. 277
Bibli	iographie	. 283
Ann	exes	I
Aı	nnexe 1 : Potentiel de production d'H ₂ en fermentation endogène des biomasses fraîches	I
Aı	nnexe 2 : Stabilisation de la biomasse d'ensilage de maïs par congélation	VII
Aı	nnexe 3 : Stabilisation de l'ensilage de seigle par congélation	XVI

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Procédés de production d' H_2 à partir de la biomasse	10
Figure 2 : Principales réactions chimiques survenant au cours de la fermentation obscure	16
Figure 3 : Principales voies métaboliques au cours de la fermentation obscure	18
Figure 4 : Co-produits de maïs utilisés dans la littérature pour la production d'hydrogène	26
Figure 5 : Structure et co-produits issus du prétraitement de l'ensilage de maïs	28
Figure 6 : Photographie des biomasses utilisées dans les expériences de fermentation	58
Figure 7 : Dispositif expérimental d'explosion à la vapeur	59
Figure 8 : Schéma du dispositif expérimental de fermentation en mode semi-batch	61
Figure 9 : Schéma du dispositif de production d'hydrogène en bioréacteur membranaire	63
Figure 10 : Composition des fractions biochimiques des ensilages de maïs et de seigle	77
Figure 11 : Composition de la flore bactérienne de l'ensilage de maïs obtenu par séquençage	79
Figure 12 : Production cumulée d'H ₂ et production des métabolites, consommation de solutés dans le milieu réactionnel et ra	pport
molaire butyrate/acétate (B/A) lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs et de seigle frais	81
Figure 13 : Abondances relatives des séquences du gène codant pour l'ARN 16S des consortia bactériens de la fermentation endo	ogène
de biomasses ensilées pendant la production d'H ₂	84
Figure 14 : Profil de fermentation de l'ensilage de maïs (lot 2) « frais » et broyé	88
Figure 15 : Evolution de la teneur en sucres solubles et en principaux métabolites au cours de la fermentation obscure de référ	rence
de l'ensilage de maïs « frais » et broyé	89
Figure 16 : Evolution du nombre de copies du gène ARNr 16S par µL d'ADN extrait des genres bactériens majoritaires au cours	de la
fermentation, du débit d'H ₂ en fonction du temps et identification des espèces bactériennes présentes dans le milieu réactionr	nel 92
Figure 17 : Profils de production d'H ₂ et évolutions des concentrations en métabolites au cours des fermentations obscures d'ens	silage
de maïs sans ajout de lactate et en fonction des concentrations en lactate ajouté : 1,5 ; 2,7 ; 4,5 ; 7,4 et 11,6 glactate/L	96
Figure 18 : Effet de l'ajout de lactate exogène à la biomasse d'ensilage de maïs congelé et broyé sur le rendement et la produ	iction
d'H ₂	98
Figure 19 : Effet de l'ajout de lactate sur le métabolisme des consortia bactériens et taux de consommation du lactate en fonction	on de
la teneur en lactate ajouté	99
Figure 20: Analyse en composante principale des caractéristiques de production d'H ₂ et des principaux métabolites produits au	cours
des fermentations d'ensilage de maïs avec ajout de lactate	101
Figure 21 : Effet de l'ajout de lactate sur l'abondance des consortia bactériens familles et espèces	102
Figure 22 : Effet de l'ajout simultané de lactate et d'acétate à l'ensilage de maïs sur le profil de production d'H2 et concentratio	ns en
métabolites au cours de la fermentation obscure	104
Figure 23 : Effet de l'ajout de lactate et d'acétate sur la production cumulée d'H ₂ et sur la production de la fermentation ob	scure
d'ensilage de maïs	106
Figure 24 : Effet de l'ajout de lactate et d'acétate sur le métabolisme et sur la consommation de lactate total au cours	de la
fermentation obscure	108
Figure 25 : Débit de production d'H ₂ et concentrations en métabolites au cours de la fermentation de substrats modèles : glu	ucose
(5 g/L) et glucose (5 g/L) + lactate (5 g/L) et productions de métabolites.	115
Figure 26 : Influence de l'exposition à l'air de la biomasse d'ensilage de maïs au cours de son stockage à 4°C pendant 10 jours, 70 j	jours,
140 jours, 213 jours et 220 jours sur la production d'hydrogène cumulée.	123
Figure 27 : Évolution de la production totale d' H_2 , de la productivité maximale et du rapport molaire H_2/CO_2 en fonction du tem	ps de
stockage de l'ensilage de maïs à 4°C	124

Figure 28 : Évolution de la composition en métabolites initiaux et du pH initial du milieu réactionnel de la fermentation obscure
d'ensilage de maïs stocké à 4°C en fonction de la durée d'exposition à l'air125
Figure 29 : Principales espèces de bactéries et de levures présentes dans l'ensilage de maïs avant fermentation obscure en fonction
de la durée de stockage à 4°C et analyse du nombre de copies du gène d'ARNr 16S (bactéries) et d'ARNr 18S (levures) par qPCR 126
Figure 30 : Influence de la durée de stockage à 4°C de la biomasse d'ensilage de maïs sur les productions totales de métabolites et
les consortia bactériens présents dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation
Figure 31 : Abondance des espèces bactériennes au cours de la fermentation d'ensilage de maïs et analyse du nombre de copies du
gène d'ARNr 16S par qPCR130
Figure 32 : Effet de la dégradation aérobie de l'ensilage de maïs à 4°C sur le potentiel de production d'H ₂ , sur le pH initial et sur la
teneur initiale totale en métabolites dans le milieu réactionnel selon le temps d'exposition à l'air
Figure 33 : Effet de l'aération de la biomasse d'ensilage de maïs congelée sur l'évolution des débits de production d'H ₂ et sur la
concentration en métabolites dans le milieu réactionnel des tests de fermentation de biomasse aérée en fonction du temps 134
Figure 34 : Effet de l'aération de l'ensilage de maïs congelé sur la production de métabolites et les consortia fermentaires prélevés
entre 22 h et 24 h
Figure 35 : Analyse en composante principale des données de production de gaz, de métabolites et des consortia fermentaires pour
l'ensilage de maïs congelé, exposé à l'air et traité par aération forcée140
Figure 36 : Effet du TSH sur le débit de production d'H ₂ par litre de bioréacteur en BRM à partir du substrat modèle de concentration
de 14 g _{glucose} /L147
Figure 37 : Configuration du BRM sans extracteur liquide-gaz et avec extracteur liquide-gaz
Figure 38 : Profils de production d'H ₂ en BRM à TSH = 3 h et 6 h avec et sans extracteur liquide-gaz150
Figure 39 : Effet du TSH et de l'extracteur liquide/gaz sur la productivité des métabolites et la vitesse de consommation du glucose
au cours de la fermentation de substrat modèle (14 g/L) en BRM152
Figure 40 : Effet de la surface des fibres creuses dans le BRM sur le débit de production d'H ₂ par unité de volume du bioréacteur 154
Figure 41 : Photographie de l'intérieur de la calandre du module à taux de remplissage doublé
Figure 42 : Effet de la surface des fibres sur la production de métabolites et la consommation de glucose
Figure 43 : Effet de l'ajout de lactate sur le profil de production d'H ₂ lors de la fermentation de substrat modèle
Figure 44 : Effet du lactate sur la productivité des métabolites et la consommation du glucose
Figure 45 : Effet du débit d'alimentation en substrat par litre de bioréacteur sur la productivité en H ₂ et analyse en composante
principale des paramètres d'alimentation du BRM et des caractéristiques de production d'H ₂ et du métabolisme
Figure 46 : Préparation d'une solution d'alimentation du BRM par fractionnement de la biomasse
Figure 47 : Effet du broyage de la biomasse d'ensilage de maïs congelé ou stockée 70-80 jours à 4°C sur le potentiel de production
d'hydrogène
Figure 48 : Effet du broyage sur les consortia bactériens issues de la fermentation de l'ensilage de maïs (lot 1) stocké 70 - 80 jours à
4°C et congelée (-20°C)
Figure 49 : Effet du broyage de la biomasse d'ensilage de maïs congelé ou stockée à 4°C sur le potentiel de production d'H2 174
Figure 50 : Effet du broyage sur les consortia bactériens issus de la fermentation d'ensilage de maïs (lot 2) stocké à 4°C (< 25 jours)
et congelé (- 20°C)
Figure 51 : Analyse en composantes principales des caractéristiques de production d'H ₂ et des principaux métabolites produits au
cours des fermentations des 2 lots d'ensilage de maïs brut ou broyé179
Figure 52 : Production d'hydrogène de la biomasse d'ensilage de maïs congelé, entière et trempée avec l'obtention du résidu et du
filtrat et production de métabolites
Figure 53 : Productions d'hydrogène et de produits fermentaires de la biomasse d'ensilage de maïs congelé, broyé et trempé (résidu
et filtrat)

Liste des figures

Figure 54 : Analyse des consortia lors de la fermentation d'ensilage de maïs (lot 1) congelé et broyé et des différentes fractions
obtenues par trempage de cette biomasse
Figure 55 : Production d'hydrogène et de métabolites lors la fermentation endogène de filtrats de seigle (lot 1) préparés à partir de
biomasse congelée brute ou broyée
Figure 56 : Consortia fermentaires lors de la fermentation endogène d'ensilage de seigle congelé, biomasse entière et filtrat 188
Figure 57 : Procédé de préparation de la biomasse hydrolysée (par explosion à la vapeur) pour la fermentation obscure en réacteur
en mode semi-batch et analyses associées192
Figure 58 : Profils des débits de production d'H ₂ des fermentations pour la production des inocula bactériens et composition
microbiologique des inocula bactériens
Figure 59 : Production cumulée d'H ₂ ; production des métabolites et consommation de glucose dans le milieu réactionnel lors de la
fermentation obscure de substrat modèle inoculé à partir de fermentât d'ensilage de maïs et de filtrat d'ensilage de seigl 195
Figure 60 : Abondances relatives des séquences du gène codant pour l'ARN 16S des consortia bactériens de la fermentation obscure
de substrat modèle inoculé
Figure 61 : Libération des sucres en fonction de la sévérité du prétraitement199
Figure 62 : Analyse de la composition en sucres monomériques et en inhibiteurs par HPAEC-PAD dans les hydrolysats d'ensilage de
maïs en fonction des paramètres de l'hydrolyse
Figure 63 : Effet des paramètres d'explosion à la vapeur sur les productions cumulées d'H ₂ obtenues avec de l'ensilage de maïs non
imprégné à l'acide (imprégnation neutre) et de l'ensilage imprégné à l'acide sulfurique (imprégnation à l'acide)
Figure 64 : Effet du facteur de sévérité combiné sur le rendement en H ₂ de la biomasse hydrolysée par explosion à la vapeur 204
Figure 65 : Effet des paramètres d'hydrolyse sur le métabolisme fermentaire205
Figure 66 : Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques de production d'H ₂ et des principaux métabolites produits
au cours des fermentations inoculées d'ensilage de maïs hydrolysé207
Figure 67 : Effet du prétraitement d'explosion à la vapeur sur les <i>consortia</i> fermentaires
Figure 68 : Production cumulée d'H ₂ lors de la fermentation de filtrats préparés à partir d'ensilage de maïs hydrolysé par explosion à
la vapeur - Comparaison avec les biomasses entières (filtrat + résidu)210
Figure 69 : Effet de la température d'hydrolyse et du fractionnement de l'hydrolysat d'ensilage de maïs obtenu par explosion à la
vapeur (entier et filtrat seul) sur le métabolisme fermentaire lors de la bioproduction d'H ₂
Figure 70 : Graphique de contour de la concentration en sucres dans le milieu réactionnel en fonction des paramètres d'hydrolyse,
de température et d'ajout d'acide et effet du facteur sévérité combiné sur la teneur en sucres totaux dans l'hydrolysat
Figure 71 : Effet de l'hydrolyse par l'autoclave sur le métabolisme fermentaire de l'ensilage de maïs
Figure 72 : Effet des prétraitements d'hydrolyse sur le rendement de production d'H ₂ lors de la fermentation obscure d'ensilage de
maïs
Figure 73 : Production d'hydrogène cumulée et production de métabolites au cours de la fermentation obscure de l'ensilage de seigle
prétraitée
Figure 74 : Procédé de préparation de la solution d'alimentation à partir de la biomasse d'ensilage de maïs et paramètres
d'alimentation pour la fermentation obscure en BRM229
Figure 75 : Production cumulée d'H ₂ et de métabolites lors de la fermentation des solutions d'alimentation préparées par filtration
de l'hydrolysat d'ensilage de maïs en réacteur en mode semi-batch231
Figure 76 : Effet du TSH sur les profils de débit de production d'H ₂ par litre de réacteur à deux concentrations en biomasse dans la
solution d'alimentation
Figure 77 : Effet du TSH sur la productivité en H ₂ et effet des paramètres d'alimentation du BRM (DAS) sur le taux de consommation
des sucres et sur le rendement de production en H ₂ 235

Liste des figures

Figure 78 : Effet du TSH sur les productions de gaz et de métabolites et sur la consommation des molécules présentes dans le milieu
réactionnel
Figure 79 : Graphique de contour de l'impact du TSH et de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation du BRM sur
la productivité en H ₂ et le rendement en H ₂ 241
Figure 80 : Effet de la concentration en biomasse sur le profil des débits de production d'H ₂ par litre de réacteur
Figure 81 : Corrélation entre le DAS et les indicateurs de fermentation en BRM : productivité en H ₂ , rendement de conversion des
sucres, taux de consommation des sucres et rapport molaire H ₂ /CO ₂ 244
Figure 82 : Effet de la concentration en biomasse sur les productions d'H ₂ et de métabolites et sur la consommation des solubles
présents dans le milieu réactionnel
Figure 83 : Effet de la concentration en biomasse sur le profil des débits de production d'H ₂
Figure 84 : Effet de la concentration en biomasse sur la productivité en H ₂ et le rendement en H ₂ 250
Figure 85 : Variations de l'abondance relative des espèces bactériennes dans le fermentât en fonction des paramètres d'alimentation
en filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs autoclavé du BRM254
Figure 86 : Variations du nombre et du débit de copies du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARNr des procaryotes dans le milieu
réactionnel en fonction des paramètres d'alimentation du BRM257
Figure 87 : Variations de l'abondance absolue en fonction des paramètres d'alimentation en filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs
autoclavé du BRM
Figure 88 : Analyse en composantes principales des différentes variables et paramètres d'alimentation lors de la fermentation
obscure d'hydrolysat d'ensilage de maïs en BRM261
Figure 89 : Production cumulée d'H ₂ et de métabolites lors de la fermentation des résidus solides de l'hydrolyse de l'ensilage de maïs
en réacteur en mode semi-batch
Figure 90 : Débit de DCO calculé sortant du BRM lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs hydrolysé et potentiel méthane
théorique (PM ₉₀) associé
Figure 91 : Evolution du débit de production d'H ₂ et de la concentration en métabolites dans le fermentât au cours de la fermentation
endogène d'ensilage de maïs (lot 1)I
Figure 92 : Evolution du débit de production d'H ₂ et de la concentration en métabolites dans le fermentât au cours de la fermentation
endogène d'ensilage de maïs (lot 2)IV
Figure 93 : Evolution du débit de production d'H ₂ pour les deux lots d'ensilage de seigle « frais » et de la concentration en métabolites
et sucres dans le fermentât au cours de la fermentation endogène d'ensilage de seigle frais lot 1 et lot 2V
Figure 94 : Débit d'H ₂ et concentration en métabolites au cours de la fermentation d'ensilage de maïs congelé (-20°C) pour un triplicat
à environ 100 jours et pour le test à 242 jours de congélationVIII
Figure 95 : Effet de la congélation de la biomasse d'ensilage de maïs sur les caractéristiques de la production d'H ₂ par fermentation
obscure endogène : production cumulée d'H ₂ , production de métabolites et composition des consortia fermentairesX
Figure 96 : Effet de la durée de congélation de l'ensilage de seigle sur la production d'hydrogène et le métabolisme au cours de la
fermentation obscure endogèneXVII
Figure 97 : Abondances relatives des séquences du gène codant pour l'ARN 16S des consortia bactériens de la fermentation endogène
d'ensilage de seigle pendant la production d'H ₂ pour différents temps et températures de stockageXVIII
Figure 98 : Configurations du BRM testées pour un fonctionnement avec ou sans boucle de recirculation
Figure 99 : Débit de production d'H ₂ par litre de bioréacteur en fonction du temps pour les tests de fermentation avec et sans boucle
de recirculationXXI
Figure 100 : Productivités des métabolites, consommation de glucose dans l'effluent en sortie du BRM sous différentes configurations
de recirculation du fermentatXXIII

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales réactions de fermentation au cours de l'ensilage.	20
Tableau 2 : Potentiel méthane de l'ensilage de maïs et de seigle	22
Tableau 3 : Production d'H ₂ par fermentation obscure à partir de co-produits de la plante de maïs	24
Tableau 4 : Prétraitements mécaniques et rendement de production d'hydrogène de l'ensilage de maïs dans la littérature	30
Tableau 5 : Module des µGC-TCD utilisés pour l'analyse des gaz	65
Tableau 6 : Caractéristiques de l'ensilage de maïs et de l'ensilage de seigle avant fermentation obscure	75
Tableau 7 : Analyses microbiologiques des biomasses testées d'ensilage de maïs et de seigle	79
Tableau 8 : Moyenne des performances de production d'H ₂ par fermentation obscure des biomasses ensilées	82
Tableau 9 : Paramètres de performances de production d'H ₂ et de l'équation de Gompertz des fermentations d'ensilage de maï fonction des concentrations en lactate ajouté	s en 97
Tableau 10 : Paramètres de performances de production d'H ₂ et issus de l'équation de Gompertz des fermentations d'ensilage maïs supplémentées en lactate et en acétate	e de 106
Tableau 11 : Productions de métabolites et différences de productions de métabolites lors des fermentations supplémentées lactate et en acétate par rapport à la référence	s en 111
Tableau 12 : Equation-bilans obtenues pour la co-fermentation du lactate et de l'acétate exogènes lors de la fermentation obse de l'ensilage de maïs par voie endogène. Les lignes surlignées en bleu seront utilisées pour calculées l'équation bilan de la conver du lactate.	cure sion 112
Tableau 13 : Equation de la réaction de co-fermentation du lactate et de l'acétate dans la littérature	113
Tableau 14 : Effet de la source de carbone sur la production d'H ₂ en milieu synthétique	114
Tableau 15 : Impact de l'exposition à l'air de la biomasse au cours de son stockage à 4°C sur les paramètres de performance e l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure de l'ensilage de maïs	t de 123
Tableau 16 : Production et rendement en H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure d'ensilag maïs congelé (référence) et congelé/aéré	e de 135
Tableau 17 : Effet du prétraitement de l'inoculum par aération sur le rendement en H ₂	136
Tableau 18 : Effet du TSH sur le débit de production d'H ₂ en BRM à partir de substrat modèle	148
Tableau 19 : Effet d'un dispositif d'extraction des gaz de l'effluent sur le débit de production d'H ₂ à partir de substrat modèle	150
Tableau 20 : Indicateurs du métabolisme au cours de la fermentation de substrat modèle (14 g/L) en BRM	152
Tableau 21 : Effet de la surface de fibres sur les performances de production d'H ₂ des BRM avec et sans extracteur liquide/gaz	154
Tableau 22 : Effet de la surface des fibres sur les indicateurs métaboliques lors de la fermentation obscure en BRM	156
Tableau 23 : Effet de l'ajout de lactate dans le substrat sur les performances de production d'H ₂	158
Tableau 24 : Effet du lactate sur les indicateurs du métabolisme fermentaire	158
Tableau 25 : Performances de production d'H ₂ obtenues en BRM et comparaison avec la littérature	162
Tableau 26 : Prétraitements mécaniques et rendement de production d'hydrogène de l'ensilage de maïs dans la littérature	169
Tableau 27 : Effet du broyage sur des biomasses d'ensilage de maïs stockées sous différentes conditions, paramètres de produc d'hydrogène en fermentation obscure et paramètres de l'équation de Gompertz	tion 171
Tableau 28 : Effet du broyage sur des biomasses d'ensilage de maïs (lot 2) stockées sous différentes conditions, paramètres production d'hydrogène en fermentation obscure et paramètres de l'équation de Gompertz	s de 175
Tableau 29 : Effet du broyage sur les deux lots d'ensilage de maïs stockées sous différentes conditions, paramètres de produc d'hydrogène en fermentation obscure et paramètres de l'équation de Gompertz	tion 177
Tableau 30 : Impact du broyage et du trempage de l'ensilage de maïs congelé sur les paramètres de performance de produc d'hydrogène et ceux de l'équation de Gompertz	tion 183
Tableau 31 : Paramètres de production d'hydrogène et de l'équation de Gompertz des fermentations de la biomasse entière et filtrats préparés à partir de l'ensilage de seigle congelé (lot 1)	des 187
Tableau 32 : Performances de la production d'H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure substrat modèle inoculé	e de 195
Tableau 33 : Paramètres du plan d'expériences pour l'optimisation du prétraitement d'explosion à la vapeur de la biomasse d'ensi de maïs – Teneur en sucres avant fermentation et rendement d'extraction des sucres	lage 198

Liste des tableaux

Tableau 34 : Impact des conditions d'hydrolyse de l'ensilage de maïs par explosion à la vapeur sur les paramètres de perform de production d'H ₂ et de l'équation de Gompertz	ances 203
Tableau 35 : Effet du fractionnement de la biomasse explosée à la vapeur sur les paramètres de performances de production d de l'équation de Gompertz	l'H₂ et 210
Tableau 36 : Paramètres pour les tests de l'optimisation du prétraitement à l'autoclave	214
Tableau 37 : Impact de l'hydrolyse de l'ensilage de maïs par autoclavage sur les paramètres de performance de production d de l'équation de Gompertz	l'H₂ et 216
Tableau 38 : Résultats de la fermentation de l'ensilage de seigle en fonction des différents prétraitements	219
Tableau 39 : Prétraitements d'hydrolyse pour la fermentation de biomasse lignocellulosique	222
Tableau 40 : Conditions de prétraitement et meilleurs rendements en H ₂ par rapport à la biomasse de référence (en %)	224
Tableau 41 : Production d'H ₂ et de CH ₄ en mode continu par la fermentation en deux étapes d'ensilage de maïs	228
Tableau 42 : Composition des solutions d'alimentation du BRM préparées à partir d'hydrolysats d'ensilage de maïs	230
Tableau 43 : Performances de la production d'H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscur solutions d'alimentation du BRM en réacteur semi-batch (100 et 200 g/L)	re des 231
Tableau 44 : Plan d'expériences des tests de fermentation selon le TSH et les paramètres d'alimentation (concentration en bio et DAS) pour l'optimisation de la production d'H ₂ du BRM	masse 232
Tableau 45 : Effet du TSH sur les paramètres de production de gaz et de conversion du substrat pour le filtrat d'hydrolysat d'en de maïs	silage 234
Tableau 46 : Effet du TSH sur la concentration en métabolites produits et en sucres non consommés dans le fermentât et s indicateurs d'efficacité du métabolisme	ur les 237
Tableau 47 : Effet de la concentration en biomasse sur les paramètres de production de gaz et de conversion du substrat constants (4 h et 6 h)	à TSH 243
Tableau 48 : Effet de la concentration en biomasse sur la teneur totale en métabolites et en sucres dans le fermentât et s indicateurs d'efficacité du métabolisme	ur les 246
Tableau 49 : Effet des paramètres d'alimentation sur la teneur totale en métabolites et en sucres dans le fermentât et s indicateurs d'efficacité du métabolisme à charge en biomasse constante	ur les 249
Tableau 50 : Description des échantillons dont les consortia bactériens ont été séquencés	252
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés Tableau 51 : Indice de Simpson des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S	252 253
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés Tableau 51 : Indice de Simpson des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S Tableau 52 : Production d'hydrogène en continu à partir de biomasse hydrolysée	252 253 264
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés Tableau 51 : Indice de Simpson des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S Tableau 52 : Production d'hydrogène en continu à partir de biomasse hydrolysée Tableau 53 : Production d'hydrogène continue à partir de biomasses réelles en BRM	252 253 264 265
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés Tableau 51 : Indice de Simpson des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S Tableau 52 : Production d'hydrogène en continu à partir de biomasse hydrolysée Tableau 53 : Production d'hydrogène continue à partir de biomasses réelles en BRM Tableau 54 : Performances de la production d'H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscur solutions d'alimentation du BRM testées en réacteur semi-batch	252 253 264 265 re des 267
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés Tableau 51 : Indice de Simpson des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S Tableau 52 : Production d'hydrogène en continu à partir de biomasse hydrolysée Tableau 53 : Production d'hydrogène continue à partir de biomasses réelles en BRM Tableau 54 : Performances de la production d'H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscur solutions d'alimentation du BRM testées en réacteur semi-batch Tableau 55 : Paramètres d'alimentation d'optimisant la production énergétique du filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs	252 253 264 265 re des 267 270
Tableau 50 : Description des échantillons dont les consortia bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 re des 267 270 271
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 267 270 271 273
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 re des 267 270 271 273 273
 Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés Tableau 51 : Indice de Simpson des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S. Tableau 52 : Production d'hydrogène en continu à partir de biomasse hydrolysée Tableau 53 : Production d'hydrogène continue à partir de biomasses réelles en BRM. Tableau 54 : Performances de la production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscur solutions d'alimentation du BRM testées en réacteur semi-batch. Tableau 55 : Paramètres d'alimentation d'optimisant la production énergétique du filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs Tableau 56 : Valorisation énergétique de biomasse par la production d'hydrogène et de méthane par voie fermentaire Tableau 57 : Prix de vente en gros (€/t) des principales molécules produites au cours de la fermentation obscure Tableau 58 : Composition des fermentâts et revenus estimés de la valorisation des métabolites générés Tableau 59 : Performances de la production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure 	252 253 264 265 267 270 271 273 273 273 273
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 re des 267 270 271 273 273 273 273 213 273
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 265 267 270 271 273
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 265 267 270 270 273 27
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 re des 267 270 270 271 273
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 267 270 270 271 273 27
Tableau 50 : Description des échantillons dont les <i>consortia</i> bactériens ont été séquencés	252 253 264 265 re des 267 270 271 273

Abréviations

CHN : Carbone, Hydrogène, Azote (analyse)

- BRM : bioréacteur membranaire
- DAS : débit d'alimentation substrat
- TSH : temps de séjour hydraulique
- NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
- Fd : protéine ferrédoxine
- ATP : adénosine triphosphate
- CoA : coenzyme A
- PFOR : pyruvate ferrédoxine oxydoréductase
- PFL : pyruvate formiate lyase
- 5-HMF : 5-hydroxy-méthyl-furufural
- STEP : station d'épuration des eaux usées
- MS : matières sèches
- MV : matières volatiles
- L/G : liquide/gaz
- DCO : demande chimique en oxygène
- CSTR : réacteur agité en continu
- PTFE : polytétrafluoroéthylène
- FSC : facteur de sévérité combiné
- μGC : micro-chromatographie en phase gazeuse
- TR : taux de recirculation
- TSC : temps de séjour des liquides dans la calandre
- BMP : potentiel biométhane
- TCD : détecteur à conductivité thermique
- HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
- RID : détecteur à indice de réfraction

HPAEC PAD : chromatographie haute performance échangeuse d'anions couplée à un décteteur par ampéromètrie pulsée

- qPCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative
- ACP : analyse en composantes principales
- NDF : fibres insolubles dans les détergents neutres
- UFC : unité formant colonie
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- EM : ensilage de maïs
- Lac : lactate
- Ac : acétate
- UASB : réacteur à flux ascendant à lit de boues

Introduction générale

Dans le contexte actuel de transition énergétique, la perspective de production d'un vecteur énergétique comme l'hydrogène permettant, *via* les piles à combustible, de produire de l'énergie électrique propre, présente un intérêt majeur tant au niveau scientifique, industriel que politique. En effet, la réaction de l'hydrogène, molécule non carbonée, avec l'oxygène n'émet aucun polluant atmosphérique. Néanmoins, l'utilisation de l'hydrogène comme source d'énergie n'a de sens qui si celui-ci est produit à partir de procédés durables et renouvelables. La fermentation obscure est une voie biologique de production de l'hydrogène par des *consortia* bactériens qui répond pleinement à ces conditions. En effet, la fermentation obscure se caractérise par la transformation de matières organiques, appelées biomasse, en hydrogène, par des bactéries dans un milieu sans oxygène et sans nécessiter de source lumineuse. Le processus comprend deux étapes (Trably *et al.*, 2018). La première est celle de l'hydrolyse pendant laquelle les *consortia* bactériens dégradent les polysaccharides composant la biomasse en monomères de sucres et/ou d'autres molécules facilement métabolisables, le substrat. La seconde étape consiste en une cascade de réactions pour convertir le substrat en énergie et en produits nécessaires au métabolisme des bactéries. Plusieurs produits sont formés : du biohydrogène, du dioxyde de carbone, des acides organiques (acétique, butyrique, propionique, pyruvique, formique, succinique, etc.) et des alcools (éthanol et butanol principalement).

Pendant la fermentation obscure, le substrat peut être utilisé via les voies productrices d'H₂, qui aboutissent à la co-production d'acétate (Eq. 1) et de butyrate (Eq. 2), ce sont celles qui nous intéressent dans nos expériences.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$$
 (Eq. 1)

$$C_6H_{12}O_6 \to CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2 + 2CO_2$$
 (Eq. 2)

La voie de l'acétate génère 4 moles d'H₂ à partir d'une mole de glucose, ce qui constitue le rendement maximal théorique *in vivo*. Dans la littérature, les rendements sont plus faibles du fait de la diversité du métabolisme fermentaire (Li et Fang, 2007 ; Sinha et Pandey, 2011). Le substrat peut être utilisé pour la production d'éthanol (voie métabolique compétitrice vis-à-vis du substrat) et l'H₂ peut être consommé pour la production de propionate, pour la réduction des nitrates et sulfates, pour la production d'acétate via l'homoacétogenèse et pour la production de méthane, le produit final de la digestion anaérobie.

Pour augmenter la production d'H₂, les travaux de recherches s'articulent autour de quatre stratégies (Bhatia *et al.*, 2021 ; François *et al.*, 2021 ; Nemestóthy *et al.*, 2020). Les deux premières sont liées à la biomasse utilisée : celle-ci doit être sélectionnée pour être favorable à la croissance de bactéries productrices d'H₂ et riche en composés fermentescibles. De plus, pour améliorer l'accès des bactéries au substrat, la biomasse peut être prétraitée. Les deux dernières stratégies concernent la conception du bioréacteur. Technologiquement, pour une production efficace d'H₂, le bioréacteur doit permettre d'une part l'extraction

de l'hydrogène du milieu réactionnel dès qu'il est produit et d'autre part, d'assurer de la stabilisation des micro-organismes producteurs d'H₂ dans le bioréacteur.

La mise en œuvre de ces stratégies a permis l'amélioration des procédés fermentaires, dont les productivités maximales peuvent atteindre jusqu'à 2,5 L_{H2}/L_{bioréacteur}/h (Noblecourt *et al.*, 2017). Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont abouti au développement d'un nouveau type de bioréacteur membranaire (BRM) (Ernst *et al.*, 2016). Ce dispositif est composé d'un réacteur de fermentation biologique de substrats liquides dans lequel sont placés des fibres creuses, permettant d'extraire les gaz produits en continu et de promouvoir la production bactérienne d'H₂. En effet, les membranes permettent la rétention de bactéries dans le milieu réactionnel en offrant une surface idéale pour le développement d'une couche de bactéries. Par ailleurs, la configuration du bioréacteur en mode flux ascendant permet de retenir les bactéries productrices d'H₂, en suspension dans le milieu ou agrégées sous forme de granules et sédimentées au fond du module (Renaudie *et al.*, 2021b).

Dans ce cadre, l'objectif principal de ce projet de thèse est de mettre en œuvre dans le BRM breveté par le laboratoire - dont le fonctionnement a été testé avec substrat modèle - une solution d'alimentation préparée à partir d'une biomasse lignocellulosique (l'ensilage de maïs) et de proposer un plan d'expériences sur les paramètres clés de la production continue que sont le débit d'alimentation en substrat (DAS) et le temps de séjour hydraulique (TSH). Comme le soulignera la revue bibliographique présentée en chapitre I du manuscrit, les biomasses ensilées sont prometteuses pour une valorisation énergétique néanmoins les données sur le mécanisme de leur fermentation restent très lacunaires.

Ainsi, en amont du procédé de production d' H_2 en BRM, le premier chapitre expérimental (chapitre III) sera dédié à la caractérisation des biomasses sélectionnées et au test de leur potentiel de production d' H_2 en tant que substrat et sources de bactéries (fermentation obscure endogène) en réacteur fonctionnant en mode semi-batch c'est-à-dire avec extraction des gaz au fur et à mesure qu'ils sont produits. Les mécanismes de fermentation de l'ensilage de maïs seront ensuite approfondis mettant en évidence une nouvelle voie de production d' H_2 à partir de l'acide lactique.

Le chapitre IV aborde une dimension plus pratique de la mise en œuvre de la fermentation obscure à savoir les phénomènes pouvant intervenir pendant le stockage et le transport des biomasses ensilés vers le bioréacteur et qui peuvent potentiellement impacter la production d'hydrogène par fermentation endogène. Nous nous intéresserons à l'effet de la dégradation aérobie et de l'aération forcée de l'ensilage de maïs sur le potentiel de production d'H₂.

Le dispositif de bioproduction d'H₂ (BRM) développé et breveté par le laboratoire et destiné à être alimenté par les biomasses ciblées sera présenté au chapitre V. Afin d'intensifier la production d'hydrogène en BRM, nous proposerons des améliorations conceptuelles et quantitatives du bioréacteur en jouant sur ses propriétés notamment par l'augmentation de la surface des fibres dans le module ; les fibres servant à stabiliser le *consortium* microbien et ainsi limitant le phénomène de lessivage des bactéries. Les paramètres opératoires clés du BRM : temps de séjour hydraulique (TSH) et débit d'alimentation en substrat (DAS) feront l'objet d'une étude.

Des solutions candidates à l'alimentation du BRM sont préparées et présentées dans les chapitres VI et VII. Pour ce faire, des prétraitements sont mis en œuvre afin d'extraire les sucres de la biomasse en phase liquide. Des prétraitements doux *i.e.* permettant de conserver la flore bactérienne pour la fermentation endogène seront mis en œuvre dans le chapitre VI (broyage et trempage). A l'inverse, des prétraitements thermiques beaucoup plus sévères aboutissant à la stérilisation de la biomasse mais intensifiant l'extraction des sucres seront étudiés au chapitre VII (explosion à la vapeur, autoclavage). A l'issue de ces deux études, une solution d'alimentation sera retenue pour l'alimentation du BRM dont le fonctionnement sera optimisé au chapitre VIII. Cette dernière partie fera le lien entre les connaissances acquises sur la fermentation des biomasses ensilés et le travail d'amélioration de la productivité en H₂ du BRM. En outre, ces tests permettront de déterminer un optimum de productivité en H₂ et de prédire les performances du réacteur à partir des paramètres d'alimentation.

Enfin, en aval du procédé, des perspectives de valorisation des co-produits seront présentées pour intégrer la bioproduction d'H₂ comme une brique technologique au cours de la valorisation énergétique de la biomasse.

Chapitre I : Revue de la littérature

L'objectif de ce chapitre est à la fois de présenter un état des lieux sur la place de l'hydrogène dans notre société et de préciser l'état des connaissances relatives aux domaines que nous mobiliserons au cours de ce travail de recherche : la fermentation obscure, les propriétés des substrats utilisés (ensilage de maïs et ensilage de seigle), les paramètres clés de la production d'hydrogène à partir de ces substrats et les caractéristiques des bioréacteurs utilisant des procédés continus de fermentation pour produire de l'hydrogène.

1. Contexte

1.1. Changement climatique et transition énergétique

Les sociétés humaines du 19^{ème} et du 20^{ème} siècle ont fait basculer la Terre dans l'ère de l'Anthropocène. Par ses actions, l'humanité impacte durablement les conditions de la vie sur la planète et devient ainsi une véritable force géologique (Bonneuil et Fressoz, 2013), notamment en raison des émissions anthropiques de gaz à effet de serre qui sont passées de 15 à 47,5 gigatonnes d'équivalent CO₂ entre les années 1970 et 2018 (Environnement et Changement climatique Canada, 2021). La responsabilité de l'humanité réside alors dans la recherche et la mise en œuvre de solutions et de mode de vie pour préserver la vie sur terre. D'où un besoin crucial de développer de nouvelles ressources énergétiques répondant aux exigences de la durabilité (Gopalakrishnan *et al.*, 2019a) :

- ces sources d'énergie doivent être suffisamment abondantes et renouvelables afin de remplacer ou de réduire la pression sur les sources d'énergie conventionnelles ;
- leur disponibilité doit être répartie au mieux sur la planète afin de limiter les problèmes géostratégiques liés au contrôle et à la dépendance des sources d'énergie ;
- leur empreinte carbone et leur impact sur le climat, l'environnement et la santé doivent être aussi faibles que possible.

L'histoire nous apprend que chaque révolution industrielle a connu une transition énergétique basée sur une source d'énergie principale (charbon, pétrole). Celle qui s'enclenche en ce début de 21^{ème} a pour objectif de réduire les émissions de gaz à effet de serre et de décarboner les activités humaines. Elle s'appuie sur des énergies non carbonées et des énergies renouvelables. Ainsi, l'hydrogène pourrait participer de façon significative à cette transition visant la neutralité carbone à l'horizon 2050. Des engagements industriels et politiques importants ont été pris en ce sens depuis 5 ans. Par exemple, l'année 2017 voit la naissance à Davos de *l'Hydrogen Council*, regroupant 13 leaders industriels des secteurs de l'énergie et du transport, et la publication du plan Hulot qui marque la volonté à l'échelle de la France de faire de l'hydrogène l'un des piliers de la transition énergétique à moyen terme. L'engagement de l'Etat français se concrétise également par :

- la révision de la Stratégie Nationale Bas Carbone issue de la Loi de Transition Energétique pour
 la Croissance Verte en 2018 (Ministère de la Transition écologique, 2021) ;
- la publication de l'ordonnance n° 2021-167 du 17 février 2021 relative à l'hydrogène (Légifrance.fr, 2021);
- le lancement de deux plans de soutien à la recherche et à l'innovation de la filière Hydrogène d'un montant de 100 millions d'euros (France Relance) et de 7,2 milliards d'euros sur 10 ans auxquels ont été ajoutés 1,9 milliards d'euros *via* le plan « France 2030 » ;
- la création du Conseil National de l'hydrogène en 2021 illustre la stratégie de coopération entre les acteurs publics et privés pour le développement de la filière hydrogène en France.

Enfin, l'Etat français conforte le rôle stratégique de l'agence de la transition écologique, l'ADEME, tant dans le domaine de la recherche, développement et innovation avec le financement de projets de recherche et de thèses en partenariat avec des laboratoires de recherche publics, des entreprises et des collectivités, que dans celui de l'expertise et du soutien aux collectivités territoriales à travers de nombreux partenariats.

1.2. La filière hydrogène en France

La filière pour la production d'H₂ est portée par des groupes internationaux de secteurs divers *e.g.* Air Liquide, ENGIE, Véolia, TotalEnergies, Michelin..., de jeunes entreprises et des start-ups comme Haffner Energy (production d'H₂ à partir de biomasse par procédé thermochimique R-Hynoca), Genvia, McPhy et Elogen (production d'H₂ par électrolyse) et enfin ATHENA recherche, une start-up pour la production d'H₂ par voie fermentaire.

Les laboratoires de recherche universitaires et du CNRS, et les organismes comme le CEA et l'IFPEN jouent un rôle clé pour le développement de l'hydrogène par l'amélioration et la découverte de technologies de rupture.

A l'échelle régionale, le tissu industriel est associé aux acteurs publics par l'intermédiaire de l'ADEME et d'associations comme les Clubs hydrogène qui marquent la volonté des régions de s'approprier le déploiement des technologies de l'hydrogène. La filière est structurée à l'échelle nationale par France Hydrogène qui a pour but de mettre en réseau les acteurs français et de promouvoir les technologies de l'hydrogène.

1.3. L'hydrogène : un vecteur énergétique

L'intérêt de l'hydrogène pour la transition énergétique vient de ses propriétés chimiques. L'hydrogène (H₂) est un gaz non toxique, non carbonée avec une densité énergétique forte. Sa combustion génère un rendement calorifique net de 122 MJ/kg, environ 3 fois supérieur à celui des carburants comme le gasoil et le diesel (Nikolaidis et Poullikkas, 2017 ; Venkata Mohan et Pandey, 2019). En outre, ce processus produit

très peu de polluants atmosphériques et aucune molécule carbonée, répondant ainsi aux critères de respect de l'environnement (Kotay et Das, 2009).

L'hydrogène peut produire de l'énergie par combustion comme un carburant conventionnel ou par réaction électrochimique dans une pile à combustible. Il est aussi considéré comme un vecteur énergétique (comme l'électricité ou la vapeur d'eau), servant de passerelle entre les sources d'énergie primaire et les usages finaux (ADEME, 2021). Ces sources d'énergie primaire peuvent être utilisées pour produire de l'H₂ par électrolyse de l'eau (*Power-to-Gas*), qui sera stocké avant d'être converti en électricité et utilisé.

2. L'hydrogène au 21^{ème} siècle

2.1. Utilisation de l'hydrogène

Actuellement, l'hydrogène est avant tout utilisé comme matière première dans l'industrie (Durot, 2021). La France en consomme environ 0,9 million de tonnes par an et le marché mondial de l'hydrogène représenterait 60 millions de tonnes par an (Ministère de la Transition écologique, 2021).

2.1.1. L'hydrogène pour l'industrie

Dans l'industrie, 55 % de la consommation actuelle d'H₂ est destinée à la production d'ammoniac par le procédé Haber-Bosch (Eq 1.1), qui est historiquement la première utilisation de l'hydrogène à l'échelle industrielle. L'H₂ réagit avec l'azote à haute température et sous pression en présence d'un catalyseur contenant du fer pour former l'ammoniac, une matière première utilisée principalement pour la production de fertilisants (Darmawan *et al.*, 2022).

$$3H_2 + N_2 \to 2NH_3 \tag{Eq. 1.1}$$

Depuis l'instauration en 2009 de la norme européenne sur la teneur maximale en soufre dans les carburants (10 ppm), les industries de raffinage, gazières et pétrolières sont les seconds consommateurs d'H₂ avec 25 % de la production. L'hydrogène est utilisé pour désulfurer les carburants lors du raffinage (Eq. 1.2) (Steinberger-Wilckens *et al.*, 2017). Ce procédé permet de réduire les émissions d'oxyde de soufre lors de la combustion dans les moteurs thermiques. L'H₂ sert également à réduire la longueur des chaînes d'hydrocarbures (crackage catalytique) ou à effectuer des modifications afin de les stabiliser ou les purifier (hydrogénation) (Shell, 2017). L'H₂ est produit sur site (H₂ captif) et provient majoritairement du reformage catalytique du naptha, complété avec de l'H₂ issu du reformage du gaz naturel (Shell, 2017).

$$R_1 - S - R_2 + 2H_2 \to R_1H + R_2H + H_2S$$
(Eq. 1.2)

Par voie catalytique, en tant que réactif, l' H_2 peut réagir avec le monoxyde de carbone (Eq. 1.3) ou le CO₂ (Eq. 1.4) pour la production de méthanol (*Gas-to-Liquid*, Lee *et al.* 2020). Cette application consomme 10 % de l' H_2 dédié à l'industrie. Le méthanol peut ensuite être utilisé comme un carburant (par combustion directe

ou *via* l'utilisation d'une pile à combustible) ou actuellement comme matière première pour la synthèse chimique.

$$CO + 2H_2 \rightarrow CH_3OH$$

$$(Eq. 1.3)$$

$$CO_2 + 3H_2 \rightarrow CH_3OH + H_2O$$

$$(Eq. 1.4)$$

Le reste de l'hydrogène présent sur le marché industriel concerne divers domaines qui mettent à contribution le pouvoir réducteur de l'H₂ pour lutter contre l'oxydation (l'industrie du verre, la chimie, la pharmacie, l'électronique, l'agroalimentaire).

2.1.2. La mobilité hydrogène

La décarbonation du secteur des transports est un enjeu majeur de la transition écologique puisque celui-ci représentait en 2016, 42 % des émissions de CO₂ en France, d'après les données de l'agence internationale de l'énergie (2018).

L'hydrogène utilisé dans une pile à combustible permet de produire de l'électricité directement à bord d'un véhicule (voiture ou mono/deux roues), propulsé par un moteur électrique. Ces véhicules, à faibles émissions de polluants, disposent d'une bonne autonomie et d'un temps de recharge réduit (de l'ordre de 5 minutes). Ils représentent donc des solutions intéressantes pour décarboner le secteur des transports, à l'heure où des zones à faible émission sont mises en place dans les grandes agglomérations françaises. Pour soutenir la mobilité à H₂ sur le territoire français, 50 stations de rechargement sont actuellement en service et 44 sont en projet ou en construction (France Hydrogène, 2021a).

L'H₂ est employé également pour les transports en commun : des autobus commerciaux fonctionnant à l'H₂ ont été déployés dans l'agglomération de Pau et de Versailles, ainsi qu'une navette fluviale à Nantes. Dans le domaine de la mobilité ferroviaire, quatorze rames de train Régiolis H₂ (Coradia iLint) construites par Alstom General Electric seront mises en circulation par la SNCF en 2025 pour décarboner les lignes non électrifiées. Dans le domaine de l'aéronautique, les premiers vols d'essai ont été effectués avec l'aéronef quadriplace HY4 à propulsion à l'hydrogène en 2020. Cette année marque également la présentation de trois concepts d'avion à H₂ dont un par Airbus Industries, qui s'est fixé comme objectif de faire voler son premier avion commercial à hydrogène d'ici 2035 (Schwoerer, 2021).

Enfin, l'application de l'H₂ la plus mature technologiquement pour la mobilité est l'ergol liquide, carburant pour la propulsion des fusées.

2.1.3. L'hydrogène énergie

L'hydrogène peut être injecté directement dans le réseau de gaz pour former l'Hythane® un mélange de d'H₂ (6 % à 20 %, volume) et de gaz naturel. L'ajout d'H₂ au gaz naturel augmente la quantité d'énergie du gaz et réduit les émissions de CO₂ et de polluants lors de la combustion du mélange (NOx). Ce gaz est notamment mis en œuvre depuis 2005 dans le cadre du projet GRHYD (communauté urbaine de Dunkerque), coordonné par ENGIE et soutenu par l'ADEME, pour le chauffage urbain et comme carburant pour les bus. En 2010, des analyses ont montré une réduction de 8 % des émissions des gaz à effet de serre et de 10 % des NOx par rapport à un fonctionnement au gaz naturel.

En tant que combustible, l'H₂ pourrait également servir dans des centrales thermiques de production d'électricité. De par sa nature de vecteur énergétique, l'hydrogène peut être couplé à des parcs de production d'énergies renouvelables comme moyen de stockage massif de l'électricité sur une longue durée. Ceci permet de pallier la production intermittente des sources d'énergies renouvelables (éolienne, photovoltaïque) et correspond au *Power-to-Gas*.

L'utilisation de réservoirs de petite capacité d'H₂ (50 L) associée à des piles à combustible ouvre un nouveau marché pour l'hydrogène-énergie dans les zones isolées. Ces dispositifs indépendants du réseau électrique permettraient le rechargement ou l'alimentation d'appareils électroniques (téléphone, drone, vélo électrique, *sound system*, etc.) et serait une alternative aux groupes électrogènes conventionnels (France Hydrogène, 2021b).

Pour conclure, si l'hydrogène est très massivement employé comme réactif chimique, son utilisation, aujourd'hui limitée, est en plein essor : production d'électricité stationnaire *via* des piles à combustible ou en centrale thermique comme combustible, vecteur énergétique pour la mobilité ou moyen de stockage d'énergies renouvelables *via* leur conversion en hydrogène (ADEME, 2021).

2.2. Procédés de production d'hydrogène à partir de biomasse

Le principe des modes de production de l'H₂ est de dissocier l'H₂ des atomes auxquels il est combiné oxygène (H₂O), carbone (CH₄ ou molécules organiques). L'empreinte carbone de l'hydrogène dépendra donc de sa source et de son procédé de production.

Or, à l'heure actuelle, la majorité de l'H₂ est produit à partir de combustibles fossiles. D'après Lepage (2021), 76 à 78 % de la production d'H₂ provient du reformage de combustibles fossiles (méthane du gaz naturel) et 18 à 22 % de la gazéification du charbon. Seule une faible proportion de l'H₂ est produite par électrolyse de l'eau (2 à 4 %) (Kumar *et al.*, 2020). Il est donc urgent de développer des procédés de production d'H₂ à partir de sources renouvelables comme la matière organique ou biomasse.

Les principaux procédés de production d' H_2 à partir de la biomasse sont présentés sur la figure 1.



<u>Figure 1</u> : Procédés de production d'H₂ à partir de la biomasse.

La biomasse peut être transformée en H_2 par des procédés thermochimiques ou par des procédés biologiques.

La première voie thermochimique est le modèle de la centrale thermique. La biomasse est brûlée afin de générer de l'énergie thermique destinée à produire de l'électricité, électricité qui sera ensuite utilisée pour produire de l' H_2 par électrolyse de l'eau. Au cours de **l'électrolyse**, les molécules d'eau soumises à un courant électrique se dissocient en ions hydroxydes (OH)⁻ à la cathode et en protons H⁺ à l'anode, ce qui produit respectivement de l'oxygène et de l'hydrogène gazeux (Eq. 1.5) sans co-production de molécule carbonée.

$$2 H_2 0 \xrightarrow{\text{énergie électrique}} 2 H_2 + O_2 \tag{Eq. 1.5}$$

Cette technologie est appliquée à l'échelle industrielle, à l'image de l'électrolyseur de Bécancour au Canada, déployé par Air Liquide, qui produit 8,2 tonnes d'H₂ par jour. En outre, l'électrolyse de l'eau rend possible l'implémentation du *Power-to-Gas* qui permet de stocker le surplus d'électricité produit par les éoliennes et les panneaux photovoltaïques. Les efforts de recherche pour optimiser cette technologie visent l'amélioration du rendement énergétique et le développement de l'électrolyse à haute température.

La seconde filière thermochimique consiste à convertir la biomasse en carburant (bio-huiles) par pyrolyse et liquéfaction puis à procéder à une étape de gazéification pour obtenir de l'H₂.

La gazéification permet de convertir directement la biomasse (sous forme solide ou liquide) en gaz de synthèse composé de CO et de H₂. Au cours de cette réaction, qui a lieu à des températures élevées (700°C - 900°C), la biomasse consomme un agent oxydant (air, oxygène ou vapeur d'eau) pour produire le gaz de synthèse et un résidu solide (Parthasarathy et Narayanan, 2014).

La pyrolyse est un procédé thermochimique réalisé à des pressions de 1 à 50 bar et à des températures variables en fonction de la durée de réaction (500°C pour la pyrolyse flash qui dure quelques secondes) (Lui *et al.*, 2020). Des composés carbonés contenant de l'hydrogène sont décomposés par chauffage en l'absence d'oxygène. Ce procédé aboutit à la production du gaz de synthèse, d'huile de pyrolyse et d'un solide appelé biochar. La pyrolyse se distingue donc de la gazéification par l'absence d'oxygène et d'eau et par une température de réaction plus faible.

La liquéfaction est un processus thermochimique à plus basses températures (150 à 420°C) qui s'effectue à haute pression (40 à 220 bar) (Gollakota *et al.*, 2018) dans l'eau ou dans un solvant. Au terme de la liquéfaction, la biomasse est convertie en un carburant liquide (bio-huile) et en un résidu solide.

La filière biochimique consiste à transformer une fraction de la biomasse en molécules d'intérêts (méthane, éthanol, biodiesel) ou directement en H₂ au cours de réactions catalysées par des microorganismes.

Le méthane, l'éthanol et le biodiesel, tout comme les produits de la liquéfaction et de la pyrolyse, sont à leur tour transformés en gaz de synthèse par reformage catalytique ou gazéification. Le reformage se divise en trois voies selon les réactifs utilisés :

- le vaporeformage consiste en une réaction endothermique catalysée entre 700°C et 1000°C et en présence de vapeur produisant du gaz de synthèse (H₂ et CO) (Choi *et al.*, 2016; Ji and Wang, 2021; Surla, 2019).
- l'oxydation partielle non catalysée est une réaction exothermique ayant lieu à haute température (1100 à 1500°C) et à pression élevée (20 à 90 bar) et au cours de laquelle des molécules carbonées sont converties en gaz de synthèse en présence d'oxygène (Hognon, 2012; Surla, 2019; Voitic *et al.*, 2018).
- le reformage autotherme combine la réaction endothermique de vaporeformage et la réaction exothermique de l'oxydation partielle dans un même réacteur. Dans ce procédé, le méthane et l'oxygène sont mélangés en parallèle à de la vapeur d'eau avant d'être préchauffés, ils sont ensuite dirigés vers le réacteur fonctionnant avec un catalyseur à base de nickel, à une pression de 20 à 60 bar et une température de 900°C à 1100°C et ne nécessitant pas de chauffage au cours de la réaction (Surla, 2019).

Les équations récapitulent la réaction du vaporeformage (Eq. 1.6) et celle de l'oxydation partielle (Eq. 1.7) pour la conversion de méthane en gaz de synthèse.

$$CH_4 + H_2O \xleftarrow{700-1000^{\circ}C}{Catalyseur} CO + 3 H_2$$

$$(Eq. 1.6)$$

$$CH_4 + \frac{1}{2}O_2 \xleftarrow{1100 - 1500^{\circ}C} CO + 2H_2 \tag{Eq. 1.7}$$

11

Les efforts de recherche sur le reformage sont dédiés à l'amélioration des catalyseurs, à la réduction de la température de réaction et au développement de réacteurs membranaires catalytiques utilisant des membranes permsélectives à H₂ pour favoriser la réaction dans le sens de la production d'H₂ (Ji and Wang, 2021).

Pour améliorer le rendement global en H₂, la réaction inverse de **conversion du gaz à l'eau** (*Water Gas Shift*) est réalisée pour convertir le CO contenu dans le gaz de synthèse en H₂. Le CO réagit avec de l'H₂O pour former CO₂ et H₂ (Eq.1.8) (Newsome, 1980). Cette réaction exothermique est effectuée, en fonction du catalyseur choisi, à basse (200°C) ou à plus haute température (350°C).

$$CO + H_2O \leftrightarrow H_2 + CO_2 \tag{Eq. 1.8}$$

La réaction inverse de conversion du gaz à l'eau est également réalisable par voie biologique. En effet, l'organisme *Rubrivivax gelatinosus CBS*, une bactérie photosynthétique pourpre, non soufrée, est capable d'effectuer cette réaction en conditions anaérobies, à pression atmosphérique et à une température de 25°C (Maness et Weaver, 2002).

Le CO₂ généré peut être ensuite éliminé par absorption avec des amines (N-méthyldiéthanolamine ou Ethanolamine) ou des sels de bases fortes. Le CO et le CO₂ restant sont converties en méthane par méthanation (Eq. 1.9 et Eq. 1.10). La réaction de méthanation peut être effectuée également par voie biologique grâce à des organismes méthanogènes autotrophes et hydrogénotrophes.

$$C0 + 3H_2 \leftrightarrow CH_4 + H_20 \tag{Eq. 1.9}$$

$$CO_2 + 4H_2 \leftrightarrow CH_4 + 2H_2O \tag{Eq. 1.10}$$

Une autre voie consiste à purifier directement l'H₂ grâce à un dispositif d'adsorption modulé en pression permettant d'absorber sélectivement le CO₂ (Dicko *et al.*, 2013).

Une alternative à ce procédé est la technologie *Cryocap*, développée en 2015, qui permet de récupérer et d'isoler le CO₂ par captage cryogénique, puis de le liquéfier avant purification pour un usage alimentaire (Air Liquide, 2017).

Enfin, **les procédés biologiques** mettant en œuvre la **photofermentation**, **l'électrolyse microbienne** et la **fermentation obscure** de composés organiques avec des bactéries, agissant comme des biocatalyseurs, permettent de produire directement de l'hydrogène. Ces procédés biologiques s'effectuent à pression atmosphérique, à basses températures (entre 37°C et 60°C) et avec des apports énergétiques facultatifs (lumière, électricité) et ne nécessitent pas d'étape de gazéification ou de reformage ; ils ont donc un coût énergétique faible par rapport aux procédés conventionnels.

La photofermentation est effectuée par les bactéries de type pourpre photosynthétiques non sulfureuses qui sont des organismes photohétérotrophes *i.e.* capables à la fois d'utiliser des substrats organiques et de capturer l'énergie lumineuse. Ainsi, lors de la production d'H₂ par photofermentation, les bactéries convertissent des substrats organiques (glucose Eq. 1.12, acides organiques) en H_2 et CO_2 en condition anaérobie grâce à l'énergie lumineuse.

$$C_6 H_{12} O_6 + 6 H_2 O \xrightarrow{\text{énergie lumineuse}} 12 H_2 + 6 C O_2$$
(Eq. 1.12)

L'utilisation de molécules organiques assez diverses peut être mise à profit pour la valorisation d'effluents industriels chargés en matières organiques ou d'effluents de fermentation obscure (Cai *et al.*, 2019; Castillo-Moreno *et al.*, 2018; Sağır et Hallenbeck, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

L'électrolyse microbienne fonctionne sur le même principe que l'électrolyse conventionnelle sauf que la dissociation de l'eau en O₂ et en H₂ est catalysée par des bactéries anaérobies et électroactives capables de réaliser des transferts d'électrons au cours de leur métabolisme. L'action des bactéries permet de réduire le voltage appliqué pour la dissociation de l'eau (entre 0,2 et 1,0 V en présence de bactéries et 1,23 V pour le procédé conventionnel, Shiva Kumar et Himabindu, 2019). Le dispositif comprend deux compartiments. Le compartiment de l'anode est le lieu de l'oxydation du substrat en CO₂, en protons et en électrons par les bactéries *via* une cascade de réactions (Kadier *et al.*, 2018). Les électrons sont transférés à l'anode tandis que les protons diffusent à travers une membrane échangeuse de protons jusqu'au compartiment de la cathode. A la cathode, les électrons et protons sont associés pour former de l'H₂. Une faible différence de potentiel électrique est appliquée entre les deux compartiments pour former l'H₂ à la cathode (Bakonyi *et al.*, 2018 ; Cokay, 2018; Li *et al.*, 2021, 2014).

Notons que l'H₂ et le O₂ sont produits dans deux compartiments différents et ne nécessitent pas d'étape de séparation.

La fermentation obscure est un processus anaérobie de conversion de la matière organique (préférentiellement les sucres monomériques) en H₂ catalysé par des bactéries. L'H₂ est principalement coproduit avec du CO₂ et de l'acétate (Eq. 1.13) ou du butyrate (Eq. 1.14)

$$C_{6}H_{12}O_{6} + 2H_{2}O \rightarrow 2 CH_{3}COOH + 4H_{2} + 2CO_{2}$$
(Eq. 1.13)
$$C_{6}H_{12}O_{6} \rightarrow CH_{3}CH_{2}CH_{2}COOH + 2H_{2} + 2CO_{2}$$
(Eq. 1.14)

La fermentation obscure se distingue des autres procédés biologiques par de bonnes productivités en H₂ (jusqu'à 78 L_{H2}/L/j à partir de glucose, Pugazhendhi *et al.*, 2017) et un rendement énergétique limité (en pratique de 15 à 33 %) (Valdez-Vazquez et Poggi-Varaldo, 2009). La fermentation obscure est un procédé qui permet la production d'H₂ à partir de biomasses variées, sans contrainte d'O₂ ni de lumière et à un coût concurrentiel par rapport aux procédés conventionnels (Nikolaidis et Poullikkas, 2017). Ainsi, elle permettrait de décarboner une partie de la production d'H₂ tout en valorisant des co-produits organiques des activités humaines.

3. Production d'H₂ par fermentation obscure : métabolisme et microbiologie

3.1. Pourquoi l'hydrogène est-il produit ?

Pour les bactéries productrices d'H₂, l'H₂ est un moyen de réguler les excès d'électrons mais ce gaz ne semble pas avoir d'utilisation notable par ces bactéries (Ding *et al.*, 2016 ; Lazaro et Hallenbeck, 2019). Dans les écosystèmes, l'hydrogène est utilisé par des microorganismes pour la bioremédiation du milieu (détoxification des éléments halogénés) et dans des interactions de croissance commensaliste qui permettent de produire de l'énergie en oxydant l'hydrogène en présence d'un accepteur d'électrons (O₂, NO₃⁻, SO₄²⁻) (Teng *et al.*, 2019).

3.2. Comment l'hydrogène est-il produit ?

3.2.1. Les hydrogénases : des enzymes clés pour la production d'hydrogène

L'H₂ est produit au cours d'une réaction d'oxydoréduction (Eq. 1.15) catalysée par des métallo enzymes : les hydrogénases.

$$R\acute{e}ducteur + 2 H^+ \rightarrow Oxydant + H_2 \tag{Eq. 1.15}$$

La production d'H₂ a lieu sur le site catalytique de l'enzyme qui est composé d'un cœur métallique contenant du nickel et/ou du fer. Les hydrogénases qui interviennent pendant la fermentation obscure sont les hydrogénases [Ni-Fe] et [Fe-Fe]. La plus efficace est la [Fe-Fe] (Wittkamp *et al.*, 2018). Les [Ni-Fe] ont une double action : production d'H₂ et consommation d'H₂ pour régénérer du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) par réduction. Elles contiennent également des sites fer – cystéine qui servent de système de transfert d'électrons. Ces enzymes sont sensibles à l'O₂ et au CO dont la présente empêche toute production. De plus, le fonctionnement des hydrogénases peut être également limité par la pression partielle en H₂. Celles-ci ne produisent plus d'H₂ au-delà de pressions partielles en hydrogène de 10⁻³ atm selon Hay *et al.* (2013). Ce phénomène expliquerait pourquoi des rendements élevés de conversion du glucose en H₂ sont souvent associés à de faibles débits de gaz produits (Trably *et al.*, 2018). Pour contourner cette limitation, des techniques permettant d'extraire l'H₂ du milieu réactionnel peuvent être mise en place. Cellesci seront abordées dans la partie 5 de ce chapitre.

3.2.2. Le métabolisme de la production d'H₂

Le processus de fermentation obscure a lieu pendant la digestion anaérobie de la biomasse qui aboutit à la production de méthane et de CO₂.

La fermentation obscure se caractérise par la transformation de matières carbonées, appelées biomasse, en hydrogène, par des bactéries. Le processus comprend 2 étapes. La première est celle de l'hydrolyse pendant laquelle les *consortia* bactériens dégradent les polysaccharides composant la biomasse en monomères de sucres et/ou d'autres molécules facilement métabolisables, le substrat. La seconde consiste en une cascade

de réactions biochimiques cellulaires qui permettent aux bactéries de produire de l'énergie et de synthétiser leurs composants cellulaires à partir du substrat hydrolysé. L'ensemble de ces réactions sont catalysées par des protéines : des enzymes qui ont une activité de catalyse spécifique et qui agissent dans des conditions précises de pH et de température.

Les bactéries productrices d'H₂ sont des chimiotrophes : elles tirent leur énergie de l'oxydation de molécules carbonées (substrat) *via* des réactions d'oxydoréduction.

La production d'énergie chimique repose donc sur le transfert d'électrons entre des donneurs (oxydants) et des accepteurs (réducteurs). Lors de la fermentation en anaérobie, l'absence d'O₂ qui est un très bon accepteur d'électrons (notamment lors de la respiration), implique l'utilisation d'autres accepteurs d'électrons par les microorganismes. Ce rôle d'accepteur est rempli par des molécules organiques qui jouent à la fois le rôle de donneur et d'accepteur d'électrons. Au final, l'énergie générée, *i.e.* la production d'électrons pendant la fermentation obscure, a lieu pendant l'oxydation du substrat qui est converti en molécules réduites (acétate, butyrate, éthanol).

Les transferts d'électrons entre donneurs et accepteurs sont effectués par des porteurs d'électrons qui permettent de faciliter le transfert d'électrons et de produire de l'énergie par la synthèse d'ATP. Les porteurs d'électrons qui jouent un rôle clé dans la fermentation sont des coenzymes NAD⁺/NADH et la protéine ferrédoxine (Fd/FdH₂).

La figure 2 présente l'ensemble des réactions qui ont lieu au cours de la fermentation obscure.

La première étape de la production d'H₂ est la conversion du glucose (substrat) en pyruvate par la glycolyse (ou voie d'Embden - Meyerhof-Parnas). Cette étape permet de produire de l'adénosine triphosphate ATP, un « vecteur énergétique » pour la cellule et des éléments réducteurs NADH.



<u>Figure 2</u> : Principales réactions chimiques survenant au cours de la fermentation obscure reproduit d'après Clion (2016), Khanna et Das (2013) et Trably *et al*. (2018)

La deuxième étape est la production d'acétyl-CoA (acétyl-Coenzyme A) à partir du pyruvate et peut s'effectuer selon deux voies :

(i) La voie de la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) catalyse la conversion du pyruvate en CO₂ et en acétyl-CoA et permet la production d'ATP. Les électrons générés pendant cette réaction sont transférés à la ferrédoxine (Fd) ou à un autre porteur d'électrons. FdH₂ est oxydé par une hydrogénase qui régénère la Fd et produit de l'H₂. Une production supplémentaire d'H₂ peut avoir lieu, produite par le NADH qui est généré pendant la glycolyse. Le NADH est oxydé par la réduction de la Fd catalysée par une NADH-Fd réductase. Cette réaction n'a lieu qu'à très faible pression partielle dans le milieu. La voie de la PFOR est privilégiée chez les microorganismes anaérobies strictes comme les bactéries du genre *Clostridium*.

(ii) La pyruvate formiate lyase (PFL), présente chez les organismes anaérobies facultatifs, catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et en formiate. Le formiate permet de produire de l'H₂ et du CO₂ pour réguler le pH intra-cellulaire (Ruggeri *et al.*, 2015a).

Enfin, l'acétyl-CoA sert à la synthèse d'acétate, d'éthanol, de lactate ou de succinate. Ce processus permet de recycler les éléments réducteurs en NAD⁺ pour la glycolyse. Le rendement maximal *in vivo* de cette voie

est de 4 mol_{H2}/mol_{glucose} lorsque l'acétate est l'accepteur d'électrons final, ce qui est équivalent à une production de 534 mL_{H2} / $g_{glucose}$ (Eq. 1.16). Lorsque la production d'H₂ a lieu par la voie du butyrate, le rendement est plus faible : 2 mol_{H2}/mol_{glucose} (Eq. 1.17).

$$C_{6}H_{12}O_{6} + 2H_{2}O \rightarrow 2 CH_{3}COOH + 4H_{2} + 2CO_{2}$$
(Eq. 1.16)
$$C_{6}H_{12}O_{6} \rightarrow CH_{3}CH_{2}CH_{2}COOH + 2H_{2} + 2CO_{2}$$
(Eq. 1.17)

3.3. Limitations de la production d'hydrogène

D'autres voies métaboliques entrent en concurrence avec la production d'H₂. Le métabolisme et les flux de protons peuvent être redirigés vers la production d'autres métabolites finaux tels que le lactate qui consomme le substrat mais ne co-produit pas d'H₂, les alcools, dont la formation requiert du NADH et ne produit pas d'H₂, ou la voie du propionate qui consomme des protons et donc du potentiel biohydrogène.

3.3.1. Les voies concurrentes au niveau du substrat

La modification du métabolisme dépendrait de l'état physiologique des bactéries et de leur phase de croissance qui détermine la disponibilité en énergie chimique associée au stock d'ATP et à la quantité de NADH (Ruggeri *et al.*, 2015a). Lors de la croissance cellulaire exponentielle, les bactéries disposent d'une quantité abondante de substrat et d'énergie. Ce contexte est favorable à la production d'H₂ par les voies du butyrate et de l'acétate (acidogenèse). La raréfaction du substrat limite la croissance cellulaire et est associée à la réduction de la production d'H₂ et à l'augmentation de la production d'alcools par la solvantogenèse. La solvantogenèse intervient également lors de l'accumulation d'acide dans le milieu réactionnel et lors de la diminution du pH à des valeurs inférieures à 5.

La production de lactate interviendrait dans des conditions de stress qui peuvent être liées à un choc de température, une baisse brutale du pH, la présence de traces d'oxygène dans le milieu, un excès ou une carence en substrat ou en nutriments (Trably *et al.*, 2018). La production de lactate peut être également liée à la présence de bactéries lactiques (*Streptococcus sp., Lactobacillus sp., Lactococcus sp.)* dans le milieu réactionnel qui convertissent les sucres en lactate (Eq. 1.18) ou en lactate et éthanol (Eq. 1.19) (Teixeira Franco *et al.*, 2016).

$$C_{6}H_{12}O_{6} \rightarrow 2 CH_{3}CH(OH)COOH$$
(Eq. 1.18)
$$C_{6}H_{12}O_{6} \rightarrow CH_{3}CH(OH)COOH + CH_{3}CH_{2}OH + CO_{2}$$
(Eq. 1.19)

3.3.2. Les voies consommatrices d'hydrogène

Les voies consommatrices d'H₂ affectent directement le rendement en H₂ de la fermentation obscure. En réponse à un stress, les bactéries peuvent produire du propionate (Eq. 1.20) (Saady, 2013). La voie de l'homoacétogenèse consomme de l'H₂ et du CO₂ pour produire de l'acétate (Eq. 1.21) (Arooj *et al.*, 2008).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2 COOH + 2H_2O$$
 (Eq. 1.20)

$$4 H_2 + 2 CO_2 \to CH_3 COOH + 2 H_2 O \tag{Eq. 1.21}$$

Cette voie illustre les interactions de commensalisme entre les bactéries productrices d'H₂ et les organismes homoacétogènes comme *Clostridium ljungdahlii* qui utilisent l'H₂ pour leur métabolisme (Kopke *et al.*, 2010). Un stress cellulaire peut également déclencher un changement de métabolisme vers cette voie (Saady, 2013). De manière générale, l'homoacétogenèse est difficilement évitable.

Des organismes méthanogènes peuvent également émerger au cours de la fermentation obscure quand celle-ci s'effectue sur une longue durée. Les organismes méthanogènes utilisent l'H₂ pour la production de CH₄.

$$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2 O$$
 (Eq. 1.22)

Les bactéries réductrices de sulfates peuvent également entrer en concurrence avec les organismes méthanogènes pour l'utilisation de l'H₂ surtout si les ions sulfates sont abondants dans le milieu réactionnel. L'H₂ sert à réduire les ions sulfates toxiques pour les bactéries en H₂S, un gaz corrosif et toxique à faible concentration (Teng *et al.*, 2019).

$$4 H_2 + SO_4^{2-} + 2 H^+ \to H_2 S + 4 H_2 0$$
 (Eq. 1.23)

L'élimination des organismes méthanogènes et des bactéries réductrices de sulfate facilement réalisable comme nous le verrons dans la partie 4 de ce chapitre.

3.4. Conclusion

La figure 3 récapitule les principales voies métaboliques actives pendant la fermentation obscure.



Figure 3 : Principales voies métaboliques au cours de la fermentation obscure
Pendant la fermentation obscure, nous distinguons quatre types de voies métaboliques qui utilisent le substrat issu de l'hydrolyse de la biomasse :

- les voies productrices de biohydrogène qui seront donc à favoriser dans nos expériences (les voies acétate et butyrate);
- les voies de consommation de l'hydrogène (propionate, homoacétogenèse, méthanogenèse, réduction des nitrates et des sulfates);
- les voies compétitrices vis-à-vis du substrat, qui détournent le potentiel de production de la biomasse pour synthétiser d'autres composés (lactate et éthanol);
- la voie du formiate, considérée comme une voie de stockage du potentiel hydrogène car pouvant menée à la décomposition du formiate en H₂ et CO₂.

4. De l'utilisation de l'ensilage de maïs et de seigle pour la production d'hydrogène par fermentation obscure

4.1. L'ensilage

4.1.1. Définitions

Le terme "ensilage" désigne à la fois une technique de stockage des plantes et le produit acidifié résultant de cette technique (Paragon *et al.*, 2004). L'ensilage est une technique de stockage du fourrage largement répandue en l'agriculture. Son principe repose sur une fermentation lactique contrôlée, qui a lieu en conditions anaérobies. Ce processus est constitué de cinq étapes : production, respiration, acidification, stabilisation et dégradation (Teixeira Franco *et al.*, 2016).

La production de la biomasse comprend la croissance végétale, le hachage et la mise en silo. Cette étape est déterminante pour la qualité du produit fini. Dans le cas du maïs, la plante est collectée au stade « pâteux dur du grain » correspondant à une teneur en matières sèches dans la plante de 30 à 35 %, teneur optimale pour la mise en silo (Carpentier et Cabon, 2011). La plante est hachée dans une ensileuse pour obtenir des morceaux de taille inférieure à 20 mm. Les morceaux sont amassés et tassés à l'aide d'engins agricoles pour chasser l'air du silo puis bâchés hermétiquement pour éviter les circulations d'air et favoriser l'initiation rapide de conditions anaérobies. La maîtrise du hachage est cruciale car une proportion importante (> 1 %) de morceaux excédants le seuil des 20 mm peut compromettre le tassement du silo (Arvalis-infos.fr., 2015).

A ce stade, les microorganismes présents dans l'ensilage sont ceux de la flore épiphyte de la plante de maïs. Cette flore est constituée par ordre d'abondance : de levures dont des espèces capables d'assimiler le lactate, de moisissures, d'entérobactéries, de bactéries lactiques (*Lactobacillus, Pediococcus,* et *Leuconostoc*) et de spores *Clostridium* en très faible quantité dont la présence peut résulter d'une contamination avec de la terre pendant la récolte (Guan *et al.*, 2018 ; Kung *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 1992). Guan *et al.* (2018) affirment que les facteurs qui ont le plus d'impact sur les *consortia* endogènes de l'ensilage de maïs sont, d'une part, les précipitations au cours de la croissance de la plante et son taux d'humidité, et d'autre part, la température intérieure du silo qui affecte les bactéries fermentaires. De façon générale, le climat régnant sur le lieu de stockage (température, hygrométrie, précipitations) va également modifier la fermentation de l'ensilage (Bernardes *et al.*, 2018). Le broyage de la biomasse semble augmenter la diversité bactérienne de la flore, notamment par une libération accrue de sucres solubles lors du broyage (Lin *et al.*, 1992).

La respiration caractérise la poursuite de l'activité métabolique des cellules végétales intactes tant qu'il reste de l'oxygène dans le silo (Paragon *et al.*, 2004). La respiration cellulaire (Eq. 1.24) consomme de l'oxygène et oxyde, en plusieurs étapes, les monosaccharides en dioxyde de carbone et en eau avec production de chaleur.

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + chaleur$$
 (Eq 1.24)

D'après McDonald (1982), la quantité de sucres consommée pour l'utilisation d'O₂ est négligeable par rapport à la teneur totale en sucres de la biomasse.

L'acidification se met en place consécutivement à l'épuisement de l'oxygène. Elle est initiée par les bactéries aérobies facultatives de la flore épiphyte (entérobactéries), qui sont remplacées par les bactéries lactiques. Ces dernières représentent moins de 1 % d'abondance dans la flore épiphyte (Gharechahi *et al.*, 2017 ; Guan *et al.*, 2018 ; Pahlow *et al.*, 2003 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016). Ainsi, les populations de bactéries présentes majoritairement avant l'ensilage disparaissent au profit des bactéries lactiques mieux adaptées aux conditions du milieu (anaérobie et acidité). Cette étape est caractérisée par une chute du pH (jusqu'à 4) provoquée par la production rapide d'acide lactique à partir des monosaccharides présents dans l'ensilage ou issus de l'hydrolyse pendant la respiration.

Le tableau 1 présente les principales réactions qui ont lieu au cours de l'acidification de l'ensilage.

Organismes	Fer	mentation	
Bactéries lactiques	Glucose	→ 2 Lactate	
Bactéries lactiques	Glucose	\rightarrow Lactate + Ethanol + CO ₂	
Bactéries lactiques	3 Fructose	\rightarrow Lactate + Acétate + 2 Mannitol + CO ₂	
Bactéries lactiques	2 Citrate	\rightarrow Lactate + 3 Acétate + 3 CO ₂	
Bactéries lactiques	Malate	\rightarrow 1 Lactate + 1 CO ₂	
Entérobactéries	2 Glucose	\rightarrow 2 Lactate + 1 Acétate + 1 Ethanol + 2 Cé	O ₂
Clostridies	2 Lactate	\rightarrow Butyrate + 2 CO ₂ + 2 H ₂	
Clostridies	Glucose	\rightarrow Butyrate + 2 CO ₂ + 2 H ₂	
Levures	Glucose	\rightarrow 2 Ethanol + 2 CO ₂	

Les bactéries lactiques sont classifiées en fonction de leur métabolisme. Les organismes homofermentaires (*Lactobacillus plantarum*) convertissent majoritairement les sucres solubles en acide lactique sans coproduction de CO₂ et donc sans perte de matières sèches. Ces bactéries permettent une fermentation rapide et une bonne stabilisation du silo avec l'acide lactique. Les bactéries hétérofermentaires (*Lactobacillus brevis*) convertissent les sucres solubles en acide lactique avec co-production d'acétate ou d'éthanol et de CO₂. Ces organismes expliquent la diversité des acides produits au cours de l'acidification.

La présence résiduelle d'O₂ peut favoriser le développement de bactéries sporulantes productrices d'acide butyrique ou de levures productrices d'éthanol. L'acide acétique (pKa = 4,76) et l'acide butyrique (pKa = 4,82) sont moins intéressants pour le stockage de la biomasse car ils sont moins « forts » que l'acide lactique (pKa = 3,86).

Notons que cette étape est cruciale pour pouvoir stabiliser l'ensilage sur le long terme et prévenir toute dérive fermentaire (production de butyrate et d'éthanol) non désirée. Elle dépend notamment de la quantité en sucres solubles, de la flore bactérienne et de l'absence d'oxygène dans le silo.

La stabilisation correspond à une période où le métabolisme fermentaire est ralenti, le pH reste stable et les conditions anaérobies sont maintenues. Ces conditions permettent de conserver la biomasse en inhibant d'une part, les enzymes protéolytiques de la plante, et d'autre part, les microorganismes capables de dégrader la matière (Brémond *et al.*, 2018). L'acidité permet de préserver une qualité énergétique d'ensilage constante, de minimiser les pertes de matières sèches et d'éviter le développement de micro-organismes indésirables (Carpentier et Cabon, 2011).

La dégradation de l'ensilage de maïs peut intervenir à l'ouverture du silo *i.e.* lors de la rupture des conditions anaérobies du milieu. La dégradation de l'ensilage est causée par la réactivation des champignons, moisissures et bactéries hydrolytiques qui entraînent des pertes en terme de teneur énergétique de la biomasse (Borreani *et al.*, 2018 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016 ; Wilkinson et Davies, 2013). Les phénomènes à l'origine de la dégradation feront l'objet d'une description plus approfondie au chapitre 4.

L'ensilage est donc une méthode de stockage de la biomasse par voie biologique qui repose sur l'acidification de la biomasse pour empêcher sa dégradation. Ce procédé requiert des engins spécifiques, une infrastructure et une expérience spécifique du fait des réactions biochimiques et des cinétiques de fermentation bactérienne complexes qui ont lieu pendant la mise en silo et qui sont nécessaires pour obtenir un ensilage de qualité stable.

4.1.2. Utilisation de l'ensilage

L'ensilage permet le stockage d'une grande diversité de matières organiques : des fourrages verts (herbe, maïs plante entière, sorgho, graminées, luzerne), des co-produits de l'industrie agro-alimentaire (pulpe de citron, marc de raisin, pulpe de tomate, paille de blé, pulpe de betterave, grignons d'olive, co-produit bananier) (Álvarez *et al.*, 2015 ; Cieciura-Włoch et Borowski, 2019; Hillion *et al.*, 2018 ; Mannetje *et al.*, 2000) et des co-produits de l'industrie brassicole (drèches) (Boessinger *et al.*, 2005 ; Heuzé *et al.*, 2017).

En 2021, l'ensilage de **maïs** représentait en France 18,8 millions de tonnes de matières sèches pour 1,308 millions d'hectares de culture (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2021). Malgré une tendance à la diminution des surfaces sur les 10 dernières années (- 108 000 ha entre 2020 et 2021, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2021) l'augmentation du rendement à l'hectare stabilise les volumes de production (+1,6 Mt en 2021 *vs* 2020).

Dans l'Union Européenne, les surfaces cultivées destinées à l'ensilage de maïs représentaient en 2020 6,1 millions d'hectares (Mha) et 16,5 Mha dans le monde d'après la Fédération Nationale de la Production des Semences de Maïs et de Sorgho (FNPSMS). Cette production est largement dédiée à l'alimentation animale mais, depuis l'année 2008, la part de la surface dédiée à la production d'ensilage de maïs pour valorisation en méthaniseur a été multipliée par 5. Selon la FNPSMS, l'Allemagne détient la plus grande surface agricole pour l'ensilage de maïs destiné à la production de biogaz en Europe (1 Mha) avec un rendement de 202 Nm³ de biogaz par tonne de matières sèches, soit plus de 2000 m³ de biogaz par hectare¹ d'après l'estimation de Scohy (2019).

Le **seigle** est une céréale cultivée essentiellement en Europe de l'Est (Allemagne, Pologne, Russie), sa production en France pour l'année 2021 s'est élevée à 189 000 tonnes. Cette plante présente des avantages agronomiques notables (résistance à des conditions de stress hydrique, peu sensible aux ravageurs, faible consommatrice d'intrants et d'eau) et pourrait être utilisé comme culture intermédiaire à vocation énergétique (CIVE) dans le cadre d'une rotation de culture. Le seigle est riche en matière azotée. D'un point de vue fermentaire, cet apport en azote est essentiel pour favoriser la croissance des bactéries anaérobies (Dai *et al.*, 2016 ; Yan *et al.*, 2015 ; Zahan *et al.*, 2018) et stabiliser la flore bactérienne du méthaniseur (Fermon, 2021).

Le tableau 2 présente une comparaison entre le potentiel méthane de l'ensilage de seigle et de celui du maïs

Potentiel méthan	Déférence	
Ensilage de seigle	Ensilage de maïs	Reference
75 ± 5	110 ± 5	Herrmann <i>et al.,</i> 2011
103 ± 11	95 ± 15	Schimpf <i>et al.,</i> 2013
94 - 121	85 - 110	Samer <i>et al.,</i> 2019
120 - 195	60 – 70	Fermon, 2021
203*	276*	Mähnert et Linke, 2009

Tableau 2 : Potentiel méthane de l'ensilage de maïs et de seigle.

* fermentation en continu

¹ Volume calculé à partir d'un rendement moyen de matières sèches par hectare de 11,7t_{MS}/ha (Scohy, 2019)

Le potentiel des biomasses est assez similaire selon les sources. Le potentiel de l'ensilage de maïs s'échelonne entre 60 et 110 m³/t_{matière fraîche} avec un rendement théorique maximal calculé à 276 m³/t_{matière fraîche}. Celui de l'ensilage de seigle est plus variable : il oscille entre 75 m³/t_{matière fraîche} et 195 m³/t_{matière fraîche} avec un rendement théorique maximal calculé 203 m³/t_{matière fraîche}.

Cette variabilité pourrait dépendre du taux de matières sèches de la plante et du stade de végétation au moment de la récolte de la biomasse pour l'ensilage (Fermon, 2021).

Ainsi, les ensilages de maïs et de seigle sont des biomasses faciles à stocker, abondantes, disponibles et dotées d'un bon potentiel énergétique par digestion anaérobie. Pris ensemble, ces critères justifient la pertinence de mettre en œuvre les biomasses ensilées pour la production d'H₂ par fermentation obscure.

4.2. Revue de la littérature sur la production d' H_2 relative aux co-produits de la culture de maïs

Quarante-cinq publications qui s'échelonnent de 2004 à 2021, relatives aux co-produits du maïs impliqués dans la production de l'hydrogène par fermentation obscure sont présentées dans le tableau 3. Notons que l'ensilage de seigle pour la production d'H₂ n'a pas fait l'objet de publication. Cette revue de la littérature permet d'étudier les principaux facteurs qui affectent la production d'H₂ par fermentation obscure : les prétraitements de la biomasse, la composition du milieu réactionnel, les paramètres biochimiques et la nature de *l'inoculum*.

<u>Tableau 3</u> : Production d'H₂ par fermentation obscure à partir de co-produits de la plante de maïs.

Référence	Granulomét (mm)	trie <i>Inoculum</i> (Prétraitement)	Temp. (°C)	рН	Prétraitement biomasse	Rendement (L _{H2} /kg _{MS})		
Paille de maïs : 29 étud	es							
Datar <i>et al</i> . (2007)	N.D.	Boues de STEP (105°C)	35	5,5*	Explosion vapeur (190 - 220°C, 3 - 5 mi H_2SO_4) Explosion vapeur (180 – 200°C, 1 - 3 mi Explosion vapeur (200°C, 3 min) +	n, 71 n) 52 155		
Fan <i>et al</i> . (2008)	0,4	Fumier de pandas (Aération)	36	5,5*	N.P. Impr. (100°C, 30 min, Acide lactique) Microbio. (25°C, 15 jours)	20 133 176		
Guo <i>et al.</i> (2014)	0,4	Fumier de bovin (100°C) Fumier de bovin (100°C), <i>Bacillus</i> sp. Fumier de bovin (100°C), CTAB (bromure de cétyltriméthylammoniun Fumier de bovin (100°C), CTAB, <i>Bacillus</i> sp.	36 n)	7,5	Autoclave (121°C, 60 min, H₂SO₄)	51 59 68 80		
Li et Chen (2007)	40	C. butyricum	35	7,2	N.P. Explosion vapeur (198°C, 10 min), Saccharification simultanée	9 68		
Li, Guo, et Liu (2014)	0,4	Fumier de bovins composté (Irradiation)	36	7	Autoclave (120°C, 60 min, H_2SO_4)	143		
Lu <i>et al</i> . (2009)	N.D.	Boues anaérobies (100°C) Boues anaérobies (100°C), C. thermocellum Boues anaérobies (100°C), C. thermocellum	37		Explosion vapeur (198°C, 10 min) Explosion vapeur (198°C, 10 min) Microbio. (37°C) Explosion vapeur (198°C, 10 min) Microbio. (55°C)	8 21 64		
Ma et al. (2011)	0,2	Boues de rivière (100°C)	36	7	Impr. (90°C, 120 min), Enzymes	165		
Pan <i>et al</i> . (2011)	0,4	Fumier de bovins (Four infrarouge)	36	7	Autoclave (120°C, 60 min, H2SO4) Autoclave (120°C, 60 min, H2SO4) , Enzymes	94 190		
Song <i>et al</i> . (2012)	0,4	Fumier de bovins Fumier de bovins (Irradiation)	36	7	Autoclave (12°C, 60 min, H_2SO_4)	79 146		
Song <i>et al</i> . (2014)	0,4	Clostridium sp.	36	7	N.P.	75		
Wang et al. (2010)	0,2	Boues de rivière (100°C)	36	7	Impr. (90°C, 120 min, HCl) + Enzymes	147		
Xing <i>et al</i> . (2011)	0,4	Fumier de pandas (Aération)	36	7	Enzymes	181		
Xu <i>et al.</i> (2010)	0,25	Ethanoligenens harbinense	37	4,8*	Explosion à la vapeur (18°C, 10 min), Saccharification simultanée Explosion à la vapeur (189°C, 10 min, Acide acétique), Saccharification simultanée	58 99		
Yang <i>et al</i> . (2015)	0,8	Fumier de bovin (112°C)	35	7	Impr. (98 - 126°C, 0 - 3 h, NaOH) Impr. (98 - 126°C, 0 - 3 h, NaOH), enzymes	135 169		
Zhang <i>et al</i> . (2007)	0,8	Fumier de bovins composté (Aération, 50°C)	36	7	N.P. Impr. (100°C, 30 min, HCl) Impr. (100°C, 30 min, NaOH)	3 131 50		
Zhang <i>et al</i> . (2011)	0,4	Boues de STEP Boues de STEP (100°C)	37	7	Autoclave (120°C, 120 min, H_2SO_4)	55 100		
Zhang <i>et al</i> . (2015)	0,4	C. sartagoforme	35	6,4	N.P.	93		
Li et al. (2018)	0,25	Fumiers variés (100°C)	40	4,8	Saccharification Saccharification simultanée	66 80		
Cheng, Li, et Liu (2012)	15	C. thermocellum	55	7	Autoclave (120°C, 20 min, NaOH)	70		
Kvesitadze <i>et al</i> . (2011)	1	C. thermocellum Coculture : C. thermocellum	55	8,5	Explosion (50°C, 30 min, CO ₂)	109 133		
Lalaurette et al. (2009)	N.D.	C. thermosaccharolyticum	55	6,8	Explosion vapeur (190°C, 1,5 min, H_2SC	a) 146		

Abréviations : N.D : non déterminé, N.P. : non prétraité, Impr. : imprégnation, Microbio. : hydrolyse par voie microbienne. *régulation du pH

Chapitre 1

Référence Gran (mm	érence Granulométrie (mm)		Temp. (°C)	рН	Prétraitement biomasse	Rendement (L _{H2} /kg _{MS})	
Paille de maïs (suite)							
Li et Liu (2012)	1	C. thermocellum Coculture : C. thermocellum T. thermosaccharolyticum	55	7	N.P. N.P. Autoclave (115°C, 30 min)	39 68 75	
Li et al. (2014)	1	Coculture : <i>C. thermocellum</i> T. thermosaccharolyticum	55	7	Microondes (5 - 90 min, NaOH) 106	
Liu et Cheng (2010)	1,2	Déchets de vinification (100°C)	55	7	N.P. Microondes (5 - 90 min) Microondes (5 - 90 min, H2SO4 Impr. (100°C, 5 - 90 min, H2SO4	26 33) 46 4) 35	
Shanmugam <i>et al</i> . (2014)	5	Boues de STEP Industrie brassicole	53		Explosion vapeur (190°C, 10 m H ₂ SO ₄)	in, 87	
Cao <i>et al</i> . (2009)	10	T. thermosaccharolyticum	60	7	Autoclave (120°C, 30 - 180 mir H₂SO₄)	n, 33	
Cao <i>et al.</i> (2012)	2	<i>Consortium</i> bois pourri (Enrichissement cellulose)	60	7	N.P. Impr. (23 - 50°C, 12 - 96 h, Citr	110 on) 159	
Liu <i>et al</i> . (2008)	Poudre	C. thermocellum Coculture : C. thermocellum T. thermosaccharolyticum	60	7	N.P. N.P.	44 78	
Ren <i>et al</i> . (2010)	1	T. thermosaccharolyticum	60	7	Impr. (80°C, 120 min, NaOH), Enzymes	194	
Zhao <i>et al</i> . (2012)	0,4	T. thermosaccharolyticum	60	7	Autoclave (121°C, 20 min), Microbio., Enzymes	80	
Panagiotopoulos et al. (2009)	8	Caldicellulo. saccharolyticus	70	7	Impr. (170°C, 30 min, H₂SO₄) + Enzymes	-	
Panagiotopoulos et al. (2011)	N.D.	Caldicellulo. saccharolyticus	70	7	N.P.	-	
Rafles de maïs : 7 études							
Tang, Ren, et Xu (2013)	2	C. hydrogeniproducens	37	6,6 - 6,9	Explosion vapeur (121°C, 20 m Enzymes	in), 83	
					Explosion vapeur (121°C, 20 m H ₂ SO ₄), Enzymes Explosion vapeur (121°C, 20 m	in, 119 in, 100	
					NaOH), Enzymes	,	
Pan <i>et al.</i> (2010)	0,4	Fumier de bovins (Aération)	36	8	N.P. Impr. (100°C, 10 - 60 min, HCl) Impr. (100°C, 30 min, NaOH, H2O2)	12 65 13	
Nasr <i>et al.</i> (2014)	N.D.	Boues anaérobies (70°C)	35	5,5	Traitement industriel pour bioéthanol	138	
Yang <i>et al</i> . (2010)	Poudre	Fumier de bovin (112°C)	36	7	N.P. Impr. (100°C, 30 min, HCl),	13 120	
Li et al. (2018)	0,25	Fumiers variés (100°C)	40	4,8	Saccharification Saccharification simultanée	90 103	
Liu <i>et al.</i> (2008)	Poudre	C. thermocellum Coculture : C. thermocellum T. thermosaccharolyticus	60	7	N.P. N.P.	45 98	
Panagiotopoulos et al. (2011)	N.D.	Caldicellulo. saccharolyticus	70	7		-	
Amidon et grains de maïs : 3							
études Liu et Shen (2004)	Poudre	Céréales concassées (100°C)	35	8	N.P.	178	
Bao, Su, et Tan (2013)	Poudre	Coculture : <i>Bacillus</i> sp et <i>Brevundimonas</i> sp.	35	6,8	N.P. Impr. (100°C, 30 min)	89 132	
Panagiotopoulos et al. (2009)	< 10	Caldicellulo. saccharolyticus	70	7	Liquéfaction + saccharification	-	
Feuilles de maïs : 1 étude							
Ivanova, Rákhely, et Kovács (2009)	N.D.	Caldicellulo. saccharolyticus	70	7,2	N.P. Microbio.	15 38	

Abréviations ; N.D : non déterminé, N.P. : non prétraité, Impr. : imprégnation, Microbio. : hydrolyse par voie microbienne. *régulation du pH

Référence	Granulométrie (mm)	<i>Inoculum</i> (Prétraitement)	Temp. (°C)	рН	Prétraitement biomasse	Rendement (L _{H2} /kg _{MS})
Ensilage de maïs : 9 études						
Cieciura-Włoch et Borowski (2019)	13	Boues de STEP Boues de STEP (80°C)	35°C	5,5		260 113
Dauptain <i>et al</i> . (2020)	< 10	Endogène Endogène (90°C) Boues de STEP (90°C)	37°C	6		136 126 124
Kyazze <i>et al.</i> (2008)	N.D.	Boues de STEP (110°C)	35°C	5,2*	Extracteur de jus	62
Benito Martin, Schlienz, et Greger (2017)	0,75	Boues anaérobies (choc de charge d'alim.)	38°C	5,5*		33
Nikolajeva <i>et al</i> . (2015)	N.D.	Endogène	37°C	6,5	Microbio.	-
Nkemka <i>et al</i> . (2015)	N.D.	Boues anaérobiques (Enrichissement cellulose)	37°C	3,9	Microbio.	56 53
Gómez-Camacho et al. (2021)	< 10	Boues anaérobies (acide et aération)	35°C	6*	+10 % d'ensilage d'herbe	20
Manzini <i>et al</i> . (2015)	0,5	Lisier (100°C)	55°C	5,5		106
Tenca <i>et al</i> . (2011)	2	Lisier (100°C)	55°C	5,5		108

Abréviations : N.D : non déterminé, N.P. : non prétraité, Impr. : imprégnation, Microbio. : hydrolyse par voie microbienne. *régulation du pH

Devant le grand nombre de publications, l'interprétation de ce tableau est déclinée dans la suite en fonction de la nature du substrat (co-produit de la plante de maïs), des prétraitements applicables à la biomasse avant fermentation obscure, de l'ajout de nutriments nécessaire à la croissance bactérienne et de l'utilisation d'*inocula* bactériens pour réaliser le processus fermentaire.

4.3. Les différents co-produits de la plante de maïs testés dans la

littérature

En référence au tableau 3, cinq co-produits de la plante de maïs ont été ciblés dans la littérature : la paille, les rafles, les feuilles, les grains et l'ensilage représentés sur la figure 4.



Figure 4 : Co-produits de maïs utilisés dans la littérature pour la production d'hydrogène.

Le premier co-produit étudié est la paille ou canne de maïs *(corn stalk, corn straw* et *corn stove,* figure 4A). Celle-ci est un mélange hétérogène composé des spathes (feuilles qui enveloppent l'épi de maïs), des tiges, des feuilles de la plante et des rafles de maïs. Traditionnellement, la paille est laissée sur place pour recouvrir le sol ou pressée en botte afin de servir de litière pour l'élevage. Ce co-produit est le plus utilisé dans la littérature consultée : 29 études sur 45 utilisent cette biomasse. Ce constat est logique dans la mesure où la paille de maïs est un gisement important de biomasse notamment dans un pays comme la Chine (220 millions de tonnes produites par an, Zhang *et al.,* 2015 mais qui ne sont pas valorisée). De plus, la paille de maïs est déjà employée pour la production de biocarburants (bioéthanol, Lynd *et al.,* 2017 et ETIP Bioenergy). L'*Energy Independence et Security Act* (2007) planifiait une production de 163 milliards de litres de biocarburant à l'horizon 2022 aux USA dont 90 milliards seraient issus de biomasses cellulosiques.

Les rafles de maïs seules, séparées de leurs grains pendant la récolte (figure 4B), font l'objet de sept publications. La feuille de la plante de maïs est un co-produit rarement étudié (figure 4C), son utilisation pour la production d'hydrogène n'a été signalée qu'une seule fois (Ivanova *et al.*, 2009). Trois publications sur le potentiel de production d'H₂ des grains (figure 4D) et de l'amidon de maïs ont été relevées. Enfin, 9 publications traitent plus spécifiquement de l'utilisation de l'ensilage de maïs (figure 4E).

D'après le tableau 3, la paille, les rafles et les feuilles de maïs ont des potentiels de production d'H₂ relativement proches (3 - 15 L_{H2}/kg_{MS}) sans prétraitement et sans utilisation de bactéries hydrolytiques en culture pure. Peu d'études ont comparé les différentes biomasses entre elles. Liu *et al.* (2008) obtiennent des rendements en H₂ très proches lors de la fermentation de paille de maïs et de rafles par la bactérie *Clostridium thermocellum* (44 et 45 L_{H2}/kg_{MS}). Toutefois, la coculture de *Clostridium thermocellum* et *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* est plus efficace pour fermenter les rafles (98 L_{H2}/kg_{MS}) que la paille (78 L_{H2}/kg_{MS}). Les travaux de Li *et al.* (2018) montrent également que les rafles hydrolysées à la cellulase et fermentée par des cultures mixtes aurait un meilleur potentiel de production que la paille, respectivement 90 et 66 L_{H2}/kg_{MS} . L'amidon, moins récalcitrant à l'hydrolyse des microorganismes que les autres biomasses, aurait un rendement supérieur (89 L_{H2}/kg_{MS}). Les productions en H₂ de l'ensilage de maïs sont très variables et s'échelonnent entre 20 et 260 L_{H2}/kg_{MS} . Notons que parmi les 45 études recensées dans le tableau 3, l'étude qui obtient le rendement les plus élevé (260 L_{H2}/kg_{MS}) met en œuvre de l'ensilage de maïs (Cieciura-Włoch et Borowski, 2019).

4.4. Les prétraitements de la biomasse avant fermentation obscure

Les biomasses sont riches en sucres, pourtant peu d'études les fermentent directement : une étape préliminaire de prétraitement est systématiquement mise en œuvre (broyage suivi ou non d'une hydrolyse). Ce choix est justifié par la structure de la biomasse qualifiée de *récalcitrante* aux microorganismes. Cette partie se propose de donner des éléments sur la structure biologique de la plante de maïs afin d'appréhender les mécanismes de prétraitement auxquels elle est soumise.

La figure 5 présente les enjeux du prétraitement de l'ensilage de maïs pour la fermentation obscure.

Chapitre 1





En référence à la figure 5, l'ensilage de maïs est constitué de deux familles de biomasse : les biomasses à amidon et les biomasses lignocellulosiques.

Les grains sont composés d'amidon, un polymère qui permet aux végétaux de stocker des nutriments glucidiques. L'amidon est un homopolymère de glucose qui contient des chaînes linéaires (amylose) ou ramifiées (amylopectine) (Marques *et al.*, 2018).

Les autres parties de la plante de maïs ont une structure lignocellulosique, ainsi les parois des cellules végétales de la plante de maïs sont composées d'un assemblage complexe et très résistant de trois macromolécules : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (McKendry, 2002). La cellulose est un homopolymère linéaire dont l'unité de base est le cellobiose, un diholoside formé de deux molécules de D-glucose reliées de manière covalente par une liaison osidique de type β -(1 \rightarrow 4). L'organisation des chaînes de glucose, grâce à des liaisons hydrogène au sein d'une chaîne de cellobiose ou entre deux chaînes, conduit à la fois à la présence de régions cristallines (lorsque les chaînes sont bien alignées) et de régions amorphes (Park *et al.*, 2010). La cellulose s'organise en forme de fibres autour desquelles se positionnent les hémicelluloses, telle une matrice (Zakzeski *et al.*, 2010). Les hémicelluloses sont des polysaccharides ramifiés, constitués de plusieurs monomères de sucres parmi lesquelles on retrouve à la fois des hexoses à 6 atomes de carbone (glucose, mannose, galactose) et des pentoses à cinq atomes de carbone (xylose et arabinose). Les hémicelluloses assurent la liaison entre la cellulose et la lignine, un polymère composé de molécules aromatiques (polyphénols). La lignine confère à la structure végétale de la rigidité, une protection aux microorganismes et au stress oxydant (Lobo *et al.*, 2021 ; Soares *et al.*, 2020).

Les co-produits de la plante de maïs intéressants pour la fermentation sont les sucres présents sous forme de polymères qui constituent l'amidon et les fractions cellulosiques et hémicellulosiques de la plante de maïs. Cependant, la structure complexe de la cellulose, notamment ses régions cristallines et la présence de lignine, rendent la biomasse récalcitrante aux enzymes hydrolytiques des microorganismes. L'enjeu est donc de libérer le substrat pour le rendre disponible aux bactéries fermentaires et, pour ce faire, des prétraitements sont mis en œuvre. Ceux-ci visent à modifier la structure de la biomasse, à dégrader la matrice lignocellulosique des parois végétales et/ou à solubiliser les sucres (Mosier, 2005).

Au cours de ces prétraitements, des molécules potentiellement inhibitrices de la fermentation obscure peuvent être produites. La dégradation de la lignine libère des composés phénoliques tels que l'acide férulique et l'acide p-coumarique, qui ont des effets antimicrobiens *via* des interactions avec les membranes cellulaires (Kalinoski *et al.*, 2020). Ensuite, les monosaccharides (hexoses et pentoses) peuvent être dégradés respectivement en 5-HMF (5-hydroxy-méthyl-furfural) et en furfural, des composés furaniques qui, à leur tour, se dégradent en acide lévulinique, acétique et formique. Ces molécules ont un effet bactériostatique qui affecte la synthèse des enzymes glycolytiques et peuvent avoir un effet mutagène (Bundhoo et Mohee, 2016). De plus, les acides sous forme non dissociée sont capables de pénétrer par diffusion dans les cellules microbiennes diminuant le pH intracellulaire et modifiant la pression osmotique (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000).

Le défi du prétraitement est donc de libérer des molécules fermentescibles tout en évitant de générer des inhibiteurs.

4.4.1. Prétraitements mécaniques et thermiques

Les prétraitements physiques visent à réduire la taille des particules de la biomasse, ce qui permet d'augmenter la surface de contact entre les bactéries fermentaires et la biomasse et plus généralement, de désorganiser la structure lignocellulosique de la biomasse (lignine et cellulose cristalline) et de favoriser l'extraction des molécules solubles.

Broyage

Même si le broyage est un prétraitement mécanique qui consomme de l'énergie - au point d'être considéré comme non viable d'un point de vue économique par Amin *et al.* (2017) pour la production de biohydrogène et de biogaz par de fermentation anaérobique - force est de constater qu'il est très fréquemment utilisé pour préparer la biomasse avant un prétraitement thermochimique ou biologique afin d'améliorer l'efficacité de ces prétraitements (Soares *et al.*, 2020). Il contribue également à l'homogénéisation du stock de biomasse (Benito Martin *et al.*, 2017). De plus, il ne génère ni effluent chimique (Amin *et al.*, 2017), ni molécule inhibitrice de la fermentation mais pourrait favoriser le relargage d'inhibiteurs naturellement présents dans la biomasse. Plusieurs outils de broyage sont décrits dans la littérature. Les broyeurs à lames produisent des morceaux de petite taille et les broyeurs à marteaux, des morceaux fins et fibreux (Montgomery et

Bochmann, 2014). Le paramètre étudié lors du broyage est le seuil de coupure (*i.e.* la taille des particules), caractérisé par le passage à travers un tamis (Montgomery et Bochmann, 2014).

Spécifiquement sur l'ensilage de maïs, en plus du hachage agricole lors de la récolte, d'autres prétraitements mécaniques sont effectués. Le tableau 4 présente les prétraitements mécaniques appliqués à l'ensilage de maïs avant la fermentation obscure.

Tableau 4	: Prétraitements	mécaniques	et	rendement	de	production	d'hydrogène	de	l'ensilage	de	maïs	dans	la
littérature	(9 études).												

Référence	Taille du broyage	Seuil de	Inoculum	Rendement
		coupure		(LH2/ KgMS)
Nkemka <i>et al</i> . (2015)	Hachage initial	-	Boues de méthaniseur	56
Nikolajeva <i>et al</i> . (2015)	Hachage initial	-	Endogène	< 10
Kyazze <i>et al</i> . (2008)	Extracteur de jus	-	Boues de STEP	62,4
Cieciura-Włoch et Borowski (2019)	Moyen	0,3 - 13 mm	Boues de STEP prétraitée	260
Tenca <i>et al</i> . (2011)	Fin	1,0 mm	Inoculum mixte	108
Benito Martin <i>et al</i> . (2017)	Fin	0,75 mm	Boues anaérobies	32,6
Manzini <i>et al</i> . (2015)	Fin	0,5 mm	Inoculum mixte	106
Gómez-Camacho <i>et al</i> . (2021)	Fin	non précisé	Boues anaérobies	20
Dauptain <i>et al</i> . (2020)	Fin	non précisé	Endogène	143 ± 11

Les études de Nikolajeva *et al.* (2015) et Nkemka *et al.* (2015) utilisent l'ensilage de maïs sans prétraitement pour la production d'hydrogène alors que la majorité des autres études effectue un broyage supplémentaire avant de mettre en œuvre le maïs ensilé. Notons l'utilisation d'un extracteur de jus utilisé par Kyazze *et al.* (2008), la biomasse testée étant le jus d'ensilage de maïs, facile à mettre en œuvre. Le broyage améliore le rendement de production en H₂; en effet, les rendements les plus importants sont obtenus après ce prétraitement (tableau 4). Nkemka *et al.* (2015) obtiennent par ailleurs un rendement intéressant (56 mL_{H2}/g_{MS}) avec de l'ensilage de maïs brut non broyé.

Plus le broyage est fin, plus il est difficile à mettre en œuvre, il convient donc de définir la taille critique à partir de laquelle le broyage n'améliore plus le rendement de production d'H₂. Song *et al.* (2014) étudient l'impact de la taille des particules sur la production d'hydrogène en utilisant des tamis permettant d'obtenir des particules de diamètre compris entre 149 et 420 µm. À ces ordres de grandeur, l'effet du broyage est insignifiant tant sur la production d'hydrogène (+2 %) que sur la phase de latence. Dumas *et al.* (2015) ont mené une démarche analogue en utilisant la paille de blé comme substrat. L'effet du broyage sur l'augmentation du rendement en biogaz (méthane) est maximal quand la taille des particules est réduite à 1 mm. Dans la littérature, le séchage de la biomasse est systématiquement réalisé avant broyage pour faciliter le prétraitement et obtenir des granulométries fines.

Pour réduire le coût énergétique du broyage, un processus d'optimisation impliquant notamment les lames de broyage, le flux d'alimentation, le taux d'humidité pourrait être proposé.

Le broyage apparaît nécessaire pour la mise en œuvre de la fermentation d'une biomasse lignocellulosique. La granulométrie des particules pour optimiser la production d'H₂ semble être le principal facteur à optimiser pour limiter le coût énergétique du broyage (Mosier, 2005).

Explosion à la vapeur

L'explosion à la vapeur est un traitement à la fois thermique, mécanique et chimique. Elle consiste à exposer la biomasse à de la vapeur saturée à haute pression (> 10 bar) et à haute température (> 150°C) pendant une courte durée (< 30 min) puis à dépressuriser rapidement le milieu provoquant l'éclatement de la biomasse par la vapeur piégée dans la matrice lignocellulosique (décompression explosive) (Ziegler-Devin *et al.*, 2021). L'explosion à la vapeur permet de solubiliser une partie importante des hémicelluloses et peut altérer la lignine. Lors de l'exposition de la biomasse à haute température, des acides contenus dans les hémicelluloses sont libérés et catalysent l'hydrolyse de la biomasse. Ce phénomène d'hydrolyse chimique est appelé autohydrolyse (Mosier, 2005).

Dans la littérature, les études qui mettent en œuvre l'explosion à la vapeur obtiennent des rendements supérieurs à 50 L_{H2}/kg_{MS}. Le prétraitement de broyage est alors facultatif : seuls Shanmugam *et al.* (2014) et Xu *et al.* (2010) broient leur biomasse préalablement à l'explosion. L'explosion à la vapeur peut être intensifiée par une imprégnation préliminaire à l'acide qui permet des gains de rendement en H₂ notables qui s'élèvent à +50 % (Datar *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2010). Dans leur étude, Datar *et al.* (2007) obtiennent un hydrolysat, à l'issue de l'explosion à la vapeur, riche en pentoses, avec un excellent rendement de conversion des sucres en H₂ (2,8 – 3,0 mol_{H2}/mol_{sucres}). Par ailleurs, comme l'explosion à la vapeur permet d'accroître la porosité et de dégrader la biomasse, elle est souvent couplée à une hydrolyse enzymatique (Datar *et al.*, 2007 ; Tang *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2010) ou microbienne (Lu *et al.*, 2009) pour valoriser le résidu solide d'explosion et accroître le rendement global de la biomasse. La présence d'inhibiteurs (furfural et 5-HMF) a été mise en évidence suite à l'explosion à la vapeur. Pour contourner ce problème, des variantes ont été développées : explosion au CO₂ a montré de bons résultats avec des rendements supérieurs à 100 L_{H2}/kg_{MS} obtenus au cours de la fermentation en cultures pures de paille de maïs prétraitée (Kvesitadze *et al.*, 2011).

Les avantages de l'explosion à la vapeur sont la rapidité du prétraitement, son coût énergétique qui, selon plusieurs sources, pourraient concurrencer le broyage (Baral et Shah, 2017 ; Ruggeri *et al.*, 2015) et la maturité technologique de la technique comme en témoigne le développement de procédés d'explosion à vapeur à l'échelle pilote (Sun et Cheng, 2002 ; Ziegler-Devin *et al.*, 2021).

Irradiation par microondes

L'application d'un champ électromagnétique, dont la fréquence est comprise entre 300 MHz et 300 GHz, délivre une force entraînant la vibration et la rotation des molécules polaires en particulier les molécules

d'eau à très haute fréquence pour se réaligner avec le champ (Nordmann, 2013). Ce mouvement entraîne d'une part, la perturbation des liaisons chimiques (prétraitement mécanique/physique) et d'autre part, une libération de chaleur à cœur et de manière ciblée car cette transmission de chaleur ne dépend que de l'énergie électromagnétique transmise à la matière (et non d'un gradient de température comme lors d'un chauffage traditionnel). La libération de chaleur (prétraitement thermique) permet également la mise en place de l'autohydrolyse de la biomasse. Liu et Cheng (2010) observent une augmentation de la production en H₂ consécutive à un prétraitement aux microondes par rapport à la biomasse de référence. Ces auteurs montrent, de surcroît, que l'irradiation par microondes couplée à un prétraitement acide permet d'améliorer la production d'H₂ de la paille de maïs par rapport à un prétraitement classique d'imprégnation à l'acide à 100°C (46 et 35 L_{H2}/kg_{MS}). Le prétraitement aux microondes associé à un prétraitement à la soude permet à Li *et al.*, (2014) d'obtenir un rendement en H₂ supérieur à 100 L_{H2}/kg_{MS}.

De manière générale, le prétraitement aux microondes demeure encore peu testé sur les co-produits du maïs. Ses avantages et ses inconvénients ne font pas consensus. Kumar et Sharma (2017) considèrent l'irradiation comme un traitement prometteur par sa facilité d'utilisation, sa rapidité d'exécution, son faible coût énergétique et sa capacité à altérer la cellulose en générant peu d'inhibiteurs. Pour l'instant, le degré de maturité de cette technologie (Technology readiness level ou TRL) est faible par rapport aux autres prétraitements comme l'explosion à la vapeur ou le prétraitement thermique à l'eau liquide (Chen, 2014).

Prétraitements thermiques - Autoclavage

La biomasse peut être soumise à un prétraitement à l'eau chaude à des températures s'échelonnant entre 80°C et 126°C (2,4 bar) et associées à des durées d'hydrolyse comprises entre 10 min et 180 min. Ce prétraitement vise à solubiliser les hémicelluloses et altérer la structure de la lignine, l'effet sur la cellulose est considéré comme faible. Un autoclave est utilisé pour effectuer le prétraitement à des températures supérieures à 100°C. Li et Liu (2012) prétraitent de la paille de maïs par autoclave (115°C, 30 min) et obtiennent un gain de rendement de 11 % au cours de la fermentation par une co-culture de *Clostridium thermosaccharolyticum*. Le prétraitement thermique semble plus efficace avec de l'amidon, notamment grâce au phénomène d'empesage (désorganisation de la structure du grain et solubilisation de l'amylose sous l'effet de la température), Bao *et al.* (2013) observant une augmentation du rendement de fermentation de +48 %. Dans la littérature consultée, le prétraitement thermique est rarement utilisé seul : il sert souvent à intensifier l'hydrolyse par un agent chimique (acide ou base) ou est couplé à une hydrolyse enzymatique.

4.4.2. Prétraitements chimiques

Traitements acides

L'acide permet de solubiliser les hémicelluloses et d'hydrolyser les polymères de sucres (Rouches *et al.,* 2016), mais son effet sur la cellulose et la lignine est faible s'il est dilué. D'un point de vue moléculaire, le

prétraitement acide déstabilise les liaisons de Van der Waals et les liaisons covalentes qui assurent la stabilité structurale de la biomasse (Amin *et al.*, 2017). Les prétraitements acides s'effectuent généralement avec des acides forts inorganiques (HCl, H_2SO_4 ou H_3PO_4); deux études ont utilisé des acides faibles comme l'acide lactique et l'acide acétique (Fan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010).

Les études qui mettent en œuvre un prétraitement acide combiné à un prétraitement thermique obtiennent systématiquement des rendements supérieurs à 50 L_{H2}/kg_{MS} , une valeur largement supérieure au rendement de la biomasse de référence non prétraitée qui est compris entre 3 et 20 L_{H2}/kg_{MS} dans ces mêmes études. Par exemple, Zhang *et al.* (2007) examinent l'effet d'une hydrolyse acide à chaud (100°C, 30 min) qui permet d'augmenter le potentiel de production d'H₂ de leur biomasse de 3 à 131 L_{H2}/kg_{MS} . Dans des conditions d'hydrolyse similaires, Liu et Cheng (2010) observent une augmentation plus modeste de la production d'H₂ de 26 L_{H2}/kg_{MS} (référence) à 35 L_{H2}/kg_{MS} , un constat également partagé par l'étude de Pan *et al.* (2010), avec des rafles de maïs, dont l'hydrolyse acide à chaud augmente le rendement en H₂ de 12 à 65 L_{H2}/kg_{MS} .

La durée d'hydrolyse et surtout la quantité d'acide par kg de matières sèches sont optimisées dans ces travaux. Plusieurs études notent un optimum en terme de quantité de sucres dans le milieu réactionnel signifiant qu'à partir d'une certaine concentration en acide, les sucres sont plus dégradés qu'ils ne sont hydrolysés (Cao *et al.*, 2009 ; Liu et Cheng, 2010 ; Pan *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2007). La quantité optimale d'acide varie également en fonction de la température du prétraitement *e.g.* les prétraitements à l'acide concentré (30 % - 70 %) sont effectués à basse température (37°C) alors que les prétraitement à acide dilué (0,5 - 1,0 %) sont effectués à plus haute température (140°C - 190°C) (Shahbazi et Zhang, 2010). Dans la littérature consultée, les prétraitements sont exclusivement des prétraitements à l'acide dilué. Quand le traitement acide est trop concentré, effectué à trop haute température ou pendant une durée trop longue, la conversion des sucres en inhibiteurs peut être si importante que la fermentation est inhibée de manière quasi-totale comme observé dans les travaux de Panagiotopoulos *et al.* (2009). Ces éléments montrent que la connaissance des conditions et des cinétiques des réactions d'hydrolyse est très importante pour éviter la formation d'inhibiteurs (Amin *et al.*, 2017).

Le type d'acide n'est pas un paramètre qui semble avoir été testé lors de l'hydrolyse de co-produits de maïs. Selon le tableau 3, l'acide sulfurique est utilisé dans 11 études , il est moins corrosif que l'acide chlorhydrique (et peu cher), ce dernier est utilisé dans 3 études (Rodríguez-Valderrama *et al.*, 2020b). Sur d'autres biomasses, Rodríguez-Valderrama *et al.* (2020) et Dai *et al.* (2021) ont comparé l'efficacité des acides entre eux. Rodríguez-Valderrama *et al.* (2020) sélectionnent l'acide chlorhydrique car il permet de mieux hydrolyser les sucres d'un mélange de déchets de fruits et légumes et de paille de maïs. D'après ces auteurs, l'acide chlorhydrique améliore le rendement des sucres extraits (+41 % par rapport à la référence) et la concentration en sucres monomériques (glucose et xylose principalement) dans l'hydrolysat par rapport à l'acide sulfurique. Toutefois, dans cette étude, il semble que l'acide chlorhydrique génère plus d'inhibiteurs (furfural, 5-HMF et composés phénoliques) lors de l'hydrolyse que l'acide sulfurique. Les prétraitements acides sont limités par le prix des composés utilisés et la nécessité de neutraliser, voire de précipiter l'acide avec du Ca(OH)₂ - formation d'un complexe CaSO₄ - pour retirer les ions sulfate du milieu réactionnel. Notons que l'acide sulfurique peut être aussi neutralisé au NaOH puisque le Na₂SO₄ n'est pas considéré comme toxique pour la fermentation d'après Zhang *et al.* (2011). Dans un contexte industriel, l'utilisation d'acide nécessite des infrastructures de stockage et des surépaisseurs pour les cuves pour résister à la corrosion.

Traitements alcalins

Les prétraitements alcalins sont caractérisés par l'ajout d'une base forte, NaOH ou d'hydroxyde de calcium contenu dans le jus de citron (Cao *et al.*, 2012). Ils provoquent non seulement un gonflement de la biomasse, mais aussi sa délignification en rompant les liens entre la lignine et les autres polymères les rendant plus accessibles (Badiei *et al.*, 2014). Ainsi, à l'inverse du prétraitement à l'acide, la fraction qui contient le plus de molécules fermentescibles est celle qui est solide, même si une partie des hémicelluloses peut être également solubilisée dans la phase liquide. Après un prétraitement en condition basique, Tang *et al.* (2013) montrent que 90 % du potentiel de production d'H₂ est contenu dans le résidu solide de rafles prétraitées contre 65 % dans le résidu traité à l'acide. Ce résultat est partagé par Yang *et al.* (2015) avec de la paille de maïs. Aussi, le prétraitement alcalin est régulièrement couplé à un prétraitement enzymatique (Ren *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015).

Le prétraitement alcalin à la soude permet d'améliorer le potentiel de production d'H₂ de la paille de maïs de 3 à 50 L_{H2}/kg_{MS} (Zhang *et al.*, 2007) et des rafles de maïs de 83 à 100 L_{H2}/kg_{MS} . Néanmoins, dans ces études, le prétraitement alcalin est moins efficace que celui à l'acide. L'imprégnation au jus de citron améliore également la production d'H₂ à partir de paille de maïs (+45 %) et donne de bons rendement d'H₂ (159 L_{H2}/kg_{MS}) (Cao *et al.*, 2012).

L'efficacité du traitement alcalin dépend de la teneur en lignine de la biomasse (Mudhoo, 2012) et se révèle plus efficace pour les biomasses peu lignifiées (Sun et Cheng, 2002). Après traitement alcalin, la biomasse est neutralisée par de l'acide chlorhydrique, ce qui modifie la pression osmotique du milieu réactionnel.

4.4.3. Traitements biologiques

Hydrolyse microbiologique

Le traitement microbiologique consiste à déconstruire les parois végétales lignifiées par l'action de microorganismes, bactéries et champignons, notamment. Ceux-ci sont capables de sécréter des cocktails enzymatiques pour dégrader la cellulose et les hémicelluloses grâce à des enzymes hydrolases capables de dépolymériser les polysaccharides (cellulases, xylanases) (Ciolacu, 2018). Les champignons sont aussi sélectionnés pour leur activité lignolytique grâce à leurs peroxydases et laccases (Kumar et Chandra, 2020). Les prétraitements microbiologiques s'effectuent dans des conditions de température moyenne comprise entre 25°C et 37°C (Nikolajeva *et al.*, 2015 ; Nkemka *et al.*, 2015 ; Zhao *et al.*, 2012) et nécessitent des temps

d'incubation plus longs que pour les prétraitements chimiques (des jours contre des heures ou des minutes). Par ailleurs, une partie des sucres peut être consommée par les microorganismes pendant le traitement. D'un point de vue coût opérationnel, cette solution de traitement semble être intéressante (pas d'intrants chimiques, mais il faut ajouter le coût d'acquisition et de culture/stockage des microorganismes) d'autant plus qu'elle peut être implémentée dans des procédés industriels avec des temps de rétention longs comme lors du processus d'ensilage. Notons que, les traitements microbiologiques fongiques ne s'effectuent qu'en condition aérobie, il est donc impossible de réaliser la fermentation simultanément.

Lu *et al.* (2009) et Fan *et al.* (2008) observent respectivement une amélioration significative du potentiel de production d'H₂ de la paille de maïs qui est multiplié par 2,6 et 8,8 par rapport aux conditions de référence. L'effet de la température d'incubation lors de la dégradation microbienne de la biomasse a été testé par Lu *et al.* (2009), qui se proposent de séparer l'étape d'hydrolyse de la biomasse de l'étape de fermentation obscure. Les auteurs montrent que le processus d'hydrolyse est plus efficace à 55°C qu'à 37°C (rendement en H₂ multiplié par 3).

Hydrolyse enzymatique

L'alternative à l'hydrolyse microbienne est l'hydrolyse enzymatique. L'objectif est de réduire le degré de polymérisation des chaînes de sucres de la cellulose et des hémicelluloses pour faciliter leur assimilation par les bactéries fermentaires. Cette opération est appelée saccharification quand des monomères de sucres sont libérés dans le milieu. Des enzymes ou cocktails enzymatiques peuvent être mis en œuvre. Ces enzymes peuvent être extraits à partir d'organismes (par exemple : *Aspergillus spp.* et *Trichoderma spp.*) (Renaudie, 2019) ou être d'origine industrielle et avoir subi des modifications par génie génétique pour améliorer leur activité (Combes et Monsan, 2016). Pour l'hydrolyse enzymatique des co-produits de maïs, les enzymes les plus utilisés sont les cellulases qui hydrolysent les liaisons β -(1 \rightarrow 4) des polymères de glucose de la cellulose.

L'hydrolyse enzymatique a un effet positif sur le rendement en H₂. Lors de la fermentation de paille et de rafles de maïs hydrolysées par voie enzymatique (cellulases), Li *et al.* (2018) obtiennent des rendements élevés 66 et 90 L_{H2}/kg_{MS} par rapport aux études sur la même biomasse non prétraitée 3 et 12 L_{H2}/kg_{MS} (Pan *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2007). Dans le processus de prétraitement, l'hydrolyse enzymatique peut être effectuée après un prétraitement thermique ou chimique pour faciliter l'accès des enzymes aux hémicelluloses et à la cellulose (Wang *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2013 ; Ma *et al.*, 2011). En effet, il semblerait également qu'il y ait une synergie entre les traitements chimiques et l'hydrolyse enzymatique permet un gain de rendement de 25 % par rapport à la référence sans hydrolyse enzymatique. Un gain de rendement en H₂ de plus de 100 % est obtenu par Pan *et al.* (2010) en implémentant une hydrolyse enzymatique (cellulase) après un prétraitement acide à chaud. L'ajout d'acide acétique pour intensifier l'explosion à la vapeur avant l'hydrolyse enzymatique (cellulase) permet à Xu *et al.* (2010) d'augmenter le rendement de 71 %. Avec des rafles de maïs, Tang *et al.* (2013) observent une augmentation de 31 % ou 20

% en couplant un prétraitement chimique catalysé par un acide ou par une base à une hydrolyse enzymatique (cellulase) par rapport à la combinaison prétraitement thermique + hydrolyse enzymatique. Notons que la combinaison des prétraitements d'hydrolyse alcaline à chaud et d'hydrolyse enzymatique (mélange de cellulase et de xylanase) permet d'obtenir les rendements de fermentation les plus élevés pour la paille de maïs (194 L_{H2}/kg_{MS}, Ren *et al.*, 2010).

L'inhibition par les produits de l'hydrolyse est un facteur limitant pour les prétraitements enzymatiques à forte charge en biomasse (Ladisch *et al.*, 1983). Cette inhibition peut être levée par la mise en œuvre d'un processus simultané de saccharification et de fermentation où les microorganismes fermenteurs sont ajoutés lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique (Teugjas et Väljamäe, 2013). La saccharification en simultanée permet d'améliorer légèrement la production d'H₂ par rapport à une hydrolyse enzymatique non simultanée comme le montrent Li *et al.* (2018) avec de la paille et des rafles de maïs, respectivement +21 % et +14 %. Ce procédé peut être compliqué à implémenter car les conditions d'hydrolyse enzymatique sont souvent différentes des conditions optimales de fermentation. Par exemple, la température optimale des cellulases est de 50°C (à pH = 5), bien plus élevée que celle nécessaire aux microorganismes mésophiles (37°C).

4.4.4. Positionnement de l'ensilage de maïs sur les traitements

Aucun traitement acide ou alcalin n'est répertorié dans la littérature consultée pour la production d'H₂ à partir de maïs ensilé (Tableau 3). Le traitement microbiologique a été expérimenté dans deux études (Nkemka *et al.,* 2015 ; Nikolajeva *et al.,* 2015). *Piromyces rhizinflata* et *Trichoderma asperellum*, deux champignons, ont été utilisés avant la fermentation obscure pour augmenter biologiquement le potentiel hydrogène des biomasses. Les résultats obtenus sont contrastés et ne permettent pas de conclure positivement puisque l'effet sur le rendement d'hydrogène n'est pas significatif. En effet, Nikolajeva *et al.* (2015) relèvent une très faible augmentation de la production d'hydrogène. Dans l'étude de Nkemka *et al.* (2015), le traitement microbiologique ne permet pas d'améliorer le rendement, en revanche, les productivités initiales en hydrogène sont meilleures avec le traitement (de 1,19 à 2,24 L_{H2}/L/j). Sur l'ensilage de maïs, le prétraitement microbiologique semble donc moins efficace que sur la paille de maïs.

4.5. Effet des nutriments

Avant fermentation, la biomasse est généralement diluée et supplémentée avec différents composés qui se déclinent en 4 grandes catégories : les sources d'azote, les tampons, les sels minéraux, les vitamines.

L'objectif est de mettre les bactéries dans les meilleures conditions pour produire de l'hydrogène et d'apporter tous les nutriments nécessaires à leur croissance et à leur métabolisme. Notons que l'ajout de nutriments est recommandé par l'étude de Carrillo-Reyes *et al*. (2019), qui se propose d'établir un protocole « standard » pour la détermination du potentiel biohydrogène (BHP) d'une biomasse. L'apport de nutriments peut s'effectuer à partir de 2 types de solutions : les milieux synthétiques dont la composition est exactement connue (Zhang et Greasham, 1999) et les milieux empiriques dont la connaissance de la composition est exactement approximative car celle-ci dépend des matières premières utilisées : extraits de levures, peptones. Ces milieux peuvent être également considérés comme complets car ils apportent tous les éléments nécessaires à la croissance cellulaire (Harrigan, 1966). Néanmoins, les ingrédients entrant dans la formulation des milieux ont des coûts relativement élevés qui sont à prendre en compte au moment de la mise en œuvre. Peu d'études ont utilisé directement de la biomasse sans ajout de nutriments au milieu de fermentation (Fan *et al.*, 2008).

4.5.1. L'hydrolysat, source de carbone

Brute ou prétraitée, la biomasse constitue la source principale de carbone qui est apportée au milieu réactionnel. La concentration d'hydrolysat varie de 5 % à 25 % (masse/volume) du volume réactionnel. Audelà de cet intervalle, le substrat aurait un effet inhibiteur sur la production d'hydrogène. Un compromis doit être trouvé pour garantir la croissance spécifique des hydrogénogènes tout en empêchant les autres bactéries de se développer. La concentration d'hydrolysat impacterait également la phase de latence des *consortia* bactériens de la même manière que le rendement en hydrogène (Pan *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont tenté d'optimiser la concentration en substrat pour améliorer le rendement en hydrogène. Leurs résultats sont variables : Liu *et al.* (2008) sélectionnent une concentration de poudre de paille de maïs de 5 g_{M5}/L par rapport à 10 g_{M5}/L. Dans des conditions similaires (poudre de maïs et culture pure), Song *et al.* (2014) obtiennent également un optimum à 4,7 g_{M5}/L, l'augmentation de la concentration en substrat à 28,1 g_{M5}/L entraînant une réduction du rendement de 20 %. Lors de la fermentation de paille de maïs hydrolysée à l'acide puis par enzymes, Ma *et al.* (2011) déterminent un optimum à 8,6 g_{M5}/L. Le rendement à une concentration de 25,8 g_{M5}/L décroit de 42 % par rapport à l'optimum. Zhang *et al.* (2007) et Zhang *et al.* (2015) observent un optimum à 14,1 g_{M5}/L de biomasse. Ces études utilisent des biomasses fermentées sous différentes modalités (prétraitement, *inoculum*). Ces trois études montrent une augmentation de 4,7 à 14,1 g_{M5}/L. Zhang *et al.* (2007) et Zhang *et al.* (2015) observent un maintien du rendement en H₂ à une valeur inférieure à l'optimum à des concentrations comprises entre 9,4 g_{M5}/L et 37,4 g_{M5}/L.

Ainsi, la littérature suggère une concentration optimale en biomasse comprise entre 5 et 15 g_{MS}/L pour optimiser le rendement. Les variations de la production d'H₂ liées à l'augmentation de la concentration en substrat s'expliquent d'un point de vue métabolique. D'après Ma *et al*. (2011) et Zhang *et al*. (2007), l'augmentation de la concentration en substrat augmente la production d'acides et le volume d'hydrogène. L'accumulation des métabolites dans le milieu réactionnel diminue le pH et entraîne une modification du métabolisme vers la production d'éthanol (Amador-Noguez *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2010).

4.5.2. La source d'azote

L'azote nécessaire à la synthèse des acides aminés et des acides nucléiques doit être disponible. Précédemment, il a été établi que la plante de maïs n'est pas très riche en azote quand elle atteint la maturité pour la récolte. Ainsi, plusieurs sources d'azote (organique et inorganiques) ont été testées pour assurer un bon approvisionnement des bactéries en azote. NH₄Cl, NH₄HCO₃ et extraits de levures sont les sources d'azote les plus utilisées. Deux études préconisent l'utilisation d'urée pour rééquilibrer le milieu en azote (Liu et Shen, 2004 ; Zhang *et al.*, 2015b). En effet, l'azote de l'urée, sous forme organique ,serait plus facilement assimilable que l'azote venant d'une source inorganique et, d'un point de vue économique, l'urée serait la moins chère des sources d'azote organique (Li et Chen, 2007). Les sources organiques riches (extraits de viande bactériologique ou *beef extract*, extraits de levures, peptones) contiennent des peptides et des acides aminés libres qui peuvent agir comme facteur de croissance (Li et Fang, 2007 ; Pan *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2015b) ou comme substrat pour la production d'hydrogène (Li *et al.*, 2019 ; Sharma et Melkania, 2018 ; Xiao *et al.*, 2015).

Selon Song *et al.* (2014), l'optimisation de la quantité d'azote peut améliorer significativement le rendement en H₂ : l'ajout de 2 g/L de NH₄HCO₃ permet de doubler le rendement de production d'H₂ de la paille de maïs qui augmente de 32,6 à 76,3 L_{H2}/g_{biomasse}. Lors de la fermentation d'amidon par des cultures mixtes, Liu et Shen (2004) notent une multiplication du rendement par 2,3 avec 1,68 g/L de NH₄HCO₃ par rapport au test avec 0,56 g/L. Un effet inhibiteur est également constaté quand la source d'azote est introduite en excès (Siles *et al.*, 2010 ; Song *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015). La quantité d'azote dans l'ensilage de maïs est donc un paramètre important à surveiller.

4.5.3. Les tampons salins

Les tampons salins ont un double rôle. Ils réduisent les variations de pH du milieu liées à la production d'acides organiques dans le milieu réactionnel en cours de fermentation obscure et garantissent une bonne salinité dans le milieu sans pour autant causer un choc osmotique (Song *et al.*, 2012b). A cela s'ajoute l'apport en phosphore qui est utilisé pour le stockage de l'énergie dans les cellules *via* l'ATP, pour la synthèse d'acide nucléique et par de nombreux coenzymes. Le phosphate entre quasiment dans la composition de tous les milieux décrits dans la littérature consultée.

L'ajout du tampon Na₂CO₃ permet à Song *et al.* (2012) d'augmenter le rendement en H₂ de 66,7 % par rapport au test de référence grâce l'atténuation des variations de pH liées à la production d'acides organiques. Zhang *et al.* (2015) notent une augmentation du rendement d'environ 30 % en ajoutant 0,15 mol/L de tampon phosphate. Le pH final (pH = 5) est significativement supérieur à celui de la référence (pH = 4) et est dans une gamme de pH plus favorable à la production d'H₂.

4.5.4. Les oligo-éléments et métaux « traces »

Des oligo-éléments et métaux « traces » sont également apportés pour l'équilibre physico-chimique des bactéries. Ils servent à réaliser des complexes catalytiques dans les enzymes. Parmi eux, le fer joue un rôle biocatalytique dans la réaction de l'hydrogénase, qui est critique pour la production d'hydrogène. En effet, l'hydrogénase (EC 1.12.7.1) contient 12 atomes de fer par molécule (Constant et Hallenbeck, 2019 ; Liu et Shen, 2004). L'ajout de 400 mg/L de fer augmente la production d'H₂ de 7,6 % par fermentation de paille de maïs (Song *et al.*, 2012b). Toujours avec de la paille de maïs, Liu et Shen (2004) observent un effet positif de la concentration en fer sur le rendement en H₂ pour des valeurs comprises entre 1,2 et 10 mg/L ; au-delà, le fer inhibe la production d'H₂. Lors de la fermentation d'amidon, Bao *et al.* (2013) montrent qu'un ajout de fer bien dosé (20 mg/L) a un impact plus important sur la production d'hydrogène qu'un prétraitement thermique (100°C, 30 min).

Parmi les autres éléments apportés au milieu réactionnel, notons l'importance du magnésium qui sert de cofacteur aux enzymes glycolytiques (hexokinases) et permet de stabiliser l'ATP (Garfinkel et Garfinkel, 1985 ; Vicelma Cardoso *et al.*, 2014), du zinc qui est impliqué dans plusieurs alcools déshydrogénases qui permettent de faciliter la synthèse du NAD⁺ (Elreedy *et al.*, 2019) et du nickel qui est un composant des hydrogénases [Ni–Fe] (Wang et Wan, 2008).

Le soufre qui entre dans la composition des groupements thiols et des acides aminés soufrés, est apporté de manière inorganique par les sels sulfates (FeSO₄, (NH₄)₂SO₄ et MgSO₄ par exemple) ou de manière organique par la cystéine. La L-cystéine est également utilisée comme désoxygénant pour maintenir des conditions anaérobies dans les bioréacteurs. Cet acide aminé est présent dans le site catalytique des hydrogénases [Ni - Fe] (Bao *et al.*, 2013). Une solution de vitamines est également utilisée en tant que facteur de croissance et cofacteurs enzymatiques.

Pour conclure, l'optimisation de la formulation du milieu semble être un levier pour améliorer le rendement en H₂, une fois les conditions optimales de prétraitement bien définies.

4.6. Études des paramètres expérimentaux des conditions opératoires des bioréacteurs

4.6.1. Effet du pH

Le pH est décrit comme un paramètre clé du rendement en hydrogène (Kvesitadze *et al.*, 2011 ; Li et Chen, 2007 ; Liu et Shen, 2004 ; Ma *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2015, 2007). Pendant la fermentation, la production d'acides organiques fait diminuer le pH du réacteur. A un seuil critique de pH, les conditions ne sont plus favorables à la production d'hydrogène du fait d'une réorientation des voies métaboliques pour résister au stress. D'après Pan *et al.* (2010), aucune production d'hydrogène n'a été observée à un pH inférieur à 4. A cette acidité, les cellules ne sont plus capables de réguler leur pH intracellulaire, ce qui a pour conséquence d'inhiber leur métabolisme *via* les enzymes qui ne sont alors plus opérationnelles. De plus, dans un milieu

réactionnel à faible pH, la toxicité des acides organiques est accrue. En effet, ceux-ci sont présents dans le milieu sous forme non-dissociée et sont capables de diffuser à travers la membrane cellulaire. L'arrivée de ces acides dans la cellule diminue le pH et augmente l'osmolarité du cytoplasme, ce qui déclenche des mécanismes de réponse au stress nécessitant de l'énergie métabolique, d'où une diminution de la production d'H₂ (Elbeshbishy *et al.*, 2017).

Dans les expériences en *batch* sans régulation de pH, l'effet du pH initial est étudié. Celui-ci doit être suffisamment élevé pour compenser la production d'acides organiques sans pour autant allonger la phase de latence. D'après Li et Chen (2007), un pH initial compris entre 7,0 et 7,5 semble être un bon compromis et permet les meilleures productions d'H₂ à partir de paille de maïs explosée à la vapeur et saccharifiée. Dans ces conditions, le pH final est de 4,3 ou 5,4. Zhang *et al*. (2007) observent un effet similaire du pH initial sur la production en H₂ lors de la fermentation de paille de maïs. La diminution du pH de 7 à 5 diviserait la production en H₂ par trois.

L'ajout de tampon salin dans le milieu réactionnel peut être une stratégie efficace pour atténuer l'acidification du pH. Une autre alternative est la régulation automatique du pH à une valeur donnée (Datar *et al.*, 2007 ; Fan *et al.*, 2008 ; Kyazze *et al.* 2008). Ces auteurs ont opté pour un *batch* avec régulation de pH aux alentours de 5,2 - 5,5, valeurs considérées dans la gamme des pH favorables à la production d'hydrogène (Hawkes *et al.*, 2007). Fan *et al.* (2008) examinent l'effet du pH au cours de la fermentation sur la production d'H₂. Ils confirment que les meilleurs rendements en H₂ sont obtenus à un pH compris entre 5 et 5,5.

4.6.2. Effet de la température

La température est liée étroitement aux populations de bactéries présentes. Elle peut être utilisée comme un moyen de sélection pour favoriser la croissance des bactéries mésophiles ou thermophiles. Dans les cas où la diversité bactérienne est faible, la température doit être adaptée aux bactéries dominantes pour garantir la production d'hydrogène. C'est notamment le cas dans les expériences en mono ou co-culture « pure ». Les températures d'opération sont donc réparties en 2 groupes : les températures favorables aux mésophiles (35°C - 38°C) et les températures favorables aux thermophiles (50°C - 70°C). Dans la littérature, les groupes sont plutôt bien équilibrés, ce qui montre que les deux types de bactéries suscitent l'intérêt.

Parmi les études consultées, aucune ne teste spécifiquement l'effet de la température lors de la fermentation de biomasse de maïs par des cultures mixtes. Il est donc difficile de conclure sur l'efficacité des bactéries thermophiles par rapport aux bactéries mésophiles. D'après Ghimire *et al*. (2015) et Kumar *et al*. (2017), les conditions de fermentation en conditions thermophiles seraient plus favorables à l'activité des enzymes hydrolytiques et donc à la dégradation de la biomasse, qu'en conditions mésophiles. De plus, l'augmentation de la température réduirait la solubilité de l'H₂ dans le milieu (Lazaro et Hallenbeck, 2019).

4.7. Inoculum et bactéries pour la production d'H₂

4.7.1. Gisements de bactéries productrices d'H₂ et « mode » de fermentation

Le choix des bactéries pour la production d'hydrogène est un élément important puisque ce sont les biocatalyseurs qui convertissent la biomasse en hydrogène. Ces microorganismes doivent être adaptés aux facteurs abiotiques de la biomasse et capables d'avoir accès à un substrat (source de carbone) pour se développer. Pour ce faire, deux modes de fermentation ont été décrits en fonction de l'origine des bactéries : la fermentation par **voie endogène** où les bactéries naturellement présentes dans la biomasse sont utilisées pour la production d'H₂ et la fermentation par **voie exogène** où des bactéries extérieures sont apportées à la biomasse.

La fermentation endogène consiste à envisager la biomasse comme une source de substrat et de bactéries grâce à la présence d'une flore endogène déjà adaptée à la biomasse. La mise en œuvre est simplifiée et les performances de production d'hydrogène proches de celles obtenues avec ajout d'un *inoculum* standardisé prétraité thermiquement ont été démontré au laboratoire sur une biomasse vitivinicole (François *et al.*, 2021). Notons également que la fermentation endogène permet de bénéficier des avantages et des inconvénients de la fermentation en culture mixte. Deux études utilisent les *consortia* endogènes à l'ensilage de maïs (Dauptain *et al.*, 2020 ; Nikolajeva *et al.*, 2015). Si les rendements en H₂ obtenus par Nikolajeva *et al.* (2015) sont très faibles, Dauptain *et al.* (2020) obtiennent un bon rendement en H₂ (136 L_{H2}/kg_{MS}) démontrant que les bactéries endogènes à l'ensilage de maïs sont productrices d'H₂.

En fermentation exogène, la biomasse peut être inoculée avec une souche bactérienne pure productrice d'H₂, avec un mélange connu de souches bactériennes (co-culture) ou avec une source de bactéries dont la composition n'est ni contrôlée, ni caractérisée (culture mixte).

L'utilisation d'une culture pure permet de travailler avec une souche bactérienne performante pour la production d'H₂, seule ou en association avec une souche à activité hydrolytique (co-culture). Outre le travail microbiologique pour sélectionner les bactéries, l'inconvénient de cette méthode est de travailler en conditions stériles ou sélectives pour éviter les contaminations. La plupart des études dans la littérature consultée utilisent des souches commerciales *e.g.* les thermophiles *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* et *Caldicelluosiruptor saccharolyticus*, ainsi que des bactéries du genre *Clostridium* : *C. thermocellum* et C. *butyricum* principalement.

La mise en œuvre d'une culture pure permet d'obtenir de bons rendements avec une souche de *Clostridium butyricum* (75 L_{H2}/kg_{MS}) et une souche de *Clostridium sartagoforme FZ11* (93 L_{H2}/kg_{MS}) sur de la paille de maïs non traitée par rapport à des cultures mixtes. En effet, ces bactéries sont à la fois des bactéries productrices d'H₂ et des bactéries hydrolytiques capables de dégrader la cellulose sans prétraitement (Song *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015). La mise en place de co-culture permet également d'augmenter le rendement de conversion de la biomasse en H₂ : sur de la paille de maïs explosée au CO₂, Kvesitadze *et al.* (2011) montrent

que la co-culture de *Clostridium thermocellum* avec *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* augmente le rendement de 22 % par rapport à une culture pure de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Li et Liu (2012) et Liu *et al.* (2008) observent des gains sur la production d'H₂ plus importants (+74 % et +77 %) consécutifs à la mise en place de la co-culture. Dans cette co-culture, les tâches sont réparties : *Clostridium thermocellum* hydrolyse la biomasse pour *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* qui produit l'H₂. *T. thermosaccharolyticum* est une bactérie non hydrolytique, capable de produire de l'H₂ avec un meilleur rendement que *Clostridium thermocellum*. Une coculture avec une répartition similaire des rôles est mise en œuvre pour la fermentation d'amidon par *Bacillus* sp (l'hydrolyseur) et *Brevundimonas* sp. la bactérie productrice d'H₂ (Bao *et al.* 2013). Avec ces microorganismes, les auteurs obtiennent un rendement en H₂ de 106 L_{H2}/kg_{biomasse}.

La production d'H₂ avec des cultures mixtes est plus facile à réaliser puisque, contrairement aux souches pures, elles ne nécessitent pas de manipulation en conditions stériles et semblent plus adaptées à l'échelle industrielle (Ghimire *et al.*, 2015a). De plus, au sein d'un *consortium*, des synergies entre bactéries peuvent exister pour accéder au substrat, dégrader des biomasses variées et consommer des métabolites intermédiaires ou des inhibiteurs. Ces synergies peuvent être renforcées par la bioaugmentation des cultures mixtes avec des cultures pures (Guo *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2009). Cette stratégie permet d'améliorer le rendement en H₂ de Lu *et al.* (2009) (multiplié par 2,6 soit +13 L_{H2}/kg_{MS}) et de Guo *et al.* (2014) (+16 % en moyenne).

Les *inocula* utilisés dans la littérature sur la fermentation de produit du maïs sont issus de milieux divers (boues anaérobie de digesteurs, fumier d'animaux, déchets agricoles, boues de STEP) dans lesquels des bactéries hydrogénogènes sont susceptibles d'être présentes. Cependant, l'utilisation de cultures mixtes nécessite d'effectuer une étape de prétraitement des bactéries et une étape d'enrichissement pour d'une part, obtenir une quantité de bactéries productrices suffisante et d'autre part, pour ne pas introduire de microorganismes hydrogénotrophes (en particulier d'archées méthanogènes) dans le système (Ghimire *et al.*, 2015a).

4.7.2. Prétraitement des consortia bactériens pour la production d'H₂

Les prétraitements des *inocula* sont fondés sur la capacité des *Bacillius sp.* et *Clostridium sp.* à sporuler quand les conditions du milieu sont défavorables à la multiplication. Ainsi, ces bactéries sont capables de se protéger et survivre plus efficacement que les autres bactéries, ce qui permet une inhibition sélective des organismes méthanogènes et des bactéries concurrentes à la fermentation obscure. Dans chaque étude, l'impact du prétraitement est notable puisque aucune trace de méthane n'est relevée dans la littérature consultée.

Choc thermique

Un traitement par choc thermique (un cycle d'au moins 30 min à 100°C) est tout à fait efficace pour éliminer les méthanogènes et sélectionner les bactéries comme les *Bacillius sp.* et *Clostridium sp.* qui sont capables

de sporuler en réponse à une température élevée (Gauvry *et al.*, 2017). De plus, c'est le traitement le plus fréquent dans la littérature sur le maïs. Un tel prétraitement (100°C, 1 h) appliqué à des boues de STEP inhibe les méthanogènes. Il en résulte une augmentation significative du rendement en H₂ de +81 % lors de la fermentation de la paille de maïs (Zhang *et al.*, 2011).

Le choc thermique peut avoir un effet délétère sur les *inocula* (boues de STEP et flore endogène) qui sont utilisés pour la fermentation d'ensilage de maïs. Cieciura-Włoch et Borowski (2019) et Dauptain *et al*. (2020) notent une diminution des performances de production d'H₂ consécutive à un choc thermique respectivement à 80 et 90°C.

Irradiation aux micro-ondes

Song *et al.* (2012) mettent en évidence la résistance des bactéries hydrogénogènes à l'irradiation aux microondes. L'irradiation perméabilise les cellules, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en protéines dans le milieu extracellulaire. Après irradiation de l'*inoculum*, la diversité bactérienne est réduite : les méthanogènes sont absents et les hydrogénogènes sont sélectionnés. Dans cette étude, l'irradiation est menée avec un rayonnement à haute énergie (2450 W) pendant une brève durée (1,5 min) et permet une amélioration du rendement en H₂ de 84 % (118,8 L_{H2}/kg_{MS}), une valeur comparable au gain observé par Zhang *et al.* (2011) à l'issue d'un prétraitement thermique.

Traitement aérobie

Un traitement aérobie est également efficace pour sélectionner les bactéries anaérobies capables de sporuler et pour inhiber les autres organismes anaérobies. Pour une bactérie anaérobie, l'oxygène est un redoutable inhibiteur. Après un tel traitement, Zhang *et al.* (2007) isolent, à partir de viande de bovins compostée, deux types de bactéries sporulantes avec des morphologies différentes qui s'avèrent être des *Clostridium sp.*.

Notons que la simple exposition de la biomasse à l'air libre a une influence sur les bactéries. Hu *et al*. (2018) étudient l'impact de l'exposition à l'air libre de l'ensilage de maïs sur les *consortia* endogènes.

Ces observations sont importantes puisque nous nous proposons d'utiliser les *consortia* issus de l'ensilage de maïs comme producteurs d'hydrogène. L'étude montre l'apparition, certes minime, de *Clostridii* (1 % d'abondance) dans la biomasse et le recul des *Lactobacillus* au profit de la croissance des *Sporolactobacillus* (28 % d'abondance) après 3 jours à l'air libre.

L'enrichissement sur cellulose

Cette méthode vise à sélectionner les bactéries capables d'hydrolyser la cellulose *i.e.* qui ont une activité cellulase. De la cellulose est additionnée au milieu ; après croissance, la cellulose hydrolysée est révélée et les bactéries sont isolées. Benito Martin *et al.* (2017) mettent en œuvre une méthode de sélection par des chocs de charge en biomasse (LST : load shock treatment). Le milieu synthétique de croissance est enrichi en

biomasse (ensilage de maïs) pendant 125 jours, à pH régulé. Au terme de cette période d'acclimatation, la régulation de pH est stoppée et l'acidification du milieu inhibe les bactéries consommatrices d'hydrogène.

Prétraitements chimiques

Les prétraitements chimiques reposent sur l'exposition de la source de bactéries à un stress induit par un molécule exogène *e.g.* le choc à l'acide (Gómez-Camacho *et al.*, 2021) ou à la base qui sélectionne les bactéries sporulantes et inhibe les méthanogènes (Hawkes, 2002). Gómez-Camacho *et al.* (2021) montrent que l'incubation de boues de digesteurs à pH = 3,0 pendant 24 h a permis la suppression de l'activité des organismes méthanogènes au profit des bactéries productrices d'H₂ (*Clostridium spp.*).

Des molécules contenant du brome sont également utilisées pour induire un stress de sélection. Le bromure de cétrimonium (CTAB) est un détergent dont les capacités tensioactives visent à déstabiliser et solubiliser les membranes des microorganismes. Son utilisation pour le prétraitement d'un *inoculum* issu de fumier de bovins a permis une augmentation du rendement en H₂ de la paille de maïs de 33 % (Guo *et al.*, 2014). Une autre molécule, le BES (2-bromoethanesulfonate), est utilisé pour supprimer l'activité des organismes méthanogènes *via* l'inhibition du coenzyme M qui est réduit en méthane par la méthyl-coenzyme M réductase (Gunsalus et Wolfe, 1978 ; Noblecourt *et al.*, 2017 ; Zinder *et al.*, 1984).

Au terme de cette étude, plusieurs méthodes, de complexités variables, ont été décrites pour obtenir des bactéries productrices d'H₂ et inhiber les microorganismes méthanogènes. A l'instar des observations pour les prétraitements de la biomasse, des critères de sélection de prétraitement de l'*inoculum* pourraient être énoncés : efficacité de la sélection de bactéries productrices d'H₂, coût énergétique, faisabilité à l'échelle industrielle.

5. Ingénierie des procédés continus de fermentation pour l'amélioration de la production d'H₂

Le génie des bioprocédés pourrait être défini comme « *la mise en œuvre optimale des procédés de transformation biologique des matières organiques en produits fonctionnels*» (Villermaux, 1994, p. 1). Cette transformation est catalysée par des microorganismes ou des enzymes. Au cœur du génie des procédés se trouve donc le bioréacteur, dispositif aux configurations multiples dans lequel s'effectuent les réactions. Dans le cas de la production d'H₂ produit les caractéristiques du bioréacteur ont un impact important sur les performances du procédé, au même titre que les microorganismes et le substrat (Carolin Christopher *et al.*, 2020). La forme du réacteur et les systèmes d'agitation déterminent le régime d'écoulement et les conditions hydrodynamiques du milieu réactionnel (Debacq, 2009), auxquels sont directement liés les phénomènes de transfert de masse entre les phases solide-liquide-gazeuse *i.e.* les bactéries, le substrat et l'hydrogène (Dahiya *et al.*, 2020). La capacité du bioréacteur à extraire l'H₂ du milieu réactionnel *via* les transferts liquide-gaze st une caractéristique essentielle d'une part afin d'éviter que l'H₂ ne soit consommé par des organismes hydrogénotrophes, d'autre part afin de maintenir des conditions thermodynamiques favorables à la

production d'hydrogène par les microorganismes, ce qui nécessite une faible pression en H₂ dans la phase liquide (Clion *et al.*, 2015 ; Trably *et al.*, 2018).

Le transfert solide-liquide impacte aussi la production d'H₂ de plusieurs manières :

- plus les bactéries accèdent facilement au substrat, plus celui-ci sera consommé efficacement pour la production d'H₂.
- le substrat, par sa nature et sa composition, peut sélectionner différentes bactéries (Dauptain *et al.*, 2020; François *et al.*, 2021; Renaudie, 2019).
- les conditions hydrodynamiques dans le milieu réactionnel peuvent favoriser la croissance des bactéries sous différentes formes : croissance en suspension, en agrégats et/ou en granules, en biofilms (Si *et al.*, 2015b).

Enfin, le mode d'alimentation du réacteur et la charge appliquée en substrat conditionnent la production d'H₂ (Palomo-Briones *et al.*, 2017). Selon le mode d'alimentation, les réacteurs peuvent être classés en deux catégories : les réacteurs à alimentation discontinue et ceux à alimentation continue (Sinharoy *et al.*, 2020). Les réacteurs à alimentation discontinue présentent généralement de bons rendements et sont principalement utilisés en recherche. De façon générale, les réacteurs en mode de fonctionnement continu sont davantage utilisés pour des applications à échelle industrielle car moins cher à opérer (Gopalakrishnan *et al.*, 2019b; Yang et Sha, 2019).

En plus des contraintes techniques de transfert entre les phases solide, liquide et gazeuse communes aux deux types de réacteurs, les réacteurs en mode de fonctionnement continu plus difficile à mettre en œuvre doivent assurer la stabilisation et le maintien d'un *consortium* bactérien robuste et riche en bactéries productrices d'H₂ en évitant le risque de lessivage dans le temps (Ramírez-Morales *et al.*, 2015).

Cette partie sera dédiée à la présentation des solutions techniques permettant de maintenir une faible pression partielle en H₂ et de stabiliser des bactéries productrices d'H₂. Ainsi, nous tenterons d'observer comment la conception de ces bioréacteurs est mise au service de la performance métabolique et de la productivité en H₂.

5.1. Techniques de maintien d'une faible pression partielle en H₂ dans le milieu réactionnel

Le biohydrogène est principalement produit par la réduction des protons en H₂ via la ferrédoxine (Fd_{red}) ou via le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (Bundhoo et Mohee, 2016).

En théorie, l'H₂ est caractérisé par une faible solubilité dans les solutions aqueuses (1,6 mg_{H2}/kg_{H20} soit 19,6 mL_{H2}/kg_{H20}, en condition standard de pression et de température). Cependant, si le transfert de masse entre les phases liquide et gaz n'est pas suffisant, notamment à cause des paramètres du bioréacteur (hydrodynamique) et des caractéristiques du milieu réactionnel comme la viscosité (Nemestóthy *et al.*, 2020),

une sursaturation du milieu en H₂ peut intervenir (Dreschke *et al.*, 2019a ; Kraemer et Bagley, 2006 ; Lamed *et al.*, 1988 ; Zhang *et al.*, 2012).

Cette accumulation d'H₂ est doublement néfaste pour le rendement de la fermentation obscure : elle réduit la production d'hydrogène puisque le gaz, qui n'est pas extrait dans la phase gazeuse, est éliminé avec les liquides dans l'effluent, et elle modifie le métabolisme du consortium fermentaire. En effet, à des concentrations élevées en hydrogène (pressions partielles élevées > 10^{-3} atm dans le milieu réactionnel selon la loi de Henry), dans un contexte thermodynamique défavorable, les voies métaboliques de consommation de l'H₂ comme l'homoacétogenèse sont favorisées (Bastidas-Oyanedel et al., 2012 ; Saady, 2013) au détriment des voies de production d'H₂ (Noblecourt *et al.*, 2017). De plus, l'accumulation de l'H₂ dans le milieu réactionnel défavorise la dégradation des acides gras en acétate par la voie de β-oxydation. Cette réaction présente une enthalpie libre standard positive ($\Delta G_r^0 = +48 \text{ kJ/mol}$) et requiert une pression partielle en H₂ faible (Dong et al., 2009; Trably et al., 2018). Plusieurs études ont rapporté des changements d'activité métabolique liés à l'accumulation d'H₂ dans le milieu réactionnel (Lamed *et al.,* 1988 ; Levin, 2004 ; van Niel et al., 2002 ; Yerushalmi et al., 1985). Ces auteurs notent une surproduction de lactate et/ou une accumulation d'éthanol, de butanol et d'acétone traduisant l'activation des voies de la solvantogenèse aux dépens des voies productrices d'H₂. A l'échelle moléculaire, il a été montré que le fonctionnement des hydrogénases est réversible (Lamed et al., 1988) et que l'H₂ inhibe le fonctionnement des hydrogénases en s'accumulant dans les canaux hydrophobes de circulation de gaz de l'enzyme (Fourmond et al., 2013).

Ainsi, l'accumulation de l'H₂ dans le bioréacteur conduit à des pertes significatives de rendement (Nemestóthy *et al.*, 2020). Les travaux du laboratoire ont montré une augmentation de la production d'H₂ entre un réacteur en fonctionnement batch (sans extraction des gaz produits) et en fonctionnement semibatch (avec extraction libre ou forcée des gaz produits) sur un substrat modèle (Clion *et al.*, 2015). Plus récemment, les travaux de Dreschke *et al.* (2019) mettent en évidence une anti corrélation entre la production d'H₂ et la sursaturation en H₂ dans la phase liquide lors de la fermentation de *Thermotoga neapolitana*. Pour maintenir une pression partielle en H₂ dans le milieu réactionnel suffisamment faible, plusieurs stratégies ont donc été proposées.

5.1.1. L'augmentation du volume de ciel gazeux

Le ciel gazeux d'un réacteur est l'espace libre au-dessus du milieu réactionnel en tête de réacteur. La présence d'H₂ dans le ciel gazeux rend le transfert de masse de l'H₂ produit dans le milieu réactionnel moins favorable (Ghimire *et al.*, 2015a). L'augmentation du volume de ciel gazeux permet de réduire la pression d'H₂, ce qui facilite la désorption de l'H₂ vers la phase gazeuse. Les travaux de la littérature se sont concentrés sur l'optimisation du rapport entre le volume de ciel gazeux et le volume total du bioréacteur (Abdeshahian *et al.*, 2014 ; Batista *et al.*, 2018 ; d'Ippolito *et al.*, 2010 ; Nguyen *et al.*, 2010 ; Oh *et al.*, 2009). Ces études observent des productions d'H₂ maximales avec des volumes de ciels gazeux compris entre 67 % et 83 % du

volume total du bioréacteur, avec des gains de production d' H_2 significatifs, compris entre 50 % et 73 % à l'exception de l'étude de Oh *et al.* (2009), qui enregistrent des gains plus faibles (de l'ordre de 10 %). *A contrario*, Mazareli *et al.* (2020) et Villa Montoya *et al.* (2019) constatent que l'augmentation du volume de ciel gazeux (respectivement de 40 % à 60 % et de 50 % à 70 %) aurait un effet négatif sur la production d' H_2 , effet toutefois non quantifié dans leurs publications.

Quoi qu'il en soit, l'inconvénient principal de l'augmentation du volume de ciel gazeux est l'encombrement accru du bioréacteur lié au surdimensionnement de la cuve et, en corollaire, une plus grande quantité de gaz nécessaire pour mettre le réacteur en anaérobie stricte.

5.1.2. Le gaz de balayage

L'utilisation d'un gaz de balayage est une méthode qui consiste à utiliser un gaz inerte (N₂, CO₂, Ar) pour faciliter le transport et l'extraction des gaz produits du milieu réactionnel pendant la fermentation obscure. Cette méthode dite de barbotage est décrite comme fiable, rapide, simple à implémenter pour réduire la pression partielle en H₂. Elle est largement utilisée dans les études de production de biohydrogène pour améliorer le rendement du procédé (Clion *et al.*, 2015 ; Karlsson, 2008 ; Kim *et al.*, 2006 ; Kraemer and Bagley, 2008 ; Logan *et al.*, 2002 ; Mizuno *et al.*, 2000 ; Nguyen *et al.*, 2010 ; Sekoai *et al.*, 2018 ; Veeravalli *et al.*, 2014). L'utilisation d'un gaz de balayage en continu peut multiplier le rendement en hydrogène jusqu'à 16 fois (Karlsson, 2008), les autres études observant des gains compris entre +43 % et +150 % (Clion, 2016; Kim *et al.*, 2006a ; Logan *et al.*, 2002 ; Mizuno *et al.*, 2000 ; Sekoai *et al.*, 2018 ; Veeravalli *et al.*, 2014). Nguyen *et al.* (2010) se distinguent en mettant en place un dégazage ponctuel du réacteur avec un gaz de balayage quand la proportion d'H₂ dans la phase gazeuse est trop importante (plus 30 %).

Parmi les facteurs qui influencent la production d'H₂, on note le débit du gaz de balayage et sa nature. L'augmentation du débit de gaz permet d'améliorer la production d'H₂. En réacteur agité en continu (CSTR) ou en réacteur à flux vertical ascendant, l'effet du débit sur la production d'H₂ semble plafonner à partir de 50 - 100 mL/L/min (Bakonyi *et al.*, 2017; Clion, 2016 ; Kim *et al.*, 2006a).

Kim *et al.* (2006) étudient également la nature du gaz de balayage sur la production en H₂. Leurs travaux suggèrent que l'utilisation de CO₂ a l'effet le plus favorable sur la production d'H₂ que le N₂ ou le gaz produit pendant la fermentation. Clion (2016) préconise un mélange de N₂ et de CO₂ (75 : 25). Bakonyi *et al.* (2017) suggèrent d'utiliser la fraction riche en CO₂ résultant du gaz de fermentation après une étape de séparation membranaire comme gaz de balayage. En condition thermophile, Dreschke *et al.* (2019a) font directement recirculer le gaz de fermentation sans séparation préalable de l'H₂ et du CO₂ et obtiennent une augmentation de la production (+16 %). Enfin, avec un procédé en deux étapes (acidogénèse couplée à l'acétogenèse et méthanisation), Nualsri *et al.* (2017) utilisent le biogaz de la méthanisation riche en CH₄ pour extraire l'H₂ produit dans le réacteur de fermentation obscure. Les stratégies utilisant les gaz de fermentation comme gaz de balayage et dans

le cas de Dreschke *et al*. (2019a), de limiter la dilution l'hydrogène, qui complique sa purification en fin de procédé.

5.1.3. L'extraction des gaz produits par dépression

La fermentation sous pression réduite, obtenue à l'aide d'une pompe à vide connectée à la sortie de la ligne des gaz, provoque une dépression dans le bioréacteur. Cette solution a été envisagée pour réduire la pression partielle en H₂ et augmenter sa bioproduction. Les résultats sont contrastés.

Clark *et al.* (2012) et Kataoka *et al.* (1997) n'observent pas d'effet significatif. Beckers *et al.* (2012) et Lee *et al.* (2014) n'observent que de faibles gains respectivement +7 % et +8 % à des pressions absolues de 903 mbar et de 507 mbar. *A contrario*, Clion (2016), Liu et Wang (2017), Mandal *et al.* (2006) et Rajhi *et al.* (2016) constatent un effet positif de la réduction de pression en tête de réacteur sur la production d'H₂ avec des pressions absolues comprises entre 200 mbar et 800 mbar. Sonnleitner *et al.* (2012) montrent que la réduction de la pression absolue à 200 mbar a un effet comparable à l'utilisation d'un gaz de balayage (N₂).

En réacteur continu, Liu et Wang (2017) et Sonnleitner *et al*. (2012) qui opèrent leur réacteur avec de longs TSH (15h - 48 h) observent un effet positif de la réduction de la pression dans le ciel gazeux du réacteur sur la production d'H₂. Avec un TSH de 10 h, Kisielewska *et al*. (2015) n'obtiennent pas d'effet significatif (avec une dépression comprise entre 25 et 30 mbar). Cependant, en augmentant le débit d'alimentation en substrat par réduction du TSH (< 8 h), ces auteurs relèvent une augmentation de la production d'hydrogène par rapport à une configuration sans pompe à vide.

Ces résultats soulignent l'intérêt d'extraire les gaz par une pompe à vide consécutivement à une augmentation du débit d'alimentation substrat (DAS) et permettrait également d'atténuer l'effet de l'inhibition de la production d'H₂ par le substrat.

D'autres études signalent plusieurs effets sur le métabolisme liés à l'extraction d'H₂ par ce procédé : amélioration de la consommation du substrat, et de la DCO, et de la production des métabolites co-produits avec l'H₂ tels que le butyrate et l'acétate (Kisielewska *et al.*, 2015 ; Liu et Wang, 2017). Ces changements métaboliques contrastent logiquement avec les études de Sarkar *et al.*, (2017) et Yan *et al.* (2017), qui observent une augmentation de la production de lactate, de propionate, d'éthanol et une diminution de la consommation du substrat en augmentant la pression dans le bioréacteur respectivement 2 bar et 1,9 bar.

Ainsi, l'utilisation d'une pompe à vide pour réduire la pression de gaz en tête de bioréacteur et améliorer le transfert de masse entre les liquides et les gaz a permis, dans la plupart des cas, d'améliorer la production d'H₂ et de réorienter le métabolisme des *consortia* fermentaires. Notons que cette stratégie augmente le coût énergétique du procédé.

5.1.4. L'agitation

Les conditions hydrodynamiques, et en particulier l'agitation du milieu réactionnel, ont un impact sur la désorption de l'H₂ dans la phase liquide (Chezeau *et al.*, 2019 ; Trad *et al.*, 2016). La vitesse de l'agitation du milieu (Aceves-Lara *et al.*, 2008 ; Chou *et al.*, 2008 ; Clark *et al.*, 2012 ; Lay, 2000 ; Palomo-Briones *et al.*, 2019) et la géométrie du mobile d'agitation (Ding *et al.*, 2010 ; Niño-Navarro *et al.*, 2016) ont été retenus dans la littérature comme paramètres permettant d'augmenter la production d'H₂.

Lamed *et al.* (1988) montrent que l'agitation permet d'améliorer significativement la production d'H₂ jusqu'à 179 %, ce qui est confirmé par Clark *et al.* (2012) avec un gain de production de 65 %. En régime turbulent, l'augmentation de la vitesse d'agitation permet d'accélérer le démarrage de la production d'H₂ dans le milieu (Lay, 2000) et la production d'H₂ comme le constatent Aceves-Lara *et al.* (2008) et Palomo-Briones *et al.* (2019) qui obtiennent des gains respectifs de 143 % et 74 %, par l'effet de la réduction de la sursaturation d'H₂ (53 % pour Palomo-Briones *et al.*, 2019) dans le milieu réactionnel. Chou *et al.* (2008) mettent en évidence un optimum de production d'H₂ pour une agitation à 100 tr/min qui correspond à la transition entre le régime laminaire et le régime turbulent. Au-delà de 100 tr/min, un changement métabolique vers les voies de production d'alcool est observé.

L'augmentation de la vitesse d'agitation est associée à une consommation accrue d'énergie. Pour améliorer l'efficacité énergétique du procédé, plusieurs équipes ont eu recours à des modélisations qui permettent de prédire les transferts de masse et les flux d'écoulement pour concevoir des mobiles d'agitation efficaces à faible vitesse de rotation (Ding *et al.*, 2010 ; Niño-Navarro *et al.*, 2016). En jouant sur la géométrie de la pale d'agitation (turbine à pale inclinée) et sur la répartition verticale des mobiles sur l'arbre, Ding *et al.* (2010) et Niño-Navarro *et al.* (2016) multiplient leur production d'H₂ respectivement par 3 et 6,8.

En bioréacteur à flux ascendant fonctionnant sans agitateur, une variante à l'agitation a été proposée pour améliorer le transfert entre la phase liquide et gazeuse : la recirculation de l'effluent (Fontes Lima et Zaiat, 2012). L'ajout d'une boucle de recirculation permet de modifier l'hydrodynamique d'un réacteur à flux ascendant sans modification du TSH en passant d'un régime flux piston à un régime turbulent. Ainsi, à TSH = 2 h, Fontes Lima et Zaiat (2012) étudient l'effet de plusieurs taux de recirculation *i.e.* le rapport du débit de recirculation sur le débit d'alimentation, sur la production d'H₂ d'un réacteur à lit fixe. Ils obtiennent un optimum de production d'H₂ et de conversion du sucrose à un taux de recirculation de 0,5 (soit un flux de recirculation correspond à la moitié du flux entrant). Cho *et al.* (2018) observent également une augmentation de la productivité de leur réacteur à lit de boues de 7 % par rapport à la référence en implémentant une recirculation (2,5 m/h de vitesse ascensionnelle).

5.1.5. Le dégazage par ultrasonication

L'ultrasonication consiste à irradier une solution avec des ultrasons. Parmi les effets résultants de cette irradiation, Elbeshbishy *et al.* (2011) ont identifié un effet de dégazage qui pourrait être favorable à la

production d'H₂ par fermentation obscure et ont implémenté des émetteurs ultrasonores dans un CSTR à TSH = 12 h, ce qui a permis une augmentation de 84 % avec une solution de glucose concentrée à 10 g/L, voire 100 % à 15 g/L. Cho *et al.* (2018) ont appliqué cette stratégie expérimentale pour améliorer les performances d'un bioréacteur à lit de boues, ils notent un bénéfice de 65 % de la productivité en H₂, un gain qui, d'après l'auteur, n'est pas assez élevé pour amortir le coût énergétique de l'ultrasonication.

5.1.6. Les membranes de séparation liquide / gaz

Des contacteurs liquide/gaz munis de membranes polymères hydrophobes peuvent être utilisées pour extraire directement les gaz du milieu réactionnel. Selon Zheng *et al.* (2010), le succès de la séparation liquide/gaz repose sur trois critères :

- la membrane doit être perméable aux gaz ;
- la membrane doit être stable quand elle est immergée ;
- Ia surface de la membrane doit être colonisable par les bactéries productrices d'H2.

Plusieurs matériaux ont été testés (caoutchouc de silicone, PTFE, tamis moléculaire carbone/silice, PE hydrophobe), sous différentes formes (membranes planes, fibres creuses, tubulaires) et selon des mises en œuvre différentes (*in situ* ou *ex situ*) pour répondre à ces critères. L'utilisation de membranes comme séparateur de phase liquide/gaz permet à Zheng *et al.* (2010) de réduire la concentration en H₂ du milieu réactionnel à des pressions favorables à la production d'H₂. La configuration du bioréacteur membranaire permet à Liang *et al.* (2002) et Singer *et al.* (2018) d'améliorer le rendement en H₂ de respectivement de 15 % et 59 %. Au laboratoire, les travaux de Clion (2016) multiplient par 3 la production d'H₂ en utilisant un module membranaire à fibres creuses par rapport à un bioréacteur agité en continu (CSTR) avec extraction des gaz par balayage. Ce réacteur appelé bioréacteur membranaire (BRM) se distingue des autres configurations testées car il ne nécessite pas de pompe à vide pour faciliter l'extraction des gaz à travers la membrane, ce qui représente un gain énergétique. Sur ce même dispositif, Renaudie *et al.* (2021a) montrent que l'utilisation d'un gaz de balayage circulant dans la lumière des fibres est facultative. L'observation de la surface des fibres par microscopie électronique à balayage révèle une couche de bactéries.

5.2. Techniques de rétention des bactéries dans le milieu réactionnel

En fermentation continu, le design du bioréacteur joue un rôle important pour maintenir les bactéries dans le milieu réactionnel. Le CSTR permet un bon contrôle des paramètres de fermentation (température, pH) dû à une bonne homogénéisation du milieu réactionnel. L'agitation permet également un transfert de masse efficace entre les phases (Barca *et al.*, 2015). Cependant, en fonctionnement à faible temps de séjour, les bactéries en suspension peuvent être lessivées dans l'effluent lors du renouvellement du milieu réactionnel, ce qui limite la productivité des systèmes de production d'H₂ (Ghimire *et al.*, 2015a).

L'enjeu est donc de découpler le temps de séjour du substrat (liquide) du temps de rétention des bactéries (solide) pour faire fonctionner le bioréacteur (Bakonyi *et al.*, 2014 ; Jung *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014). La

mise en place de biofilms bactériens assure le maintien d'une quantité élevée de bactéries, ce qui permet d'alimenter le réacteur avec des débits d'alimentation en substrat (DAS) élevés et des TSH faibles, de résister aux effets inhibiteurs des co-produits fermentaires (Moreno Dávila *et al.*, 2020) et de réduire le volume des bioréacteurs (Muri *et al.*, 2018).

L'inconvénient majeur de ces stratégies est l'immobilisation non spécifique des bactéries, ce qui peut favoriser l'émergence de microorganismes consommateurs du substrat (bactéries lactiques) et/ou d'organismes méthanogènes (Detman *et al.*, 2021).

5.2.1. La rétention des bactéries par procédés membranaires

Un dispositif membranaire peut être couplé à un réacteur CSTR pour filtrer l'effluent en sortie de réacteur. Cette configuration de bioréacteur membranaire permet de découpler la rétention des bactéries du temps de rétention hydraulique (Kim *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2010 ; Shen *et al.*, 2009). La membrane peut être localisée soit sur une boucle de recirculation, soit immergée dans le bioréacteur. Deux types de membranes de séparation sont utilisées. Les membranes de microfiltration, permettant la séparation des bactéries de l'effluent, retiennent les bactéries dans le milieu (séparation solide/liquide). Les membranes d'ultrafiltration filtrent spécifiquement les co-produits de la fermentation (acides gras volatils) dont l'accumulation dans le milieu réactionnel est toxique (séparation liquide/liquide). On notera que les deux séparations concentrent les bactéries dans le milieu.

Cependant, le colmatage des pores des membranes lié à l'accumulation de substances polymériques d'origine microbienne (Lee *et al.*, 2010 ; Oh *et al.*, 2004 ; Shen *et al.*, 2010) ou à la production d'un biofilm réduisant le transfert de matière au travers de la membrane, complique la mise en œuvre du procédé et nécessite d'implémenter des stratégies de nettoyage de la membrane (rétro lavage ou *backwashing*). Les membranes dynamiques peuvent limiter ces phénomènes de colmatage (Park *et al.*, 2019). Cette technique consiste à immobiliser un biofilm sur un tamis qui est disposé sur la membrane de filtration.

5.2.2. Les bioréacteurs à biomasse fixée : lit fixe et lit fluidisé

Les réacteurs à biomasse bactérienne fixée sont des réacteurs généralement à flux ascendant, utilisés pour la fermentation de substrats liquides. Le principe de ces réacteurs repose sur l'utilisation de supports colonisés par les bactéries (Carolin Christopher *et al.*, 2020). Ces supports favorisent le développement et le maintien d'une concentration de bactéries importantes dans le bioréacteur sous forme de biofilms permettant ainsi d'obtenir des productivités en H₂ élevées et un *consortium* robuste, résistant aux variations d'alimentation en substrat, à l'accumulation de co-produits fermentaires et au lessivage.

Dans le réacteur à lit fixe, les supports fixés dans le bioréacteur peuvent être orientés en fonction de l'écoulement des liquides. Ce type de réacteur est souvent opéré à des temps de séjour compatibles avec un écoulement des liquides en flux piston, ce qui permet un bon transfert de masse entre le substrat et les

bactéries. L'utilisation d'une boucle de recirculation est souvent privilégiée pour éviter l'apparition de gradients de pH ou de nutriments dans le bioréacteur.

Dans le réacteur à lit fluidisé, les supports sont maintenus en suspension grâce au flux de liquide ascendant et au flux de gaz dans une moindre proportion. Ainsi, les supports se comportent comme des liquides et ce phénomène améliore le transfert de masse entre les *consortia* bactériens immobilisés et le substrat. En contrepartie, le coût énergétique pour fluidiser le lit est plus important (Waligórska, 2012).

Le succès de l'immobilisation des bactéries dépend de la taille, de la porosité, de la forme et de l'affinité des supports avec les bactéries. En effet, l'adhésion d'un biofilm à une surface dépend de ses caractéristiques physicochimiques *i.e.* nature ionique et forces électrostatiques (Barca *et al.*, 2015). La fixation peut être réversible, notamment à cause d'un flux de liquide trop rapide. Dans la littérature, une grande diversité de supports a été testée dont, à titre d'exemple, les billes de verre (Han *et al.*, 2017 ; Pekguzel *et al.*, 2015 ; Zhang et Logan, 2004), l'argile expansée (Cavalcante de Amorim *et al.*, 2009 ; Karaosmanoglu Gorgec et Karapinar, 2019 ; Khamtib *et al.*, 2021), le charbon actif (Jamali *et al.*, 2016, 2021 ; Lee *et al.*, 2006), des pièces de céramique (Dounavis *et al.*; Keskin *et al.*, 2011 ; Sui *et al.*, 2017) et des éponges (Gokfiliz et Karapinar, 2017 ; Kirli et Kapdan, 2016 ; Wongthanate et Polprasert, 2015).

Une autre stratégie consiste à piéger les bactéries dans une matrice semi perméable, ce qui évite le lessivage des *consortia* et les protègent des variations des conditions du milieu tout en permettant au substrat de diffuser à l'intérieur de la matrice (Chen *et al.*, 2021 ; Kumar *et al.*, 2016). L'utilisation de gélifiant naturel - alginate, chitosan, kappa-carraghénane/gélatine (Dzul Rashidi *et al.*, 2020 ; Güngörmüşler *et al.*, 2021 ; Ta *et al.*, 2020) - ou de polymères synthétiques tel que le fluorure de polyvinylidène (PVDF) a permis d'obtenir des performances de production d'H₂ intéressantes.

5.2.3. Réacteur à biomasse granulaire

Le réacteur à lit de boues est une variante du lit fluidisé pour lequel aucun support n'est utilisé. Les bactéries sont maintenues dans le milieu réactionnel grâce à leur capacité à s'agréger et à former des granules (flocs). Les granules sédimentent au fond du bioréacteur et forment un lit de boue dans lequel le substrat est injecté (Mainardis *et al.*, 2020). Ce lit de boue permet le maintien d'une concentration élevée de cellules dans le réacteur. Ainsi, plus les granules ont une vitesse de sédimentation élevée, plus les temps de séjour peuvent être réduits et le flux ascendant des liquides rapide (Gopalakrishnan *et al.*, 2019). La production de gaz fermentaires sous forme de bulles permet de mélanger partiellement le milieu et améliore le transfert de masse (Batstone *et al.*, 2005).

Malgré le faible temps de génération des bactéries, le principal inconvénient de ce type de bioréacteur est le temps nécessaire à la mise en place du lit de granules bactériennes (environ 40 jours).

Pour conclure, les travaux de Keskin *et al.* (2011) et d'Anburajan *et al.* (2017) comparent les paramètres d'alimentation et les productivités en H_2 de bioréacteurs à lit fixe et de CSTR. Les productivités des CSTR plafonnent à TSH = 6 h alors que les bioréacteurs à lit fixe atteignent leur productivité optimale à des TSH beaucoup plus faibles (entre 1 h et 2 h selon les supports). De plus, aux mêmes TSH, les réacteurs à lit fixe obtiennent de meilleurs rendements en H_2 que les CSTR, ce qui souligne le succès de la stratégie visant à retenir la biomasse bactérienne dans le bioréacteur pour intensifier la production d' H_2 .

6. Conclusion et objectifs de la thèse

L'hydrogène est appelé à jouer un rôle important dans le contexte actuel de la transition énergétique et de la réduction des émissions anthropiques de gaz à effet de serre. Le point critique de la filière hydrogène est la décarbonation des procédés pour la production d'hydrogène. À l'inverse des procédés conventionnels, qui utilisent des matières premières fossiles, la production d'hydrogène renouvelable et bas carbone s'appuie sur des procédés thermochimiques utilisant des matières renouvelables (biomasses) ou sur l'électrolyse de l'eau en utilisant de l'électricité produite à partir de sources d'énergie non carbonés. Ces technologies de production d'H₂ à haut niveau de maturité technologique (TRL) sont en pleine essor et pourraient être complétées par des procédés biologiques peu énergivores tel que la fermentation obscure. La fermentation obscure permet de produire de l'hydrogène à une bonne productivité, à partir de matières organiques diverses sans contrainte de lumière ou d'oxygène ce qui en fait une voie intéressante pour décarboner une partie de la production d'H₂ tout en valorisant des co-produits organiques des activités humaines. Dans ce travail, les biomasses ciblées pour la production d'hydrogène sont des ensilages de maïs et de seigle.

L'étude bibliographique montre que l'ensilage de maïs est une biomasse adéquate pour la valorisation énergétique : elle est riche en matières métabolisables, abondante, disponible en Europe et facile à stocker puisque sa stabilisation est assurée par une fermentation lactique qui limite sa dégradation.

La fermentation obscure de l'ensilage de maïs n'a été mise en œuvre qu'à 9 reprises dans la littérature (Benito Martin *et al.*, 2017 ; Cieciura-Włoch et Borowski, 2019 ; Dauptain *et al.*, 2020 ; Gómez-Camacho *et al.*, 2021 ; Kyazze *et al.*, 2008 ; Manzini *et al.*, 2015 ; Nikolajeva *et al.*, 2015 ; Nkemka *et al.*, 2015 ; Tenca *et al.*, 2011) et seulement trois études se concentrent exclusivement sur cette biomasse (Benito Martin *et al.*, 2017 ; Gómez-Camacho *et al.*, 2021 ; Nikolajeva *et al.*, 2015). Dauptain *et al.* (2020) ont montré la faisabilité de la production d'H₂ en mode endogène et décrivent la composition finale du milieu en termes de métabolites et de bactéries. Par cytométrie en flux, Gómez-Camacho *et al.* (2021) ont étudié l'effet du pH sur les dynamiques microbiennes, notamment l'état des bactéries (spores, état végétatif, pré spores). Des données sont donc manquantes ou à approfondir en ce qui concerne la cinétique d'utilisation du substrat contenu dans l'ensilage, le métabolisme fermentaire et l'évolution des *consortia* bactériens au cours de la fermentation, les prétraitements de la biomasse et des *consortia*, et la production en réacteur continu). Après une recherche bibliographique approfondie, il semblerait qu'aucune étude n'ait utilisée le seigle (plante entière) ou l'ensilage de seigle comme substrat pour la fermentation obscure. Seule une étude (Cieciura-Włoch et Borowski, 2019) rapporte la fermentation de « *rye stillage* » traduit comme *drèche de seigle* issue de distillerie. En effet, le seigle est la céréale la plus utilisée pour la production d'éthanol en Pologne (Lopaciuk *et al.*, 2007 cités par Krzywonos *et al.*, 2009).

A travers les travaux mettant en œuvre les produits du maïs, nous avons pu identifier les principaux facteurs qui influent sur la production d'H₂ et observer les solutions mises en œuvre dans la littérature pour les optimiser. Tout d'abord, l'accessibilité du substrat aux bactéries productrices est cruciale pour la production d'H₂, étant donné que les produits de la plante de maïs ont une structure lignocellulosique récalcitrante à l'hydrolyse enzymatique (première étape de la digestion anaérobie). En conséquence, des prétraitements mécaniques, thermiques, chimiques sont mis en œuvre dans la littérature pour solubiliser le substrat mais ceux-ci peuvent aussi générer des inhibiteurs. La composition du milieu réactionnel joue également un rôle sur la production d'H₂ et notamment la concentration en substrat. Des additifs peuvent être ajoutés afin de stimuler le métabolisme et augmenter le rendement en H₂ tels que des éléments riches en azote, des tampons salins, des métaux et des vitamines. Les paramètres opératoires principaux du bioréacteur que sont la température et le pH impactent directement le développement du consortium fermentaire et son métabolisme, qui doit être favorable à la production d'H₂. Enfin, la nature des consortia bactériens utilisés conditionne le rendement final, notamment par la présence de bactéries productrices d'H₂ et de bactéries hydrolytiques qui peuvent être sélectionnées par des prétraitements. L'utilisation et la caractérisation des consortia natifs (s'ils produisent de l'hydrogène par fermentation endogène) pourraient offrir des pistes de recherche pour améliorer la production d'H₂.

Les performances de la production d'H₂ sont étroitement liées aux choix technologiques du bioréacteur. Les deux points critiques identifiés pour la production d'H₂ en mode continu sont la rétention de la biomasse bactérienne et le maintien d'une pression partielle en H₂ faible dans le milieu réactionnel. La littérature fait état de nombreuses solutions et configurations de réacteurs pour mettre en œuvre des conditions favorables à la production d'H₂. Dans cette étude, nous utiliserons le bioréacteur membranaire à extraction liquide-gaz breveté par Ernst *et al.* (2016) et qui est utilisé dans les travaux de Clion (2016) et Renaudie *et al.* (2021a). Ce bioréacteur utilise deux stratégies de rétention de la biomasse bactérienne : réacteur à lit fixe (développement des bactéries sur les membranes) et réacteur à biomasse granulaire (sédimentation des bactéries au fond du module) et la présence de membranes de séparation liquide/gaz permettant d'extraire *in situ* l'hydrogène du milieu réactionnel.

Cette thèse consiste à optimiser le procédé de production d'H₂ en BRM avec des biomasses ensilées, le maïs et le seigle.
Le premier objectif sera de **caractériser les biomasses et de tester leur potentiel hydrogène en bioréacteur discontinu.** Pour ce faire, nous privilégierons la fermentation en mode endogène avec des cultures mixtes sans prétraitement et sans ajout de nutriments. Cette approche a déjà été mise en œuvre avec succès au laboratoire pour la fermentation de biomasses diverses (François *et al.*, 2021 ; Renaudie, 2019 ; Renaudie *et al.*, 2022). Nous tenterons d'approfondir les connaissances de la littérature (Dauptain *et al.*, 2020 ; Gómez - Camacho *et al.*, 2021) sur les mécanismes de fermentation des biomasses ensilées en identifiant les substrats consommés, les métabolites produits et les bactéries qui émergent au cours de la fermentation par rapport à la flore initiale de la biomasse.

Toujours avec le réacteur discontinu, le second objectif sera de **proposer des prétraitements pour améliorer** le potentiel de production d'H₂ et d'analyser leurs effets sur le métabolisme fermentaire.

- Le premier prétraitement cible la flore endogène de la biomasse et est inspiré de la dégradation aérobie de l'ensilage qui intervient lors de l'ouverture du silo. Les enjeux seront de comprendre les mécanismes de la dégradation aérobie de l'ensilage et leur impact sur la fermentation obscure, puis d'en tirer profit pour augmenter le potentiel hydrogène de la biomasse.
- Les prétraitements suivants (mécaniques et/ou thermochimiques) visent à améliorer la fermentesciblité de la biomasse en dégradant sa structure lignocellulosique et en solubilisant ses sucres. A travers une stratégie de plans d'expériences, les paramètres des prétraitements de l'ensilage de maïs seront optimisés afin de maximiser le potentiel de production d'H₂ de la biomasse. Même si les prétraitements de l'ensilage de maïs ont été très peu étudiés dans la littérature, les données sur les autres fractions de la plante de maïs nous permettent d'espérer des gains de production d'H₂ significatifs.

Ces données nous permettront de remplir le troisième objectif : la **préparation d'un substrat d'alimentation** liquide pour le BRM à partir d'ensilage de maïs.

Le quatrième objectif est de produire de l'hydrogène en bioréacteur membranaire, d'incrémenter des améliorations technologiques et de compléter les connaissances du laboratoire sur l'effet des paramètres d'alimentation du bioréacteur alimenté avec un substrat modèle (solution de glucose). En particulier :

- Quel est l'effet du temps de séjour hydraulique (TSH) dans le réacteur sur les performances de production d'H₂ ?
- Quel est l'effet de l'augmentation de la surface de fibres *in situ* sur les performances de production d'H₂ ?
- Le lactate impacte-t-il les performances de production d'H₂?

Enfin, la synthèse des connaissances sur les biomasses ensilées, les prétraitements et sur le BRM permettra de **mettre en œuvre l'ensilage de maïs pour une production d'hydrogène en mode continu** que nous optimiserons en travaillant sur les paramètres clés d'alimentation du BRM.

Chapitre 1

Chapitre II: Matériels et Méthodes

Les différentes matières et biomasses, décrites succinctement dans ce chapitre, ont été utilisées pour réaliser l'apport en substrats des bioréacteurs. Les principaux prétraitements mis en œuvre pour améliorer le potentiel de production d'H₂ des biomasses ainsi que les techniques de base pour préparer la biomasse sont passés en revue. Une deuxième partie détaille les configurations des bioréacteurs en mode discontinu (semibatch) et en mode continu avec le bioréacteur membranaire (BRM) ainsi que leurs paramètres de fonctionnement. Enfin, ce chapitre présente les instruments et les techniques scientifiques utilisés pour les analyses chimiques et microbiologiques qui permettront de calculer les critères de performances des fermentations et de comprendre leur fonctionnement. Les matériels et méthodes développés au laboratoire s'appuient en partie sur les travaux antérieurs de Clion (2016), François-Lopez (2016) et Renaudie (2019).

1. Substrat de fermentation et prétraitements

1.1. Milieu synthétique

Le substrat modèle est un milieu synthétique, qui consiste en une source de carbone et de nutriments dilués dans l'eau de l'Eurométropole de Strasbourg. Ce milieu est facile à préparer en grande quantité et de manière reproductible par rapport à des substrats réels, permettant ainsi une bonne maîtrise et reproductibilité des résultats. Ses utilisations sont multiples. Lors des tests en mode de fonctionnement continu en BRM, le substrat modèle est utilisé pour renouveler le milieu réactionnel et tester différents modes de fonctionnement pour améliorer la production d'H₂. En réacteur semi-batch, le substrat modèle est utilisé pour tester le potentiel de production d'H₂ à partir d'*inoculum* bactérien dans la perspective de le comparer à d'autres substrats substrats (des hydrolysats de biomasse par exemple).

Le substrat modèle est préparé avec du glucose (3 - 14 g/L) comme source de carbone et complémenté avec des sels inorganiques : (NH₄)₂SO₄ (3,5 g/L), KH₂PO₄ (175 mg/L), FeSO₄·7H₂O (250 mg/L), MgSO₄·H₂O (50 mg/L) et NiCl₂·6H₂O (0,2 mg/L). La composition de milieu synthétique a été définie par Clion (2016), d'après les études de Argun *et al.*, (2008), Lin (2004), Lin et Lay (2005), Sinha et Pandey (2011), Wang et Wan (2008) et Wong *et al.*, (2014). Cette solution est stockée à 4°C jusqu'à utilisation, pendant une durée maximale de 24 h.

1.2. Biomasses

Les biomasses utilisées au cours de l'étude sont des ensilages de maïs et de seigle (figure 6) issus de cultures de couverture de la région Nouvelle-Aquitaine (site de Pot au Pin) et sont fournies par Air Liquide.

Chapitre 2



a. Ensilage de Maïs

b. Ensilage de Seigle

Figure 6 : Photographie des biomasses utilisées dans les expériences de fermentation : ensilage de maïs (a) et ensilage de seigle (b)

Deux lots de chaque biomasse prélevés à 14 mois d'intervalle sont utilisés. Les ensilages sont collectés directement dans le silo, la matière est conditionnée dans des bidons en plastiques de 2 litres pour les biomasses du lot 1, dont une partie a été fractionnée dans des piluliers de 125 mL et dans des bidons métalliques de 25 kg pour les biomasses du lot 2, dont une partie a été fractionnée dans des sacs de congélation. En effet, après 2 jours à température ambiante (temps de livraison postale), les ensilages sont aliquotés puis stockés à -20°C (biomasse congelée) ou à 4°C (biomasse fraîche) jusqu'à leur utilisation. Le stockage à -20°C a pour but de stabiliser la biomasse pour une utilisation sur de longues durées, le stockage à 4°C permet d'étudier l'évolution de la biomasse fraîchement récoltée.

1.3. Prétraitements de la biomasse

1.3.1. Broyage

La biomasse est broyée et homogénéisée par un broyeur à couteaux (GRINDOMIX, GM 200). Des batchs d'environ 40 g de biomasse sont introduits dans le bol. Un pré-broyage est effectué à 200 tr/min pendant 1 min suivi d'un cycle de broyage fin : 30 s à 500 tr/min puis 15 s à 650 tr/min.

1.3.2. Aération forcée

La biomasse est étalée sur une grande surface en verre et placée sous sorbonne avec un flux d'air d'aspiration d'environ 0,4 m/s pendant une nuit et à température ambiante. Après aération, la biomasse est immédiatement mise en œuvre pour la fermentation.

1.3.3. Autoclavage

Les hydrolyses en autoclave sont effectuées avec l'équipement de l'Institut Universitaire de Technologie Louis Pasteur. La biomasse est placée dans des bouteilles en verre et diluée avec de l'eau de l'Eurométropole de Strasbourg (rapport massique matière sèche/liquide de 1/5 équivalent à un rapport massique biomasse/eau de 1/1) ou avec une solution d'acide sulfurique (à concentration massique variable : 0,1 %_{mass.} - 0,3 %_{mass.} par rapport à la masse de biomasse brute). La biomasse est traitée à différentes températures (80°C - 140°C) et durée (20 min - 60 min) dans l'autoclave.

1.3.4. Traitement micro-ondes

La biomasse brute (ensilage de seigle) est diluée avec de l'eau osmosée (rapport massique matière sèche/liquide de 1/26 équivalent à un rapport massique biomasse/eau de 1/9) dans des réacteurs en téflon de 50 mL munis d'une soupape. Les réacteurs sont chauffés par rayonnement micro-ondes (Four micro-ondes Anton Paar) pendant 3 min à 200°C et à une pression maximale de 20 bar. La biomasse totale (solide et liquide) est stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

1.3.5. Imprégnation à l'acide

Pour ce traitement, 150 g d'ensilage broyé est imprégné avec une solution d'acide sulfurique (1,67 %_{mass.}). Le rapport massique matière sèche/liquide est de 1/3. La biomasse est placée dans des sachets en plastique à 4°C pendant 20 h au minimum. La biomasse est utilisée directement sans essorage ni filtration ou congelée pour une utilisation ultérieure.

1.3.6. Explosion à la vapeur

Les explosions à la vapeur ont été réalisées avec le pilote du LERMAB (Université de Lorraine). Le dispositif est présenté sur la figure 7.



- 1. Entrée de la biomasse
- 2. Réacteur
- 3. Exploseur
- 4. Vanne de récupération de la biomasse
- 5. Générateur de vapeur

Figure 7 : Dispositif expérimental d'explosion à la vapeur (Crédit photographique : LERMAB, Université de Lorraine)

La biomasse (150 g pour l'ensilage de maïs et 100 g pour l'ensilage de seigle) imprégnée à l'acide sulfurique ou non imprégnée est placée dans un réacteur de 2 litres à double enveloppe et à commande automatique de la pression de vapeur et du temps de rétention. La biomasse est traitée à différentes températures (170°C - 190°C) et temps de rétention (2 min - 10 min) en injectant une vapeur saturée dans la chambre de résistance à la pression. Après un temps de réaction donné, la biomasse saturée de vapeur est rejetée dans un grand réservoir de décharge : l'« exploseur ».

Le facteur de sévérité combiné (FSC) du traitement de chaque explosion est déterminée grâce à une corrélation (Eq. 2.1) entre la température, temps de rétention (Chornet et Overend, 1988) :

$$FSC = \log\left[t \times e^{\frac{T-T_r}{14,75}}\right] - pH$$
 (Eq. 2.1)

avec FSC : facteur de sévérité combiné, T : température du processus (°C), Tr la température de référence (100°C) ; t : temps de séjour (min), le terme 14,75 est une constante basée sur l'énergie d'activation dans les conditions où la cinétique du processus est de premier ordre et obéit à la loi d'Arrhenius, pH : le pH du milieu réactionnel.

1.4. Préparation du substrat à partir de biomasses réelles

Pour mettre en œuvre les biomasses d'ensilage de maïs et de seigle dans le BRM, il est nécessaire de préparer un substrat liquide riche en matières métabolisables et capable de circuler dans le circuit d'alimentation du BRM. Cette partie détaille le processus pour obtenir un substrat à partir des biomasses (trempage et séparation solide/liquide) et comment les différentes fractions obtenues sont mises en œuvre pour un test de production d'H₂ en réacteur semi-batch.

1.4.1. Trempage

La biomasse brute, broyée ou autoclavée est diluée en quantité voulue avec l'eau du réseau de l'Eurométropole de Strasbourg dans un seau en plastique de 10,7 L. Le mélange est agité sur une durée variable de 1h à 16h, à température ambiante, au moyen d'un agitateur à tige à régulation de vitesse mécanique (100 tr/min) muni d'une ancre. Le dispositif est muni d'un couvercle en plastique pour limiter l'évaporation et les projections.

1.4.2. Séparation solide/liquide

La séparation solide/liquide est mise en œuvre après trempage de la biomasse. La biomasse est filtrée en deux temps : pré-filtrage à l'aide d'un filtre grille (seuil de coupure < 5 mm) et filtrage fin avec un filtre textile (seuil de coupure : 5 μ m). Le résidu est essoré manuellement et vigoureusement pour extraire le maximum de liquide. Le pH du filtrat est ajusté à une valeur comprise entre 6,5 et 7 par ajout de pastilles de NaOH et d'une solution de NaOH à 3M. Le filtrat et le résidu sont stockés à -20°C pour limiter le développement de microorganismes. Le filtrat obtenu est utilisé dans un délai de 14 jours après préparation.

1.4.3. Fermentation de la biomasse hydrolysée

L'hydrolysat et le résidu (obtenus par autoclavage, explosion à la vapeur ou traitement par micro-ondes) sont séparés par filtration (comme décrit au paragraphe 1.4.2), pesés et stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Les

fermentations sont effectuées avec une masse de résidu et avec un volume d'hydrolysat équivalent à 50 g de biomasse non traitée.

2. Dispositifs et procédés de fermentation

Différents modes de fonctionnement des bioréacteurs de fermentation ont été mis en œuvre dans cette étude. Dans un premier temps, un bioréacteur agité en mode semi-batch a été utilisé pour tester le potentiel de production d'H₂ des biomasses et des biomasses prétraitées. Ensuite, des fermentations ont été effectuées avec le bioréacteur membranaire (BRM). Le BRM est un dispositif pour la bioproduction d'H₂ en continu, intensifiée et à partir d'une solution de milieu synthétique (substrat modèle) ou d'un substrat d'alimentation liquide préparé à partir de la biomasse d'ensilage.

2.1. Fermentation en réacteur agité en mode semi-batch

Un schéma du dispositif expérimental de fermentation en mode semi-batch composé d'un réacteur agité avec extraction des gaz produits, est présenté sur la figure 8.



Figure 8 : Schéma du dispositif expérimental de fermentation en mode semi-batch (adapté de Clion, 2016)

Les fermentations sont réalisées dans un réacteur de 1 L agité (IKA, Eurostar digital), avec un volume opérationnel de 0,7 L. Le réacteur, opéré à pression atmosphérique, est équipé d'une double enveloppe couplée à un bain thermostaté (Fischer Scientific, Polystat[™] 24) et d'une vanne de fond pour le prélèvement de liquide. Le milieu réactionnel est constitué de la biomasse ensilée, diluée en quantité voulue (équivalente à 71,6 g_{biomasse}/L, sauf indication contraire) avec l'eau du réseau de l'Eurométropole de Strasbourg, additionné d'un *inoculum* bactérien uniquement dans le cas où la biomasse a subi un traitement thermique sous pression (autoclave, traitement d'explosion à la vapeur et traitement aux micro-ondes). Le pH du milieu réactionnel

est initialement ajusté à pH=7,0, par ajout d'une solution de soude à 3 M. Tout au long de l'expérience, le pH du milieu réactionnel suivi en continu est maintenu à une valeur supérieure à 5,5 par des injections ponctuelles d'une solution de soude 1M contrôlées par un système de régulation de pH (HANNA Instruments, Black Stone BL7916,) asservi à la mesure du pH (SI Analytics GmBH, électrode pH H8381).

La fermentation s'effectue à l'obscurité et à température contrôlée (37°C) et sous agitation (220 tr/min). Le mobile d'agitation permet une agitation du milieu liquide sans immersion de certains constituants de la biomasse notamment les grains et les feuilles, qui restent à la surface du milieu.

Le réacteur est mis en anaérobie strict par un flux d'azote (50 mL/min) contrôlé par un débitmètre massique (Brooks 5850E). Ce gaz inerte bulle dans le milieu liquide permettant ainsi d'extraire les gaz produits. Le flux de gaz sortant est séparé des composés liquides volatils par condensation à travers deux pièges froids placés en série (Huber Cryostat TC40). L'analyse des gaz en ligne est effectuée par un micro-chromatographe en phase gazeuse (SRA T3000), qui permet un suivi régulier de la détection des gaz H₂, CO₂ et N₂ (3 analyses toutes les 10 minutes). Le surplus de gaz est évacué à l'évent.

Des prélèvements d'environ 7 mL sont effectués aux différentes étapes de la fermentation par la vanne de fond du bioréacteur. Les échantillons sont centrifugés à 4500 tr/min pendant 30 min (Hettich, EBA 200). Le surnageant est séparé du culot puis les fractions sont stockées à -20°C.

La fermentation est stoppée quand le débit de production d'H₂ mesuré est inférieur à 0,05 mL_{H2}/min. Après fermentation, un protocole de nettoyage complet du bioréacteur (détergent et javel) est appliqué afin d'éliminer toutes les bactéries et biofilms bactériens présents sur les surfaces du dispositif expérimental.

2.2. Fermentation en bioréacteur membranaire (BRM)

Le bioréacteur membranaire (BRM) liquide/gaz (L/G) est un dispositif de bioproduction d'H₂ développé et breveté par le laboratoire (Ernst *et al.*, 2015). Le BRM est un réacteur de fermentation biologique d'un substrat liquide couplé à des fibres creuses permettant une extraction des gaz en continu. Ponctuellement, un dispositif additionnel de séparation liquide-gaz est utilisé pour dégazer l'effluent liquide sortant du bioréacteur. Un schéma du dispositif expérimental est présenté sur la figure 9.



Figure 9 : Schéma du dispositif de production d'hydrogène en bioréacteur membranaire (BRM) (adapté de Clion, 2016)

Le bioréacteur membranaire (L/G) (Polymem) consiste en un module membranaire cylindrique (rayon intérieur est de 2,1 cm) composé de fibres creuses en polytétrafluoroéthylène (PTFE), empotées à chaque extrémité du module. Les fibres mesurent 38,4 cm de long, ont un diamètre interne de 0,45 mm et un diamètre de pores de 0,1 µm. Dans cette étude, deux modules contenant 238 fibres et 476 fibres sont utilisés. Le volume total de calandre des réacteurs est respectivement de 478 mL et 238 mL. Lors de la fermentation, le réacteur est placé en position verticale donc un ciel gazeux est présent dans la partie supérieure de la calandre, le volume utile des réacteurs est donc respectivement de 422 mL et 218 mL (hauteur remplie du réacteur est de 34 cm). Le BRM est maintenu à une température de 37°C grâce à un serpentin composé d'un tube flexible entourant la calandre dans lequel circule de l'eau chauffée par un bain thermostaté à circulation (Fischer Scientific, Polystat[™] 24). Lors des tests de fermentation, un flux d'azote dont le débit est contrôlé par un débitmètre massique (10 mL/min) circule dans les fibres en co-courant avec la circulation du liquide dans la calandre. Ce gaz de balayage est utilisé afin de faciliter l'analyse des gaz produits ; des études antérieures menées au laboratoire ayant montrées que le dispositif fonctionne de manière efficace sans l'utilisation de ce gaz (Renaudie *et al.*, 2021a).

Le flux de gaz sortant est séparé des composés liquides volatils par condensation dans deux pièges froids placés en série (Huber, Cryostat TC40). Un débitmètre (Mesa Labs, Dry Cal Defender 530) mesure ponctuellement (2 fois par jour) le débit de gaz produits en sortie. L'analyse en ligne des gaz est effectuée par un micro-chromatographe en phase gazeuse (Agilent 490 µGC), qui permet un suivi régulier de la détection des gaz H₂, CO₂ et N₂ (1 analyse toutes les 4 minutes). Le surplus de gaz est évacué à l'évent.

Le réservoir de substrat, d'un volume total de 1,5 L, est équipé d'une double enveloppe où circule de l'eau refroidie par un cryoplongeur (Huber Cryostat TC40) et pompée par le bain thermostaté (Fischer Scientific, Polystat[™] 24) permettant de maintenir la solution d'alimentation à une température inférieure à 6°C. À chaque recharge en substrat, le réservoir est mis en anaérobie par un flux d'azote. Le BRM est alimenté en substrat par une pompe péristaltique à 4 canaux (Ismatec, ISM 940E). Le pH est régulé en continu avec une solution de soude injectée dans le système par une pompe péristaltique (Jobin Yvon Instruments, LabCraft). Le débit de la pompe et la concentration en soude sont ajustés en fonction de la valeur souhaitée du pH en sortie du réacteur.

Au niveau de la sortie de liquide du bioréacteur, une partie du fermentât recircule dans le réacteur grâce à une pompe péristaltique (Ismatec ISM 940E ou ISM 849). La pression, le pH, le potentiel redox sont respectivement mesurés et enregistrés en continu grâce à des sondes placées en sortie sur le milieu circulant dans la calandre et à un analyseur multi-paramètres.

Pour les fermentations réalisées à temps de séjour hydraulique (TSH) compris entre 2 et 6 h, un dispositif d'extraction liquide/gaz en verre connecté à deux pièges isolables par un système de vannes a été rajouté au dispositif de sortie afin de séparer les gaz produits de la mousse générée par l'effet surfactant des résidus de microorganismes (lipides, protéines) et le gaz dans le milieu réactionnel.

Le volume total de liquide en circulation dans l'ensemble du dispositif est d'environ 500 mL ou 300 mL selon le taux de remplissage en fibres de la calandre du bioréacteur choisi.

Après fermentation, le bioréacteur est rincé abondamment à l'eau.

Les paramètres de fonctionnement clés sont définis afin de caractériser le fonctionnement du BRM. Le débit d'alimentation en substrat (DAS) (Eq. 2.2) dépend de la concentration en sucres (C°) de la solution d'alimentation et du temps de séjour hydraulique (TSH) fixé grâce à la pompe péristaltique alimentant le réacteur en substrat.

$$DAS = \frac{C^{\circ}}{TSH}$$
(Eq. 2.2)

La pompe péristaltique de la boucle de recirculation contribue au temps de séjour des liquides dans la calandre (TSC). Le TSH et le TSC permettent de définir le taux de recirculation (TR) (Eq. 2.3).

$$TR = \frac{TSC}{TSH}$$
(Eq. 2.3)

2.3. Digestion anaérobie

Le test de potentiel biométhane (BMP, Biochemical Methane Potential) permet de déterminer la quantité maximale de méthane produite par un échantillon composé de matières organiques (biomasse, fermentât, résidu solide de filtration). Les tests BMP sont sous-traités à l'INRAE-Transfert. Le taux de matières sèches (MS) et matières volatiles (MV) sont déterminés pour un échantillon solide. Une mesure de la demande

chimique en oxygène (DCO) est réalisée pour les échantillons liquides. La mesure du BMP est réalisée dans des fioles de 500 ml, à 35°C, en utilisant des boues anaérobies comme *inoculum*. La production de biogaz est mesurée au cours du temps et sa composition est analysée par chromatographie en phase gazeuse. La mesure du potentiel méthane est réalisée en duplicat (2 essais en parallèle).

3. Méthodes analytiques pour la caractérisation des biomasses, des gaz et des fermentâts

3.1. Analyse de la composition de la phase gazeuse

Les micro-chromatographes en phase gazeuse (μ GC) permettent l'analyse en ligne des gaz extraits des bioréacteurs.

Le μGC SRA T3000 est constitué de deux modules équipés d'un détecteur à conductivité thermique (TCD) et le μGC Agilent 490 est composé d'un seul module équipé d'un détecteur à conductivité thermique. Le tableau 5 donne la configuration des instruments utilisés.

	SF	Agilent μGC 490		
Module	Module 1	Module 2	Module A	
Colonne	Molsieve 5A	PoraPLOT U	CP-CO _x	
Phase	Aluminosilicate tamis moléculaire 5Å	Poly (Divinylbenzène Ethylène glycol diméthacrylate)	Carboxène	
Dimension de la colonne	10 m x 0,32 mm, 30 μm	8 m x 0,32 mm, 10 μm	1 m	
Gaz vecteur	Argon	Hélium	Argon	
Température injecteur	90°C	90°C	90°C	
Température colonne	110°C	85°C	110°C	
Durée	75 s	75 s	220 s	
Gaz analysés	N ₂ , O ₂ , H ₂ , CO, CH ₄	CO ₂ , CH ₄	N ₂ , H ₂ , CO ₂ , CO, CH ₄	

<u>Tableau 5</u> : Module des μ GC-TCD utilisés pour l'analyse des gaz

Le premier module du μ GC SRA T3000 comporte une colonne de type tamis moléculaire 5Å permettant la séparation des gaz permanents (N₂, O₂, H₂, CO, CH₄). La colonne polymérique PoraPLOT U du second module permet notamment la séparation du CO₂ et du CH₄. Sur le μ GC Agilent 490, la séparation de tous les gaz est effectuée avec un module unique. Les gaz sont quantifiés par étalonnage externe.

3.2. Analyse de la composition du fermentât en acides organiques et

monosaccharides

Les acides organiques et les monosaccharides (glucose, fructose) sont analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, Agilent 1260 Infinity LC), respectivement avec 2 détecteurs : un détecteur à longueur d'onde variable (*variable wavelength detector*, VWD, spectrophotométrie UV/Vis) et

un détecteur à indice de réfraction (*refractive indice detector*, RID). La colonne Hi-Plex H (300 mm x 7,7 mm, 8 μm) est composée de billes de styrène-divinylbenzène greffées de groupements d'acide sulfonique. Une précolonne PL Hi-Plex (50 mm x 7,7 mm, 8μm) permet de préserver l'intégrité de la colonne.

Les surnageants des échantillons sont décongelés, centrifugés à 15 000 tr/min (Sigma Laborzentrifugen 1-16) pendant 15 min puis filtrés à l'aide de filtres à seringue (diamètres de pores : 0,2 µm). 20 µL d'échantillon filtré sont injectés dans la colonne (65°C). La séparation chromatographique est réalisée par l'élution des molécules en mode isocratique par une phase mobile d'acide sulfurique (5 mM), à un débit de 0,4 mL/min. La cellule optique du détecteur à indice de réfraction est maintenue à 35°C. La détection des acides organiques par spectrophotométrie est réalisée à 210 nm. Les analytes sont quantifiés par étalonnage externe.

3.3. Analyse de la composition du fermentât en alcools

Les alcools sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890A) avec un détecteur à ionisation de flamme (*flame ionization detector*, FID) et séparés par une colonne capillaire HP-INNOWax (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm) dont la phase stationnaire est constituée de polyéthylène glycol. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 220°C et 250°C. La température du four est maintenue à 45°C pendant 4 min puis est augmentée jusqu'à 220°C avec une rampe de montée en température de 10°C par minute. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,5 mL/min dans la colonne.

Les surnageants des échantillons sont décongelés, centrifugés à 15 000 tr/min (Sigma Laborzentrifugen 1-16) pendant 15 min puis dilués 5 fois avec une solution d'étalon interne composée d'isopropanol dilué à 100 ppm dans de l'acétone. Ces échantillons sont ensuite filtrés à l'aide de filtres à seringues (diamètres de pores : 0,2 µm). 0,7 µL d'échantillon sont injectés. Les analytes présents dans les échantillons sont quantifiés par étalonnage interne.

3.4. Analyse de la composition du fermentât en monosaccharides

L'analyse des monosaccharides (xylose, arabinose, glucose, mannose, fucose, rhamnose, galactose, acide galacturonique et acide glucuronique) a été réalisée par la plateforme analytique du LERMAB (Université de Lorraine) par chromatographie ionique couplée à l'ampéromètrie pulsée (High-Performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC PAD). L'équipement utilisé est un chromatographe ionique Dionex ICS-3000 équipé d'une colonne Dionex CarboPacTM PA-20 (3 × 150 mm) et d'un détecteur électrochimique avec une électrode de travail en or (Dionex Corp.).

Les surnageants des échantillons sont décongelés, centrifugés à 15 000 tr/min (Sigma Laborzentrifugen 1-16) pendant 15 min et dilués avec de l'eau ultra pure à une teneur en sucres proche de 4 mg/L. Les échantillons dilués sont filtrés à l'aide filtres à seringue (diamètres de pores : 0,2 µm). Les analytes sont quantifiés par étalonnage externe.

3.5. Matières sèches et matières volatiles

Les matières sèches et volatiles sont déterminées selon la méthode standard APHA (APHA, 1999) et sont réalisées en triplicat.

Les matières sèches sont définies comme l'ensemble des solides non volatils à 105°C. Une quantité déterminée de biomasse est incubée à l'étuve à 105°C jusqu'à obtention d'un résidu sec de masse constante. La matière sèche est exprimée en pourcentage par rapport à la masse de l'échantillon initial.

Les matières volatiles sont définies comme les solides évaporables à 550°C par opposition aux cendres qui ne sont pas évaporables à 550°C. Le résidu sec est incubé dans un four à moufle à 550°C pendant au minimum 2h. La différence de masse entre le résidu sec initial et les cendres permet de déduire les matières volatiles. Les matières volatiles sont exprimées en pourcentage par rapport à la masse de l'échantillon initial ou à celle de la matière sèche.

3.6. Analyse Carbone Hydrogène Azote (CHN)

Les analyses CHN ont été réalisées par la Plateforme d'Analyse des Inorganiques (RePSeM, IPHC, Strasbourg) à partir de matières sèches.

L'échantillon est pesé avec précision dans une capsule d'étain qui est introduite dans un réacteur d'oxydation/réduction chauffé à 900-1000°C. Un apport contrôlé d'oxygène provoque l'oxydation de l'étain, réaction exothermique qui augmente la température du réacteur jusqu'à 1800°C. À cette température, les substances organiques et inorganiques sont converties en gaz (CO₂, N₂, H₂O) qui sont séparés sur une colonne de chromatographie gazeuse (GC) et finalement détectés par un détecteur à conductibilité thermique (TCD).

3.7. Analyses de la composition macromoléculaire de la biomasse

Les analyses de la composition macromoléculaires des biomasses d'ensilages ont été sous-traitées à Eurofins Galys (caractérisation par spectroscopie proche infrarouge, caractérisation des sucres par Luff-Schoorl et analyses microbiologiques). Les analyses comprennent l'analyse des protéines (matière azotée totale), la teneur énergétique (amidon, sucres, matières grasses), la composition en fibres (cellulose, hémicelluloses, lignine), le profil fermentaire (pH, acétate, lactate), les oligo-minéraux (chlore) et des analyses microbiologiques (*Clostridium perfringens*, entérobactéries, levures et moisissures).

3.8. Dosage des sucres totaux

Cette méthode permet de quantifier par dosage spectrophotométrique, la teneur en sucres totaux (oses, diosides et polysaccharides) présents dans un échantillon donné. Deux types d'échantillons sont utilisés pour les analyses des sucres totaux : des échantillons de biomasse solides et des échantillons de milieu réactionnel liquide. Les résultats sont exprimés en équivalents hexose et sont indépendants de la nature des sucres : structure primaire, degrés de polymérisation, liaisons intermoléculaires (Dreywood, 1946 ; Cui et Brummer, 2005). Pour chaque échantillon, le dosage est réalisé en triplicat.

Pour le dosage des sucres totaux des biomasses ensilées, un échantillon de 3 g de biomasse fraîche broyée est hydrolysé à chaud (80 min) avec 50 mL d'acide sulfurique (95 %). L'hydrolysat et le résidu sont séparés par centrifugation (4 000 tr/min pendant 1 h). L'hydrolysat est dilué dans de l'eau ultra-pure.

Pour le dosage d'échantillons du milieu réactionnel liquide, deux analyses sont effectuées : dosage des sucres totaux et dosage des sucres solubles. Selon l'analyse, les échantillons sont décongelés puis respectivement homogénéisés ou centrifugés 15 min à 15 000 tr/min (Sigma Laborzentrifugen 1-16) avant d'être dilués dans de l'eau ultra-pure.

Une série de 6 étalons est réalisée par dilution d'une solution de glucose (1 g/L) pour obtenir une droite d'étalonnage (0 - 100 ppm de glucose).

Une solution d'anthrone (2 g/L) dissous dans de l'acide sulfurique à 95 % est réalisée. Dans des tubes à essai, 1 mL d'échantillon dilué ou d'étalon est mélangé à 2 mL de solution d'anthrone. À l'abri de la lumière, les tubes sont incubés 20 minutes à 80°C puis refroidis sur la glace pour stopper la réaction. Après retour à température ambiante, l'absorbance des échantillons est mesurée à 625 nm (Shimadzu, 2401 PC). La teneur en sucres totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en équivalent hexose par gramme de biomasse ou en équivalent hexose par litre.

Pour chaque biomasse, un triplicat d'hydrolyse et un triplicat de dilution sont réalisés (9 mesures). La teneur en sucres totaux est valide lorsque le coefficient de variation du triplicat de dilution est inférieur à 5 %.

3.9. Dosage de la DCO totale

Les analyses de la demande chimique en oxygène totale (DCO) des échantillons sont réalisées à l'aide de tubes prédosés (HANNA Instruments, COD MR W/HG reagents vials). L'échantillon de matières sèches ou de milieu réactionnel liquide est dilué à l'eau ultrapure puis digéré en présence de dichromate de potassium pendant 2h à 150°C. La quantité de DCO est déterminée par un dosage spectrophotométrique en utilisant une droite d'étalonnage effectuée avec des dilutions de glucose (0-1500 mg_{DCO}/L). L'absorbance des échantillons à 605 nm est mesurée par spectroscopie UV-Visible (Shimadzu, 2401 PC). Les dosages sont réalisés en triplicat et les résultats sont donnés en g_{DCO}/kg_{biomasse} ou g_{DCO}/L.

4. Analyse microbiologique

4.1. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN sont réalisées à partir de culots bactériens obtenus par centrifugation du milieu réactionnel prélevé au cours de la fermentation (4 500 tr/min, 30 min). Les culots sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation. L'ADN est extrait avec un kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) en suivant le protocole du fabricant et quantifié avec le kit Quant-IT[™] Assays (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant.

Les travaux de biologie moléculaire sont réalisés à l'Institut de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie de Strasbourg (GMGM – UMR 7156).

4.2. Séquençage

4.2.1. Procaryotes

Le séquençage des procaryotes à partir de l'ADN extrait a été sous-traité à l'INRAE-transfert. L'identification taxonomique est basée sur le séquençage du gène d'ARN ribosomique 16S (régions variables V4-V5, d'une longueur médiane de 376 paires de bases), présent dans tous les génomes microbiens. Cette méthode est la référence pour l'identification d'espèces bactériennes dans un milieu (Forsythe, 2018). Le séquençage réalisé sur un séquenceur MiSeq (Illumina) et le prétraitement des séquences est réalisé par un pipeline informatique développé par l'INRAE. L'identification des espèces réalisée par l'INRAE est complétée par une recherche avec l'outil en ligne NCBI *Nucleotide Blast* sur la base de données « microbe ».

4.2.2. Eucaroytes

Le séquençage des eucaryotes à partir de l'ADN extrait a été sous-traité à l'INRAE-transfert. L'identification taxonomique est basée sur le séquençage du gène d'ARN ribosomique 18S (région variables V4). Le séquençage a été également réalisé sur un séquenceur MiSeq (Illumina) et le prétraitement des séquences est réalisé par un pipeline informatique développé par l'INRAE. L'identification a été réalisée sur la base de la taxonomie PR2 (Protist Ribosomal Reference, basé sur GenBank 203 – octobre 2014).

4.3. Analyse qPCR

Les analyses de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) à partir de l'ADN extrait ont été soustraitées à l'INRAE-transfert. La qPCR permet de quantifier le nombre de copies d'un gène ciblé (gène d'ARN ribosomique 16S pour les procaryotes ou 18S pour les eucaryotes) et de déduire la quantité d'ADN totale de l'échantillon.

5. Analyse des données

Dans cette étude, des paramètres de performances sont utilisés en fonction des différentes configurations de bioréacteurs mises en œuvre (semi-batch et BRM) afin notamment de mettre en perspective les résultats obtenus avec ceux de la littérature et les rendements théoriques *in vivo*.

5.1. Paramètres de performances

Le volume produit d'H₂, obtenu par analyse par μ GC-TCD, permet d'évaluer le potentiel de production d'H₂ d'une biomasse.

Dans le réacteur en mode semi-batch, ce volume de production est rapporté au volume de milieu réactionnel (mL_{H2}/L_{milieu}).

Dans le cas du fonctionnement en continu, la production est évaluée par unité de temps, il s'agit alors de la productivité en H_2 , exprimée en mL_{H2}/L/h, calculée en moyenne sur une période de temps représentative.

Pour toutes les configurations utilisées, le rendement en H₂ produit est calculé par rapport à la quantité de substrat ajouté initialement ou au débit d'alimentation en substrat (DAS), le rendement de production en H₂ est exprimé soit par masse de biomasse (L_{H2}/kg_{biomasse}), par masse de matières sèches (L_{H2}/kg_{MS}) ou par mole d'équivalent glucose (mol_{H2}/mol_{hexose}).

5.2. Modélisation de la production cumulée d'hydrogène

L'équation de Gompertz modifiée (Eq. 2.4) permet de modéliser le volume d'H₂ cumulé produit dans le réacteur fonctionnant en mode semi-batch (Lay *et al.,* 1999 ; Zwietering *et al.,* 1990) :

$$H(t) = H_{max} + exp\left\{-exp\left[\frac{R_m e}{H_{max}}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$
(Eq. 2.4)

Avec H(t) : la production d'hydrogène cumulée (mmol_{H2}/L_{réacteur}), H_{max} : la production maximale d'hydrogène cumulée (mmol_{H2}/L_{réacteur}), R_m : la productivité maximale en hydrogène (mmol_{H2}/L_{réacteur}/h), λ : le temps de latence (h), t : le temps d'incubation et e : la constante de Néper.

Cette modélisation permet de déterminer la production maximale d'hydrogène cumulée (H_{max}), la productivité maximale en hydrogène (Rm) et le temps de latence λ qui sont des critères de performance pour la fermentation en réacteur semi-batch.

5.3. Caractérisation du métabolisme des consortia bactériens

Le premier indicateur de caractérisation du métabolisme de la fermentation est le rapport molaire des quantités de gaz produits H₂ et CO₂.

Les résultats des analyses HPLC-UV, permettant de définir les teneurs en acides organiques dans le milieu réactionnel, sont utilisés pour calculer le rapport molaire $\frac{Butyrate}{Acétate}$ noté (B/A) et le rapport molaire $\frac{H_2}{2 \times (Butyrate + Acétate)}$ noté H₂/2(B+A).

Le rapport molaire B/A permet de caractériser le métabolisme des *consortia* bactériens pour la production d'H₂ et notamment d'identifier quelle voie de production d'H₂ est favorisée entre la voie de l'acétate (Eq. 2.5) et du butyrate (Eq. 2.6).

$$C_6 H_{12} O_6 + 2 H_2 O \to 2 C H_3 COOH + 4 H_2 + 2 C O_2$$
(Eq. 2.5)

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \to CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2 + 2CO_2$$
 (Eq. 2.6)

La production d'acétate par d'autres voies non productrices d'H₂ comme l'homoacétogenèse induit un biais pour l'interprétation du rapport molaire B/A. L'utilisation du rapport molaire H₂/2(B+A) permet de vérifier

que le butyrate et l'acétate sont issus des voies coproductrices d' H_2 (Eq. 2.5 et Eq. 2.6). Théoriquement, si seules les voies (Eq. 2.5) et (Eq. 2.6) sont utilisées pour la production d'acétate et de butyrate, ce rapport est égal à 1. Le rapport molaire $H_2/2(B+A)$ est réduit si de l'acétate est produit par d'autres voies métaboliques par exemple la voie de l'homoacétogenèse (Eq. 2.7).

$$4 H_2 + 2 CO_2 \to CH_3 COOH + 2 H_2 O \tag{Eq. 2.7}$$

A partir des teneurs en métabolites analysées à l'HPLC UV/RI, la quantité d'acétate produite par la voie de l'homoacétogenèse est estimée grâce à l'équation adaptée de Arooj *et al.* (2008) (Eq. 2.8).

$$Ac\acute{e}tate_{homoac\acute{e}to.} = \frac{2 \times (Butyrate + Ac\acute{e}tate) - Propionate - 2 \times Formiate - H_2}{6}$$
(Eq. 2.8)

5.4. Analyses statistiques

Les données ont été traitées et analysées avec le logiciel Excel. Les corrélations ont été déterminées en utilisant la fonction COEFFICIENT.CORRELATION.

Les analyses en composantes principales (ACP) basées sur les corrélations de Pearson sont effectuées avec le logiciel XLSSTAT fourni par l'Université de Strasbourg. L'ACP est une méthode de statistique exploratoire et descriptive multidimensionnelle qui permet de résumer, dans un espace de faibles dimensions, la variance d'un nuage de points multivariés. Dans notre cas, l'ACP fournit une visualisation des données collectées au cours des fermentations (gaz produits, métabolites produits, *consortia* bactériens identifiés) par des graphiques simples qui permettent d'avoir un aperçu des relations linéaires (corrélations) entre ces données. Avant l'ACP les données sont normalisées.

Les plans d'expériences sont réalisés et interprétés avec le logiciel MINITAB fourni par l'Université de Strasbourg. Le plan choisi au cours de cette étude est le plan factoriel complet. Ce type de plan permet d'étudier les effets de plusieurs facteurs sur une réponse (quantité de sucres solubles libérés pour un prétraitement ou la productivité en H₂ du BRM par exemple) en faisant varier simultanément les niveaux des paramètres de façon exhaustive. La fonction « graphique de contour » est utilisée pour représenter graphiquement l'évolution de la réponse en fonction de deux paramètres sélectionnés.

6. Conclusion

Pour chaque test de fermentation présenté dans cette étude, le pH du milieu réactionnel ainsi que la composition des gaz en sortie du bioréacteur sont systématiquement suivis. L'analyse des gaz produits (H₂ et CO₂) en ligne par µGC-TCD permet d'obtenir l'évolution du débit de gaz en fonction du temps. À partir de ce profil, la production cumulée d'H₂ est calculée ce qui permet de déduire les critères de productions d'H₂. Les mêmes calculs sont effectués pour la production de CO₂.

En réacteur en mode de fonctionnement semi-batch, la production d'H₂ est modélisée par l'équation de Gompertz afin de déterminer la production maximale d'H₂ (Hm), la productivité en H₂ maximale (Rm) et le

temps de latence (λ). Des prélèvements réguliers de milieu réactionnel (*a minima* au début et à la fin de la fermentation) permettent de suivre la composition du fermentât en acides organiques et en alcools, pour calculer les productions de métabolites et ainsi évaluer l'efficacité du métabolisme.

Avec le BRM en mode de fonctionnement continu, des prélèvements de milieu réactionnel sont effectués pour avoir un suivi régulier de la teneur en métabolites dans le fermentât au cours du temps et en fonction des paramètres expérimentaux testés.

Enfin, sur les fermentations clés de cette étude, des analyses microbiologiques qualitatives et quantitatives sont effectuées afin de suivre les dynamiques des *consortia* bactériens en fonction des conditions expérimentales mises en œuvre.

Chapitre 3

Chapitre III : Caractérisation des biomasses

1. Introduction

La nature de la biomasse utilisée comme substrat pour la production d'H₂ doit répondre à plusieurs critères pour rendre compétitive la production biologique : un faible éloignement du site de production au site d'utilisation de la biomasse pour limiter le coût du transport et son impact environnemental, une production de biomasse riche en composés facilement fermentescibles (sucres), à forts tonnages et transposables à différentes régions de France et du monde. Afin de réunir un maximum de ces critères, deux biomasses ont été sélectionnées : le maïs pour l'ensilage, cultivée dans toutes les régions de France excepté l'extrême sudest, le seigle, plante rustique adaptée aux sols pauvres. Les deux plantes sont utilisées comme cultures intermédiaires et leur ensilage est un moyen de conservation fermentaire de la biomasse. Ainsi, les ensilages de maïs et de seigle ont été ciblés dans cette étude et ont été fournis par Air Liquide.

Outre le fait que la biomasse d'ensilage soit déjà mise en œuvre pour la méthanisation, l'utilisation de biomasses ensilées pour la fermentation obscure présente deux avantages : la stabilité pour la conservation de la qualité de la biomasse et la présence d'une flore endogène anaérobie. L'acidité dans le silo pendant le stockage permet de stabiliser la biomasse et de conserver la qualité de la plante, de sa valeur énergétique et de sa teneur en matières sèches (Guan *et al.*, 2018). L'ensilage s'effectue sur de grands tonnages de biomasses, avec des moyens relativement modestes et sans intrant en comparaison des traitements d'hydrolyse et de saccharification.

L'ensilage se caractérise par de nombreuses modifications biochimiques et microbiologiques qui impactent la biomasse. L'utilisation de l'ensilage comme prétraitement biologique a déjà été discutée dans la littérature (Brémond *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2016 ; Montgomery et Bochmann, 2014 ; Rouches *et al.*, 2016). Pour l'instant, il a été établi que la fermentation en silo ne permet pas de dégrader significativement la lignine par rapport à un prétraitement fongique (Rouches *et al.*, 2016) ni par exemple, d'améliorer le potentiel biogaz (CH₄ et CO₂) de la biomasse (Brémond *et al.*, 2018; Montgomery et Bochmann, 2014). Cette affirmation est nuancée par les travaux de Liu *et al.* (2016), d'où il ressort que l'intensification du potentiel biogaz par ensilage dépend de la nature de la biomasse ensilée.

Par ailleurs, Brémond *et al.* (2018) évoquent que l'optimisation de l'ensilage couplée à des prétraitements pour dégrader la cellulose, pourrait aboutir à un procédé peu coûteux, applicable à de grands tonnages pour améliorer l'utilisation des biomasses par les microorganismes de la digestion anaérobie.

Pendant l'ensilage, la fermentation lactique permet le développement d'une flore de bactéries anaérobies. En outre, Li *et al*. (2012) ont montré l'intérêt d'utiliser une biomasse ensilée, de l'herbe par exemple, comme substrat et source de *consortia* bactériens pour la fermentation obscure. Ils rapportent un rendement élevé en H₂ de 163 ± 25 L/kg_{MS} à une concentration de 25 g d'ensilage d'herbe par litre d'eau. Les auteurs de cette étude concluent que la fermentation avec la flore endogène de la biomasse permet d'obtenir les meilleurs rendements, leurs expériences avec un *inoculum* de flore endogène, enrichi par croissance sur l'ensilage et traité chimiquement ayant donné des rendements inférieurs. Le choix de la fermentation endogène est égalemennt motivé par les travaux précédents conduits au laboratoire (François, 2016 ; François *et al.*, 2021 ; Renaudie, 2019), qui ont montré l'intérêt d'utiliser les bactéries de la flore endogène à la biomasse pour la production d'H₂, ainsi que par les résultats obtenus par Li *et al*. (2012) sur une biomasse ensilée.

Cependant, la production d'H₂ par fermentation endogène d'ensilage peut sembler être un défi microbiologique : l'ensilage repose sur la fermentation lactique, une fermentation concurrente de la fermentation obscure qui mobilise des microorganismes et des voies métaboliques différentes. Ainsi, les bactéries lactiques cruciales pour l'ensilage ne sont pas considérées comme désirables en fermentation obscure (Guo *et al.*, 2010) et à l'inverse la présence de bactéries productrices d'H₂ du genre *Clostridium* dans l'ensilage n'est pas souhaitée (Borreani *et al.*, 2018). Ainsi, la majorité des travaux de la littérature sur la bioproduction d'H₂ par fermentation obscure à partir d'ensilage de maïs mettent en œuvre une fermentation exogène en utilisant soit des boues de STEP, avec un rendement compris entre 62,4 et 113,0 L_{H2}/kg_{MS} (Kyazze *et al.*, 2008 ; Cieciura-Włoch et Borowski, 2019), soit des boues de méthaniseurs avec un rendement de 32,6 à 56,3 L_{H2}/kg_{MS} (Benito Martin *et al.*, 2017 ; Nkemka *et al.*, 2015), soit un *inoculum* mixte thermophile avec un rendement d'environ 107 L_{H2}/kg_{MS} (Tenca *et al.*, 2011 ; Manzini *et al.*, 2015).

Malgré les contre-arguments précédemment cités, Nikolajeva *et al*. (2015) et Dauptain *et al*. (2020) ont testé la fermentation obscure endogène d'ensilage de maïs. Nikolajeva *et al*. (2015) obtiennent de faibles volumes d'H₂ produits en fermentation (3,5 mL) alors que dans les travaux de Dauptain *et al*. (2020) une production d'H₂ importante (146 L_{H2}/kg_{MS}) est obtenue avec de l'ensilage de maïs (ensilé pendant 2 ans) ; de plus, dans cette étude, l'ajout d'*inoculum* exogène à la biomasse ne permet pas d'augmenter la production d'H₂.

À notre connaissance, l'utilisation de l'ensilage de seigle en fermentation obscure n'a pas été publiée à ce jour.

Ainsi, les objectifs de ce chapitre seront, dans les deux premières parties, **de caractériser les deux biomasses sélectionnées et de tester leurs potentiels H₂ respectifs en tant que substrat et source de bactéries** par fermentation obscure endogène en réacteur fonctionnant en mode semi-batch. Les métabolites produits au cours de la fermentation seront analysés afin de comprendre les mécanismes de production d'H₂, notamment les voies métaboliques empruntées par les *consortia* au cours de la fermentation. Enfin, les *consortia* présents dans le milieu réactionnel seront identifiés afin de mettre en évidence l'émergence d'une flore bactérienne productrice d'H₂ et de la caractériser. La troisième partie sera focalisée sur l'ensilage de maïs et proposera une **description fine des mécanismes de la fermentation obscu**re endogène de cette biomasse et du **rôle du lactate** présent initialement ou ajouté à la biomasse lors de la production d'H₂.

2. Caractérisation des lots de biomasses ensilées

Deux lots de biomasses ensilées ont été mis en œuvre au cours de ce projet de recherche. Dans un premier temps, la caractérisation biochimique et microbiologique de chaque lot d'ensilage de maïs et de seigle est présentée. Cette partie nous permettra d'identifier les éléments clés des biomasses qui pourraient avoir un impact sur la production d'H₂, de définir les valeurs de référence pour le calcul des rendements de production et de montrer la conformité de la composition des ensilages avec la littérature et les données agricoles françaises.

2.1. Analyses biochimiques

Le tableau 6 présente les caractéristiques de chaque lot d'ensilage de maïs et de seigle utilisés dans cette étude. Chaque mesure a été répétée trois fois (n = 3).

	Ensilage de Maïs (lot 1)	Ensilage de Maïs (lot 2)	Ensilage de Seigle (lot 1)	Ensilage de Seigle (lot 2)	
Matières sèches (% total)	33,2 ± 1,2	29,8 ± 0,5	27,0 ± 1,1	24,6 ± 0,8	
Matières volatiles (% de la MS)	93,7 ± 3,1	95,7 ± 2,1	93,2 ± 1,6	91,7 ± 1,2	
Cendres (% de la MS)	6,3 ± 3,1	4,3 ± 2,1	6,8 ± 1,6	8,3 ± 1,2	
C (% de la MS)	46,0 ± 0,8	44,0 ± 0,2	46,4 ± 0,7		
N (% de la MS)	$1,1 \pm 0,4$	< 1	1,0 ± 0,2	ND	
C/N	43,5 ± 0,4	ND	47,3 ± 0,5		
H (% de la MS)	6,0 ± 0,1	6,8 ± 0,1	5,8 ± 0,1		
Sucres solubles $(g_{soluble} / kg_{MS})^1$	< 4,4	< 4,4 / 1,3 ²	41,9 ± 2,6	< 5,7	
Acide acétique (g _{soluble} /kg _{MS}) ¹	24,1 ± 0,3	12,9 ± 2,0	4,2 ± 1,7	33,5 ± 0,1	
Acide propionique $(g_{soluble} / kg_{MS})^1$	13,3 ± 2,1	< 4,5	< 4,5	< 4,5	
Acide butyrique (g _{soluble} /kg _{MS}) ¹	7,8 ± 0,6	$1,4 \pm 0,1$	2,5 ± 0,2	20,2 ± 0,7	
Acide lactique (g _{soluble} /kg _{MS}) ¹	51,2 ± 0,6	69,0 ± 0,6	18,5 ± 2	37,3 ± 0,1	
Acide succinique (g _{soluble} /kg _{MS}) ¹	$0,6 \pm 0,1$	2,1 ± 0,2	6,9 ± 0,5	4,8 ± 0,1	
Ethanol $(g_{soluble}/kg_{MS})^1$	18,4 ± 2,7	3,8 ± 0,1	0,8 ± 0,7	5,3 ± 0,1	

Table and C. Cause at full-tion and all	Verselle ere de vereve et de	Varational de atteixa accest	famore and attack and all and the
l'ableau 6 : Caracteristiques de	l'ensilage de mais et de	l'ensilage de seigle avant	termentation obscure

MS : matières sèches

ND : non déterminé

¹ Teneur en composés solubles à t₀ (premier prélèvement du bioréacteur) établie par HPLC-RI

² Mesure par HPAEC-PAD

Les taux de matières sèches (MS) dans les lots d'ensilage de maïs sont respectivement de 33,2 % et 31,4 % dont 93,7 % et 95,7 % de matières volatiles. Ces valeurs de MS sont cohérentes avec les données de la littérature (Benito Martin *et al.*, 2017 ; Biernacki *et al.*, 2013 ; Kyazze *et al.*, 2008 ; Nkemka *et al.*, 2015 ; Tenca *et al.*, 2011) respectivement de 34,6 ; 31,1 ; 34,6 ; 34,2 et 33,5 %. Le taux de MS dépend du stade de végétation auquel la matière première a été collectée : ce taux s'élève à 32 % en fin de croissance de la plante *i.e.* au stade vitreux, et augmente au cours de la croissance (Demarquilly, 1994). Les ensilages de seigle présentent des taux de matières sèches légèrement inférieurs qui s'élèvent à 27,0 % et 24,6 % dont 93,2 %

et 91,7 % de matières volatiles. Richer (2013) relève un taux de matières sèches entre 19 % et 22 % contre 27 % en moyenne pour Urness (2013), ce qui est cohérent avec nos analyses.

À partir des données d'analyse CHN, les rapports C/N sont estimés à 43,5 et 47,3 respectivement pour l'ensilage de maïs et de seigle, des valeurs supérieures à celles reportées par Nkemka *et al.* (2015) et Cieciura - Włoch et Borowski (2019), qui sont respectivement de 31,7 et 33,9 pour de l'ensilage de maïs. S'il est admis que l'azote est un élément prépondérant pour la croissance et le métabolisme des microorganismes - puisque nécessaire à la synthèse des acides aminés et des acides nucléiques - il n'existe, en revanche, pas de consensus dans la littérature à propos d'un rapport C/N optimal (Ghimire *et al.*, 2015b). Cela s'explique par la diversité des biomasses, des *inocula* bactériens et des températures de fermentation mises en œuvre dans les différentes études (Mohammadi *et al.*, 2012b). À titre d'exemple, Argun *et al.* (2008) obtiennent un rendement en H₂ optimal lors de la fermentation de poudre de blé supplémentée en urée tel que le rapport C/N soit de 200. Pour le calcul du rapport C/N, les auteurs ne prennent pas en compte la teneur en azote de la biomasse. Tao *et al.* (2007) et Lin (2004) préconisent un rapport C/N autour de 50 pour la fermentation de saccharose par des flores mixtes soumises à un prétraitement thermique. O-Thong *et al.* (2008) obtiennent un rendement en H₂ optimal avec un rapport C/N de 74 par fermentation d'effluents de fabrication d'huile de palme en conditions thermophiles. Un effet inhibiteur est également constaté si la source d'azote est introduite en excès (Siles *et al.*, 2010 ; Song *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015).

A noter que Kyazze *et al.* (2008), Manzini *et al.* (2015) et Tenca *et al.* (2011) utilisent des sources d'azote supplémentaires (NH₄)₂SO₄ ou NH₄Cl pour assurer le bon approvisionnement des bactéries en cet élément lors de la fermentation d'ensilage de maïs pour la production d'H₂. Ainsi, le rapport C/N de nos biomasses, proche de 50, ne justifie pas l'ajout d'intrants pour le modifier.

Hormis pour l'ensilage de seigle (lot 1) dont la quantité de fructose et glucose initiale est estimée à 41,9 g_{soluble}/kg_{MS}, les sucres solubles ne sont pas quantifiables par HPLC-RI. Pour l'ensilage de maïs (lot 2) les sucres solubles monomériques sont quantifiés par HPAEC-PAD (1,3 g_{soluble}/kg_{MS}, valeur inférieure à la limite de quantification en HPLC-RI).

Par ailleurs, des composés organiques volatils sont analysés par HPLC-UV, tels que l'acide lactique et l'acide acétique, qui sont les composés majoritairement produits lors de l'ensilage dans les silos. La présence de ces acides indique un métabolisme hétérofermentatif dans le silo. Les teneurs en acide lactique des ensilages du lot 1 sont inférieures à celles du lot 2 montrant que les silos n'étaient pas au même stade de fermentation lactique ou que la prise d'échantillon s'est effectuée dans des conditions différentes. De fortes variations des teneurs en acide acétique sont également observées en fonction des lots. Des acides propionique et butyrique et de l'éthanol, qui sont les métabolites caractéristiques de la fermentation anaérobie, montrent de légères variations pendant le stockage de la biomasse (Ávila et Carvalho, 2020). Du fait de la présence d'acides, le pH est faible (environ 4) quand la biomasse est diluée dans l'eau avant fermentation.

Notons que l'ensilage de seigle (lot 2) présente un profil métabolique riche en acide acétique et en acide butyrique. Cette diversité d'acides plus faibles que l'acide lactique n'améliore pas la stabilité de l'ensilage (Borreani *et al.*, 2013) et pourrait indiquer une contamination par des bactéries de la famille des *Enterobacter* ou des *Clostridia*.

2.2. Analyses des fractions biochimiques des biomasses

Les analyses des fractions biochimiques des ensilages de maïs et de seigle ont été réalisées par Eurofins Galys, afin de compléter les connaissances sur les biomasses. La figure 10 présente la composition des ensilages de maïs et de seigle utilisés dans cette étude pour chaque lot.





Le faible taux de matières minérales dans l'ensilage de maïs (< 5 % des MS) indique l'absence de contamination par le sol lors de la récolte ou du prélèvement. La teneur en matières azotées totales décrit la valeur protéique de la biomasse, elle correspond en moyenne sur les deux lots à 77 g/kg_{MS} pour le maïs ce qui est cohérent avec les données de Demarquilly (1994) (70 g/kg_{MS}) et à 106 g/kg_{MS} pour le seigle. L'ensilage de maïs est considéré comme un fourrage peu concentré en matières azotées totales et en azote fermentescible qui se traduit par un rapport microbien (Rmic) faible (déficit d'azote dégradable par les bactéries) ; à l'inverse, l'ensilage de seigle serait plus équilibré en termes de matières azotées totales dégradables par les bactéries (Rmic = 10). Le taux de nitrate dans le sol est le facteur principal qui peut influencer la quantité d'azote dans les plantes. Sur un milieu déficient en azote, la plante mobilise l'azote contenu dans la tige pour le développement des grains, à l'inverse quand l'azote est présent en excès dans le milieu, celui-ci s'accumule dans la tige. Suivant les milieux et le dosage de fertilisants, le maïs aura des teneurs en azote variables (Arvalis-infos.fr., 2015).

Les ensilages de maïs et de seigle sont des biomasses lignocellulosiques riches en fractions cellulosiques et hémicellulosiques. Ces composants des parois cellulaires de la plante sont des polymères de sucres difficilement accessibles par les bactéries fermentaires (Montgomery et Bochmann, 2014). La teneur en cellulose et hémicelluloses est relativement proche pour chaque lot de biomasses ensilées et nettement supérieure pour l'ensilage de seigle (en moyenne 362 g/kg_{MS} pour la cellulose et 272 g/kg_{MS} pour les hémicelluloses) comparativement à l'ensilage de maïs (en moyenne 196 g/kg_{MS} pour la cellulose et 183 g/kg_{MS} pour les hémicelluloses). La composition des ensilages de maïs en cellulose et hémicelluloses est cohérente avec les valeurs de Nkemka *et al.* (2015), qui obtiennent respectivement 228 ± 3 g/kg_{MS} et 145 ± 31 g/kg_{MS}. De plus, l'ensilage de maïs se caractérise par une fraction d'amidon importante (300 - 350 g/kg_{MS}) qui provient des grains de maïs, plus facilement fermentescibles. Cette valeur est cohérente avec les données d'Arvalis (Arvalis-infos.fr., 2019) sur l'ensilage de maïs français (297 ± 63 g/kg_{MS}). Dans l'ensilage de seigle, la fraction d'amidon n'est pas détectable, ce qui signifie que la plante est récoltée à un stade où les graines ne sont pas encore développées.

L'ensilage de seigle est donc composé principalement de cellulose et d'hémicelluloses. Notons que les deux ensilages (maïs et seigle) ont des teneurs en lignine faibles (en moyenne 20 g/kg_{MS} pour l'ensilage de maïs et 36 g/kg_{MS} pour l'ensilage de seigle).

Les teneurs totales des ensilages de maïs et de seigle en composants structuraux de cellules végétales notamment la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (mesuré par le Neutral Detergent Fiber, NDF) sont respectivement de 411 ± 20 g/kg_{MS} et 670 ± 15 g/kg_{MS}. Ces valeurs sont intéressantes à comparer à celles d'autres biomasses comme l'ensilage d'herbe (446 g/kg_{MS}) ou la poudre de malt riche en amidon (320 g/kg_{MS}) (Manzini *et al.*, 2015) ; la valeur NDF du seigle est plus proche du son de riz (534 g/kg_{MS}), de la canne de Provence (886 g/kg_{MS}) ou du roseau (739 g/kg_{MS}) (Manzini *et al.*, 2015 ; Nkemka *et al.*, 2015).

Les teneurs en sucres solubles dans les biomasses ensilées sont très faibles, en moyenne 11 g/kg_{MS} pour l'ensilage de maïs et 29 g/kg_{MS} pour l'ensilage de seigle lot 1 (valeur sous-estimée par rapport à l'analyse par HPLC-RI). Les sucres solubles ne sont pas détectables dans l'ensilage de seigle lot 2.

Les teneurs en matières grasses représentent également une faible part de la matière sèche totale (en moyenne 32 g/kg_{MS} pour les 2 lots de biomasses ensilées).

Les résultats présentés sur la figure 10 et le tableau 6 ne montrent pas de grande variabilité entre les lots, à l'exception des teneurs en amidon et des profils métaboliques (teneurs en acides organiques). Ils dénotent d'une bonne homogénéité de la composition de nos biomasses à l'instar des données sur l'ensilage français (Carpentier et Ferard, 2017).

Pour la suite, les rendements de conversion des sucres exprimés en mole d'H₂ par mole de sucres seront calculés en aditionnant les teneurs en sucres issus des différentes fractions biochimiques (amidon, sucres, cellulose et hémicelluloses) présentées sur la figure 10, soit 3,95 mol_{sucres}/kg_{MS} pour l'ensilage de maïs lot 1 ; 4,02 mol_{sucres}/kg_{MS} pour l'ensilage de maïs lot 2 ; 3,65 mol_{sucres}/kg_{MS} pour l'ensilage de seigle lot 1 et 3,56 mol_{sucres}/kg_{MS} pour l'ensilage de seigle lot 2.

2.3. Analyses microbiologiques

Le tableau 7 présente les teneurs en microorganismes potentiellement indésirables pour l'ensilage. Les quantités sont établies en unité formant colonie (ufc) par gramme de biomasse.

Microbiologie		Maïs lot 1	Maïs lot 2	Seigle lot 1	Seigle lot 2
Clostridium perfringens	ufc/g	< 10	< 10	< 10	< 10
Entérobactéries	ufc/g	< 10 ³	> 1,5 x 10 ³	< 10 ³	< 10 ³
Levures	ufc/g	<105	>15 x 10 ⁶	<105	<105
Moisissures	ufc/g	<105	< 4 x 10 ⁵	<105	<105

Tableau 7 : Analyses microbiologiques des biomasses testées d'ensilage de maïs et de seigle

ufc/g : unité formant une colonie (\approx nombre de cellules) par gramme de biomasse

Les ensilages présentent de faibles teneurs en *Clostridium perfringens* (< 10 ufc/g), une bactérie saccharoprotéolytique (McDonald, 1982), responsable d'intoxications alimentaires (Ávila et Carvalho, 2020) et productrice d'H₂ (Wang *et al.*, 2011).

L'ensilage de maïs (lot 2) présente une composition en entérobactéries, levures et moisissures remarquable. En effet, la présence des entérobactéries et des moisissures est anormale dans ce lot d'ensilage. De façon générale, les entérobactéries se développent au début de la fermentation de l'ensilage puis elles sont rapidement remplacées par les bactéries lactiques (Kung *et al.*, 2000 ; Pahlow *et al.*, 2003). Les moisissures sont associées à la dégradation de l'ensilage de maïs dans le silo. Aucune prolifération notable de microorganismes n'est à signaler dans les autres lots de biomasses, en particulier pour l'ensilage de seigle (lot 1) malgré un profil fermentaire différent (acide lactique, acide butyrique, acide acétique).

Ces résultats ont été complétés par un séquençage de la microflore des deux lots d'ensilage de maïs présenté sur la figure 11.



Figure 11 : Composition de la flore bactérienne de l'ensilage de maïs obtenu par séquençage du gène codant pour l'ARN 16S

La composition des ensilages de maïs en espèces bactériennes est très différente d'un lot à l'autre. Le lot 1 présente une flore largement dominée par des bactéries lactiques de l'ordre des *Lactobacillales* (> 80 %), ce qui est cohérent avec les ensilages de maïs analysés par Gharechahi *et al.* (2017), Guan *et al.* (2018) et Drouin *et al.* (2019). Parmi les *Lactobacillales*, notons la présence de *Lactobacillus brevis* (33 %, hétérofermentatif) et de *Lactobacillus plantarum* (28 %, hétérofermentatif facultatif), deux bactéries utilisées dans plusieurs études comme *inoculum* bactérien pour améliorer la qualité de l'ensilage (Ranjit et Kung, 2000 ; Li et Nishino, 2011 ; Arasu *et al.*, 2014 ; Ávila *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2017), accompagnés des *Leuconostoc lactis* (18 %, hétérofermentatif). L'ensemble de ces bactéries sont décrites comme prédominantes dans la flore de la biomasse avant ensilage (Gharechahi *et al.*, 2017) et sont identifiées dans l'ensilage surtout en début de fermentation lactique (Fessard, 2017). Des *Clostridia* sont également présentes (2 % d'abondance) en très faible quantité dans la biomasse initiale, ce qui est considéré comme un marqueur de la dégradation de l'ensilage (Borreani *et al.*, 2018), mais qui ne semble pas néfaste pour la fermentation puisque Dauptain *et al.* (2020) détectent de leur côté une quantité significative de *Clostridiales* dans un ensilage de maïs ensilé pendant 2 ans avant fermentation obscure.

Le lot 2 d'ensilage de maïs se distingue significativement de la littérature avec une diversité bactérienne très importante et peu de Lactobacillales. Des bactéries appartenant aux familles Comamonadaceae (18 %) Xanthomonadaceae (ordre des Stenotrophomonas, 14 %) et Sphingobacteriaceae (13 %) présentes dans ce lot ont été également identifiées par da Silva et al. (2020) dans du fourrage de maïs frais dans des proportions similaires (respectivement 9 %, 19 % et 17 %). Liu et al. (2020) établissent une corrélation positive entre Stenotrophomonas et Acinetobacter avec la neutralisation du pH et la raréfaction de l'acide lactique, au cours de l'aération d'ensilage d'orge. Une souche bactérienne de Bacillus thermoamylovorans présente à 9 % dans le lot 2, a été isolée dans un digesteur anaérobie alimenté avec de l'ensilage de maïs (Cibis et al., 2016). La souche est décrite comme une bactérie productrice d'acide acétique et propionique et possède également des enzymes permettant de dégrader l'amidon et les composants des parois des cellules végétales (Combet - Blanc et al., 1995). Cette bactérie a déjà été mise en œuvre en fermentation en co-culture avec des bactéries du genre Clostridium pour tirer avantage de son activité hydrolytique permettant d'améliorer les performances de production d'H₂ des systèmes étudiés (J.-J. Chang et al., 2008 ; Chou et al., 2011). Ainsi, le lot 2 présente une flore bactérienne assez surprenante pour de l'ensilage de maïs, caractérisé par la présence marquée de bactéries provenant a priori de la flore épiphyte de la plante de maïs avant ensilage (da Silva et al., 2020 ; Guan et al., 2018) et qui, d'après Brenner et al. (2005) sont des bactéries au métabolisme strictement aérobie, incapables de se développer dans les conditions anaérobies d'un silo. Ainsi, le lot 2 présente une flore proche d'un ensilage « frais » ou qui aurait peu fermenté.

3. Potentiel de production d'hydrogène en fermentation endogène des biomasses

« fraîches »

Les tests de production d'H₂ sont effectués par fermentation en bioréacteur agité semi-batch à 37°C à partir de 50 g de biomasse fraîche (c'est-à-dire réceptionnée et stockée à 4°C) et sans *inoculum* (fermentation endogène).

Une première série d'expériences a été réalisée dans l'objectif d'évaluer le potentiel H₂ des biomasses sans prétraitement ni inoculation exogène.

3.1. Comparaison des performances de production d'hydrogène des biomasses d'ensilage de maïs et de seigle en réacteur semi-batch

Les deux lots d'ensilage de seigle et de maïs ont été testés en fermentation obscure endogène sans aucun prétraitement.

Les premiers réplicats de fermentation ont permis de déterminer les potentiels de production d'H₂ des lots de biomasses des ensilages de maïs et seigle et de valider les conditions de fermentation du bioréacteur semi-batch développé au laboratoire (Clion *et al.*, 2015). Les conditions opératoires (pH, anaérobiose et d'absence de source lumineuse) sont donc favorables à la croissance de bactéries hydrogénogènes et acidogènes présentes dans la biomasse et à la production d'H₂. Des informations détaillées sur ces tests de fermentations sont présentées à l'annexe 1.

La figure 12 présente le comparatif des potentiels de production d'H₂ et des métabolites produits par les biomasses d'ensilage de maïs et de seigle. Les moyennes des paramètres de performances de production et des paramètres de l'équation de Gompertz sont regroupées dans le tableau 8.



<u>Figure 12</u> : Production cumulée d'H₂ en mL (a) et production des métabolites, consommation de solutés dans le milieu réactionnel en mmol/L et rapport molaire butyrate/acétate (B/A) (b) lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs et de seigle frais. Les barres d'erreurs représentent la variabilité (maïs : n=2 et n= 4, respectivement pour les lots 1 et 2 ; seigle : n=3 et n=1, respectivement pour les lots 1 et 2).

Ensilage	Production	Rendement		Productivité max	Latence (λ)	Rapport
	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(L _{H2} /kg _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	H ₂ /CO ₂
Maïs lot 1 (n=2)	535 ± 2	23 ± 1	0,21 ± 0,01	41 ± 13	8,4 ± 1,3	0,46 ± 0,01
Maïs lot 2 (n=4)	970 ± 93	46 ± 4	0,47 ± 0,05	106 ± 36	$4,0 \pm 0,1$	0,63 ± 0,06
Seigle lot 1 (n=3)	275 ± 2	$14,4 \pm 0,1$	$0,16 \pm 0,01$	98 ± 18	7,5 ± 0,8	0,96 ± 0,18
Seigle lot 2 (n=1)	237	14,4	0,16	21	9,0	0,46

Tableau 8 : Moyenne des performances de production d'H2 par fermentation obscure des biomasses ensilées

Une production moyenne de 535 ± 2 mL_{H2}/L_{bioréacteur} a été obtenue pour l'ensilage de maïs (lot 1) et 970 ± mL_{H2}/L_{bioréacteur} pour le lot 2 d'ensilage de maïs contre seulement 275 ± 2 mL_{H2}/L_{bioréacteur} en moyenne pour le seigle (lot 1) et 237 mL_{H2}/L_{bioréacteur} pour l'ensilage de seigle (lot 2) (tableau 8). De même, la fermentation d'ensilage de maïs présente de meilleurs rendements que le seigle (23 ± 1 - 46 ± 4 L_{H2}/kg_{MS} contre 14,4 ± 0,1 L_{H2}/kg_{MS}), notamment grâce à des teneurs en sucres totaux plus élevées et grâce à la présence d'hydrates de carbone non fibreux dans la biomasse (amidon).

L'ensilage de maïs présente des productions en H₂ très variables entre les deux lots. Les performances du lot 2 sont plus élevées bien que la composition microbienne de sa flore soit peu conforme par rapport à celle de la flore attendue pour de l'ensilage de maïs (abondance de levures, moisissures et présence de bactéries aérobies). Outre un rendement de production par kilogramme de matières sèches doublé, le lot 2 se caractérise par une consommation des sucres mieux orientée vers la production d'H₂, ce qui se traduit par un rendement de production de sucres contenus dans la biomasse 2,2 fois plus élevé pour le lot 2 (0,21 et 0,47 mol_{H2}/mol_{sucres} pour le lot 1 et le lot 2, respectivement) et ce, malgré des compositions en fractions biochimiques assez proches entre les lots.

La meilleure utilisation des sucres et la productivité en H₂ élevée de l'ensilage de maïs (lot 2) s'expliquerait en partie par la présence de la bactérie hydrolytique *Bacillus thermoamylovorans* dans le *consortium* initial (9%). Grâce à ses enzymes, *Bacillus thermoamylovorans* pourrait effectuer un prétraitement biologique pour dégrader la biomasse d'ensilage de maïs avant fermentation (Chang *et al.*, 2008 ; Combet - Blanc *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2003). En effet, Chou *et al.*, (2011) montrent que l'ajout de *Bacillus thermoamylovorans* dans une co-culture de *Clostridium beijerinckii L9* et *Clostridium butyricum M1* pourrait améliorer la productivité en H₂ lors de la fermentation d'effluents de levures (bourbes brassicoles).

Les deux lots d'ensilage de maïs présentent des profils de débit de production d'H₂ similaires, mais d'intensités différentes. Ainsi, le premier pic de production d'H₂ du lot 2 permet d'atteindre des débits largement supérieurs au lot 1, ce qui se traduit par une productivité maximale en H₂ deux fois plus supérieure pour le lot 2 (41 ± 13 mL_{H2}/L/h et 106 ± 36 mL_{H2}/L/h respectivement pour les lot 1 et 2). Les durées de fermentation des deux lots d'ensilages de maïs sont proches (entre 40 h et 50 h) malgré un temps de latence divisé par 2 pour le lot 2.

Chapitre 3

Les deux lots d'ensilage de maïs montrent des productions de métabolites similaires pour l'acétate (38,8 ± 4,8 mM) et le butyrate (19,4 ± 2,9 mM) avec un rapport molaire butyrate/acétate (B/A) moyen de 0,51 ± 0,13 lors des 2 tests de fermentation du lot 1 et des 4 tests de fermentation du lot 2. D'après la figure 12, le métabolisme du lot 2 serait plus favorable à la production d'H₂ alors que le métabolisme du lot 1 serait plus diversifié : solvantogenèse avec une production d'éthanol de 2 à 4 fois plus importante avec le lot 1, homoacétogenèse liée à une production d'acétate élevée comparativement à la production d'H₂ et production de propionate (voie hydrogénotrophe). Notons que le lactate est totalement utilisé au cours des fermentations ; la teneur initiale en lactate (supérieure pour le lot 2) peut expliquer les différences de consommation entre les deux lots.

L'ensilage de seigle permet la production d'un volume d'H₂ faible en comparaison à l'ensilage de maïs, ce qui pourrait être lié à la nature de la biomasse de l'ensilage de seigle : biomasse récalcitrante, absence de fraction d'amidon et teneur plus faible en composés fermentescibles. Toutefois pour le lot 1, la productivité maximale élevée et le métabolisme de la fermentation favorable à la production d'H₂ suggèreraient d'une part, l'émergence d'un *consortium* riche en bactéries productrices d'H₂ et d'autre part, la présence dans l'ensilage de seigle (lot 1) d'un substrat peu abondant mais facilement fermentescible par le *consortium* composé en grande partie de sucres solubles, glucose et fructose détecté par HPLC-RI. D'après la caractérisation, le lot 2 est plus riche en sucres totaux mais son rendement en sucres faible et sa cinétique de fermentation lente suggèrent que peu de sucres sont accessibles et fermentescibles par les bactéries du milieu réactionnel soulignant la récalcitrance de cette biomasse.

Le métabolisme de la fermentation d'ensilage de seigle se caractérise également par l'utilisation du lactate présent dans le milieu réactionnel et par une production d'acides plus faible par rapport à la fermentation d'ensilage de maïs, notamment pour l'acétate, ce qui augmente le rapport molaire B/A. Les productions en butyrate et en acétate sont largement supérieures à la production d'H₂ observée par rapport aux rendements théoriques en H₂ des deux voies, ce qui suggèrent que le substrat est utilisé pour d'autres voies métaboliques : homoacétogenèse (dans les deux lots), solvantogenèse (lot 1) et production de propionate (lot 2).

Enfin, le métabolisme global des *consortia* bactériens lors de la fermentation d'ensilage de seigle (lot 1) semble meilleur que celui de l'ensilage de maïs malgré des volumes produits plus faibles. En effet, le rapport H_2/CO_2 est plus favorable à la production d' H_2 pour le seigle (lot 1) et moins de métabolites issus de voies métaboliques concurrentes vis-à-vis de l'utilisation du substrat, notamment l'éthanol et l'acétate (produit en partie par acétogenèse), sont produits au terme de la fermentation (figure 12).

Ainsi, les 2 lots d'ensilage de seigle présentent, à la fois des compositions et des rendements en L_{H2}/kg_{MS} assez similaires. Les paramètres de production d' H_2 du lot 1 sont plus intéressants que ceux du lot 2. En effet, cet ensilage est fermenté avec un métabolisme favorable à la production d' H_2 (rapport molaire H_2/CO_2 proche

de 1 et plus faible production de métabolites par des voies concurrentes pour le substrat par rapport à l'ensilage de maïs), ce qui se traduit également par une cinétique de production plus rapide (24 h contre 50 h) avec une productivité maximale en H₂ (98 mL_{H2}/L/h) comparable à celle de l'ensilage de maïs (lot 2).

3.2. Nature des *consortia* présents dans les biomasses ensilées fraîches

Pour expliquer les différences de production d'H₂ au cours de la fermentation endogène des ensilages, l'ADN microbien contenu dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation a été séquencé. La figure 13 illustre la composition des communautés bactériennes de la fermentation obscure des biomasses ensilées. Le seigle lot 2 n'est pas séquencé en raison d'une productivité faible en H₂.



Figure 13 : Abondances relatives des séquences du gène codant pour l'ARN 16S des consortia bactériens de la fermentation endogène de biomasses ensilées pendant la production d'H₂

Les échantillons des biomasses pour l'analyse en séquençage ont été prélevés en cours de fermentation (pendant la période de production d'H₂), et donc choisis volontairement à des temps différents selon les lots de biomasse.

Les trois *consortia* bactériens qui émergent de la fermentation obscure sont très différents. Les bactéries du genre *Clostridium* sont assez bien représentées dans les trois fermentations (43 %, 15 %, 49 %).

L'ensilage de maïs (lot 1) présente une diversité de *Clostridium* avec un *taxon* apparenté à *C. butyricum/beijeirincki/diolis* (19 %), producteur d'H₂ (De Vos *et al.*, 2009) et un *taxon* identifié comme *C. ljundahli* (9 %), une bactérie homoacétogène et consommatrice d'H₂ (Kopke *et al.*, 2010). La présence de ce dernier *taxon* pourrait expliquer l'écart de production entre lot 1 et lot 2. En effet, la production en H₂ est 1,8 fois plus faible dans le lot 1 où ce *taxon* est présent. Le *taxon* affilié à *Coproccoccus sp.* (23 %) présent dans le lot 1 correspond à une bactérie appartenant à l'ordre des *Clostridiales* et à la famille des *Lachnospiraceae*, productrice de butyrate (Rivière *et al.*, 2016 ; Vital *et al.*, 2017). Des bactéries non productrices d'H₂ sont également identifiées en quantité remarquable dans ce lot, notamment des bactéries lactiques (*L. plantarum*).

Pour le consortium de l'ensilage de maïs (lot 2), il reste toujours très différent du lot 1. On note un recul significatif des taxons initiaux non producteurs d'H₂ Comamonadaceae sp. (18 %), Stenotrophomonas sp. (14%), Sphingobacteriaceae sp. (13%) et Bacillus thermoamylovorans (9%) et l'émergence de quatre taxons principaux : trois taxons (Clostridium butyricum/beijeirincki/diolis, Veillonella sp. et Enterococcus sp.) seraient des producteurs d'H₂ dont deux d'entre eux seraient également capables d'utiliser le lactate (Clostridium butyricum/beijeirincki/diolis, Veillonella sp.). Enfin, deux taxons appartiennent aux bactéries lactiques (Streptococcus sp., Enterococcus sp.). Les capacités de production d'H₂ des Enterococcus sp. (25 %) et des Clostridium butyricum/beijeirincki/diolis (15 %) sont bien documentées dans la littérature (Liu et al., 2009 ; Song et al., 2012 ; Valdez-Vazquez et al., 2015 ; Yin et Wang, 2019a, 2019b). Streptoccocus sp. (22 %) est une bactérie lactique ; les travaux de Toledo-Alarcón et al. (2020) montrent que Streptococcus sp. est corrélé positivement à la production de lactate et négativement à la production $d'H_2$. Cette bactérie est souvent détectée dans des bioréacteurs faiblement producteurs en H₂. D'après Chalmers et al. (2008) et Mashima et Nakazawa (2015), Veillonella sp. (19%) fermente le lactate, de plus, les auteurs rapportent des interactions de commensalisme avec Streptoccocus sp.. Dans leur étude, Ng et Hamilton (1971) mettent en évidence les capacités de Veillonella parvula à fermenter le lactate en acétate, propionate, CO₂ et avec une faible coproduction d'H₂. De Vos et al. (2009) confirment bien les modestes capacités de production d'H₂ de Veillonella sp. par rapport aux bactéries du genre Clostridium.

L'ensilage de seigle présente une majorité de *C. butyricum/beijeirincki/diolis* (49 %) accompagnée d'*Enterobacter sp.* (20 %), d'*Escherichia coli* (18 %) et d'*Enterococcus* sp. (7 %). La capacité de production d'H₂ de l'ensemble de ces *taxon*s est connue (Abd-Alla *et al.*, 2019 ; Bakonyi *et al.*, 2012 ; Valdez-Vazquez *et al.*, 2015).

Ainsi, les conditions de la fermentation obscure ont sélectionné des bactéries très différentes de la flore initiale. Malgré la subsistance de bactéries lactiques au cours de la fermentation et le développement d'une bactérie homoacétogène (*C. ljungdahli*), la majorité des *taxons* en activité est productrice d'H₂, témoignant ainsi des bonnes conditions expérimentales et du potentiel de la flore endogène des biomasses ensilées pour la production d'H₂ dans notre réacteur semi-batch.

3.3. Conclusion sur le potentiel de production d'hydrogène en fermentation endogène des biomasses « fraîches » ensilées

Ainsi, cette première étude sur les ensilages de maïs et de seigle a permis de caractériser la composition des biomasses d'une part et d'obtenir d'autre part, des premières valeurs de leurs potentiels de production d'H₂ sans prétraitement ni *inoculum* externe.

Les deux lots d'ensilage de maïs présentent des similarités lors de la caractérisation des fractions biochimiques. Leur composition bactérienne sont cependant très différentes : le lot 1 est riche en bactéries lactiques typiques de la flore des ensilages alors que le lot 2 présente une flore très diversifiée et riche en levures et moisissures. Les compositions des fractions biochimiques des lots d'ensilage de seigle sont très similaires malgré un taux de matières sèches variable.

Les conditions expérimentales (pH, anaérobie et absence de source lumineuse) sont favorables à la fermentation obscure et aux bactéries acidogènes et hydrogénogènes. Les ensilages de maïs présentent des productions de métabolites proches, mais des volumes d'H₂ produits différents. L'ensilage de maïs (lot 2) présente un bon potentiel de production (46 L_{H2}/kg_{MS}) par rapport au lot 1 (23 L_{H2}/kg_{MS}), qui pourrait résulter de fractions biochimiques facilement fermentescibles car potentiellement dégradées par la flore eucaryote initiale de la biomasse.

Les résultats de l'ensilage de seigle (lot 1) sont prometteurs. Cette biomasse, n'ayant pas été testée dans la littérature, est intéressante car elle présente une productivité maximale proche de celle de l'ensilage de maïs (lot 2) avec un métabolisme favorable à la production d' H_2 : rapport molaire H_2/CO_2 proche de 1 et faible production de métabolites par des voies concurrentes pour la consommation de substrat. Une variabilité importante entre le lot 1 et le lot 2 est observée en termes de productivité maximale en H_2 et de rapport molaire H_2/CO_2 .

Enfin, la fermentation obscure de ces biomasses ensilées a permis de mettre en évidence la consommation du lactate produit pendant la fermentation lactique. Ce fait expérimental intéressant a été observé par Dauptain *et al.* (2020) parmi les études ayant mis en œuvre l'ensilage de maïs en fermentation. De plus, il a été montré dans notre étude que le lactate est consommé à différents moments de la fermentation : phase de latence pour l'ensilage de seigle (lot 2) et pendant la production d'H₂ pour les autres lots de biomasse, ce qui interroge sur les mécanismes de consommation du lactate.

Dans la partie suivante, une analyse fine du métabolisme de fermentation endogène de l'ensilage de maïs est proposée pour comprendre notamment : quels sont les substrats disponibles dans le milieu réactionnel et à quelles étapes de la fermentation sont-ils utilisés, quels sont les métabolites produits lors de la consommation des substrats et comment évoluent les *taxons* bactériens au cours de la fermentation ?

4. Rôle du lactate dans la production d'hydrogène

L'ensilage de maïs est une biomasse riche en acide lactique (51,2 - 69,0 g/kg_{MS}, d'après nos données). Cet acide produit par les bactéries lactiques pendant la fermentation lactique permet le stockage de la biomasse ensilée en conditions acides. Les tests de fermentation précédents ont mis en évidence la consommation totale de cet acide à l'issue de la fermentation obscure et faisaient état de plusieurs interrogations quant au rôle du lactate lors de la fermentation obscure de l'ensilage de maïs :

- (i) à quelles étapes de la fermentation est-il consommé ?
- (ii) est-ce un substrat pour la production d'H₂?
- (iii) quel est l'impact de la consommation du lactate sur le métabolisme de la fermentation obscure ?

(iv) quelles sont les bactéries capables de consommer le lactate ?

Une nouvelle série d'expériences a été réalisée pour répondre à ces questions et apporter un éclairage sur l'impact du lactate sur la production d'H₂, l'orientation du métabolisme fermentaire et l'évolution des *consortia* bactériens.

Dans cette partie, les mécanismes de la fermentation obscure du lot 2 d'ensilage de maïs sont présentés à la lumière des métabolites produits et des *taxons* bactériens identifiés dans le milieu réactionnel. Le rôle du lactate sur la production d'H₂ sera spécifiquement étudié en ajoutant à la biomasse du lactate exogène avant fermentation.

4.1. Contexte et objectif

L'acide lactique ou lactate selon le pH du milieu réactionnel est un métabolite généré lors de la fermentation obscure (Sikora *et al.*, 2013). Sa production et son accumulation dans le milieu réactionnel sont dues à des voies métaboliques non productrices d'H₂ considérées comme des voies concurrentes à la production d'H₂ vis-à-vis du substrat (Guo *et al.*, 2010 ; Cabrol *et al.*, 2017 ; Noike *et al.*, 2002 ; Ren *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2012) (*Eq*. 3.4).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH$$

(*Eq*. 3.4)

Le rôle du lactate dans la fermentation a fait l'objet d'un regain d'attention suite aux publications de plusieurs études qui ont observé la consommation de lactate au cours de la fermentation obscure (Matsumoto et Nishimura, 2007) ou mis en évidence des corrélations entre la présence de bactéries lactiques et la production d'H₂ ou de butyrate (Chojnacka *et al.*, 2011 ; Fuess *et al.*, 2018). De tels phénomènes ont été identifiées lors de la mise en œuvre de substrats modèles (Baghchehsaraee *et al.*, 2009 ; Diez-Gonzalez *et al.*, 1995 ; Grause *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2012) et de substrats complexes comme les ensilages de maïs (Dauptain *et al.*, 2020) et d'herbe (Li *et al.*, 2012), le lactosérum (Asunis *et al.*, 2019 ; Blanco *et al.*, 2019), les mélasses sucrières (Chojnacka *et al.*, 2011 ; Detman *et al.*, 2019), les résidus de distillation (vinasses) pour la production d'alcool (Fuess *et al.*, 2018 ; García-Depraect et León-Becerril, 2018 ; Matsumoto et Nishimura, 2007 ; Oliveira *et al.*, 2020) et les soupes de déconditionnement (Noblecourt *et al.*, 2018). Ces études ont décrit les voies métaboliques potentielles de la consommation du lactate et suggèrent que le lactate serait un substrat potentiel pour la production d'H₂.

Les études citées évoquent rapidement l'utilisation possible du lactate au cours de la fermentation obscure de biomasses ensilées. La biomasse d'ensilage de maïs a en effet la particularité de contenir naturellement de l'acide lactique produit par des bactéries fermentatives pendant le processus de stockage. L'acide lactique y joue en effet un rôle fondamental, car il permet de maintenir des conditions acides et ainsi d'inhiber la dégradation microbienne de la biomasse ensilée par le développement de moisissures ou de levures (Borreani *et al.*, 2018 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016).

Si l'utilisation du lactate est encore sujette à discussion lors de la fermentation obscure, elle est en revanche très bien établie pendant le processus d'ensilage. Borreani *et al.* (2018), McDonald (1982), Teixeira Franco *et al.* (2016) et Wilkinson et Davies (2013) rapportent la présence de clostridies saccharolytiques capables de fermenter le lactate en butyrate et en H₂ d'où la possibilité d'un réseau trophique avec le lactate entre les bactéries lactiques et les clostridies.

Dans cette étude, une fermentation obscure endogène à la biomasse d'ensilage de maïs est mise en œuvre pour bénéficier de la présence de bactéries fermentant le lactate et de bactéries productrices d'H₂ mises en évidence au paragraphe 3.6. Le rôle du lactate sur la production d'H₂, sur le métabolisme de la fermentation obscure et sur les *consortia* bactériens sera étudié en ajoutant du lactate exogène au milieu réactionnel avant la mise en œuvre de la fermentation obscure.

4.2. Mécanisme de la fermentation obscure d'ensilage de maïs frais

4.2.1. Production d'H₂ et métabolisme

Une première fermentation de référence, sans ajout de lactate, est effectuée avec de l'ensilage de maïs (lot 2) « frais », broyé et dilué dans l'eau de l'Eurométropole de Strasbourg en réacteur en fonctionnement semi-batch avec régulation de pH à 5,5. La figure 14 présente le profil de production des gaz et d'évolution du pH du milieu réactionnel au cours de la fermentation de référence.



Figure 14 : Profil de fermentation (production de gaz et variation du pH) de l'ensilage de maïs (lot 2) « frais » et broyé

Un rendement de production en H₂ de 24,0 ± 0,1 L_{H2}/kg_{biomasse} (équivalent à 80,5 L_{H2}/kg_{MS}) est obtenu, soulignant ainsi l'émergence d'une microflore endogène productrice d'H₂. Après une phase de latence de 4 h environ, la production d'H₂ débute et atteint un pic de production (> 2 mL/min) entre 11 h et 13 h, avant cette période, le milieu réactionnel s'acidifie (diminution du pH) puis la régulation maintient le pH à environ 5,5. Le débit de production d'H₂ diminue régulièrement avec un épaulement à 17 h jusqu'à l'arrêt de la production. Pendant la phase descendante, une remontée du pH est observée ce qui signifierait que le pH est neutralisé soit par la consommation des acides soit par la libération de groupements azotés (NH₃) dans le milieu réactionnel (consécutivement à la protéolyse), qui peuvent tamponner le milieu (Ghimire *et al.*, 2017). Le débit de CO₂ suit le profil du débit d'H₂ avec un décalage temporel.

Plusieurs analyses ont été effectuées afin de mieux comprendre le métabolisme des *consortia* notamment quels composés sont consommés et produits. Les monosaccharides, les acides organiques et les alcools présents dans le milieu réactionnel ont été analysés respectivement par HPAEC-PAD, HPLC-UV et GC-FID lors de la fermentation de référence.



La figure 15 présente les teneurs en monosaccharides et métabolites lors de la fermentation.

Figure 15 : Evolution de la teneur en sucres solubles (a) et en principaux métabolites (b) au cours de la fermentation obscure de référence de l'ensilage de maïs « frais » et broyé

Les sucres présents initialement dans le milieu sont le xylose (0,34 mM) et l'arabinose (0,10 mM), qui sont des aldoses à 5 carbones ($C_5H_{10}O_5$) ; ceux-ci sont consommés dès le début de la fermentation.

Après 6 h, du glucose issu de polysaccharides ou des fractions amidon ou cellulosique est libéré dans la phase soluble, sa concentration maximale (0,18 mM) est atteinte au moment où le débit d'H₂ est maximal, ce qui indique un lien entre la libération du glucose et la vitesse de production d'H₂. La libération du glucose dans le milieu réactionnel suggère une activité hydrolytique du *consortium* bactérien endogène à la biomasse au cours de la fermentation. L'acétate et le butyrate sont les principaux métabolites produits lors de cette phase. Le démarrage de la production d'acétate correspond au début de la libération du glucose alors que le butyrate est produit plus tardivement (à partir de 9 h). La concentration de ces deux métabolites, co-produits de l'H₂, augmente de façon simultanée à la production d'H₂. Notons qu'une légère production de lactate (+6,5 mM) intervient pendant le pic de production d'H₂.

A 16 h, la consommation des sucres solubles, notamment le glucose, est quasi-totale alors que la production d'H₂ continue avec cependant un débit moindre, ceci indique un changement de substrat ; conjointement, une consommation du lactate est observée. En conséquence, un changement de métabolisme intervient : la production d'H₂ ralentit et semble se poursuivre par la voie du butyrate dont la concentration continue d'augmenter alors que la concentration d'acétate se stabilise. On assiste donc à une co-production de butyrate et d'H₂ simultanée à la consommation de lactate. En ce qui concerne les autres métabolites, la

teneur en formiate et en éthanol dans le milieu réactionnel augmente légèrement au cours de la fermentation et la production de propionate reste faible.

La consommation du lactate est un fait expérimental notable. Généralement, l'accumulation de lactate dans le milieu du fait de la présence de bactéries lactiques est considérée comme compétitrice de la production d'H₂ (Guo *et al.*, 2010 ; Cabrol *et al.*, 2017; Noike *et al.*, 2002 ; Ren *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2012). Pour la biomasse testée dans cette étude, le lactate est déjà présent dans le milieu réactionnel avant le début de la fermentation, de plus, il est produit pendant la première phase de consommation du glucose et est ensuite consommé. Il a été rapporté dans la littérature deux voies d'utilisation du lactate. La première permet de convertir directement le lactate en butyrate avec co-production de H₂ et de CO₂ (Eq. 3.5 d'après McDonald, 1982 ; Pahlow *et al.*, 2003 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016). Cette voie a été mise en évidence par des travaux étudiant le processus de l'ensilage de maïs (Borreani *et al.*, 2018 ; McDonald, 1982 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016). Ces auteurs rapportent la présence de bactéries du genre *Clostridium* possédant une activité saccharolytique et capables de fermenter le lactate.

$$2 CH_3 CHOHCOOH \rightarrow CH_3 (CH_2)_2 COOH + 2 CO_2 + 2 H_2$$
 (Eq. 3.5)

Un autre groupe d'études (Blanco *et al.*, 2019 ; Chojnacka *et al.*, 2011 ; Detman *et al.*, 2019 ; Grause *et al.*, 2012 ; Hashsham *et al.*, 2000 ; Juang *et al.*, 2011 ; Matsumoto et Nishimura, 2007 ; Wu *et al.*, 2012) indique que le lactate est co-fermenté avec de l'acétate pour générer du butyrate de l'H₂ et du CO₂ selon l'équation (Eq. 3.6) (Diez-Gonzalez *et al.*, 1995) :

$$CH_3CHOHCOOH + 0.4 CH_3COOH → 0.7 CH_3(CH_2)_2COOH + 0.6 H_2 + 1 CO_2$$
 (Eq. 3.6)

Notons toutefois que la stœchiométrie de l'équation varie selon les études alors que le mécanisme est commun. Ce dernier mécanisme de fermentation semble aussi probable dans notre étude puisque l'on observe entre 11 h et 25 h une co-production de butyrate et d'H₂ simultanée à la consommation de lactate. La stabilité, suivie d'une légère décroissance de la quantité d'acétate, suggérant un équilibre entre les voies de production d'acétate (co-production d'H₂ et homoacétogenèse) et les voies de consommation d'acétate par co-fermentation du lactate.

L'analyse de la littérature montre que la présence ou la production de lactate avant le démarrage de la production d'H₂ dans le milieu réactionnel favorise la production de butyrate. La fermentation de mélasses de betteraves sucrières contenant naturellement du lactate produit majoritairement du butyrate (Detman *et al.*, 2019). Toujours avec cette même biomasse, Chojnacka *et al.* (2011) montrent la capacité de granules bactériennes à consommer le lactate en cours de fermentation. Ils relèvent une importante surproduction de butyrate associée à une absence de lactate en fin de fermentation par rapport à une fermentation sans granules. Blanco *et al.* (2019), García-Depraect *et al.* (2019), Grause *et al.* (2012) et Matsumoto et Nishimura (2007) montrent que la consommation du lactate coïncide avec la production de butyrate. A des pH
comparables aux nôtres (5,5 - 6), Asunis *et al*. (2019) rapportent la présence de butyrate comme métabolite majoritaire dans une fermentation lors de laquelle le lactate est consommé.

La cinétique de fermentation que nous avons obtenue est semblable à celles observées dans la littérature (Asunis et al., 2019; Blanco et al., 2019; García-Depraect et León-Becerril, 2018; Grause et al., 2012; Juang et al., 2011). Ces études montrent une fermentation en deux étapes. Lors de la première étape, les sucres issus de la biomasse (Asunis et al., 2019 ; García-Depraect et León-Becerril, 2018 ; Juang et al., 2011) ou présents dans le milieu réactionnel sous forme de monomères (Blanco et al., 2019 ; Grause et al., 2012) sont convertis majoritairement en lactate (Eq. 3.2) et dans une moindre mesure, en acétate et en H₂ (Asunis et al., 2019 ; Blanco et al., 2019 ; García-Depraect et León-Becerril, 2018 ; Juang et al., 2011). Dans notre cas, ce processus de production de lactate intervient pendant le stockage en silo et lors de la fermentation du glucose. Notons que les quantités de lactate initiales dans notre biomasse sont faibles par rapport à la littérature : 2,1 g/L contre 12 g/L détecté par Blanco et al. (2019) dans du lactosérum. Detman et al. (2019) et Grause et al. (2012) montrent l'importance de la présence de sucres dans le milieu initial pour accélérer le développement des consortia et la conversion du lactate en butyrate, rôle qui serait celui du xylose et de l'arabinose dans notre étude. Pendant la seconde étape, la majorité du potentiel H₂ est produit par cofermentation du lactate et de l'acétate avec un rendement théorique maximal de 0,6 moL_{H2}/mol_{lactate}, équivalent à un rendement de 1,2 mol_{H2}/mol_{hexose} et donc inférieur au rendement théorique de la voie butyrate (2 mol_{H2}/mol_{hexose}). La régulation du pH impacte étroitement le métabolisme de la production d'H₂ à partir du lactate. Asunis et al. (2019), Juang et al. (2011) et Wu et al. (2012) obtiennent des productions optimales à pH compris entre 5,5 et 6 alors que Lee et al. (2008) et Matsumoto et Nishimura (2007) préconisent des pH entre 6 et 7. Blanco et al. (2019), García-Depraect et al. (2019) et Grause et al. (2012) soulignent le bénéfice d'un saut de pH entre les 2 étapes de fermentation : un pH compris entre 6 et 7 pour la production de lactate et un pH plus acide de 5 à 5,8 pour la production d'H₂ par la consommation du lactate. Cette observation correspond à notre stratégie expérimentale puisque le pH est ajusté à 7 en début de fermentation puis est régulé à une valeur supérieure à 5,5.

En conclusion, dans notre biomasse, le choix du substrat par les organismes fermentaires s'effectue sur des critères d'efficience liés à la nature de la molécule métabolisable (sucres ou lactate) et à son accessibilité (soluble ou à hydrolyser). Ces résultats mettent en évidence les métabolites des voies de production de l'H₂ (acétate et butyrate) sont majoritaires et les autres métabolites issus de voies non productrices d'H₂ sont produits en faibles quantités, ce qui témoigne d'un métabolisme favorable à la production d'H₂. Les phénomènes observés au cours de la fermentation et décrits dans la littérature suggèrent que la consommation du lactate lors d'une seconde phase est associée à une surproduction d'H₂ par rapport aux voies classiques (acétate et butyrate) de bioproduction d'H₂ à partir de monosaccharides. Les données du séquençage de l'ADN des *consortia* bactériens vont compléter ces observations.

4.2.2. Analyse des consortia bactériens en cours de fermentation

Pour analyser les dynamiques microbiennes au cours de la fermentation, l'ADN de culots bactériens issus de plusieurs prélèvements (à 0 h, 6 h, 11 h, 19 h) est extrait et séquencé.



La figure 16 présente l'évolution des consortia bactériens au cours de la fermentation.

<u>Figure 16</u> : Evolution du nombre de copies du gène ARNr 16S par μ L d'ADN extrait des genres bactériens majoritaires au cours de la fermentation, du débit d'H₂ en fonction du temps (a) et identification des espèces bactériennes présentes dans le milieu réactionnel (b).

Les données de la qPCR montrent une forte croissance des bactéries du genre *Clostridium* lors de la première phase de fermentation et dans une moindre mesure des *Lactobacillus*. Le nombre de copies du gène ARNr 16S par µL d'ADN extrait se stabilise entre 11 h et 19 h, ce qui indique que les bactéries entrent dans une phase de ralentissement de croissance marquée par une diminution du débit de production en H₂. La croissance du *taxon* appartenant au genre *Enterococcus* lors de la seconde phase (après 11 h) montre un changement dans la dynamique du *consortium* bactérien pouvant impacter le métabolisme. En effet, les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques dont plusieurs espèces sont productrices d'H₂ (Li *et al.*, 2020 ; Valdez-Vazquez *et al.*, 2015 ; Yin et Wang, 2016, 2019b).

Le milieu réactionnel initial se caractérise par une diversité bactérienne importante (figure 16b) et la plupart des bactéries identifiées ne sont *a priori* pas productrices d'H₂. Parmi les bactéries productrices d'H₂ qui sont minoritaires dans le *consortium* initial, on relève la présence d'*Enterococcus* (8 %) et de *Clostridium* (< 5 %). Les 6 premières heures de fermentation sont marquées par le développement des bactéries du genre *Clostridium* qui deviennent majoritaires (> 75 %) : *Clostridium tertium* (30 %), *Clostridium bifermentans* (18 %), *Clostridium butyricum* (13 %), *Clostridium isatidis* (11 %) et *Clostridium sp.* (5 %). *Clostridium tertium*, *Clostridium bifermentans* et *Clostridium isatidis* sont des bactéries productrices d'H₂ (Compton *et al.*, 2000 ; De Vos *et al.*, 2009 ; Sivagurunathan *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2003 ; Yin *et al.*, 2021) et leur métabolisme est très favorable à la production d'acétate (De Vos *et al.*, 2009), ce qui expliquerait l'accumulation rapide d'acétate en début de la fermentation.

Chapitre 3

La diversité du *consortium* et des communautés du genre *Clostridium* se réduit considérablement au profit de *Clostridium butyricum* qui devient majoritaire (64 %) à 11 h. Cette période correspond à un pic de débit de production en H₂ (0,09 mmol_{H2}/min soit 2,3 mL_{H2}/min) et de libération du glucose dans le milieu réactionnel dont *Clostridium butyricum* pourrait être à l'origine. En effet, plusieurs études ont montré les capacités de production d'H₂ de *Clostridium butyricum* et son activité saccharolytique (Hu *et al.*, 2013 ; Jungermann *et al.*, 1973 ; Obanda *et al.*, 2020). Il serait donc possible d'associer la présence de *Clostridium butyricum* à l'hydrolyse des sucres complexes de l'ensilage de maïs. L'hydrolyse de la biomasse et la disponibilité en glucose semblent favoriser la croissance des bactéries du genre *Lactobacillus*, qui se traduit par une légère production de lactate (figure 15).

La période entre 11 h et 19 h est marquée par la diminution de la disponibilité en glucose et en monosaccharides dans le milieu et par la consommation du lactate associée à une production de butyrate. Au niveau de l'abondance des taxons bactériens, Clostridium butyricum reste le taxon majoritaire et un taxon appartenant à Enterococcus émerge. Valdez-Vazquez et al., (2015) ont montré les capacités de taxons bactériens apparentés au genre *Enterococcus* pour la production d'H₂ à partir de paille de blé broyée avec comme principaux métabolites formés de l'acétate et du lactate. De plus, les activités cellulolytique et xylanolytique des Enterococcus ont été mises en évidence dans la littérature (Malfliet et al., 2013 ; Robert et Bernalier-Donadille, 2003 ; Valdez-Vazquez et al., 2015). Ces éléments expliquent l'émergence du taxon des Enterococcus observée au cours de la fermentation et suggèrent un mécanisme de crossfeeding avec les bactéries fermentant le lactacte (probablement *Clostridium butyricum*) pour la conversion du lactate en butyrate avec co-production d'H₂. Une autre souche d'Enterococcus identifiée comme Enterococcus faecium INET2 a été caractérisée par Yin et Wang (2016, 2019b). Cette souche n'est pas capable d'utiliser l'amidon mais son profil fermentaire lors de la fermentation de substrat modèle (glucose) est très proche de celui observé dans notre étude : production d'acétate puis de butyrate. Enfin, aucune étude dans la littérature n'a rapporté la capacité de bactéries du genre Enterococcus (bactéries lactiques) à utiliser le lactate, ce qui indiquerait que l'utilisation du lactate soit associée à *Clostridium butyricum*.

La composition du *consortium* bactérien à 19 h de fermentation est conforme à la littérature. En effet, Sträuber *et al.* (2016) et Dauptain *et al.* (2020) montrent l'émergence d'une flore bactérienne productrice d'H₂ lors de la fermentation d'ensilage de maïs avec des *consortia* riches en *Clostridium* et en *Enterobacteriales* (Dauptain *et al.*, 2020) et une proportion mineure de *Lactobacillales* (Sträuber *et al.*, 2016) à cause d'une alternance volontaire entre production de gaz et fermentation lactique. Sträuber *et al.* (2016) soulignent également l'activité hydrolytique et acidogénique importante des *consortia*, un constat confirmé par notre étude.

Par rapport à la littérature, concernant l'utilisation du lactate lors de la fermentation obscure, nous observons des divergences au niveau des *consortia* analysés. Dans notre étude, le développement des bactéries lactiques est faible au cours de la fermentation alors que dans l'étude de García-Depraect *et al*. (2019), ces

bactéries représentent jusqu'à 50 % d'abondance à 24 h correspondant à une phase de fermentation lactique spontanée (très faiblement observable dans notre étude) lors de la fermentation d'un mélange de vinasse de téquila et d'effluent de nixtamalisation (procédé méso-américain de préparation du grain de maïs). Ce développement est remarquable puisque le milieu de cette étude a été inoculé avec un *consortium* riche en *Clostridium*. Dans l'étude d'Asunis *et al.* (2019), l'émergence de bactéries lactiques serait plutôt associée à la flore endogène du lactosérum, utilisé comme substrat. Le développement des *Clostridia* dans ces études n'interviendrait qu'à la fin de l'utilisation des sucres *i.e.* quand ils sont convertis totalement en lactate.

Dans ces études, la présence d'acide lactique ou de bactéries lactiques pose question quant au double rôle que pourrait jouer le lactate dans la fermentation obscure puisque d'une part, sa production mobilise les sucres qui pourraient être utilisés par les bactéries productrices d'H₂ et d'autre part, il sert de substrat à la production d'H₂ (Sikora et al., 2013). Chojnacka et al. (2011) remarquent en effet, une corrélation positive entre la présence de bactéries lactiques et la production d'H₂, constat appuyé par la consommation totale de l'acide lactique présent dans la biomasse initiale (des mélasses de betteraves sucrières contenant 0,8 g_{lactate}/L). Plus récemment, Fuess et al. (2018) établissent une corrélation similaire entre bactéries lactiques et production d'H₂. Detman et al., (2019) suggèrent donc la mise en place d'un réseau trophique (crossfeeding) entre les bactéries lactiques qui convertissent une partie du substrat en acide lactique (par une voie concurrente à la fermentation obscure) et des bactéries utilisant l'acide lactique pour la production d'H₂. Dans cette direction, Liu et al. (2008) augmentent la production d'H₂ de Clostridium thermocellum JN4, une bactérie productrice d'H₂ et de lactate avec Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum GD17 une bactérie capable de convertir lactate en H₂ et en butyrate. Cette co-culture permet de consommer totalement le lactate et de doubler le rendement de production d'H₂ signifiant l'existence d'un réseau trophique entre les deux bactéries à partir du lactate. Les travaux de Park et al. (2021) montrent également le bénéfice d'une co-culture entre Sporolactobacillus vineae et Clostridium butyricum par rapport à une culture pure *Clostridium butyricum* pour la production d'H₂. Les prédictions métagénomiques suggèrent une augmentation de l'expression des gènes liés à la production de butyrate à partir du lactate sans accumulation de lactate dans le milieu, ce qui renforcerait l'hypothèse d'un crossfeeding avec le lactate entre les deux microorganismes.

La littérature propose plusieurs bactéries fermentant le lactate pour intervenir dans le réseau trophique (Matsumoto et Nishimura, 2007 ; Ohnishi *et al.*, 2012 ; Ziara *et al.*, 2019). Matsumoto et Nishimura (2007) isolent notamment une bactérie mésothermophile classifiée en tant que *Clostridium diolis*, capable de co-fermenter l'acide lactique et l'acide acétique pour la production d'H₂. Detman *et al.* (2019), Diez-Gonzalez *et al.* (1995) et Wu *et al.*, (2012) rapportent les capacités de bactéries du genre *Clostridium* à utiliser le lactate avec ou sans acétate, notamment *Clostridium butyricum*, ce qui confirme les hypothèses sur la bactérie utilisant le lactate dans notre biomasse. Cette bactérie est donc capable de changer de substrat rapidement

(sucres libres, sucres issus d'une hydrolyse, lactate) avec un métabolisme très favorable à la production d'H₂ (peu de propionate et d'éthanol).

Ainsi, nous avons établi que le lactate est consommé après la phase de consommation du glucose résultant de l'hydrolyse de la biomasse et qu'une bactérie fermentant le lactate, également productrice d'H₂ (*Clostridium butyricum*), est majoritaire dans les *consortia* lors de la fermentation endogène de l'ensilage de maïs. Les données de la littérature suggèrent fortement que le lactate est converti en butyrate avec production d'H₂, ce qui est confirmé par le métabolisme fermentaire très favorable à la production de butyrate que nous avons obtenu entre 11 h et 21 h. Nous pouvons donc conclure que le lactate présent et généré lors du processus fermentaire est un substrat pour la production d'H₂ avec co-production du butyrate.

4.3. Mécanisme des fermentations supplémentées en lactate

Afin d'approfondir et de quantifier l'effet de la teneur en lactate sur la fermentation, des ajouts dosés de cet acide sont introduits dans le milieu réactionnel avant fermentation. Les fermentations suivantes sont réalisées, cette fois, avec de l'ensilage de maïs congelé et broyé pour pouvoir disposer d'une qualité de biomasse stable au cours du temps. Les conditions expérimentales (bioréacteur et régulation de pH) restent identiques à celle de la partie précédente.

4.3.1. Profil de production $d'H_2$

Différentes quantités de lactate (de 1,5 à 11,6 g/L) ont été ajoutées à la biomasse avant fermentation. Trois tests de référence sont effectués avec de l'ensilage de maïs congelé sans ajout de lactate avec une teneur initiale en lactate de 12,6 mmol/L soit 1,1 g/L.

La figure 17 présente l'évolution des débits de production d'H₂ et des concentrations en métabolites dans le milieu réactionnel lors des fermentations d'ensilage de maïs selon la concentration en lactate ajoutée.



<u>Figure 17</u>: Profils de production d'H₂ et évolutions des concentrations en métabolites au cours des fermentations obscures d'ensilage de maïs sans ajout de lactate (triplicat) et en fonction des concentrations en lactate ajouté : 1,5 (duplicat) ; 2,7 ; 4,5 ; 7,4 et 11,6 $g_{lactate}/L$.

Les profils de production sont assez répétables. Le débit d'H₂ décrit un pic de production dont le sommet est le plus souvent dédoublé. Le débit d'H₂ décroît rapidement dans un premier temps puis plus progressivement dans un second temps. Les temps de fermentation s'échelonnent principalement de 26 h à 30 h, excepté à 11,6 g_{lactate}/L (près de 40 h). L'ajout de lactate ne semble pas avoir d'impact sur le temps de latence du *consortium* bactérien.

En terme de métabolites, l'acétate et le butyrate sont les acides produits les plus abondants du milieu réactionnel. Dans les trois références, sans ajout de lactate, les concentrations finales en acétate et en butyrate sont similaires avec un rapport molaire B/A proche de 1. Lors des fermentations avec une teneur en lactate ajoutée de 1,5 g/L, la concentration finale en butyrate augmente et cette tendance se confirme sur les fermentations avec des teneurs supérieures en lactate ajouté augmentant le rapport molaire B/A (avant une baisse à 11,6 g/L). Lors des fermentations avec des teneurs ajoutées en lactate supérieures à 2,7 g/L, on peut observer une consommation d'acétate simultanée à la consommation du lactate, ce qui confirme le mécanisme de co-fermentation du lactate et de l'acétate. À la fin des fermentations avec des teneurs en lactate ajoutées de 7,4 g/L et 11,6 g/L, il reste des concentrations assez importantes de lactate dans le milieu réactionnel (respectivement 32,1 et 34,7 mM) alors que l'H₂ n'est plus produit. Un *shift* métabolique semble avoir lieu vers la production d'acétate par homoacétogenèse comme le souligne l'accumulation d'acétate dans le milieu en fin de fermentation.

Les concentrations des autres métabolites dans le milieu réactionnel (éthanol, formiate et propionate) restent faibles, ce qui met en évidence un métabolisme fermentaire orienté vers les voies de production d'H₂.

Les paramètres de performances de production d'H₂ et les paramètres de l'équation de Gompertz sont regroupées dans le tableau 9.

Teneur en lactate exogène g/L	Production mL _{H2} /L _{bioréacteur}	Rendement mLH2/gbiomasse + lactate	Productivité max (mL _{H2} /L/h)	latence (λ) h	Rapport H ₂ /CO ₂	Rapport B/A
0 (référence)	2220 ± 110	31,0 ± 1,4	293 ± 38	5,9 ± 0,3	0,84 ± 0,02	0,85 ± 0,11
1,5 ± 0,1	2209± 54	30,2 ± 0,6	319 ± 84	5,6 ± 0,6	0,83 ± 0,08	1,31 ± 0,15
2,7	2722	36,2	416	5,5	0,84	1,72
4,5	2955	38,4	400	4,8	0,87	2,35
7,4	3208	40,2	436	6,9	0,88	2,29
11,6	3141	36,6	378	3,9	0,88	1,35

<u>Tableau 9</u> : Paramètres de performances de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz des fermentations d'ensilage de maïs (EM) en fonction des concentrations en lactate ajouté

Les productions d'H₂ s'échelonnent de 2,2 à 3,2 $L_{H2}/L_{bioréacteur}$ et correspondent à des rendements en H₂ compris entre 30,2 et 40,2 $L_{H2}/kg_{EM + lactate}$ ou entre 97,2 et 117,0 L_{H2}/kg_{MS} . Les productivités maximales obtenues sont importantes (de 293 à 436 $mL_{H2}/L/h$). Les performances optimales de production sont atteintes avec un ajout de lactate dans le milieu réactionnel de 7,4 g/L, ce qui permet une augmentation de

la production en H₂ de 45 %, du rendement en H₂ de 30 % et de la productivité de 49 % par rapport au triplicat de référence. Les données chiffrées confirment que l'ajout de lactate n'impacte pas significativement la durée de la phase de latence des *consortia* producteurs d'H₂ qui est de 7 h environ pour la plupart des tests. Le rapport H₂/CO₂ reste stable avec les ajouts de lactate.

4.3.2. Effet du lactate sur la production et le rendement en H₂

Après la présentation des différents profils fermentaires obtenus par fermentation obscure d'ensilage de maïs supplémenté en lactate, l'effet des ajouts de lactate dans le milieu réactionnel est analysé par rapport à la production de métabolites et à l'évolution des *consortia* fermentaires.

La figure 18 présente l'effet de l'ajout de lactate exogène sur la production cumulée d' H_2 et sur le rendement de production d' H_2 par rapport à la masse d'ensilage de maïs et de lactate ajouté (EM + lactate).



Figure 18 : Effet de l'ajout de lactate exogène à la biomasse d'ensilage de maïs congelé et broyé sur le rendement et la production d'H₂

La production d'H₂ de la référence (sans ajout de lactate) est de 31,0 ± 1,4 L_{H2}/kg_{EM} , ce qui équivaut à une production cumulée de 2,2 ± 0,1 $L_{H2}/L_{bioréacteur}$. Une valeur similaire au potentiel H₂ de la biomasse supplémentée de 1,5 $g_{lactate}/L$ est obtenue.

Un ajout de lactate supérieur à 1,5 g_{lactate}/L améliore significativement la production d'H₂. Un rendement en H₂ maximum de 40,2 L_{H2}/kg_{EM + lactate} soit une production de 3,2 L_{H2}/L_{bioréacteur} (+45 %) est obtenue avec 7,4 g_{lactate}/L correspondant à un optimum. Au-delà de cette valeur, la production en H₂ tend vers une asymptote et le rendement en H₂ diminue.

Dans la littérature, trois études réalisent des ajouts dosés de lactate à un substrat dans leur bioréacteur : amidon et lactate (Baghchehsaraee *et al.*, 2009), hexose et lactate (Kim *et al.*, 2012) et mélasses de l'industrie sucrière et lactate (Detman *et al.*, 2019). Cette dernière étude (Detman *et al.*, 2019) cible une biomasse réelle (mélasses de betteraves sucrières) mais ne mesure que les variations de métabolites sans suivre les productions de gaz. Baghchehsaraee *et al.* (2009) montrent que l'ajout de lactate à l'amidon permet d'augmenter la production cumulée en H₂ de 55 % soit une augmentation effective du rendement de 35 %. Ils obtiennent un gain de rendement en H₂ dès l'ajout d'une teneur en lactate de 0,25 g_{lactate}/L. Notons que cette valeur est à comparer avec la charge de biomasse initiale (5 g_{amidon}/L) qui est 14 fois inférieure à notre charge de biomasse. L'ajout de 0,25 g_{lactate}/L dans l'étude de Baghchehsaraee *et al.* (2009) équivaudrait à un ajout de 3,5 g/L pour notre étude, ainsi l'effet du lactate sur la production d'H₂ est donc cohérent entre nos deux études. Quand les ajouts de lactate sont importants (3 - 5g/L), Baghchehsaraee *et al.* (2009) observent également un plafonnement de la production d'H₂ et une diminution du rendement en H₂, ils montrent également qu'à ces concentrations, le lactate n'est pas toxique pour les *consortia* bactériens.

Kim *et al.* (2012) utilisent un substrat modèle constitué de glucose (20 g/L) et teste des ajouts de lactate s'échelonnant de 1 g/L à 16 g/L. La production d'H₂ est optimale à 8 g_{lactate}/L et le gain de production est plus modéré (+21 % de production cumulée). Comme pour notre étude, Kim *et al.* (2012) observent une valeur seuil (2 g/L) à partir de laquelle l'ajout de lactate augmente la production de H₂. À 16 g/L, le lactate n'améliore plus la production d'H₂, un volume d'H₂ similaire à la référence est alors obtenu.

Ainsi, l'ajout de lactate permet d'augmenter significativement le potentiel H_2 de la fermentation. À l'instar des travaux de Kim *et al.* (2012), nous observons une valeur seuil en dessous de laquelle le lactate ne permet pas de surproduction d'H₂. Cette valeur dépendrait de l'apport initial en source de carbone (sucres). Dans cette étude, nous avons également déterminé qu'au-delà d'une concentration ajoutée de 7,4 g_{lactate}/L, la production d'H₂ tend vers une asymptote.

4.3.3. Effet du lactate ajouté sur les métabolites

La figure 19 présente les productions de métabolites et le taux de consommation du lactate du milieu réactionnel en fonction des quantités de lactate exogène ajoutées.



Figure 19 : Effet de l'ajout de lactate sur le métabolisme des consortia bactériens (a) et taux de consommation du lactate (b) en fonction de la teneur en lactate ajouté.

La référence (sans ajout de lactate) présente un métabolisme adapté à la production d'H₂ : les teneurs en butyrate et en acétate sont équilibrées par rapport à la quantité d'H₂ produite. L'activité des voies de production d'acétate sans co-production d'H₂ notamment l'homoacétogenèse semble faible au cours de la fermentation. On observe que l'ajout de lactate augmente la production de butyrate de 38 à 68 mM (7,4 g_{lactate}/L). Les productions d'acétate comprises entre 26,2 et 34,9 mM sont variables et ne semblent pas dépendre de la quantité de lactate ajoutée. Notons qu'une surproduction d'acétate (50,3 mM) intervient pour le test à 11,6 g_{lactate}/L ; cette production est significativement supérieure à celle observée par les autres fermentations. Des variations de la production de ces deux acides résultent une augmentation du rapport molaire B/A, qui atteint un optimum de 2,3 pour une quantité de lactate ajoutée de 7,4 g/L. Ces résultats confirment la voie métabolique de conversion du lactate en H₂ avec co-production de butyrate.

La taux de consommation du lactate diminue avec la quantité de lactate ajoutée (figure 19b). On observe un taux de consommation du lactate élevé (environ 90 %) qui chute autour de 65 % pour des teneurs élevées en lactate *i.e.* à partir de à 7,4 g/L. Baghchehsaraee *et al.* (2009) observent également une consommation partielle de lactate à partir de 3 g/L, concentration à partir de laquelle la production d'H₂ est maximale et stagne. Dans l'étude de Kim *et al.* (2012), le lactate n'est consommé que dans les fermentations à 4 et 8 g_{lactate}/L et cette consommation est très faible (< 20 %).

En ce qui concerne les autres métabolites, les productions de propionate et de formiate sont très faibles (< 10 mM, non représentées) ; il en est de même pour la production d'éthanol (production de 6 à 10 mM). L'ajout de lactate réduit très légèremen t la solvantogenèse, qui est déjà peu marquée dans l'expérience de référence (8,9 ± 1,6 mM) ; la valeur minimale (6,0 mM) pour la production d'éthanol est obtenue pour des teneurs de 4,5 g_{lactate}/L.

Baghchehsaraee *et al.* (2009) notent que la production de butyrate est augmentée significativement alors que les quantités d'acétate et d'éthanol diminuent avec l'ajout d'acide lactique. Kim *et al.* (2012) observent également un changement de métabolisme qui est orienté vers la production d'H₂ par la voie du butyrate pour des ajouts de lactate de 2 à 8 g/L, lesquelles obtiennent des rapports molaires B/A favorable au butyrate, respectivement de 1,3 et 2,7, ce qui est cohérent avec notre rapport molaire B/A maximal de 2,2. Detman *et al.* (2019) fermentent des mélasses contenant des sucres en quantité équivalente à 20 g/L de saccharose et ajoutent 7,4 g/L de lactate de sodium (équivalent à 6 g/L de lactate). La fermentation de référence avec des mélasses présente un bon métabolisme pour la production d'H₂ par la voie du butyrate et montre une utilisation du lactate naturellement présent dans la biomasse. Les fermentations avec ajout de lactate présentent un taux d'utilisation élevé du lactate 88 - 98 %, une augmentation de la production de butyrate, peu de solvantogenèse et de production d'acétate.

Ainsi, le métabolisme des *consortia* bactérien de l'ensilage de maïs de notre étude est cohérent avec les variations de métabolisme consécutives à l'ajout de lactate observées dans la littérature pour d'autres

biomasses. Le lactate est donc fermenté par une voie aboutissant à des productions d'H₂ et de butyrate. De plus, Baghchehsaraee *et al.* (2009) mettent en évidence un excès de NADH qui indiquerait un niveau énergétique plus important lié à un stock important de donneurs d'électrons qui sont disponibles pour la réduction de composés accepteurs d'électrons comme par exemple H⁺ pour faire de l'H₂. Cette observation est logique au vu de la réaction d'oxydation du lactate en pyruvate présentée dans l'équation 3.7 (Weghoff *et al.*, 2015) :

$$Lactate + Fd^{2-} + 2 NAD^{+} \rightarrow pyruvate + Fd + 2 NADH \qquad (Eq. 3.7)$$

4.3.4. Analyse des corrélations

L'ajout de lactate à la biomasse induit des changements remarquables du métabolisme fermentaire. Sur l'ensemble des fermentations présentées, nous avons effectué une analyse statistique pour étudier les corrélations entre les productions de gaz, les métabolites produits et la quantité de lactate. Une analyse en composante principale (ACP) basée sur les corrélations de Pearson avec des données normalisées vise à identifier des corrélations entre les variables fermentaires.

La figure 20 présente l'ACP obtenue avec les fermentations mettant en œuvre différentes quantités de lactate dans la biomasse.



<u>Figure 20</u>: Analyse en composante principale (ACP) des caractéristiques de production d'H₂ et des principaux métabolites produits au cours des fermentations d'ensilage de maïs congelé et broyé avec ajout de lactate

Les deux composantes F1 et F2 de l'ACP présentées sur la figure 20 sont suffisantes pour expliquer plus de 90 % de la variabilité des données. L'ACP effectuée fait apparaître une corrélation entre la production de butyrate, de CO₂, d'H₂ et le rapport molaire H₂/CO₂ signifiant que la production d'H₂ s'effectue principalement par la voie du butyrate. La productivité en H₂, la quantité de lactate ajoutée et le nombre de mole de lactate consommé semblent corrélés à ces variables suivant l'axe horizontal. Une autre corrélation montre que la production d'H₂ est associée à la productivité maximale et à l'ajout de lactate. La corrélation entre la production de butyrate, d'H₂ et le nombre de moles de lactate consommé confirme le rôle du lactate comme substrat pour la production d'H₂ et la voie métabolique génératrice de butyrate pour son utilisation.

Les trois variables associées au lactate montrent une corrélation positive entre l'ajout de lactate et le nombre de moles de lactate consommé et une corrélation négative avec le taux de consommation du lactate ce qui signifie que plus le lactate est ajouté en grande quantité plus le nombre de moles consommé est important mais l'efficacité *i.e.* le taux de consommation du lactate est réduit.

La production d'acétate et d'éthanol ne sont pas corrélée avec la production d'H₂ ou la consommation du lactate. Il avait été montré précédemment (Chapitre III, 4.3.3) que ces productions restaient stables indépendamment des ajouts de lactate dans le milieu. Pour la production d'acétate, l'absence de corrélation pourrait s'expliquer par l'équilibre entre sa co-fermentation avec le lactate, sa production par les voies productrices d'H₂ (Eq. 3.2) et l'homoacétogenèse (Eq. 3.1). Pour l'éthanol, les productions sont très faibles et il est donc difficile d'observer des corrélations significatives.

Pour conclure, les ajouts dosés de lactate ont montré une modification du métabolisme de la fermentation avec une augmentation très significative de la production de butyrate associée à une surproduction d'H₂ (> 25 %) à partir de 2,7 g/L, même si de faibles quantités de lactate (1,5 g/L) suffisent à orienter le métabolisme vers la voie du butyrate. A partir d'une concentration en lactate de 4,5 g/L, sa consommation n'est plus totale, cette quantité « seuil » semblerait dépendre de la quantité d'hydrates de carbone utiles à la croissance de bactéries consommatrices de lactate dans le milieu réactionnel.

4.3.5. Effet du lactate sur les consortia bactériens

L'ADN présent dans le milieu réactionnel de la fermentation de référence et dans celle supplémentée avec 7,4 g_{lactate}/L a été extrait et séquencé. La figure 21 présente l'impact du lactate ajouté à 7,4 g/L sur les *consortia* fermentaires.



Figure 21 : Effet de l'ajout de lactate (7,4 g/L) sur l'abondance des consortia bactériens familles (a) et espèces (b).

La famille bactérienne des *Clostridiaceae* (auxquelles appartiennent les bactéries du genre *Clostridium*) est majoritaire au cours des fermentations (71 % - 76 %, figure 21a). On observe peu de diversité au sein de cette famille dominée par *Clostridium butyricum* (figure 21b). L'ajout de lactate dans le milieu réactionnel renforce l'abondance de cette bactérie et des *Clostridia* en général, au détriment des *taxons Clostridiaceae sp.* et *Lachnospiraceae sp.*. Un *taxon* appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* émerge dans la fermentation avec ajout de lactate. Notons enfin l'absence des *Enterococcus* et la très faible présence des bactéries de la famille des *Lactobacillales* dont le développement a été potentiellement inhibé pendant la congélation.

Clostridium butyricum avait été identifiée comme consommatrice de lactate et productrice d'H₂ (Detman *et al.*, 2019) ou capable de *crossfeeding* avec des bactéries lactiques (Park *et al.*, 2021), expliquant l'enrichissement en cette bactérie observé avec l'ajout de de lactate.

Le *taxon* appartenant à la famille *Enterobacteriaceae* présente une bonne homologie (98,4 %) avec *Citrobacter freundii*, identifiée lors de la fermentation du glycérol en 1,3 propanediol (Moscoviz *et al.*, 2016). La présence d'une *Citrobacter* dans cette fermentation serait assez surprenante car Pasteris *et al.* (2011) soutiennent que cette bactérie est inhibée par des ajouts de lactate exogène (à partir de 5 g/L). *Citrobacter* est une bactérie productrice d'H₂ avec un rendement maximal théorique de 2 mol_{H2}/mol_{hexose} et possède la capacité de retirer les traces d'O₂ dans le milieu fermentaire. Cette faculté a conduit Beckers *et al.* (2010) à l'associer en co-culture avec *Clostridium butyricum* mais le rendement de la co-culture s'est avéré légèrement moins bon qu'avec une culture pure de *Clostridium butyricum*.

Ainsi, l'ajout de lactate (7,4 g/L) s'accompagne d'un enrichissement du *consortium* en *Clostridium butyricum*, bactérie productrice d'H₂ et capable d'utiliser le lactate comme substrat. Le rôle dans la fermentation du second *taxon* majoritaire apparenté à la famille des *Enterobacteriaceae* reste difficile à interpréter en l'absence d'une identification *taxon*omique plus approfondie.

4.4. Effet de la teneur en acétate sur l'assimilation du lactate

Plusieurs études ont souligné l'importance de l'acétate en tant que co-substrat dans la fermentation du lactate (Detman *et al.*, 2019 ; Diez-Gonzalez *et al.*, 1995 ; García-Depraect and León-Becerril, 2018 ; Juang *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2008 ; Matsumoto et Nishimura, 2007 ; Wu *et al.*, 2012). Grause *et al.* (2012) lui attribue un rôle d'accélérateur du métabolisme de la fermentation du lactate. Asunis *et al.* (2019), Blanco *et al.* (2019), García-Depraect *et al.* (2019) et García-Depraect et León-Becerril (2018) ont observé la consommation de l'acétate co-produit pendant la première phase de leur expérience (fermentation lactique) et mis en évidence une co-fermentation du lactate et de l'acétate. Enfin, l'ensemble de ces études relève des taux de consommation élevés du lactate en fin de fermentation.

Ces éléments peuvent être rapprochés de nos résultats relatifs aux consommations partielles du lactate relevées lors des ajouts dosés (figure 19b) et des remarques de Baghchehsaraee *et al.* (2009) et de Kim *et al.* (2012) confirmant la contribution de l'acétate dans la consommation du lactate.

4.4.1. Effet de l'ajout d'acétate sur la production d'hydrogène

Nous avons donc testé l'impact de l'ajout de l'acétate sur la production d'H₂ et sur la consommation du lactate selon différentes modalités dont l'une avec un rapport molaire lactate_{ajouté}/acétate_{ajouté} de 1/0,6, qui correspond à un surdosage en acétate par rapport à la stœchiométrie 1/0,4 proposée par Diez-Gonzalez *et al.* (1995).

La figure 22 présente l'évolution des débits de production d'H₂ et des concentrations en métabolites dans le milieu réactionnel lors de la fermentation d'ensilage de maïs supplémenté en lactate et en acétate. Deux quantités de lactate (7,4 et 11,6 g/L) et d'acétate (3 et 4,5 g/L) ont été testées.



<u>Figure 22</u> : Effet de l'ajout simultané de lactate et d'acétate à l'ensilage de maïs sur le profil de production d'H₂ et concentrations en métabolites au cours de la fermentation obscure

Chapitre 3

Les profils de production d'H₂ sont assez similaires et la production d'H₂ s'effectue en une étape avec un pic unique correspondant à un débit maximal d'H₂. Les acides ajoutés semblent impacter ce débit maximum de production d'H₂ : l'acétate seul réduit le débit maximal d'H₂ par rapport à la référence (2 contre 3,5 mL_{H2}/min). À une teneur de 7,4 g/L de lactate (avec ou sans acétate), un optimum est atteint (5 mL_{H2}/min). Toujours à cette teneur ajoutée en lactate, l'ajout d'acétate ne provoque pas l'apparition d'un second pic de débit de production d'H₂, distinctif du pic principal, ce qui signifierait que le lactate ajouté est consommé au cours de la fermentation du substrat principal (sucres de la biomasse) et prolonge la durée du pic de production d'H₂. Avec une teneur en lactate de 11,6 g/L et quelle que soit la teneur en acétate, la fin de la cinétique de fermentation semble varier par rapport aux autres fermentations. En effet, un épaulement est observable entre 20 h et 30 h de fermentation qui semble être corrélé avec une diminution de la quantité de lactate dans le milieu réactionnel.

D'un point de vue métabolique, l'ajout d'acétate a un impact sur la consommation en lactate : sans acétate, la concentration en lactate semblerait se stabiliser aux alentours de 30 mM. Quand l'acétate est ajouté au milieu réactionnel, la concentration en lactate diminue et le système tend vers une consommation totale du lactate. En particulier dans les conditions expérimentales où 7,4 g/L de lactate et 3,0 g/L d'acétate sont ajoutés, la consommation du lactate est plus rapide. Lors de l'essai avec 11,6 g/L lactate (sans acétate), la production d'H₂ chute sous le débit de production d'H₂ limite (< 0,05 mL_{H2}/min) au bout de 40 h. Les fermentations supplémentées simultanément en acétate et en lactate n'ont pas été stoppées à 40 h en raison d'une très faible production d'H₂ (> 0,05 mL_{H2}/min) détectée en sortie du réacteur. Sur les tests avec ajout d'acétate, on observe également une consommation quasiment totale du lactate.

Par ailleurs, on remarque que l'ajout d'acétate n'inhibe pas la production biologique d'acétate : une augmentation de la quantité d'acétate (entre +18 mM et +33 mM) dans le milieu réactionnel est observée en début de fermentation qui correspond au pic de débit de production d'H₂. La production d'H₂ semble toujours corrélée à la concentration en butyrate dans le milieu, ce qui confirme le rôle majeur des voies de coproduction de l'H₂ et du butyrate dans le métabolisme fermentaire.

Les autres métabolites (éthanol, formiate, propionate) sont détectés en faibles quantités dans le milieu réactionnel sauf lors de la fermentation avec des teneurs en lactate et en acétate de 11,6 g/L et 3,0 g/L pour laquelle 20,7 mM de propionate sont détectées en fin de fermentation.

Les paramètres de performances de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz sont regroupés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Paramètres de performances de production d'H₂ et issus de l'équation de Gompertz des fermentations d'ensilage de maïs (EM) supplémentées en lactate (Lac) et en acétate (Ac).

Teneur en lactate g/L	Teneur en acétate g/L	Production L _{H2} /L _{bioréacteur}	Rendement L _{H2} /kg _{EM+Lac+Ac}	Productivité max (mL _{H2} /L/h)	Latence (λ) h	Rapport H ₂ /CO ₂	Rapport B/A
0	0	2,22 ± 0,11	31,0 ± 1,4	293 ± 38	5,9 ± 0,3	0,84 ± 0,02	0,85 ± 0,11
0	3	1,46	19,7	234	6,0	0,65	0,75
7,4	0,0	3,21	40,2	436	6,9	0,88	2,29
7,4	3,0	3,60	44,0	450	6,0	0,87	11,91
11,6	0,0	3,14	36,6	314	3,9	0,88	2,22
11,6	3	2,85	33,2	298	6,0	0,75	3,02
11,6	4,5	2,71	30,5	295	7,0	0,73	2,63

L'impact de l'ajout d'acétate conjugué à celui du lactate sur la production d'H₂ est illustré à la figure 23.



<u>Figure 23</u> : Effet de l'ajout de lactate et d'acétate sur la production cumulée d'H₂ (a) et sur la production ($L_{H_2}/L_{bioréacteur}$) de la fermentation obscure d'ensilage de maïs

Les productions d'H₂ obtenues sont comprises entre 1,46 et 3,60 $L_{H2}/L_{bioréacteur}$ correspondant à des rendements de production d'H₂ entre 19,7 et 44,0 $L_{H2}/kg_{EM+Lac+Ac}$ soit entre 60,1 et 117,0 L_{H2}/kg_{MS} (dans ces contions, l'ajout d'acétate n'améliore pas le rendement en H₂ par rapport à la quantité de matières sèches). Les valeurs maximales de production sont atteintes aux conditions expérimentales correspondant à un ajout de 7,4 g/L de lactate et 3 g/L d'acétate. Comme observé sur la figure 22 et le tableau 10, la productivité maximale d'H₂ semble varier en fonction de la quantité de lactate ajoutée : les *optima* sont atteints pour des teneurs en lactate de 7,4 g/L (avec ou sans ajout d'acétate) et s'élèvent en moyenne à 443 ± 7 mL_{H2}/L/h. L'effet de l'ajout d'acides n'a pas d'impact significatif sur le temps de latence des *consortia* bactériens hormis pour le test à 11,6 g_{lactate}/L et 3,0 g_{acétate}/L. Le rapport molaire H₂/CO₂ des fermentations les plus productives en H₂ est maintenu par rapport à la référence. Le rapport molaire H₂/CO₂ des autres fermentations est inférieur à la référence.

Il apparaît que, l'ajout d'acétate seul n'est pas favorable à la production d' H_2 ; en effet, la production d' H_2 décroît de 32 % par rapport à la référence. Ce résultat est cohérent avec les études de Baghchehsaraee *et al*. (2009) de Matsumoto et Nishimura (2007) en substrat modèle, avec respectivement comme source de carbone de l'amidon ou un mélange d'extrait de levure et de peptones qui montrent que l'ajout d'acétate réduit la production d'H₂. En mode de production continue d'H₂, les travaux de Clion (2016) montrent également une diminution du débit de production d'H₂ après un ajout d'acétate dans le milieu réactionnel.

Comme constaté précédemment, à 7,4 g/L de lactate, l'ajout d'acétate semble avoir un effet bénéfique sur la production d'H₂ (+12,5 %), alors qu'à 11,6 g/L de lactate, l'ajout d'acétate réduit la production d'H₂ par rapport à l'ajout de lactate seul. Cette diminution de la production d'H₂ peut être causée par l'acétate ou une augmentation de la pression osmotique du milieu consécutive à l'ajout d'acétate et de lactate présents sous forme de sels (à pH > pKa) (Ballongue *et al.*, 1987 ; Ciranna *et al.*, 2014 ; Elbeshbishy *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2012). Ce phénomène est cohérent avec la légère diminution de production d'H₂ observée.

En effet, l'effet de la teneur en acides organiques sur la fermentation obscure a été recensé dans plusieurs articles (Bundhoo et Mohee, 2016; Chen et al., 2020; Elbeshbishy et al., 2017), qui soulignent le pouvoir inhibiteur des acides dissociés à l'origine de la lyse des cellules bactériennes. Plus spécifiquement, neuf études ont relevé l'effet inhibiteur de l'acétate sur la production d'H₂ à partir de culture pure (Ciranna *et al.,* 2014 ; Tang et al., 2012) ou de cultures mixtes (Clion, 2016 ; Van Ginkel et Logan, 2005 ; B. Wang et al., 2008 ; Wang et al., 2010 ; Y. Wang et al., 2008 ; Zhang et al., 2012 ; Zheng et Yu, 2005). Ces études montrent que les seuils d'inhibition observés sont très faibles, le plus haut s'élève à une concentration d'acétate de 40 mM soit de 2,4 g/L (Ciranna et al., 2014). Dans leur étude, Wu et al. (2012) ne notent pas d'inhibition de la production en fonction de la quantité de lactate (15 - 30 g/L) et d'acétate (4,5 - 9 g/L) ajouté, ce qui signifierait que leur bactérie (Clostridium tyrobutyricum) est résistante à de plus grandes concentrations en lactate/acétate que Clostridium butyricum issue de l'ensilage de maïs. Matsumoto et Nishimura (2007) ne dépassent pas une quantité d'acétate de 3 g/L pour leur test de fermentation avec Clostridium diolis. Enfin, Van Ginkel et Logan (2005) observent que les acides exogènes ajoutés ont un effet inhibiteur plus faible que les acides produits par les bactéries. Noblecourt et al., (2017) observent une diminution de la production d'H₂ quand une teneur en acides organiques issus de la fermentation (acétate, butyrate, lactate) supérieur à 12,5 g/L est atteinte.

Dans notre étude, les ajouts de lactate et d'acétate augmentent la pression osmotique jusqu'à une valeur de 10,5 bar, une pression équivalente à un ajout de 203 mmol/L de NaCl soit 11,8 g/L. Les tests pour lesquelles la production d'H₂ est inhibée ont une pression osmotique de 9,2 à 10,5 bar alors que les productions maximales d'H₂ sont obtenus à des pressions osmotiques comprises entre 4,2 et 6,8 bar, équivalentes à un ajout de 130 mmol/L de NaCl (soit 7,5 g/L) et qui correspondrait à la limite d'inhibition de notre système par la pression osmotique. L'effet sur la production d'H₂ de l'augmentation de la pression osmotique et plus particulièrement des ions Na⁺ a été étudié dans la littérature (Zheng *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2012 ; Paillet *et al.*, 2020). Ces travaux montrent qu'une augmentation de la force osmotique consécutive à l'ajout d'ions dans le milieu réactionnel peut affecter la production d'H₂ positivement ou à l'inverse l'inhiber totalement. La concentration en ions est très variable selon les études : Paillet *et al.* (2020) observent une augmentation de la production d'H₂ pour des forces ioniques de 0,09 à 0,7 mol/L (4,6 - 36,1 bar), Lee *et al.* (2012) notent un volume d'H₂ plus élevé par rapport à leur test de référence en ajoutant 1,0 g/L de NaCl (0,89 bar) mais audelà de cette teneur le volume diminue. Zheng *et al.* (2005) notent une diminution du rendement de production d'H₂ dès un ajout de 50 mmol/L (2,6 bar) de NaCl dans le milieu réactionnel. Ainsi, les valeurs de pression osmotique maximale relevées dans notre étude sont dans l'ordre de grandeur des pressions osmotiques relevées dans la littérature. Le mécanisme d'inhibition proposé par Lee *et al.* (2012) interviendrait au niveau des canaux ioniques spécifiques au sodium qui nécessitent de l'énergie chimique (sous forme d'ATP) pour maintenir la concentration en sodium dans les cellules, cette dépense d'énergie réduit le rendement de production d'H₂ des bactéries. Walter *et al.*, (1987) montre que la pression osmotique créée par la présence de solutés dans le milieu réactionnel (KCl par exemple) impacte le système d'assimilation du substrat par les bactéries et des performances du métabolisme (vitesse de production des acides).

Ainsi, l'ajout d'acétate exogène, s'il est bien dosé par rapport au lactate, permet donc d'améliorer la production d'H₂ lors de la fermentation de lactate à condition que la concentration en acides organiques n'atteigne pas une valeur inhibitrice.



4.4.2. Effet de l'ajout d'acétate sur la production de métabolites

La figure 24 présente l'analyse des métabolites contenus dans le milieu réactionnel et permet d'évaluer l'impact de l'acétate sur la consommation du lactate.

Figure 24 : Effet de l'ajout de lactate et d'acétate sur le métabolisme (a) et sur la consommation de lactate total (présent dans l'ensilage et ajouté) (b) au cours de la fermentation obscure

L'ajout d'acétate seul dans le milieu réactionnel oriente le métabolisme vers des voies non productrices d' H_2 notamment l'homoacétogenèse. En effet, une surproduction d'acétate (+29 %) associée à une réduction de la production d' H_2 (-33 %) est observée par rapport à la référence. A une teneur en lactate ajoutée de 7,4 g_{lactate}/L, l'ajout d'acétate améliore la consommation du lactate (91 %) et sa conversion en butyrate (+16 %) et en H₂ (+12 %). On observe un rapport molaire B/A (12,2) très favorable au butyrate puisqu'il n'y a quasiment pas eu de production d'acétate. Ainsi, l'ajout d'acétate et de lactate dans de bonnes proportions oriente le métabolisme de la fermentation vers des consommations quasitotales du lactate et de l'acétate pour produire du butyrate et de l'H₂. Les autres voies métaboliques sont peu actives (faible production d'éthanol et de propionate).

A une teneur en lactate ajoutée de 11,6 g_{lactate}/L, l'effet de l'ajout d'acétate permet toujours d'augmenter la conversion du lactate en butyrate. Cependant, la réaction est moins efficace en termes de rendement de production d'H₂ et de butyrate produit par mole de lactate. La production d'H₂ est plus faible que sans ajout d'acétate malgré la quantité de butyrate produite, ce qui signifie qu'une part importante de la production d'H₂ a été mobilisée pour la production d'acétate par homoacétogenèse malgré la teneur initiale élevée en acétate dans le milieu (4,5 g/L).

Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une valeur « seuil » à partir de laquelle l'acétate est utilisé comme co-substrat. Malgré les quantités significatives d'acétate produites au cours de la première partie de la fermentation (de 26,2 à 34,9 mM, figure 19a), il faut ajouter de l'acétate exogène (50 mM) pour observer une consommation significative du lactate dans le milieu et une surproduction d'H₂ (à 7,4 g_{lactate}/L).

Ainsi, la consommation du lactate semble peu impactée par la concentration en métabolites. En revanche, le métabolisme semble affecté avec une réduction de la quantité d'H₂ produite et la reprise de l'activité des voies métaboliques non productrices d'H₂ (homoacétogenèse pendant la première partie de la fermentation et production de propionate). Ces voies métaboliques pourraient être activées en réponse au stress consécutif à la quantité importante de métabolites dans le milieu. Par ailleurs, une partie de l'énergie chimique pourrait être utilisée pour détoxifier le milieu, *i.e.* réduire les quantités de lactate. En effet, le lactate sous forme dissociée (lactate de sodium) a des propriétés antibactériennes connues (Alakomi *et al.*, 2000 ; de Wit et Rombouts, 1990 ; Houtsma *et al.*, 1996 ; Kao et Frazier, 1966 ; Schelegueda *et al.*, 2012 ; Wong et Chen, 1988). Thylin *et al.* (1995) ont déterminé les concentrations minimales d'inhibition de la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* en fonction du pH. Dans les conditions du bioréacteur (pH compris entre 5,6 et 7), la concentration minimale d'inhibition du lactate serait supérieure à 400 mM (36 g_{lactate}/L). Ce résultat, qui est certes quatre fois supérieur aux concentrations relevées dans notre étude et qui dépend du milieu, nous donne un ordre de grandeur quant au pouvoir inhibiteur du lactate. La concentration minimale d'inhibition sur la production d'H₂ pourrait être plus faible que celle communément admise pour la croissance bactérienne.

Dans leur étude, Detman *et al.* (2019) examinent l'effet d'un ajout simultané de lactate et d'acétate à une biomasse par rapport au métabolisme de référence de la biomasse et de la biomasse supplémentée avec du lactate. L'effet de l'acétate est difficilement évaluable par rapport à l'expérience avec ajout de lactate seul

puisque dans les deux expériences, le taux de consommation du lactate était élevé et la concentration en acétate faible dans le milieu final.

Pour conclure, l'effet de l'acétate sur la production d'H₂ au moyen d'ensilage de maïs semble dépendre de la quantité initiale de lactate. Sans ajout de lactate dans le milieu réactionnel, l'ajout d'acétate a un effet négatif sur le potentiel H₂. A 7,4 g_{lactate}/L, l'acétate ajouté a permis d'améliorer la production en H₂ en améliorant la consommation du lactate dans le milieu réactionnel. Dans le cas d'une plus forte teneur en lactate (11,6 g/L), l'ajout d'acétate permet d'améliorer le taux d'utilisation du lactate mais, le métabolisme global est moins favorable à la production d'H₂. Ces observations permettent de valider le mécanisme de co-fermentation du lactate avec l'acétate par les bactéries endogènes de l'ensilage de maïs qui utilisent également le lactate pour la production d'H₂.

D'un point de vue pratique, ces résultats montrent qu'une surproduction biologique de lactate pendant le processus d'ensilage (par exemple, à la suite d'une inoculation du silo en bactéries lactiques) impactera positivement les performances de production d'H₂. D'après les données d'Eurofins, la teneur moyenne en acide lactique de l'ensilage est de 45 g/kg_{MS} (équivalent à une concentration de 13 mM dans nos conditions expérimentales) ; cette valeur est confirmée dans la littérature (Borreani *et al.*, 2013 ; Danner *et al.*, 2003 ; Drouin *et al.*, 2021 ; Herrmann *et al.*, 2011, 2015 ; McEniry *et al.*, 2006 ; Offer *et al.*, 2001). Il semble donc peu probable d'obtenir un ensilage de maïs dont la concentration en lactate inhiberait la production d'H₂ (une teneur en lactate supérieure à 82,2 mM soit 284 g_{lactate}/kg_{MS}). Toutefois en cas de co-fermentation d'ensilage de maïs avec une biomasse riche en acide lactique, la quantité d'acide lactique sera à analyser pour déterminer si un ajout d'acétate est nécessaire. Si la concentration en acide lactique est très forte (> 10 g/L) ou très faible (valeur seuil à déterminer), l'ajout d'acétate n'est pas recommandé, si la concentration en acide lactique est moyenne, l'ajout d'acétate pourrait améliorer la production H₂ dans les conditions expérimentales testées.

4.5. Mise en équation du métabolisme du lactate

Les fermentations ont mis en évidence la consommation significative du lactate et le rôle de l'acétate lors de ce processus. L'objectif de cette partie est de proposer une équation décrivant la conversion du lactate et de l'acétate en butyrate, H₂ et CO₂.

Pour établir cette équation, l'hypothèse de départ est de distinguer le métabolisme lié à la fermentation de la biomasse (métabolisme de la référence sans ajout de lactate) des variations de métabolismes liées à l'ajout de lactate et d'acétate (Δ_{acide}). Ainsi les productions de métabolites obtenues avec les fermentations de références ($C_{acide/réf}$) seront retranchées aux productions de métabolites obtenues avec les essais supplémentés en acides (C_{acide}) (Eq. 3.8) (tableau 11).

$$\Delta_{acide} = C_{acide} - C_{acide/ref}$$
(Eq. 3.8)

Le tableau 11 présente les différences de production de métabolites lors des fermentations supplémentées en lactate et en acétate par rapport à la référence (triplicat de fermentations de l'ensilage de maïs congelé et broyé).

Lactate	Acétate	Lactate	ΔLactate	Butyrate	ΔButvrate	H ₂	ΔH ₂	CO ₂	ΔCO ₂
ajouté	ajouté	initial		produit	,	produit	E.	produit	2
g/L	g/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
0,0	0,0	13,3	0	26,8	0	90,3	0	107,9	0
1,5	0,0	25,6	12,3	45,0	18,2	91,8	1,5	110,9	3,0
2,7	0,0	28,5	15,1	38,0	11,2	113,1	22,8	134,4	26,4
4,5	0,0	33,8	20,5	44,8	18,0	122,8	32,5	141,5	33,5
7,4	0,0	53,8	40,4	68,0	41,2	133,4	43,1	151,0	43,1
11,6	0,0	66,2	52,8	58,2	31,4	130,6	40,3	148,8	40,9
7,4	3,0	64,9	51,6	77,7	50,9	149,6	59,3	172,1	64,1
11,6	3,0	102,2	88,9	78,6	51,8	112,5	22,2	154,6	46,7
11,6	4,5	109,7	96,4	90,2	63,4	118,6	28,3	157,6	49,7

<u>Tableau 11</u> : Productions de métabolites et différences de productions de métabolites lors des fermentations supplémentées en lactate et en acétate par rapport à la référence.

L'étape suivante permet de déterminer la quantité d'acétate consommée au cours de la réaction. En effet, la quantité d'acétate détectée dans le milieu réactionnel correspond à l'équilibre entre les voies de production et de consommation de l'acétate. Les autres métabolites ne posent pas ce problème, nous ferons l'approximation que ceux-ci sont soit uniquement consommés (lactate) soit uniquement produits (H₂, CO₂, butyrate). L'acétate servira donc de variable d'ajustement pour équilibrer les réactions qui se présenteront sous la forme (Eq. 3.9) :

$$A \ lactate + B \ ac\acute{e}tate \rightarrow C \ butyrate + D \ CO_2 + E \ H_2$$
(Eq 3.9)

Avec A, B, C, D, E, les coefficients stœchiométriques à déterminer.

La contribution des autres voies métaboliques sur la production d'H₂ et de CO₂ ne sera pas prise en compte puisqu'il a été montré que la production de propionate et d'éthanol par solvantogenèse est très faible comparativement aux métabolites évoqués précédemment.

Les équations de co-fermentation du lactate sont calculées à partir des valeurs du tableau 11. Un bilan des atomes CHO est établi respectivement pour les réactifs (lactate) et les produits (butyrate, CO₂, H₂). Ce bilan permet de calculer entre les réactifs et les produits l'écart relatif aux atomes de carbone pour déduire le nombre de mole d'acétate qui réagit avec le lactate. Le bilan CHO est ensuite mis à jour en ajoutant l'acétate. Pour chaque condition expérimentale, une équation est proposée. Le tableau 12 présente les 8 équations obtenues pour la production de butyrate, de CO₂ et d'H₂ à partir de lactate et d'acétate (Eq 3.10 à Eq 3.17).

Tableau 12 : Equation-bilans obtenues pour la co-fermentation du lactate et de l'acétate exogènes lors de la fermentation obscure
de l'ensilage de maïs par voie endogène. Les lignes surlignées en bleu seront utilisées pour calculées l'équation bilan de la
conversion du lactate.

Lactate ajouté	Acétate ajouté	Coefficients stœchiométriques							Rendement en H ₂
g/L g/L	Lactate	Acétate	\rightarrow	Butyrate	CO ₂	H ₂		L/kg _{EM+Lac + Ac}	
1,5		1	0,6		1,5	0,2	0,1	(Eq. 3.10)	30,2 ± 0,6
2,7		1	0,9		0,7	1,7	1,5	(Eq. 3.11)	36,2
4,5		1	1,1		0,9	1,6	1,6	(Eq. 3.12)	38,4
7,4		1	1,1		1,0	1,1	1,1	(Eq. 3.13)	40,2
11,6		1	0,1		0,6	0,8	0,8	(Eq. 3.14)	34,6
7,4	3	1	1,1		1,0	1,2	1,2	(Eq. 3.15)	44,0
11,6	3	1	0,1		0,7	0,5	0,3	(Eq. 3.16)	33,2
11,6	4,5	1	0,1		0,6	0,5	0,2	(Eq. 3.17)	30,5

La méthode utilisée permet d'équilibrer les équations Eq. 3.11 - Eq. 3.15 de manière satisfaisante, puisque que peu d'écart sont obtenus lors du bilan CHO des réactifs et des produits de la réaction. Les équations Eq. 3.10, Eq. 3.16, Eq. 3.17 présentent des excès d'atomes d'oxygène dans le bilan CHO des réactifs, ce qui impliquerait que de l'eau métabolique soit produite (Diez-Gonzalez *et al.*, 1995; Hashsham *et al.*, 2000; Juang *et al.*, 2011; Matsumoto and Nishimura, 2007) ou que d'autres réactions ou phénomènes d'inhibitions interviennent pendant la fermentation.

Au vu des stœchiométries obtenues qui sont variables, la quantité de lactate et d'acétate ajoutée semble avoir un impact sur les équilibres chimiques.

A faible teneur en lactate ajouté (1,5 g/L), il semble que la production de butyrate soit favorisée (coefficient stœchiométrique du butyrate maximal : 1,5) par rapport à la production de gaz.

Les fermentations à une teneur en lactate de 4,5 et 7,4 g/L (surlignées en bleu dans le tableau 12) et quel que soit l'ajout d'acétate, présentent des stœchiométries similaires. Le lactate et l'acétate sont consommés de manière quasi équimolaire. Le rendement cette voie est d'environ 1 mol_{butyrate}/mol_{lactate} équivalent un rendement de production d'H₂ supérieur à 1 mol_{H2}/mol_{butyrate}. Un optimum correspondant à 1,8 mol_{H2}/mol_{butyrate} est obtenu pour une teneur en lactate de 4,5 g/L, ce qui est proche du rendement théorique en H₂ par la voie du butyrate, produit à partir d'hexoses (2 mol_{H2}/mol_{butyrate}). Le CO₂ et l'H₂ sont produits de manière équimolaire.

Les fermentations avec une teneur en lactate ajoutée de 11,6 g/L présentent un plus petit coefficient au niveau de la stœchiométrie de l'acétate (0,1). En effet, la concentration en acétate lors de ces fermentations se stabilise alors que dans les autres fermentations, la concentration en acétate diminue en fin de test. L'explication la plus probable semble être une production d'acétate par d'autres voies métaboliques qui

compense la consommation de l'acétate lors de la fermentation du lactate. Ce constat est cohérent avec la réduction de la production d'H₂ observée au cours de ces fermentations.

Ainsi, l'équation de la co-fermentation du lactate et de l'acétate pour la production d'H₂ est impactée par les teneurs initiales en substrat. Si la quantité de lactate est trop faible, aucune surproduction d'H₂ n'est observable : la voie métabolique ne s'active pas. Si la quantité de lactate est trop importante des phénomènes d'inhibition sont observés (surproduction d'acétate sans co-production d'H₂) et la production de CO₂ devient plus importante que la production d'H₂. Pour la suite, l'équation que nous proposons (Eq. 3.17) est obtenue en moyennant les équations des fermentations avec des teneurs en lactate comprises entre 4,5 g/L et 11,6 g/L.

Lactate + 1,1 Acétate \rightarrow 1 Butyrate + 1,3 CO_2 + 1,3 H_2 (Eq. 3.17)

Le tableau 13 présente les équations stœchiométriques pour la production d'H₂ et de butyrate à partir de l'utilisation de lactate et d'acétate proposées dans la littérature.

			Déférence			
Lactate	Acétate	\rightarrow	Butyrate	CO ₂	H ₂	Reference
1	0,43		0,7	1	0,57	Diez-Gonzalez et al., 1995
1	0,4		0,7	1	0,6	Hashsham <i>et al.,</i> 2000
1	1		1	1,4	0,8	Hashsham et al., 2000
1	0,5		0,75	1	0,5	Duncan <i>et al.,</i> 2004
1	0,5		0,75	1	0,5	Matsumoto et Nishimura, 2007
1	0,5		0,83	0,75	0,5	Juang <i>et al.,</i> 2011
1	0,4		0,7	1	0,6	Grause <i>et al.</i> , 2012
1	0,16 - 0,42		0,65 - 0,71	0,36 - 0,7	0,09 - 0,47	Wu <i>et al.,</i> 2012
1	0,28		0,67	1,16	0,39	Blanco <i>et al.,</i> 2019
1	1,1		1	1,3	1,3	Cette étude

Tableau 13 : Equation de la réaction de co-fermentation du lactate et de l'acétate dans la littérature

D'après ces équations, il semblerait qu'environ 1 mol de lactate et 0,16 à 0,5 mole d'acétate permettent de produire 0,65 à 1 mole de butyrate, 0,36 à 1,4 mole de CO₂ et 0,09 à 0,8 mole d'H₂. Les équations sont assez variables puisqu'obtenues avec des teneurs en lactate et en acétate différentes avec ou sans source de carbone additionnelle (glucose ou sucres présents dans la biomasse).

L'étude de Hashsham *et al.* (2000) à partir de glucose obtient l'équation la plus proche de la nôtre. En effet, les coefficients stœchiométriques de l'acétate, du butyrate et du CO₂ sont très proches. De manière remarquable, les conditions que nous avons testées permettent d'obtenir une équation avec une production équimolaire d'H₂ et de CO₂ alors que dans la littérature consultée, le coefficient stœchiométrique du CO₂ est systématiquement supérieur à celui de l'H₂. Enfin, aucune étude n'a proposé plusieurs équations en fonction de la teneur en lactate ajouté en réacteur en mode de fonctionnement batch ou semi-batch. Seule l'étude de Wu *et al.* (2012), en mode continu, montre l'effet du débit d'alimentation (218 - 83,5 $g_{DCO}/L/j$) en lactate et en acétate avec un rapport massique de 3/1 sur la co-fermentation du lactate et de l'acétate. D'après les auteurs de cette étude, les équations obtenues sont moins favorables à la production d'H₂ car obtenues en fermentation en mode continu.

4.6. Mise en œuvre du lactate comme source de carbone unique

Les résultats précédents ont montré que le lactate peut être utilisé comme substrat pour la production d'H₂ à partir d'une biomasse complexe via une co-fermentation avec l'acétate. L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet du lactate sur une fermentation en substrat modèle (glucose) puis de tester le lactate comme source de carbone unique dans un milieu synthétique pour la production d'H₂. Le milieu synthétique est constitué d'une solution de nutriments KH₂PO₄ (175 mg/L), (NH₄)₂SO₄ (3,5 g/L), FeSO₄·7H₂O (250 mg/L), MgSO₄·H₂O (50 mg/L), NiCl₂·6H₂O (2 mg/L) à laquelle sont ajoutés la source de carbone (lactate, glucose) et l'acétate. Le milieu est inoculé avec un culot bactérien prélevé en fin de fermentation obscure de l'ensilage de maïs congelé et broyé (référence), car il a été montré que ce culot contient majoritairement des bactéries (*Clostridium butyricum*) capables de métaboliser le lactate (paragraphe 4.2.2).

Le tableau 14 présente les combinaisons de sources de carbone testées ainsi que les performances de production d'H₂ obtenues.

Substrat (g/L)		Production	Productivité maximale	Pappart H. /CO.		
Glucose	Lactate	Acétate	(mLH2/Lbioréacteur)	(mL _{H2} /L/h)	Rapport H2/CO2	
5			825	199	0,64	
5	5		855	187	0,71	
	5		0	0	/	
	5	5	0	0	/	

Tableau 14 : Effet de la source de carbone sur la production d'H2 en milieu synthétique

Seules les fermentations utilisant le glucose (5 g/L) comme source de carbone produisent de l'H₂. L'ajout de lactate (5 g/L) permet une légère augmentation de la production d'H₂, non significative par rapport aux résultats précédents (4.3.1). La présence de lactate semble avoir cependant légèrement amélioré le rapport H₂/CO₂. Après 70 h, les fermentations Lactate et Lactate + Acétate n'ont donné lieu à aucune production d'H₂, ce qui confirme que les bactéries de l'*inoculum* bactérien ne peuvent se développer et produire de l'H₂ sans un apport minimum en monosaccharides.

La figure 25 illustre l'impact de l'ajout de lactate sur le débit de production d'H₂ extrait du bioréacteur et la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel au cours du temps pour les fermentations de glucose en milieu synthétique.

Chapitre 3



<u>Figure 25</u>: Débit de production d'H₂ et concentrations en métabolites au cours de la fermentation de substrats modèles : glucose (5 g/L) (a) et glucose (5 g/L) + lactate (5 g/L) (b) et productions de métabolites (c).

Lors de la fermentation avec le glucose seul, la production d'H₂ est étroitement liée à la concentration en glucose dans le milieu : pendant une phase de latence d'environ 19 h, aucune production significative d'H₂ n'est observée et le glucose est peu consommé. La consommation du glucose est associée à une production d'H₂ et de métabolites (acétate et éthanol). Dès que les sucres sont totalement consommés, l'activité métabolique ralentit considérablement : les concentrations en métabolites se stabilisent à l'exception de l'éthanol qui continue de s'accumuler dans le milieu réactionnel.

L'ajout de lactate modifie le métabolisme. En début de fermentation, une partie du lactate est consommée donnant lieu à une production de propionate, de butyrate et d'acétate. Pendant la phase de production d'H₂, le glucose est converti en lactate, acétate et éthanol. En fin de fermentation, le lactate est à nouveau consommé partiellement pour produire du butyrate et du propionate, les concentrations en acétate et en éthanol restent stables. Ainsi, on remarque que la consommation du lactate en début et fin de test produit du butyrate et de l'H₂, ce dernier étant consommé pour produire du propionate. Ce fait peut expliquer l'absence d'augmentation du potentiel de production d'H₂ malgré la consommation du lactate. Saady (2013) suggère également que le lactate peut être converti en propionate. Cette réaction consomme le NADH qui est utilisé comme donneur d'électrons pour la production d'H₂ via la formation de ferrédoxine sous forme réduite ou de formiate.

La présence du lactate semble réduire la solvantogenèse dont l'activité est moins marquée en fin d'expérience. Cette information est cohérente avec les observations des expériences précédentes et la littérature (Baghchehsaraee *et al.,* 2009). Ainsi, il apparaît que l'ajout exogène de lactate complexifie le métabolisme de la fermentation mais ne réduit pas la production d'H₂. D'après la figure 25c, l'*inoculum* bactérien produit de l'H₂ à partir du glucose par la voie de l'acétate. Les faibles teneurs en acétate et butyrate obtenues par rapport à la production d'H₂ suggèrent une production efficace avec très peu d'homoacétogenèse et qui n'est quasiment pas impactée par l'ajout de lactate comme le suggèrent les rapports molaires $\frac{H_2}{2(B+A)}$ respectivement de 1,07 et 0,87, qui sont proches de 1.

Dans la littérature, plusieurs études montrent que, dans un milieu empirique (peptone, tryptone, extrait de levure), l'ajout d'une source de carbone supplémentaire au lactate permet d'obtenir une production d' H_2 associée à l'utilisation du lactate (Baghchehsaraee et al., 2009 ; Grause et al., 2012 ; Matsumoto et Nishimura, 2007 ; Ohnishi et al., 2012). Grause et al. (2012) mettent en œuvre la co-fermentation du lactate (18 g/L) et de l'acétate (1,2 g/L) additionné de peptone (2 g/L), d'extrait de levure (2 g/L) et d'une dose de glucose (1,2 g/L) en début de fermentation pour stimuler la croissance bactérienne. Matsumoto et Nishimura (2007) montrent que l'ajout de lactate (3 g/L) permet d'augmenter le potentiel de production d'H₂ d'un milieu complexe (tryptone (5 g/L) et extrait de levure (5 g/L)) par Clostridium diolis (+30 %). Ohnishi et al. (2012) effectuent également la fermentation de lactate en batch séquentiel dans un milieu complexe (tryptone (5 g/L) et extrait de levure (3g/L)). Le premier batch de la séquence ne donne pas lieu à une production de gaz significative mais permet d'enrichir le consortium en bactéries fermentant le lactate puisque des productions d'H₂ sont obtenues lors des séquences suivantes. La bactérie identifiée, fermentant le lactate, est apparentée à Megasphaera els denii. L'analyse des métabolites montre que son métabolisme est très différent de celui de notre étude puisque des teneurs importantes en acétate, propionate et en butyrate sont obtenues, métabolisme proche de celui qui est observé en début et fin de test. Ohnishi et al. (2012) isolent également une bactérie du genre Clostridium apparentée à C. sporogenes qui n'est pas capable d'utiliser le lactate. En effet, la bactérie produit un volume d'H₂ qui résulte de la fermentation des éléments contenus dans le tryptone et l'extrait de levure du milieu.

Dans notre cas, l'analyse du milieu réactionnel des fermentations sans glucose ne montre pas de conversion significative du lactate en butyrate au cours des 70 h de fermentation. Ces résultats sont cohérents avec les études de Baghchehsaraee *et al.* (2009) et Logan *et al.* (2002) qui obtiennent des productions d'H₂ très faibles $(2,5 - 3,2 \text{ mL}_{H2}/g_{\text{lactate}})$ avec le lactate comme unique source de carbone.

En milieu empirique, Matsumoto et Nishimura (2007) observent une production quasiment quadruplée en ajoutant simultanément de l'acétate (3 g/L) et du lactate (3 g/L) par rapport à l'ajout de lactate seul grâce à la bactérie *Clostridium diolis*. D'après Detman *et al*. (2019), la bactérie *Clostridium butyricum* serait capable de convertir le lactate en butyrate en présence d'acétate et sans sucre dans le milieu réactionnel. Toutefois, l'absence d'analyse des gaz dans cette étude ne permet pas d'évaluer le potentiel H₂.

Au terme de cette revue de la littérature, plusieurs éléments pourraient expliquer l'utilisation très incomplète du lactate et ses effets très modérés sur la production d'H₂.

Tout d'abord, les temps de fermentation sur substrat modèle (40 h-70 h), dans notre étude, sont plus courts par rapport à la littérature mais par rapport à la biomasse d'ensilage, les durées de fermentation sont plus longues. En effet, Detman *et al.* (2019) observent la conversion du lactate au terme d'une fermentation de 9 jours avec un temps de latence très différents de ceux usuellement observés en fermentation obscure ; et Grause *et al.* (2012) notent un temps de latence d'environ 20 h entre les deux phases de production *i.e.* pour le changement de sources de carbone (du glucose vers lactate), ce qui pourrait expliquer la diminution de la concentration en lactate observée entre 30 et 45 h (figure 25).

L'utilisation d'une source de carbone complémentaire au lactate pourrait avoir un impact sur le métabolisme et les *consortia* de la fermentation. Comme nous l'avons vu, plusieurs études utilisent des substrats empiriques (peptone, tryptone et extrait de levure) contenant des éléments (peptides, sucres) qui permettent de favoriser le développement bactérien et le démarrage de la fermentation ce qui est crucial pour la production d'H₂.

Les *consortia* utilisés comme *inoculum* bactérien pour les fermentations pourraient également être impliqués dans la métabolisation partielle du lactate. L'ensilage de maïs et le milieu synthétique glucose sont très différents en termes de composition et de biodisponibilité des sucres, ce changement allonge grandement le temps de latence (19 h), suggérant un temps « d'adaptation » plus long des *consortia* bactériens au milieu réactionnel contenant un sucre simple. En effet, dans l'ensilage de maïs, peu de sucres solubles sont initialement présents et une hydrolyse est nécessaire pour avoir accès au substrat alors que dans le milieu synthétique, une quantité importante de glucose est disponible pour le *consortium*, ce qui pourrait favoriser l'émergence de genres bactériens consommateurs de glucose (équation 3.18 d'après McDonald, 1982 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016) et qui ne sont pas capables de métaboliser le lactate notamment les *Enterobacteriaceae* ou d'orienter le métabolisme vers d'autres voies ne permettant pas la dégradation du lactate et/ou favorisant la production de propionate.

$2 Glucose \rightarrow 2 Lactate + 1 Acétate + 1 Ethanol + 2 CO_2$ (Eq 3.18)

Contrairement à l'étude menée sur l'ajout de lactate sur la biomasse ensilée, les conditions expérimentales testées (composition du milieu réactionnel et temps de fermentation) et les *consortia* bactériens utilisés ne permettent donc pas d'obtenir un effet de surproduction d'H₂ par ajout de lactate lors de fermentation en milieu synthétique. Les fermentations en milieu synthétique ont montré des métabolismes différents par rapport aux expériences en substrat réel : production d'H₂ par la voie de l'acétate et production massive d'éthanol. L'ajout de lactate au milieu contenant du glucose a provoqué des variations sur le métabolisme avec des productions de butyrate et de propionate. Ainsi la potentielle production d'H₂ est annulée par la consommation d'H₂ pour la production de propionate. Notons que sans glucose dans le milieu réactionnel, aucune production d'H₂ n'a été détectée.

4.7. Conclusion sur le rôle du lactate dans la production d'hydrogène lors de la fermentation endogène d'ensilage de maïs

Nous avons pu montrer que le métabolisme de la fermentation est étroitement lié aux substrats (monosaccharides, sucres hydrolysés, lactate) qui sont successivement fermentés en fonction de leur nature (sucres ou acide) et de leur accessibilité (soluble ou à hydrolyser). Lors de la fermentation d'ensilage de maïs, un métabolisme favorable à la production d'H₂ dont une bactérie identifiée comme une *Clostridium butyricum* serait largement contributrice. En accord avec la littérature, il a été montré que cette bactérie présenterait une activité hydrolytique (libération de glucose au cours de la fermentation) (Hu *et al.*, 2013 ; Jungermann *et al.*, 1973 ; Obanda *et al.*, 2020) et serait capable de fermenter le lactate pour produire de l'H₂ (Detman *et al.*, 2019 ; Diez-Gonzalez *et al.*, 1995 ; Hu *et al.*, 2013).

Nous montrons qu'en fonction de la concentration en lactate, l'équation résultante diffère pour la biomasse complexe. La co-fermentation du lactate et de l'acétate est optimale pour la production d'H₂ avec des teneurs en lactate ajoutées de 4,5 à 7,4 g/L (Eq. 3.17) soit des teneurs totales initiales de 5,9 et 8,8 g/L.

Lactate + 1,1 Acétate \rightarrow 1 Butyrate + 1,3 CO_2 + 1,3 H_2 (Eq 3.17)

Ces travaux ont également démontré que la présence de lactate dans la biomasse d'ensilage de maïs a un impact sur le métabolisme de la fermentation obscure en favorisant la production de H₂ par la voie du butyrate et sur les *consortia* bactériens en renforçant l'abondance d'une bactérie affiliée à *Clostridium butyricum* dans le milieu réactionnel. La conversion hydrogénogène du lactate en butyrate fait également intervenir un co-substrat (acétate) dont la présence est cruciale pour augmenter le taux de consommation du lactate. La fermentation du lactate a été possible grâce au maintien de conditions d'acidité (pH > 5,5) qui sont favorables à la présence des acides sous formes dissociés (lactate et acétate). En effet, à pH faible et au cours du stockage dans le silo (pH < 4,5), les *Clostridia* sont inhibées par la présence d'acide lactique alors que dans le bioréacteur, à pH plus élevé, nous avons montré que ces bactéries sont capables d'utiliser le lactate comme source de carbone pour croître et produire de l'H₂.

Enfin, nous avons tenté d'approfondir les mécanismes de consommation du lactate lors d'expériences avec des substrats modèles en utilisant le lactate comme source de carbone seule ou comme co-substrat avec le glucose. Les conditions expérimentales testées et le *consortium* bactérien utilisé n'ont pas permis d'obtenir de surproduction d'H₂ liée à la présence du lactate, compensée par l'utilisation du substrat pour la production d'éthanol.

5. Conclusion

Au terme de ce chapitre, nous avons montré la possibilité de produire de l'H₂ par voie fermentaire endogène à partir de deux biomasses ensilées : l'ensilage de maïs et l'ensilage de seigle. La caractérisation des biomasses a mis en évidence une fraction importante d'amidon dans l'ensilage de maïs et un taux de matière azotée favorable à la fermentation dans l'ensilage de seigle. Une série de fermentation a permis d'obtenir des premières valeurs du potentiel de production d'H₂ des biomasses sans prétraitement ni *inoculum* externe soulignant l'émergence de bactéries productrices d'H₂ présentes dans la flore de l'ensilage riche en bactéries lactiques. La mise en place de prétraitements mécanique, thermique ou chimique afin d'augmenter la matière métabolisable soluble pourrait permettre d'augmenter la production d'H₂ des biomasses.

Parmi les deux lots d'ensilage de maïs testés, nous avons relevé des productions d'H₂ variables $(535 \pm 2 \text{ mL}_{H2}/\text{L}_{\text{bioréacteur}} \text{ et } 970 \pm 93 \text{ mL}_{H2}/\text{L}_{\text{bioréacteur}})$ mais des métabolismes assez similaires lors de la fermentation. Concernant les lots d'ensilage de seigle, les rendements de productions obtenus étaient similaires (14,4 L_{H2}/kg_{MS}) mais les cinétiques de fermentations étaient très différentes, celle du lot 1 caractérisée par une productivité maximale élevée est remarquable. Enfin, la fermentation obscure de ces biomasses ensilées a permis de mettre en évidence la consommation du lactate produit pendant la fermentation lactique de l'ensilage. Ce fait expérimental a motivé une étude approfondie du métabolisme de la fermentation obscure de l'ensilage de maïs et du rôle du lactate au cours de la production d'H₂ par voie fermentaire.

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence la présence de plusieurs substrats dans la biomasse d'ensilage de maïs (monosaccharides, sucres hydrolysés, lactate) qui sont successivement métabolisés selon des critères d'efficience liés à la nature de la molécule et à son accessibilité. La consommation de ces différents substrats impacte le métabolisme de la fermentation obscure globale et les *consortia* bactériens producteurs d'H₂.

Les travaux sur l'ajout du lactate au milieu réactionnel confirment ce constat. En effet, selon la teneur ajoutée en lactate dans le milieu réactionnel, des variations du métabolisme et des *consortia* sont observés avec notamment une augmentation de la production de butyrate et de l'abondance en *Clostridii*. Nous avons montré que la conversion hydrogénogène du lactate en butyrate fait également intervenir l'acétate comme co-substrat, ce qui confirme les données de la littérature.

Ainsi, les biomasses ensilées sont des biomasses complexes pour la fermentation obscure tant par leurs compositions en substrats potentiels pour la production d'H₂ (acide lactique, monosaccharides, sucres hydrolysables) que par la diversité des bactéries de leur flore endogène de laquelle émergent les bactéries productrices d'H₂.

Chapitre 3

Chapitre IV : Impact de l'aération passive et active de l'ensilage de maïs sur la production d'hydrogène

Après avoir présenté les biomasses et leurs spécificités lors de la fermentation obscure, ce chapitre aborde une dimension plus pratique de la mise en œuvre de la fermentation à savoir les phénomènes pouvant intervenir pendant le stockage et le transport de la biomasse vers le bioréacteur et qui peuvent potentiellement impacter la production d'H₂ par fermentation endogène.

Tout d'abord, nous nous intéresserons à la dégradation aérobie de l'ensilage de maïs en fonction du temps de stockage, ce phénomène peut en eff *et al*térer la qualité de l'ensilage. Puis, nous proposerons un mode de stabilisation de la biomasse tout en analysant les impacts de ce mode de stockage (congélation) sur les caractéristiques de la fermentation. En effet, la stabilisation de la biomasse à des fins expérimentales est nécessaire pour pouvoir mesurer l'impact d'un traitement sur les performances de production d'H₂. Enfin, une étude sur l'aération active de la biomasse sera conduite pour comprendre les mécanismes de la dégradation aérobie de l'ensilage.

1. La dégradation aérobie de l'ensilage de maïs

1.1. Contexte de l'étude

Comme déjà décrit dans le chapitre I, l'ensilage de la biomasse repose sur une fermentation lactique en condition anaérobie qui permet d'inhiber les enzymes et les organismes capables de dégrader la biomasse (Weinberg et Ashbell, 2003). Le maintien de l'anaérobie dans le silo est crucial pour la préservation de la biomasse *a fortiori* après l'ouverture du silo. L'exposition à l'air entraîne des changements métaboliques et microbiens dans la flore de l'ensilage, par exemple, la consommation d'acide lactique et le développement de moisissures et levures. Sur le long terme, les phénomènes d'aération impactent négativement la qualité et la sécurité sanitaire de l'ensilage pour les animaux et le rendement en biogaz (Driehuis, 2013 ; Teixeira Franco *et al.*, 2016).

Comme démontré dans le chapitre III de notre étude, nous avons tiré profit des réactions biochimiques qui se produisent lors de l'ensilage et de la diversité microbienne de la biomasse pour mettre en place une fermentation productrice d'H₂ (fermentation obscure) à partir des microorganismes endogènes à la biomasse. On peut s'attendre à pouvoir bénéficier de l'alternance des conditions anaérobies et aérobies de la biomasse. En effet, les bactéries productrices d'H₂ sont des bactéries sporulantes, qui peuvent résister aux stress environnementaux, y compris à l'exposition à l'air (Bundhoo *et al.*, 2015). Par conséquent, les bactéries productrices d'H₂ pourraient être sélectionnées parmi la diversité microbienne présente dans l'ensilage de maïs. À l'inverse, les microorganismes aérobies pourraient ne pas proliférer pendant la fermentation obscure et les microorganismes anaérobies indésirables seront potentiellement inhibés lors de l'exposition à l'air d'ensilage.

Afin d'appréhender l'effet de la dégradation aérobie sur le potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de maïs, la biomasse est stockée dans un premier temps de stockage à 4°C pour ralentir le phénomène de dégradation et avoir la possibilité de réaliser les fermentations en duplicata. De plus, nous effectuerons deux types d'analyses pour caractériser la dégradation aérobie et son impact sur la fermentation obscure :

- des analyses avant fermentation obscure : analyse de la composition initiale de la biomasse en métabolites et identification des espèces microbiennes présentes ;
- des analyses pendant la fermentation obscure : analyse des populations microbiennes présentes en cours de fermentation et de leur métabolisme.

Notre objectif sera dans un premier temps de **montrer la présence de biomarqueurs de la dégradation aérobie de l'ensilage** puis d'apporter des éléments pour **expliquer les variations de potentiel de production d'H₂ par fermentation endogène** de la biomasse exposée à l'air. Nous apporterons des résultats notamment sur les modifications biochimiques et microbiologiques de l'ensilage de maïs pour déterminer dans quelle mesure les différences observées en performance de production d'H₂ proviennent de la dégradation de la biomasse ayant pour conséquence une biodisponibilité inférieure ou supérieure en substrat. Nous essaierons de répondre au questionnement suivant :

- Est-ce que les communautés bactériennes initiales sont modifiées, donnant lieu à une sélection d'espèces bactériennes à plus fort ou faible rendement ou productivité en H₂ ?
- Est-ce que la biomasse bactérienne, présente au départ et potentiellement productrice d'H₂, s'est adaptée à la biomasse exposée à l'air et à sa composition ?

1.2. Potentiel de production d'hydrogène de l'ensilage de maïs stocké à 4°C (lot 1)

L'ensilage de maïs collecté a été stocké dans des flacons en plastique avec un grand volume d'air pour assurer l'exposition à l'air de l'ensilage. Les flacons ont été conservés à 4°C pour retarder la dégradation, puis la biomasse a été retirée au fur et à mesure pour tester son potentiel H₂ par fermentation endogène.

Pour rappel, les fermentations réalisées à l'obscurité et dans un réacteur semi-batch de 1 L mettent en œuvre 700 mL d'ensilage de maïs (71,5 g/L) dilué dans l'eau de l'Eurométropole de Strasbourg. Le pH ajusté à 7,0 est maintenu au-dessus de 5,5 avec une solution de NaOH pendant la fermentation. Aucune solution de nutriment ou *inoculum* bactérien n'a été ajouté au milieu réactionnel du bioréacteur. L'analyse microbiologique des *consortia* bactériens prélevés dans le bioréacteur est effectuée par séquençage ADN, au début et pendant l'expérience de fermentation.

Une première série d'expériences a été réalisée pour tester le potentiel H₂ de l'ensilage de maïs frais, sans aucun prétraitement. Dix jours après la réception de la biomasse, une production d'H₂ de $535 \pm 2 \text{ mL}_{H2}/\text{L}_{bioréacteur}$ et une productivité maximale de 41 ± 13 mL_{H2}/L_{bioréacteur}/h ont été obtenues (Chapitre III, paragraphe 3.1). Le potentiel de production d' H_2 de la biomasse est ensuite testé en fonction de la durée de stockage à 4°C.

La figure 26 présente les productions cumulées d'H₂ aux différents temps de stockage testés qui s'échelonnent de 10 jours après réception de la biomasse à 220 jours (date de l'épuisement de la biomasse dans le flacon de stockage).



<u>Figure 26</u> : Influence de l'exposition à l'air de la biomasse d'ensilage de maïs au cours de son stockage à 4°C pendant 10 jours, 70 jours, 140 jours, 213 jours et 220 jours sur la production d'hydrogène cumulée (les barres d'erreur rendent compte de la variabilité, n = 2).

Le potentiel de production d'H₂ cumulée augmente jusqu'à 140 jours puis diminue au-delà. De façon remarquable, on observe que le potentiel de production d'H₂ après 220 jours d'exposition à l'air à 4°C est proche de celui de la biomasse fraîchement reçue (10 jours). Notons que des barres d'erreurs importantes sont observées pour la fermentation de la biomasse exposée à l'air pendant 70 jours, celles-ci s'expliquent par des cinétiques de fermentation différentes entre les deux réplicats mais qui n'impactent pas le volume final d'H₂ produit. Le tableau 15 présente les paramètres de performances de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz en fonction du temps de stockage de la biomasse d'ensilage de maïs à 4°C exposée à l'air.

<u>Tableau 15</u> : Impact de l'exposition à l'air de la biomasse au cours de son stockage à 4°C sur les paramètres de performance et de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure de l'ensilage de maïs.

Temps de stockage	Production H ₂	Rendement H ₂		Productivité	Latence (λ)	Rapport
(jours)	mLH2/Lbioréacteur	L _{H2} /kg _{MS}	mol _{H2} /mol _{hsucres}	mL _{H2} /L/h	(h)	H ₂ /CO ₂
10	535 ± 2	22,5 ± 0,2	0,21 ± 0,01	41 ± 13	7,6 ± 1,1	0,48 ± 0,0
70	920 ± 25	38,1 ± 1,0	0,36 ± 0,02	128 ± 21	7,4 ± 0,2	0,62 ± 0,0
140	1037 ± 38	43,7 ± 1,6	0,40 ± 0,02	115 ± 25	8,4 ± 2,6	0,89 ± 0,04
213	857	36,2	0,33	66	11,4	0,45
220	517 ± 10	21,8 ± 0,4	0,20 ± 0,01	49 ± 2	6,3 ± 0,4	0,37 ± 0,01

Avec exposition à l'air et stockage à 4°C, la production cumulée d'H₂ augmente et atteint un optimum à 140 jours de 1037 ± 38 mL_{H2}/L_{bioréacteur} (+93 % par rapport à la référence), soit un rendement moyen de 43,7 L_{H2}/kg_{M5} (MS correspondant aux matières sèches de la biomasse à 10 jours) équivalent à 0,40 mol_{H2}/mol_{sucres} (+95 % par rapport à la référence). À 220 jours, le potentiel de production d'H₂ chute pour atteindre une production similaire à celle obtenue lors de la réception de la biomasse. Notons également que la productivité maximale et le rapport molaire H₂/CO₂ suivent une tendance similaire à la production cumulée d'H₂. La productivité d'H₂ par rapport au test de référence est plus que doublée entre 70 jours et 140 jours de stockage (115 ± 25 mL_{H2}/L_{bioréacteur}/h soit +180 %) alors que le rapport molaire H₂/CO₂ est presque doublé (+85 %) à 140 jours. Les temps de latence sont variables et ne semblent pas corrélés avec les durées d'exposition à l'air. Ainsi, quel que soit le temps de stockage à 4°C, les performances de production d'H₂ sont *a minima* maintenues sur 220 jours.

La figure 27 résume l'effet de l'exposition à l'air à une température de 4°C de la biomasse d'ensilage de maïs sur les paramètres clés de la production d'H₂ en mode semi-batch.



<u>Figure 27</u> : Évolution de la production totale d' H_2 (a), de la productivité maximale (b) et du rapport molaire H_2/CO_2 (c) en fonction du temps de stockage de l'ensilage de maïs à 4°C.

Cette figure fait apparaître une corrélation entre la production d' H_2 , la productivité maximale d' H_2 et le rapport molaire H_2/CO_2 . Ces paramètres semblent suivre une tendance parabolique par rapport au temps d'exposition à l'air à 4°C et dont les *optima* se situeraient à environ 120 jours - 140 jours de stockage. Ainsi, l'exposition à l'air à 4°C intensifie significativement la production d' H_2 de la biomasse d'ensilage de maïs.

1.3. Caractérisation de la biomasse et des consortia initiaux

La figure 28 présente la composition du milieu réactionnel avant fermentation en fonction du temps de stockage de la biomasse. Un échantillon de biomasse congelée est utilisé comme référence sous l'hypothèse que la congélation n'induit pas de modification de la biomasse (phénomène d'hydrolyse et de dégradation).



<u>Figure 28</u> : Évolution de la composition en métabolites initiaux et du pH initial du milieu réactionnel de la fermentation obscure d'ensilage de maïs stocké à 4°C en fonction de la durée d'exposition à l'air.

Le milieu réactionnel de référence est à un pH de 4,4 et est riche en acide lactique comme en acide acétique. Le rapport molaire de ces deux acides est de 1,5 indiquant une fermentation lactique effectuée par des bactéries hétérofermentaires (Kung *et al.*, 2018). Parmi les autres métabolites, notons la présence marquée d'éthanol qui témoigne d'une fermentation alcoolique dans la biomasse, et d'acide formique à une teneur moindre (1,0 mmol/L). Le milieu réactionnel de l'ensilage à 10 jours est très similaire à celui de la référence, le pH (4,4 - 4,5) et le ratio molaire lactique/acétique (1,4 - 1,5) sont très proches. Notons toutefois que l'échantillon à 10 jours contient de l'acide butyrique et des acides en plus grande quantité, ce qui signifie que la fermentation de l'ensilage se poursuit à 4°C. Cette tendance est confirmée par l'analyse de la composition de l'échantillon à 70 jours. En effet, les concentrations d'acide lactique et d'acide acétique sont légèrement supérieures par rapport à celles correspondantes à 10 jours et 140 jours : le milieu réactionnel s'est appauvri en éthanol et en acides organiques présents dans la biomasse se poursuivent après 140 jours. En effet, à 213 jours et 220 jours, la teneur en acides dans le milieu initial est inférieure à 1 mmol/L et le pH est supérieur à 7,5.

Ainsi, par l'analyse de la composition en acides organiques et en alcools dans le milieu avant fermentation, on note que des changements importants sur la biomasse de départ ont eu lieu au cours du stockage de l'ensilage de maïs en aérobie, qui ont conduit à la neutralisation du milieu par la consommation des acides.

Afin de vérifier si l'étude des *consortia* de la biomasse pendant le stockage permettrait d'expliquer ces variations, l'ADN de deux échantillons de biomasse stockés respectivement à 140 jours et 220 jours à 4°C a été extrait, séquencé et quantifié pour étudier l'impact du temps de stockage sur la flore endogène de la biomasse avant fermentation. Un échantillon de biomasse congelée sera utilisé comme référence. La figure

<u>29</u> présente l'évolution des différentes espèces procaryotes et eucaryotes dans l'ensilage de maïs avant fermentation.



<u>Figure 29</u> : Principales espèces de bactéries et de levures présentes dans l'ensilage de maïs avant fermentation obscure en fonction de la durée de stockage à 4°C et analyse du nombre de copies du gène d'ARNr 16S (bactéries) et d'ARNr 18S (levures) par qPCR ; les données de qPCR sont représentées en échelle logarithmique.

Le *taxon* majoritaire dans les échantillons initiaux (avant fermentation) est assimilé au genre *Lactobacillus* ; les autres *taxons* identifiés (*Pediococcus ethanolidurans* et *Leuconostoc lactis*) font partie des bactéries lactiques. Suivant la durée de stockage, des différences en termes d'abondance sont observées.

La référence présente une abondance de bactéries lactiques parmi lesquelles sont identifiées les *Lactobacilli* (65,6 %) accompagnées des *Leuconostoc* (18,1 %) - des bactéries prédominantes dans la flore épiphytique du maïs (Gharechahi *et al.*, 2017) et présentes dans l'ensilage de maïs surtout en début de fermentation lactique (Fessard, 2017). L'identité des bactéries lactiques présentes dans la biomasse est cohérente avec la composition de la biomasse en métabolites. En effet, *Leuconostoc Lactis, L. plantarum* et *L. brevis* sont des bactéries hétérofermentatives, facultatives pour *L. plantarum*. Ces microorganismes sont capables de convertir leur substrat en un mélange d'acides lactique et acétique. *L. brevis* peut également métaboliser les sucres en éthanol (De Vos *et al.*, 2009). Parmi les eucaryotes, la levure *Kazachstania exigua* est majoritaire (91 %) dans l'échantillon de référence. Cette levure a été identifiée comme espèce majoritaire dans des
ensilages de maïs exposés à l'air (Dolci *et al.*, 2011), ce qui n'est pas le cas avec une abondance relative de 10 % dans les ensilages de maïs stockés en anaérobie stricte selon Santos *et al.* (2017).

Malgré les changements de conditions dans l'ensilage stocké durant 140 jours, le séquençage des procaryotes montre un profil d'abondance relative assez similaire : l'échantillon est largement dominé par les bactéries lactiques (84 % dans l'échantillon de référence et 94 % à 140 jours) et la diversité des bactéries est réduite. D'après les données de qPCR, le nombre de copies de gènes a été multiplié par 10 environ par rapport à la référence, ce qui témoigne d'une activité microbienne dans la biomasse. Au niveau des levures, la variation est notable, la levure Pichia fermentans est l'espèce majoritaire (95 %) dans l'échantillons à 140 jours et la qPCR révèle une large prolifération des eucaryotes (x 286). Pichia fermantans est une levure sensible à l'anaérobie, capable d'assimiler le lactate (Pahlow et al., 2003). Suite à l'exposition de la biomasse à l'air, il est très probable que cette levure initie la consommation des acides, la neutralisation du pH et d'autres phénomènes (hydrolyse et dégradation de la biomasse) améliorant le potentiel H_2 de la biomasse. Ces eucaryotes anaérobies facultatifs et résistants à l'acidité ont déjà été observés dans l'ensilage de maïs (Santos et al., 2017) et sont considérés comme des initiateurs de la détérioration aérobie de l'ensilage (Pahlow et al.2003 ; Borreani et al., 2014). Si Pichia fermentans est capable d'assimiler une grande diversité de monosaccharides (Caputo et al., 2012 ; Prabhu et al., 2020) notamment le xylose que l'on retrouve dans l'ensilage de maïs, il existe peu d'information dans la littérature sur l'activité hydrolytique de cette levure. À notre connaissance, seul Utama et al. (2019) ont rapporté l'existence d'une levure, identifiée avec 100 % d'homologie à Pichia fermantans, capable de dégrader la cellulose du chou chinois.

Une modification des consortia bactériens de l'ensilage de maïs a lieu entre 140 jours et 220 jours de stockage comme l'indique les données de qPCR (x 226) et conduit à une diversification des espèces bactériennes. À 220 jours de stockage, les bactéries lactiques restent toujours majoritaires, parmi elles, les Lactobacilli (41 % d'abondance) sont les plus nombreux. La proportion de L. plantarum et L. brevis se réduit respectivement de 36 % à 11 % et de 49 % à 17 % au profit de L. paracasei (11 %), de Pediococcus ethanolidurans (18 %) et de Paenibacillus spp. (17 %). La présence de ces deux dernières espèces est tout à fait remarquable puisqu'elle découle directement de la neutralisation du pH consécutive à l'action des levures. En effet, le pH optimal de croissance de ces bactéries est respectivement compris entre 5-6 et 6-8, des valeurs largement supérieures au pH de l'ensilage de maïs (Tohno et al., 2016 ; Wang et al., 2019). Notons que Pediococcus ethanolidurans (18 %) est une bactérie lactique homofermentative (De Vos et al., 2009), déjà identifiée dans la flore épiphytique du maïs (Ávila et Carvalho, 2020) et dans l'ensilage de plantes fourragères (De Vos *et al.*, 2009), capable de se développer au début de la mise en silo des végétaux, à des températures fraîches (Wang et al., 2019). Paenibacillus (17 %) est signalé dans de nombreuses études de l'ensilage de maïs (Borreani et al., 2013 ; Driehuis, 2013 ; Drouin et al., 2019 ; Guan et al., 2018 ; Shi et al., 2010 ; Tohno et al., 2016 ; Xu et al., 2018). Les bactéries appartenant à ce genre sont anaérobies facultatives et connues grâce à leurs enzymes extracellulaires (xylanases) capables de dégrader les polysaccharides (Grady et al., 2016 ; Shi et al., 2010) ; elles seraient aussi à l'origine de synergies avec les *Lactobacillus* (Xu *et al.,* 2018). La présence de *Paenibaccillus*, classée comme genre de bactéries sporulantes est considérée comme un marqueur typique de l'aération de l'ensilage et de l'augmentation du pH (Borreani *et al.,* 2013).

Notons enfin la présence du genre *Microbispora* (8,5 % d'abondance) correspondant à des bactéries sporulantes présentes dans le sol, capables d'utiliser le lactate et l'arabinose comme source de carbone mais incapables d'hydrolyser l'amidon (Miyadoh *et al.*, 1990). Le pH du milieu réactionnel à 220 jours correspond à la gamme de pH favorable de *Microbispora rosea* (Franco, 2015). Le rôle de cette bactérie dans la fermentation lactique ou obscure ne semble pas avoir été documenté pour l'instant.

Au niveau des eucaryotes, la croissance microbienne augmente encore à 220 jours (x 30) et les populations se diversifient avec l'apparition de *Penicillium* (17 %) et dans une moindre mesure de *Ceuthospora*. *Penicillium* est un champignon filamenteux capable d'hydrolyser les structures lignocellulosiques grâce à un arsenal d'enzymes diversifiées qui jouent un rôle prépondérant dans la dégradation de la matière organique (de Almeida Antunes Ferraz *et al.*, 2018 ; Naraian et Gautam, 2018). *Penicillium* produit également des substances antimicrobiennes qui pourraient inhiber le développement des bactéries de la fermentation obscure (Kumar *et al.*, 2018). Drouin *et al.* (2021) mettent en évidence l'augmentation de l'abondance de *Penicillium* et l'augmentation de la concentration en mycotoxines (Deoxynivalenol et Roquefortine C) au cours de l'aération de l'ensilage de maïs. La Roquefortine C agit comme un bactériostatique sur les bactéries à gram positif (Kopp-Holtwiesche et Rehm, 1990). Jeong *et al.* (2010) ont observé des effets négatifs de la Deoxynivalenol sur le métabolisme de la fermentation de *consortia* provenant du rumen de bovins lors de la production de gaz et d'acides organiques.

Ainsi, à partir de ces éléments, la présence à 220 jours de microorganismes à activité hydrolytique tels que le champignon *Penicillium* et la bactérie du genre *Paenibaccillus* pourrait être à l'origine de la réduction du potentiel H₂ de la biomasse en libérant et en consommant des sucres provenant des parois végétales. Comme le rappellent Ávila et Carvalho (2020), les sucres contenus dans les parois végétales ne sont quasiment pas utilisés par les bactéries lactiques pendant la fermentation lactique de l'ensilage, mais peuvent servir de substrat pour les *Paenibacillium* ou d'autres champignons capables de dégrader la matière végétale. Les *Clostridium* pourraient également dégrader les protéines et utiliser le lactate comme source de carbone (Borreani *et al.*, 2018; McDonald, 1982; Teixeira Franco *et al.*, 2016), mais elles n'ont pas été détectées dans le milieu initial.

1.4. Analyse des métabolites et *consortia* pendant la fermentation obscure

Nous avons établi que les échantillons de biomasse d'ensilage de maïs présentaient des *consortia* bactériens initiaux et des teneurs en métabolites très différents au cours du stockage à 4°C exposé à l'air. Dans cette partie, nous étudions l'évolution du métabolisme et des *consortia* bactériens au cours de la fermentation

obscure, à des moments clés de la production d'H₂ (entre 11 et 24 heures de fermentation). La figure 30 présente l'évolution du métabolisme global et des *consortia* bactériens de la fermentation obscure d'ensilage de maïs aux différents temps de stockage.



<u>Figure 30</u>: Influence de la durée de stockage à 4°C (10 jours, 70 jours, 140 jours et 220 jours) de la biomasse d'ensilage de maïs sur les productions totales de métabolites (a) et les consortia bactériens présents dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation (b). Les productions totales de métabolites sont calculées par la différence de concentration en métabolites dans le milieu final et le milieu initial.

L'analyse des métabolites présents dans le milieu réactionnel (figure 30a) révèle une forte production de butyrate et d'acétate, co-produits de l'H₂. Des composés issus de voies métaboliques non productrices d'H₂ sont détectés en faible concentration (éthanol et propionate). Le lactate présent initialement dans le milieu de fermentation est totalement métabolisé ; les variations de la consommation de lactate sont dues aux teneurs initiales en lactate, qui sont différentes selon le temps de stockage. Comme les rapports molaires H₂/CO₂ des fermentations sont inférieurs à 1 et que la production d'acétate est élevée par rapport à la production d'H₂ (hormis à 140 jours de stockage), il semblerait qu'une partie de l'acétate soit issue d'une voie métabolique non hydrogénogène (homoacétogenèse) à l'instar des travaux de Arooj *et al.* (2008) et de Saady (2013).

Pendant les premiers 140 jours, on constate une diminution de la production d'acétate (de 44,5 mmol/L à 23,0 mmol/L) et d'éthanol (de 13,5 à 3,3 mmol/L) et une augmentation de la quantité de butyrate de (17,9 mmol/L à 24,5 mmol/L) augmentant ainsi le rapport molaire B/A. De manière générale, la quantité de métabolites produits diminue avec le temps de stockage, indiquant une réorientation du métabolisme de la fermentation vers la production d'H₂ par la voie du butyrate et de l'acétate avec un net recul des voies concurrentes : homoacétogenèse et solvantogenèse.

À 220 jours, le rapport B/A redevient favorable à l'acétate suite à la diminution de la production de butyrate et à l'augmentation de la production d'acétate. Les voies métaboliques concurrentes sont modulées

positivement par rapport à la fermentation à 140 jours comme l'illustre l'augmentation de la production d'acétate et d'éthanol.

Ces changements de métabolismes sont associés à des changements importants des *consortia* bactériens présents dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation (figure 30b). Parmi les bactéries identifiées dans le milieu réactionnel à 10 jours, le genre *Clostridium* est le plus abondant (47 %) suivi des bactéries productrices de butyrate appartenant au genre *Coproccocus* (23 %) et des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (23 %).

À 70 jours, l'abondance du genre *Clostridium* est maximale (77 %). On note également la présence de bactéries des genres *Enterococcus, Enterobacter, Escherichia* qui sont identifiés comme des bactéries productrices d'H₂ (Abd-Alla *et al.*, 2019 ; Akroum-Amrouche *et al.*, 2014 ; Bakonyi *et al.*, 2012 ; Jo *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2021 ; Yin et Wang, 2019) alors que les *Lactobacillus* deviennent minoritaires (3 %).

À 140 jours de stockage, le taux de *Clostridium* plafonne à 70 % et la proportion de bactéries non productrices d' H_2 est faible (16 % de *Lactobacillus* à 140 jours).

À 220 jours, l'échantillon présente une population de bactéries assez différente avec une abondance notable de *Pediococcus* (25 %), un genre qui regroupe des bactéries sporogènes qui étaient présentes en faible proportion à 140 jours. Le taux de *Clostridium* est revenu à un niveau comparable à celui de la fermentation effectuée à 10 jours (45 %) et le reste du *consortium* est constitué de *Lactobacillus* (24 %), et de *Coprococcus* et *Microbispora* en très faibles proportions.

Ainsi, la proportion des *Clostridii* est la plus élevée dans les fermentations qui produisent le plus d'H₂ et qui ont la meilleure productivité en H₂. La figure 31 présente l'abondance et la quantité des espèces bactériennes identifiées au cours des fermentations.



<u>Figure 31</u> : Abondance des espèces bactériennes au cours de la fermentation d'ensilage de maïs (a) et analyse du nombre de copies du gène d'ARNr 16S par qPCR (b). Les données de la qPCR sont représentées en échelle logarithmique.

Chapitre 4

La proportion de *Clostridium beijenrencki/butyricum/diolis* dans le *consortium* est stable, entre 19 % et 25 % sauf pour l'échantillon à 70 jours (70 %). Suivant les temps de stockage à 4°C, l'abondance des autres *Clostridium* dans le *consortium* est très variable. A 10 jours, trois espèces sont présentes en quasi équiproportion et à 140 jours, *Clostridium sp.* est majoritaire (47 %). Une diminution de la proportion de *C. ljungdhali* a également lieu au cours du stockage. Comme cette espèce est potentiellement homoacétogène, consommatrice d'H₂ (Kopke *et al.*, 2010), son recul pourrait contribuer à l'amélioration des productions d'H₂ et du métabolisme des fermentations observée jusqu'à 140 jours. Notons enfin à 220 jours, le développement de *Clostridium intestinale*, une *Clostridium* productrice d'H₂ dans le milieu réactionnel (Ramachandran *et al.*, 2011).

Le genre *Lactobacillus* est présent dans tous les prélèvements, mais en très faible proportion à 70 jours. Notons que ce genre bactérien est majoritaire dans la biomasse avant fermentation. Le genre *Lactobacillus* regroupe trois espèces : *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus paracasei*. Comme pour les espèces du genre *Clostridium*, la proportion des espèces de *Lactobacillus* varie suivant les conditions de stockage même si la proportion globale du genre est assez stable. À 10 jours, *Lactobacillus plantarum* est majoritaire au sein du genre (17 %). Au cours du stockage, la part de cette espèce diminue fortement entre 70 jours et 140 jours au profit de *Lactobacillus paracasei* qui atteint 15 % d'abondance dans le *consortium* au terme de 220 jours de stockage. Cette émergence semble corrélée avec l'apparition de *Pediococcus ethanolidurans* et au déclin relatif des autres *Lactobacillus* dans le stock de biomasse conservé à 4°C (figure <u>31</u>). La diminution de l'abondance des bactéries du genre *Clostridium* et la résurgence des bactéries du genre *Lactobacillus* s'explique par la sécrétion de toxines antibiotiques par les organismes eucaryotes (*Penicillium*) auxquelles les *Clostridium* sont très sensibles et les *Lactobacillus* sont très résistants, en particulier *L. paracasei* (Detman *et al.*, 2018).

La qPCR révèle une légère augmentation de la quantité de bactéries en fermentation avec l'augmentation du temps de stockage. Cette augmentation semble décorrélée de la prolifération des procaryotes observée dans la biomasse initiale (figure 31) puisqu'une grande partie des genres bactériens observés en cours de fermentation ne se sont pas identifiés comme majoritaires dans le *consortium* avant fermentation (*Clostridium*, *Coprococcus*).

Notons qu'aucun changement de diversité n'est observable du côté des eucaryotes et les données de la qPCR montrent une diminution du nombre de copies du gène par µL d'ADN au cours de la fermentation obscure (données non présentées). Les conditions de fermentation obscure ne sont donc pas favorables au développement des levures et champignons, qui interviennent pendant la dégradation aérobie de l'ensilage.

1.5. Conclusion sur l'effet de la dégradation aérobie de la biomasse

Ces travaux ont montré les nombreuses variations biochimiques et microbiologiques qui interviennent dans la biomasse d'ensilage de maïs dans le cas où des conditions anaérobies strictes du silo ne seraient pas maintenues. La figure 32 récapitule les modifications intervenues sur la biomasse au cours de cette expérience d'exposition à l'air de l'ensilage de maïs stocké à 4°C.



<u>Figure 32</u> : Effet de la dégradation aérobie de l'ensilage de maïs à 4°C sur le potentiel de production d'H₂, sur le pH initial et sur la teneur initiale totale en métabolites dans le milieu réactionnel selon le temps d'exposition à l'air

La fermentation lactique a été consolidée pendant les 70 premiers jours de stockage avec une légère diminution du pH (figure 32) de la biomasse et une diminution de la diversité des bactéries lactiques au profit du genre *Lactobacillus,* ce qui a permis une augmentation des performances de la fermentation obscure. La dégradation aérobie de l'ensilage de maïs s'est ensuite mise en place et est caractérisée par une augmentation du pH consécutive à la consommation des acides présents dans la biomasse (figure 32). Cette dégradation est initiée par la levure *Pichia fermantans* et permet d'obtenir un optimum de rendement d'H₂ par fermentation endogène (43,7 L/kg_{MS}, soit +94 % par rapport à la référence). Le métabolisme de ces fermentations s'avère beaucoup plus efficace et orienté vers la production d'H₂ par la voie du butyrate avec une diminution notable de la voie de production d'acétate par homoacétogenèse et les *consortia* fermentaires s'enrichissent en bactéries productrices d'H₂ appartenant au genre *Clostridium*.

À partir de 140 jours, la dégradation de la biomasse s'accélère, les conditions de pH et d'aération étant désormais favorables à la prolifération de microorganismes (bactéries hydrolytiques et champignons) capables de dégrader les parois végétales. Ainsi, cette hydrolyse conjuguée à la consommation progressive des sucres libérés aboutit à l'appauvrissement de la biomasse, qui entraîne une baisse des performances de production d'H₂, proches de la référence à 10 jours de stockage, une réorientation du métabolisme vers des voies non productrices d'H₂ et une réduction de l'abondance relative des bactéries productrices d'H₂.

2. Prétraitement d'aération forcée de l'ensilage de maïs et augmentation de la production d'hydrogène

2.1. Contexte

Pour confirmer le bénéfice de l'aération sur le potentiel de production d'H₂ de la biomasse qui a eu lieu au cours du temps lors de la dégradation aérobie de l'ensilage, une série de fermentations est réalisée avec de la biomasse aérée de façon active.

Les prétraitements d'exposition de la biomasse à l'air libre suscitent un réel intérêt dans la littérature et plusieurs études utilisant des biomasses de maïs (Fan *et al.*, 2008 ; Pan *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2007) envisagent l'aération des *inocula* bactériens comme un prétraitement qui améliore la production d'H₂ par fermentation obscure (Zhang *et al.*, 2007).

L'aération consiste à exposer la biomasse et ses *consortia* endogènes à l'O₂, augmentant ainsi le potentiel red/ox du milieu. La présence d'oxygène génère une pression de sélection pour les *consortia* qui se sont développés en anoxie dans le silo. L'objectif est d'inhiber les bactéries qui ne résistent pas à l'oxygène et de sélectionner les bactéries sporulantes productrices d'H₂ (*Clostridium*) (Bundhoo *et al.*, 2015). Cette conjecture vient de l'idée généralement admise que les bactéries méthanogènes, les sulfato-réductrices et les bactéries homoacétogènes sont anaérobies strictes (Peters et Conrad, 1995).

2.2. Potentiel de production d'hydrogène de la biomasse aérée

Les biomasses utilisées ont été stockées à -20°C pour prévenir tout phénomène de dégradation avant fermentation. L'ensilage de maïs est aéré pendant 17 heures sous sorbonne avec un débit d'extraction de 0,4 m/s. Une série de 5 réplicats est effectuée pour avoir une bonne vision de l'effet de l'aération active sur les performances de production d'H₂ de l'ensilage de maïs. Ces tests de fermentation sont comparés avec ceux réalisés sur la biomasse de référence (ensilage de maïs congelé) non aérée. Une étude détaillée de l'effet de la congélation sur la fermentation obscure d'ensilage de maïs est présentée en annexe.

La figure 33 présente l'effet de l'aération active de l'ensilage de maïs sur le débit de production d'H₂ lors de la fermentation obscure.



<u>Figure 33</u> : Effet de l'aération de la biomasse d'ensilage de maïs congelée sur l'évolution des débits de production d'H₂ (a) et sur la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel des tests de fermentation de biomasse aérée (b) en fonction du temps

L'ensilage de maïs étant une biomasse hétérogène, la production d'H₂ s'effectue en deux phases (figure 33a). Au cours de la première phase de production (de 10 h à 30 h), les profils obtenus sont similaires. Le prétraitement d'aération impacte plutôt la seconde phase de production (entre 30 h et 50 h) où les débits d'H₂ analysés varient, mais restent supérieurs à ceux de la référence. Ainsi, le surplus de production d'H₂ consécutif au prétraitement d'aération est généré principalement au cours de la seconde phase de production.

Les deux phases de production de gaz décrites précédemment semblent se confirmer également au niveau du métabolisme. En effet, la première phase de production est caractérisée par le métabolisme « habituel » de la fermentation d'ensilage de maïs, à savoir une production d'H₂ par la voie du butyrate, un rapport molaire B/A d'environ 1, une consommation du lactate et une production d'éthanol faible. La seconde phase de production d'H₂ est plus favorable aux voies métaboliques non productrices d'H₂ (homoacétogenèse et solvantogenèse). La solvantogenèse pourrait être favorisée par l'absence initiale d'éthanol dans le milieu et par la teneur importante du milieu en acétate. En effet, après accumulation d'acétate dans le milieu réactionnel, la solvantogénèse est la voie métabolique privilégiée pour régénérer le NADH en NAD⁺ (Yoo, 2016).

Le tableau 16 présente l'effet de l'aération sur la production et le rendement en H₂ et sur les paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs.

<u>Tableau 16</u> : Production et rendement en H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs congelé (référence) et congelé/aéré

Biomasse	Production d'H ₂	Render	nent d'H2	Productivité max	Latence (λ)	Rapport
Diomasse	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(mL H ₂ /g _{мs})	mol _{H2} /mol _{sucres}	(mL H₂/L/h)	(h)	H ₂ /CO ₂
Maïs congelé et aéré	957 ± 233	40,6 ± 9,9	0,38 ± 0,09	72 ± 17	9,8 ± 1,4	0,49 ± 0,14
Maïs congelé	690 ± 80	29,1 ± 3,4	0,27 ± 0,03	60 ± 13	9,0 ± 1,0	0,57 ± 0,12

Le prétraitement d'aération permet d'améliorer significativement le rendement en H_2 de la biomasse en fermentation endogène. Les productivités maximales en H_2 pour la biomasse aérée et la référence sont proches. Le temps de latence est légèrement augmenté (une heure environ), conséquence de l'exposition à l'air. Le rapport molaire H_2/CO_2 , voisin de 0,5, est légèrement plus faible que la référence.

Ainsi, l'effet de l'aération active semble bénéfique pour le potentiel H_2 de la biomasse. Notons cependant que les productions finales cumulées d' H_2 sont variables et s'échelonnent de 747 à 1347 $mL_{H2}/L_{bioréacteur}$. L'aération permettrait d'obtenir des gains de production pouvant s'élever jusqu'à +95 %, un ordre de grandeur similaire avec ce qui a été observé pour la biomasse stockée 140 jours à 4°C (optimum de production d' H_2).

Dans la littérature, plusieurs études ont porté sur l'impact du prétraitement d'aération de l'*inoculum* bactérien exclusivement, provenant de diverses origines (boues anaérobies et activées et fumiers compostés ou non) sur la production d'H₂ à partir de substrats modèles (glucose, saccharose, cellulose) ou de biomasses issues de cultures du maïs (pailles, rafles, maïs rassis) ayant subi des prétraitements de broyage ou d'hydrolyse. Le tableau 17 résume l'effet de l'aération de l'*inoculum* bactérien sur les productions d'H₂. Notre étude se distingue de la littérature puisqu'elle est la seule à tester le prétraitement d'aération sur les *consortia* bactériens et la biomasse pour une fermentation endogène.

Inoculum	Prétraitements	Rendement en H ₂	Référence
Boues anaérobies	<u>Substrat</u> : saccharose (10 g/L) Prétraitement : 0,5 h, aération	Contrôle : 344 mL/g _{glucose} (2,58 mol/mol _{éq. hexose}) Traité : 322 mL/g _{glucose} (2,42 mol/mol _{éq. hexose}) Δ = - 6,2 %	Zhu et Beland (2006)
Boues anaérobies Boues compostées	<u>Substrat</u> : cellulose en poudre (10 g/L) Prétraitement : Aération forcée	BA : 45,4 mL/g _{glucose} BC : 193 mL/g _{glucose} Δ = N.A.	Ueno <i>et al</i> . (1995)
Fumier de bovins composté	<u>Substrat</u> : saccharose (10 g/L) Prétraitement : 72 h, aération en milieu liquide	Contrôle : N.A. Traité : 248 mL/g _{saccharose} Δ = N.A.	Song <i>et al.</i> (2012)
Boues anaérobies	<u>Substrat</u> : glucose (1 g/batch) Prétraitement : 24 h, aération	Inoculum enrichi sur glucose Contrôle : N.A. Traité : 256,6 mL/g _{saccharose} Δ = N.A. Contrôle : 65,7 mL /g _{glucose} Traité : 80,2 mL/g _{glucose} Δ = 22,0 %	Wang et Wan (2008)
Boues anaérobies	<u>Substrat</u> : glucose (10 g/L) Prétraitement : Aération répétée en milieu liquide	<i>Inoculum</i> enrichi sur glucose (12h) Contrôle : 209 mL/g _{glucose} (1,57 mol/mol _{glucose}) Traité : 261 mL/g _{glucose} (1,96 mol/mol _{glucose}) Λ = 24.4 %	Ren <i>et al</i> . (2008)
Boues activées de STEP	<u>Substrat</u> : glucose (10 g/L) Prétraitement : 24 h, aération	Contrôle : 32,7 mL/g _{glucose} Traité : 73,6 mL/g _{glucose} Δ = 125,1 %	Chang <i>et al.</i> (2011)
Boues anaérobies	<u>Substrat</u> : glucose Prétraitement : 2 jours-14 jours, aération (100 L _{air} /L _{inoculum} /h)	Contrôle (2 jours) : 67 mL/g _{DCO glucose} Traité (12 jours) : 142 mL/g _{DCO glucose} Δ = 112,0 %	Giordano <i>et al.</i> (2014)
Boues anaérobies	<u>Substrat</u> : mixture de poudre de riz et de salade Prétraitement : 2 h, aération sous pompe	Contrôle : 18,8 mL/g _{MV} Traité : 23,0 mL/g _{MV} Δ = 22,3 %	Dong <i>et al.</i> (2010)
Fumier de bovins composté	<u>Substrat</u> : paille de maïs hydrolysée (15 g/L) Prétraitement : 3 h (50°C), aération sous	Contrôle : N.A. Traité : 149,7 mL/g _{MV} Δ = N.A.	Zhang <i>et al.</i> (2007)
Fumier de bovins	pompe <u>Substrat</u> : rafle de maïs broyée Prétraitement : 24 h, aération sous pompe	Inoculum enrichi sur saccharose (12h-20h) Contrôle : N.A. Traité : 13,1 mL/g _{MV} Δ = N.A.	Pan <i>et al.</i> (2010)
Fumier de Panda	<u>Substrat</u> : paille de maïs broyée (15 g/L) Prétraitement : 24 h, aération sous pompe	Inoculum enrichi sur glucose (48h-72h) Contrôle : N.A. Traité : 20 mL/g _{MS} Δ = N.A.	Fan <i>et al.</i> (2008)
Fumier composté	<u>Substrat</u> : maïs rassis broyé (10 g/L) Contrôle : 3 h en milieu liquide Prétraitement : 96 h, aération forcée en milieu liquide	Contrôle : 75 mL/g _{substrat} Traité : 194 mL/g _{substrat} Δ = 159 %	Wang <i>et al</i> . (2012)
	<u>Substrat</u> : maïs rassis saccharifié (10 g/L) Contrôle : 3 h en milieu liquide Prétraitement : 96 h, aération forcée en milieu liquide	Contrôle : 265 mL/g _{substrat} Traité : 250 mL/g _{substrat} Δ = - 6 %	
Flore endogène	<u>Substrat</u> : ensilage de maïs (71,5 g/L) Prétraitement : 16 h, aération sous sorbonne	Contrôle : 30,4 mL/g _{MV} (9,6 mL/g) Traité : 43,3 mL/g _{MV} (13,3 mL/g) Δ = 42 ± 35 %	Cette étude

N.A. : non applicable (données manquantes)

Le premier facteur de différenciation entre les études est le temps d'aération. Celui-ci s'échelonne de 30 minutes à plusieurs jours. Giordano *et al.* (2014) étudient l'impact du temps d'aération et trouvent un optimum de rendement de 142 mL_{H2}/g COD _{glucose} après 14 jours d'aération (+112 %).

Le second facteur de différenciation est le mode d'aération. Notons qu'il est difficile d'évaluer l'efficacité de l'aération d'une étude à l'autre, compte tenu du manque de données précises et de protocoles standardisés pour l'aération. Seuls Giordano *et al.* (2014) rapportent précisément le débit d'air utilisé. L'aération s'effectue sur *l'inoculum* bactérien brut ou dilué et peut être couplée à d'autres prétraitements tels qu'un choc thermique (Zhang *et al.*, 2007) et l'enrichissement sur un milieu riche en sucres (Pan *et al.*, 2010 ; Fan *et al.*, 2008 ; Ren *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2012).

Pour la plupart des études, l'aération améliore la production d'H₂ de la biomasse avec des gains de production variables de +22 % à +150 %. Nos données sont tout à fait conformes à la littérature. Le bénéfice de l'aération semble lié à l'efficacité de production d'H₂ de l'*inoculum* témoin (non aéré). Les études qui présentent de bonnes productions avec *l'inoculum* témoin (60 mL/g_{glucose} et 1,57 mol/mol_{glucose}) obtiennent un gain de production d'environ 20 % (Dong *et al.*, 2010 ; Ren *et al.*, 2008 ; Wang et Wan, 2008) alors que quand *l'inoculum* témoin présente des productions faibles, l'aération permet de doubler la production (+120 %) (Chang *et al.*, 2011 ; Giordano *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2012).

L'effet de l'aération de l'inoculum sur la production d'H₂ ne semble pas dépendre de la nature du substrat (substrat modèle ou substrat réel). En effet, pour ces deux types de substrats l'aération permet des gains variables de production d'H₂ s'échelonnant de -6,2 % à +125 % avec des substrats modèles et de -6,0 % à +159 % avec des substrats réels. Parmi les études mettant en œuvre un substrat réel, Wang *et al.* (2012) observent, sur une biomasse de maïs rassis broyé, des gains de production d'H₂ très différents à partir d'un *inoculum* de fumier composté lors de la fermentation selon le prétraitement de la biomasse : +159 % sans saccharification et -6,0 % avec saccharification enzymatique. Ce résultat supposerait que l'aération a sélectionné des *consortia* bactériens contenant des bactéries hydrolytiques spécifiques au substrat non saccharifié qui permettent un gain de production d'H₂ significatif. Néanmoins, les auteurs de l'étude n'apportent pas d'information supplémentaire par rapport au métabolisme ou à la nature des *consortia* fermentaires pour expliquer ces variations ou valider cette hypothèse.

Par ailleurs, l'aération ne semble pas améliorer significativement la productivité en hydrogène (Dong *et al.*, 2010 ; Wang et Wan, 2008), ce qui est cohérent avec nos résultats. Seuls Chang *et al*. (2011) notent pour leur part une augmentation significative de la productivité (de 2,54 à 15,16 mL_{H2}/L/h).

Enfin, nous avons pu observer que les résidus de la plante de maïs (paille, rafle, maïs rassis) ont été utilisés dans 4 études pour tester l'effet de l'aération de l'*inoculum* sur la production d'H₂. Les résidus de maïs broyés présentent des rendements en H₂ faibles (13,1 et 20 mL_{H2}/g_{MS}) en comparaison des résidus ayant subi des prétraitements plus poussés tels que l'hydrolyse ou la saccharification qui obtiennent des rendements plus

élevés (149,7 mL_{H2}/g_{MV} et 250 mL_{H2}/g_{substrat}). Le rendement de production de notre biomasse, qui n'a pas subi de prétraitement autre que l'aération, se situe dans la fourchette basse (43,3 mL/g_{MV}).

2.3. Analyse des métabolites et consortia pendant la fermentation obscure

La figure 34 présente un comparatif du potentiel H₂ de l'ensilage de maïs congelé (référence) et de celui de l'ensilage de maïs congelé et aéré de façon active.



<u>Figure 34</u> : Effet de l'aération de l'ensilage de maïs congelé sur la production de métabolites (a) et les consortia fermentaires prélevés entre 22 h et 24 h (b). Les barres indiquent la variabilité (référence n=4 ; aéré n= 5).

Concernant les métabolites (figure 34a), l'acétate et le butyrate sont les acides majoritaires produits à l'issue de la fermentation. La quantité de ces deux acides, respectivement +51,8 mmol/L et +28,7 mmol/L est significativement supérieure lors de la fermentation d'ensilage de maïs aéré (contre +26,6 et +20,5 mmol/L dans le test de référence). L'augmentation de la production de butyrate est d'ailleurs cohérente avec l'augmentation de la production d'H₂. De manière générale, l'aération semble avoir augmenté la production de gaz et de métabolites (acétate, butyrate, éthanol) par rapport à la référence à l'exception du propionate (voie hydrogénotrophe), qui est moins produit (< 5 mmol/L). Nous avions montré précédemment que le métabolisme de la deuxième phase de production des tests de fermentation était beaucoup plus marqué par l'homoacétogenèse et la solvantogenèse que par la production de butyrate, ceci explique d'une part, la surproduction d'éthanol et d'acétate dans les tests de fermentation de biomasse aérée et d'autre part, la diminution du rapport molaire H₂/CO₂ global de la fermentation.

Ce constat est également relevé dans la littérature. En effet, Chang *et al.* (2011), Ren *et al.* (2008) et Wang et Wan (2008) observent une production accrue d'éthanol dans le fermentât après traitement de l'*inoculum* par aération. Ces données, corrélées avec l'augmentation de la production d'acétate, rendent compte d'un métabolisme typique de la solvantogenèse puisque, dans ces études, la quantité de butyrate diminue. Bien que le métabolisme s'oriente naturellement, en fin de fermentation vers des voies non productrices d'H₂, ce

changement métabolique est observé de manière accrue en fin de fermentation pour nos expériences de biomasses aérées. Ainsi, l'aération permet d'améliorer la production d'H₂ à partir de l'ensilage de maïs malgré un métabolisme global moins efficace lié à une activité importante de voies non hydrogénogènes en fin de fermentation.

Les consortia bactériens identifiés en cours de fermentation (à 22 et 24 h) sont assez similaires, d'un point de vue qualitatif, entre la référence et la biomasse aérée (figure 34b). Les bactéries du genre Clostridium sont majoritaires dans le fermentât (environ 50 % d'abondance) et sont légèrement plus abondantes pour la biomasse aérée. Parmi les bactéries du genre Clostridium, l'aération permet d'enrichir significativement le consortium en Clostridium butyricum (de 13 % à 29 % d'abondance relative) et d'inhiber le développement de Clostridium ljungdahlii, une bactérie homoacétogène consommatrice d'H₂ (Kopke et al., 2010) qui représentait 7 % du consortium bactérien de la référence. Cette observation complète les travaux de Sparling (1997), qui suggèrent que certaines Clostridium sont sensibles à l'O2 et peuvent être inhibées pendant un traitement aérobie, notamment Clostridium thermocellum. De manière remarquable, l'espèce de Clostridium inhibée suite au traitement aérobie est celle qui ne produirait pas d'H₂. Des Enterococcus sont également détectés en proportions importantes (29 % et 25 %). Ces bactéries productrices d'H₂ dont le métabolisme est favorable à la production d'acétate pourraient expliquer les fortes quantités d'acétate détectées dans le milieu réactionnel (Valdez-Vazquez et al., 2015 ; Yin et Wang, 2019b, 2016). Parmi les taxa identifiés en plus faible proportion, on trouve des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (18 % et 15 %) et des bactéries hydrolytiques et productrices d'acétate de la famille des Lachnospiraceae (< 10 %) (Palomo-Briones et al., 2017 ; Suksong et al., 2019). Notons enfin l'absence de bactéries sporogènes ou hydrolytiques observées dans l'ensilage de maïs dégradé ou de Lactobacillus dont le développement a été inhibé par la congélation.

Après aération et prétraitement, Zhang *et al.* (2007) isolent également deux types de bactéries sporulantes avec des morphologies différentes qui s'avèrent appartenir au genre *Clostridium*. De la même manière, Wang *et al.* (2012) ont pu isoler et observer deux bactéries anaérobies facultatives qui appartiendraient respectivement aux *Clostridium* et aux *Enterobacter*, ce qui est cohérent avec les bactéries majoritaires détectées dans notre étude.

Conformément aux données métaboliques sur l'accroissement de la solvantogenèse des *consortia* prétraités par aérobie, Ren *et al.* (2008) observent un enrichissement des *consortia* en bactéries productrices d'H₂ effectuant également la fermentation éthanolique : *Ethanoligenens harbinens* qui n'ont pas été observées dans notre *consortia*.

Enfin, dans la plupart des études, l'activité des méthanogènes *i.e.* la détection de méthane, a été totalement inhibée (Pan *et al.*, 2010 ; Fan *et al.*, 2008 ; Ren *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2007, Ueno *et al.*, 1995 ; Chang *et al.*, 2011 ; Giordano *et al.*, 2014). L'efficacité du traitement aérobie sur les méthanogènes est donc

importante. Cet effet n'a pas été étudié dans notre étude puisqu'aucune trace de méthane n'était déjà présente dans la fermentation de référence.

Pour conclure, le traitement aérobie des *inocula* bactériens permet de sélectionner des bactéries productrices d'H₂. Il est donc favorable à l'amélioration de la production d'H₂ et a permis de raffiner les *consortia* fermentaires en inhibant *Clostridium ljungdahlii*, la bactérie consommatrice d'H₂ au profit du développement de *Clostridium butyricum*.

L'aération forcée de la biomasse s'est donc révélée être un bon prétraitement pour améliorer significativement le potentiel de production H₂ de l'ensilage de maïs par une fermentation obscure endogène à la biomasse. Ces observations mettent en évidence la robustesse du procédé global en termes d'approvisionnement de la biomasse. En effet, celle-ci peut donc être exposée à l'air libre sur de courte durée sans perte de potentiel d'H₂, ceci étant fréquent après l'ouverture du silo et pendant le transport de la biomasse vers le bioréacteur.

3. Analyses des corrélations entre les données issues des fermentations

Les données issues des fermentations présentées (dégradation lente en aérobie à 4°C et aération forcée) ont fait l'objet d'une analyse statistique pour étudier les corrélations entre production de gaz/métabolites produits/*consortia bactériens*. La figure 35 présente une analyse en composante principale construite sur les corrélations de Pearson avec les données normalisées, ce qui permet d'identifier les corrélations entre les variables étudiées.



<u>Figure 35</u> : Analyse en composante principale des données de production de gaz, de métabolites et des consortia fermentaires pour l'ensilage de maïs congelé, exposé à l'air (10 jours, 70 jours, 140 jours, 220 jours) et traité par aération forcée (16 h).

Chapitre 4

Les deux composantes F1 et F2 de l'ACP présentées sur la figure 35 sont suffisantes pour expliquer plus de 70 % de la variabilité totale. Trois groupes de variables peuvent être identifiés sur l'ACP de la figure 35. Le premier groupe (figure 35, cadre bleu) rassemble des indicateurs de performance de la fermentation obscure (productivité d'H₂, rapport molaire H₂/CO₂) corrélés à l'abondance des bactéries du genre *Clostridium* dans le *consortium* fermentaire. Cette corrélation est logique étant donné que la majorité des bactéries du genre *Clostridium* identifiées sont productrices d'H₂ à l'exception de *Clostridium ljungdahlii* et cohérente avec plusieurs études qui associent, corrélation à l'appui, la production d'H₂ avec l'abondance des bactéries du genre *Clostridium* (Dauptain *et al.*, 2020 ; Etchebehere *et al.*, 2016 ; Park *et al.*, 2014 ; Yang et Wang, 2019). De façon simplifiée, la production de butyrate serait également liée à la production d'H₂ signifiant que la production d'H₂ s'effectue *via* cette voie (Guo *et al.*, 2014). La variable correspondant à l'abondance des *Enterobacter* n'est pas assez bien représentée et n'est donc pas interprétable en termes de corrélation avec les autres variables.

Le second groupe (figure 35, cadre rouge) comprend des métabolites issus de voies non productrices d'H₂ (éthanol), consommatrices d'H₂ (propionate) et des genres de bactéries *a priori* producteurs d'H₂ (*Escherichia* et *Enterococcus*). La production d'acétate est plus difficile à discuter puisque ce métabolite peut être synthétisé aussi bien par des voies hydrogénogènes qu'hydrogénotrophes (Arooj *et al.*, 2008 ; Guo *et al.*, 2014). Il semble que dans notre étude, il soit principalement lié à l'homoacétogenèse. L'ACP permet d'établir une relation entre la production d'acétate et l'abondance d'*Enterococcus*. Cette corrélation est pertinente puisque plusieurs études ont montré que le métabolisme fermentaire des bactéries du genre *Enterococcus* est favorable à la production d'acétate sans production d'H₂ (Valdez-Vazquez *et al.*, 2015 ; Yin et Wang, 2016 ; Yin et Wang, 2019).

Le dernier groupe (figure 35, cadre violet) réunit la production de lactate avec l'abondance des bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Pediococcus*). La production de lactate est également anti corrélée à la production de butyrate. Il avait été établi précédemment que le lactate présent dans le milieu réactionnel initial était consommé au cours de la fermentation. Ainsi, cette anti corrélation confirme que le lactate est bien converti en butyrate et en H₂ au cours de la fermentation obscure (Chapitre III, paragraphe 4.3, Detman *et al.*, 2019 ; Fuess *et al.*, 2018 ; Matsumoto et Nishimura, 2007).

4. Conclusion

Au cours de cette étude, une dégradation aérobie lente de l'ensilage de maïs a été reproduite en condition laboratoire et à 4°C. Les principaux biomarqueurs de la dégradation aérobie de l'ensilage ont été observés : la consommation des acides organiques présents dans l'ensilage (acide lactique et acide acétique) associée à la neutralisation du pH, la prolifération de levures (*Pichia fermentans*) et de moisissures (*Penicillium*) dans la biomasse et l'apparition de bactéries hydrolytiques (*Paenibacillus*) dont les conditions optimales de croissance ne sont pas adaptées au pH acide (pH < 4) de l'ensilage conservé en conditions anaérobies.

Les expériences de fermentation endogène ont mis en évidence des variations de potentiel de production $d'H_2$ de la biomasse exposée à l'air.

À 70 jours de stockage à 4°C, la production d'H₂ a augmenté (de 535 ± 2 à 920 ± 25 mL_{H2}/L_{bioréacteur}) ; ceci est liée à la sélection de bactéries résistantes à l'air et productrices d'hydrogène. On note un enrichissement du *consortia* fermentaire en bactéries du genre *Clostridium*. Au sein du genre *Clostridium*, il est observé un net recul de la bactérie hydrogénotrophe *C. ljungdahlii*, un phénomène également relevé lors de l'aération forcée de la biomasse. Par ailleurs, les conditions de stockage de la biomasse dans le vial restent relativement stables : la production d'acides s'est poursuivie comme le confirme la diminution du pH par rapport à la référence, ce qui signifie que la dégradation aérobie de la biomasse d'ensilage de maïs n'est pas encore significative. L'aération forcée pendant 16h sous sorbonne de la biomasse congelée a permis d'obtenir une production d'hydrogène (957 ± 233 mL_{H2}/L_{bioréacteur}) proche de celle obtenue avec la biomasse exposée à l'air et à 4°C pendant 70 jours, ce qui représente un gain de temps si ce mode de traitement est retenu. L'aération forcée cible les bactéries de la flore endogène de la biomasse et a permis d'intensifier la production d'H₂ (+40 %) en sélectionnant les *consortia* fermentaires corroborant ainsi les données de la littérature sur le sujet.

À 140 jours d'exposition à l'air, on note une augmentation de la production d'H₂ de 13 % par rapport à 70 jours, ce qui est assez modeste et qui représente cependant un gain de +93 % (1037 ± 38 mL_{H2}/L_{bioréacteur}) par rapport à la référence. Cette augmentation semble liée d'une part à une amélioration du métabolisme avec un recul de l'homoacétogenèse et de la production d'éthanol, ce qui contraste avec les effets observés lors de l'aération forcée de la biomasse et d'autre part, à un prétraitement biologique de la biomasse par la levure *Pichia fermentans* qui aboutit la consommation des acides et à une hydrolyse de la structure végétale de la biomasse.

À 220 jours, la chute de la production d'H₂ semble liée à la prolifération de bactéries sporogènes et hydrolytiques, de levures et de champignons, qui ont dégradé et appauvri la biomasse en plus d'une probable sécrétion de substances antimicrobiennes par *Penicillium*. La présence de ces molécules semble avoir inhibée partiellement la croissance des bactéries productrices d'H₂ du genre *Clostridium* au cours de la fermentation obscure et sélectionné des bactéries lactiques (*L. paracasei*).

Au terme de cette étude, il apparaît que l'effet de l'exposition à l'air de l'ensilage sur la production d'H₂ par fermentation endogène est un phénomène de réactions en chaîne entre les paramètres biochimiques et microbiologiques de la biomasse. L'aération agit comme un prétraitement de la flore endogène initiale composée majoritairement de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* qui favorise l'émergence, au cours de la fermentation obscure, de bactéries résistantes à l'air parmi lesquelles on retrouve des bactéries productrices d'H₂ du genre *Clostridium*. Si l'exposition à l'air est prolongée, des modifications biochimiques

de la biomasse, notamment la neutralisation du pH, interviennent suite à la prolifération des microorganismes aérobies (*Pichia fermentans*). Ces nouvelles conditions permettent d'obtenir de meilleurs rendements de production d'hydrogène. Ils sont aussi favorables, si l'aération se poursuit, au développement de microorganismes hydrolytiques (*Penicillium, Paenibacillus*), qui dégradent la biomasse et produisent des substances antibactériennes inhibant les bactéries productrices d'H₂ et réduisant sur le long terme la production.

Ces résultats montrent que la fermentation obscure peut être une voie de valorisation énergétique de l'ensilage de maïs exposé à l'air. Ainsi, le prétraitement aérobie pourrait être favorable à la production d'H₂ par fermentation endogène s'il est correctement implémenté *i.e.* sans aller jusqu'à la dégradation aérobie de la biomasse et à la prolifération de champignons capables d'inhiber les bactéries productrices d'H₂.

Pour s'affranchir des phénomènes d'aération et ainsi disposer d'une qualité de biomasse stable et d'un potentiel de production d'H₂ reproductible au cours du temps, la biomasse d'ensilage de maïs a été stockée à -20°C (Annexe 2). La comparaison des productions de gaz, de métabolites et des *consortia* fermentaires de la biomasse congelée par rapport à la biomasse « fraîche » a montré une légère amélioration de la production d'H₂, qui s'explique par un métabolisme plus efficace ainsi qu'une plus grande abondance de bactéries productrices d'H₂ parmi les communautés bactériennes fermentaires. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que la congélation peut être utilisée également comme un prétraitement pour enrichir les *inocula* bactériens issus de milieux anaérobies en bactéries productrices d'H₂ (Dong *et al.*, 2010). Pour la suite des expériences, la stabilisation de la biomasse par congélation sera privilégiée.

Chapitre 4

Chapitre V : Fermentation de substrat modèle en BRM

Ce chapitre présente le dispositif de bioproduction d'H₂ (BRM), breveté par le laboratoire. Avant la mise en œuvre des biomasses ciblées, nous proposons une étape d'amélioration conceptuelle et quantitative des paramètres de fonctionnement du procédé en utilisant pour substrat modèle le glucose.

1. Introduction

La conception du bioréacteur joue un rôle prépondérant pour une production efficace d'H₂ en mode continu. Deux paramètres majeurs pour le fonctionnement des bioréacteurs continus ont été identifiés dans la littérature : le maintien d'une faible pression partielle en H₂ dans le milieu réactionnel (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012) et la stabilisation d'un *consortium* bactérien robuste et riche en bactéries productrices d'H₂ dans le bioréacteur (Ramírez-Morales *et al.*, 2015).

Afin de répondre aux exigences d'extraction d'hydrogène *in situ* et d'immobilisation bactérienne, un bioréacteur à membrane liquide/gaz (BRM L/G) fonctionnant en continu et composé d'un module de fibres creuses a été développé et breveté dans notre laboratoire (Ernst *et al.*, 2015).

La spécificité de ce réacteur est d'intégrer en une seule unité à la fois la bioproduction d'hydrogène dans la calandre et l'extraction *in situ* des gaz par séparation membranaire, dans la lumière des fibres pour éviter son utilisation dans le milieu et promouvoir la production de bactéries productrices d'H₂. Ce système constitue un contacteur liquide-gaz original pour la production d'hydrogène par fermentation obscure.

Le bioréacteur a également des caractéristiques de réacteur à flux ascendant pour l'immobilisation des bactéries. En effet des couches de bactéries se développent sur les fibres (réacteur à lit fixe), des bactéries se développent en suspension dans le milieu liquide et des agrégats bactériens sont observés au fond du module (réacteur ascendant à lit de boues) (Renaudie *et al.*, 2021b). Cette configuration promeut la croissance de la biomasse bactérienne et limite le lessivage et ne nécessite pas de système d'agitation mécanique par rapport à un réacteur agité (CSTR, Clion, 2016). La membrane a donc un double rôle : extraire les gaz afin de maintenir une pression partielle en hydrogène faible dans le bioréacteur et servir de support de croissance aux bactéries.

Les travaux présentés dans cette partie concernent la production d'H₂ continue en bioréacteur membranaire avec un substrat modèle (solution de glucose). Cette étude vise à tester plusieurs configurations pour améliorer le fonctionnement du BRM. La productivité en H₂ du bioréacteur et le métabolisme des *consortia* fermentaires permettront d'évaluer les performances des tests de fermentation. Les paramètres suivants sont évalués au sein du BRM L/G :

• configuration de la recirculation de l'effluent liquide ;

- débits d'alimentation en substrat par variation du temps de séjour hydraulique (TSH) afin d'explorer les limites opératoires de fonctionnement ;
- la surface membranaire utilisée.

Par ailleurs, dans l'optique de mettre en œuvre un substrat à base d'ensilage de maïs dans le BRM, un substrat modèle contenant du lactate sera testé.

Une étude sur la configuration de la recirculation de l'effluent liquide est présentée à l'annexe 4.

Enfin, une analyse statistique des données présentées permettra d'identifier les principales corrélations entre les paramètres d'alimentation, de production d'hydrogène et de métabolisme fermentaire.

Les expériences ont été conduites dans un BRM L/G similaire à celui utilisé dans l'étude de Renaudie *et al.* (2021a, 2021b). Le BRM, utilisé pour réaliser cette étude, a été ensemencé en septembre 2017 et utilisé sans réensemencement après un an et demi d'arrêt.

2. Effet du TSH à une concentration d'alimentation en sucres de 14 g/L

Du point de vue du procédé, les recherches conduites au laboratoire sur le bioréacteur membranaire se sont concentrées sur l'optimisation du débit d'alimentation substrat (DAS) et du temps de séjour hydraulique TSH indépendamment l'un de l'autre et ont notamment identifié une corrélation entre la concentration en glucose dans l'alimentation et le rendement du bioréacteur en hydrogène. Le rendement optimal est obtenu à une teneur de 14 g_{glucose}/L (1,37 mol_{H2}/mol_{glucose consommé}). Ce test avait été effectué à un TSH de 8 h équivalent à un débit d'alimentation substrat de 1,75 g/L/h (Renaudie *et al.*, 2021a). Dans cette partie, nous proposons d'approfondir le fonctionnement du BRM à cette concentration dans l'alimentation et étudierons l'impact de la réduction du TSH associé à une augmentation simultanée du DAS sur la productivité et le rendement en H₂.

Plusieurs études dans la littérature ont étudié l'impact du TSH pour une concentration en substrat fixée dans l'alimentation (Anburajan *et al.*, 2017 ; Bakonyi *et al.*, 2015 ; Chang *et al.*, 2002 ; Keskin *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2006 ; Pugazhendhi *et al.*, 2017 ; Si *et al.*, 2015 ; Tomczak *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2006). Notons tout d'abord que les plages de variations des TSH varient logiquement selon les types de bioréacteur. Ainsi, les CSTR sont testés avec des temps de séjour longs par exemple de 12 h à 92 h et de 6 h à 50 h respectivement dans les études de Bakonyi *et al.* (2015) et de Zhang *et al.* (2006). Les bioréacteurs à biomasse immobilisée sont alimentés avec des temps de séjour courts jusqu'à 1 h pour l'étude Chang *et al.* (2002) et 2 h pour les travaux de Li *et al.* (2006) et Si *et al.* (2015). Pour tous les types de bioréacteurs, la réduction du TSH est le plus souvent associée à une augmentation de la productivité en H₂. Celle-ci atteint un optimum qui peut correspondre également à l'optimum de rendement en H₂ (Keskin *et al.*, 2011). Par exemple, Li *et al.*, (2006) maintiennent leur rendement malgré la réduction de TSH de 6 h à 2 h. Toutefois, plusieurs études relèvent une diminution du rendement en H₂ avec l'augmentation du DAS (*i.e.* par

diminution du TSH) en raison de l'inhibition des voies de production d'H₂ : en CSTR, Bakonyi *et al.* (2015) observent une baisse du rendement d'un facteur 3 (de 1,13 à 0,34 mol_{H2}/mol_{glucose ajouté}) consécutivement à une réduction du TSH de 92 h à 12 h et Kumar *et al.* (2014) relèvent une chute de rendement en H₂ de 1,62 à 0,60 mol_{H2}/mol_{glucose ajouté} lors de la diminution du TSH de 18 h à 6 h.

Notre objectif sera ainsi de déterminer l'impact du DAS, conjointement aux variations du TSH à une concentration en glucose fixée dans l'alimentation, sur la productivité, le rendement en H₂ et sur le métabolisme des *consortia* fermentaires. Ces tests de fermentation permettront de préciser ces limites opératoires à DAS élevé.

La concentration en glucose de l'alimentation est constante (14 $g_{glucose}/L$) et chaque test est réalisé à TSH constant (compris entre 3,0 – 10 h) équivalent à des DAS s'échelonnant de 1,3 - 4,7 $g_{glucose}/L/h$.

2.1. Effet du TSH sur les performances de production d'hydrogène

Quatre expériences ont été réalisées avec des TSH de 3 h, 6 h, 8 h et 10 h afin d'étudier son impact sur la productivité en H₂. La figure 36 présente les profils des débits d'H₂ obtenus en sortie du BRM.



<u>Figure 36</u> : Effet du TSH sur le débit de production d' H_2 par litre de bioréacteur en BRM à partir du substrat modèle de concentration de 14 g_{glucose}/L. N.B. : les profils de débit de production d' H_2 sont superposés (les temps de démarrage ne sont pas représentés).

Les fermentations se caractérisent par 4 étapes : une phase de latence pendant laquelle les *consortia* ne produisent pas d'H₂ (celle-ci n'est pas affichée pour les tests à 6 h, 8 h, 10 h), une phase pendant laquelle le débit d'H₂ augmente et qui correspondrait à la phase de croissance des *consortia* bactériens dans le module, une phase où le débit maximal est atteint puis maintenu correspondant au moment où le métabolisme bactérien est dédié à la production d'H₂ et enfin un ralentissement de la production. Ce ralentissement de la production peut être lié potentiellement à un manque de substrat pour maintenir une croissance bactérienne dynamique ou le développement de bactéries non productrices d'hydrogène.

Les performances de production de cette étude sont présentées dans le tableau 18.

TSH	DAS	Productivité moyenne en H ₂	Rendement H ₂	Consommation du glucose	H ₂ /CO ₂	pH en
(h)	(g/L/h)	(mL _{H2} /L/h)	molH2/molglucose ajouté	(%)		sortie
10	1,4	201	1,18	98 %	0,79	4,6
8	1,8	235	1,01	97 %	0,94	4,6
6	2,3	328	1,14	83 %	1,03	4,4
3	4,7	343	0,55	84 %	0,99	4,7

Tableau 18 : Effet du TSH sur le débit de production d'H2 en BRM à partir de substrat modèle

Les productivités en H₂ sont comprises entre 201 et 343 mL/L/h, celles-ci sont calculées sur une durée d'au moins 24 h correspondant à une capacité de production comprise entre 4,8 L_{H2}/L/j et 8,2 L_{H2}/L/j à TSH = 3 h. La réduction du TSH conjointement à l'augmentation du DAS permet d'augmenter à la fois la productivité moyenne et le rapport H₂/CO₂. Ce résultat signifie que l'augmentation de la productivité en H₂ s'accompagne d'un enrichissement en H₂ des gaz produits dans le BRM. Pour des TSH allant de 6 à 10 h, le rendement en H₂ est maintenu à une valeur supérieure à 1,0 mol_{H2}/mol_{glucose ajouté}, ce qui signifie que l'augmentation du glucose varie également en fonction du TSH : à TSH long (8 et 10 h), la consommation du glucose est totale alors qu'à des TSH plus court (3 et 6 h), le taux de consommation diminue à 83 %. Ainsi, à des DAS supérieur à environ 2 g/L/h, l'apport en substrat semble supérieur à la demande microbienne ce qui pourrait inhiber le métabolisme des bactéries productrices d'H₂. Une autre explication à la diminution du taux de consommation des sucres pourrait être liée à la présence de courts-circuits hydrauliques dans le bioréacteur.

À TSH = 3 h, on note une diminution significative du rendement en H₂. En effet par rapport à TSH = 6 h, le DAS a été multiplié par 2 avec peu d'effet sur la productivité en H₂. Cependant, au cours de cette expérience, dont le débit de production est le plus élevé, il a été observé la présence de bulles de gaz dans l'effluent liquide, qui circule dans la boucle de recirculation, et de l'hydrogène a été détecté à l'aide d'un explosimètre (OLDHAM, EX2000) dans le flacon de récupération de l'effluent. Ces éléments laisseraient penser que la limite d'extraction *in situ* de l'H₂ produit ait été atteinte, conduisant d'une part, à l'augmentation de la pression partielle en H₂ avec un effet inhibiteur et d'autre part, à l'évacuation d'une partie de l'H₂ produit par l'effluent liquide, qui n'est pas prise en compte dans la production d'H₂ et donc non analysée par le μ GC-TCD. Ainsi, l'évacuation d'une partie des gaz par l'effluent liquide explique la baisse de rendement en H₂ et le plafonnement de la productivité en H₂ car ceux-ci ont été sous-estimés.

2.2. Amélioration de l'extraction des gaz

Pour favoriser l'extraction du gaz présent dans la sortie de l'effluent liquide, un dispositif d'extraction gaz / liquide a été implémenté dans le circuit de recirculation selon le schéma de la figure 37.

Chapitre 5



Figure 37 : Configuration du BRM sans extracteur liquide-gaz (a) et avec extracteur liquide-gaz (b)

Les gaz extraits de la recirculation en sortie du bioréacteur sont mélangés aux gaz extraits *in situ* avant les pièges froids ce qui permet d'analyser l'ensemble des gaz produits. Sur la ligne de gaz entre l'extracteur L/G et les gaz sortants du BRM, un système de récupération des liquides est mis en place. Il est encadré par 2 vannes qui permettent de l'isoler lors de sa vidange.

Pour cette étude, la teneur en glucose dans l'alimentation reste fixée à 14 g/L et les deux temps de séjour donnant les débits d'hydrogène les plus élevés, ont été testés (3 h et 6 h). L'objectif est de déterminer la proportion de gaz extraite avec le dispositif et son impact sur le métabolisme du *consortium* du BRM.

La figure 38 présente l'effet du dispositif d'extraction liquide gaz sur les profils de production d' H_2 en BRM à des TSH de 3 h et 6 h.

Concernant les tests à TSH = 6 h, un duplicat de fermentation a été effectué afin de s'approprier le fonctionnement du dispositif expérimental. La phase de latence des *consortia* précédent la production d'H₂ n'est pas représentée. Les débits d'H₂ stables montrent la mise en place d'un régime pseudo stable dans les deux configurations testées et les débits atteints sont quasi similaires. Ainsi, dans ces conditions d'alimentation du BRM (DAS = 2,3 g/L/h), les fibres creuses permettent l'extraction totale du gaz produit dans la calandre du bioréacteur.



<u>Figure 38</u> : Profils de production d'H₂ en BRM à TSH = 6 h (a) et à TSH = 3 h (b) avec et sans extracteur liquide-gaz. Sur le test TSH = 6 h avec extracteur de gaz, les barres d'erreur représentent la variabilité sur le débit d'H₂ (n=2). Les temps de latence sont ajustés pour superposer les courbes de débits de production d'H₂.

Sur les tests à TSH = 3 h, la production d'H₂ se stabilise à un débit significativement supérieur au test sans extracteur. À 42 h et 55 h, des interruptions de l'analyse en ligne n'ont pas permis de mesurer les gaz produits. Sur le test sans extracteur, le débit de production plafonne rapidement et diminue légèrement avant de se stabiliser. Ainsi, aux conditions expérimentales de ce test (TSH = 3 h, DAS = 4,6 g/L/h), la capacité d'extraction maximale *in situ* des fibres creuses a été atteinte. Une partie importante des gaz ont été évacués par l'effluent liquide d'où la nécessité d'utiliser un extracteur liquide/gaz.

Le tableau 19 compare les performances de production obtenues en BRM pour les deux TSH testés (3 et 6 h) sans et avec extracteur liquide/gaz.

	Extracteur	Productivité moyenne en H ₂ (mL _{H2} /L/h)	Rendement H ₂ mol _{H2} /mol _{glucose ajouté}	Consommation du glucose (%)	H ₂ /CO ₂
TSH = 6 h	Sans	328	1,14	83 %	1,03
DAS = 2,3 g/L/h	Avec	311 ± 15	1,05 ± 0,09	95 ± 2 %	0,96 ± 0,01
TSH = 3 h	Sans	342	0,55	84 %	0,99
DAS = 4,6 g/L/h	Avec	536	0,86	90 %	1,02

Tableau 19 : Effet d'un dispositif d'extraction des gaz de l'effluent sur le débit de production d'H₂ en BRM à partir de substrat modèle

À TSH = 6 h et comme observé sur les profils de production, peu de gaz circule dans l'effluent donc les productivités en H₂ et les rendements obtenus avec le dispositif d'extraction des gaz sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus sans l'extracteur. À TSH = 3 h, sans extracteur, la productivité plafonne à une valeur légèrement supérieure à celle des tests à TSH = 6 h. Avec extracteur liquide/gaz, le débit d'H₂ s'élève à 536 mL_{H2}/L/h (12,9 L_{H2}/L/j) soit une augmentation de +56 %. Ainsi, le dispositif mis en œuvre permet d'extraire les gaz de l'effluent de manière satisfaisante. La récupération de la totalité des gaz permet d'ajuster le rendement à une valeur de 0,86 mol_{H2}/mol_{glucose}. Notons que la récupération des gaz produits améliore le taux de consommation du glucose au cours de la fermentation, ce qui pourrait être une conséquence directe de la diminution de la teneur en H₂ dans le milieu réactionnel. Comme observée précédemment, l'augmentation du DAS consécutivement à la réduction du TSH permet une augmentation de la productivité en H₂ qui s'accompagne d'une baisse du rendement de production en H₂. Le rapport molaire H₂/CO₂ est maintenu aux alentours de 1, ce qui signifie que le gaz extrait dans l'effluent est homogène avec celui extrait *in situ*.

Ainsi, nous avons mis en évidence une limite d'extraction *in situ* des gaz lorsque la productivité est supérieure à 8 $L_{H2}/L/j$. Pour un fonctionnement à DAS = 4,6 g/L, l'utilisation d'un dispositif additionnel pour dégazer l'effluent est nécessaire pour récupérer la totalité des gaz produits. Ces résultats font écho à l'étude de Kisielewska *et al.* (2015) avec un réacteur à flux ascendant à lit de boues (UASB) dont l'extraction des gaz du bioréacteur est facilitée par une pompe à vide. Les auteurs soulignent le bénéfice de cette stratégie sur l'extraction des gaz et sur le taux de conversion de la DCO quand des productivités élevées en H₂ (> 4 $L_{H2}/L/j$) étaient atteintes.

2.3. Analyse des métabolites

L'objectif de cette partie est de déterminer l'impact du TSH sur la production de métabolites en période de fonctionnement pseudo-stable sur les tests avec et sans extracteur liquide-gaz (figure 39 et tableau 20). La figure 39 présente les débits de production de gaz et des métabolites ainsi que les débits de consommation de glucose en fonction du TSH.



<u>Figure 39</u> : Effet du TSH et de l'extracteur liquide/gaz sur la productivité des métabolites et la vitesse de consommation du glucose au cours de la fermentation de substrat modèle (14 g/L) en BRM

Le tableau 20 regroupe les variations des indicateurs de fermentation selon le TSH fixé.

TSH / DAS (h) / (g/L/h)	Extracteur	Teneur en métabolites (g/L)	B/A	$\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$	Homoacétogenèse estimée mmol _{acétate} /L/h
10,0 /1,3	Sans	4,4	1,0	1,02	0,0
8,0 / 1,6	Sans	5,0	1,5	0,64	0,9
6,0 / 2,2	Sans	4,3	1,9	0,88	0,3
	Avec	5,0	0,9	0,68	1,0
3,0 / 4,7	Sans	3,0	2,2	0,60	1,6
	Avec	5,5	1,1	0,52	3,3

Tableau 20 : Indicateurs du métabolisme au cours de la fermentation de substrat modèle (14 g/L) en BRM

La teneur en glucose consommée (figure 39) augmente de façon logique avec le DAS. La production d'H₂ s'accompagne de production d'acétate et de butyrate, qui sont les principaux métabolites produits. La diminution du TSH augmente le débit de production d'acides métaboliques (figure 39), mais cette augmentation est en trompe l'œil pour le test à TSH = 3 h sans extracteur, qui présente une concentration en métabolites dans le milieu réactionnel faible (tableau 20). Cette faible concentration en métabolites est associée à l'observation de bulles de gaz dans l'effluent, recirculant dans le BRM, pouvant être la cause d'une inhibition de la fermentation.

L'essai à TSH = 3 h avec extracteur présente un métabolisme dynamique avec une production d'acides, notamment l'acétate, significativement supérieure au test sans extracteur. Cette nouvelle dynamique est

possible grâce à l'évacuation de l'H₂ qui n'est plus renvoyé dans le module membranaire et montre que les limites de production d'H₂ du BRM n'ont pas encore été atteintes.

La réduction du TSH est associée à une meilleure productivité en H₂ malgré une augmentation de la production d'acétate par homoacétogenèse. La présence de l'extracteur diminue le rapport B/A et augmente la production d'acétate par homoacétogenèse montrant que cette voie était particulièrement inhibée par la présence de gaz dans le milieu réactionnel. Ainsi, l'implémentation de l'extracteur de gaz à des TSH courts (< 6 h) permet de favoriser l'ensemble des voies métaboliques (productrices ou non d'H₂).

3. Effet de la surface des fibres dans le BRM

Afin d'intensifier la production d'H₂, un paramètre du BRM avait été identifié : l'augmentation de la surface des fibres (Ernst *et al.*, 2015). Dans ce type de bioréacteur, les fibres servent à la fois à extraire les gaz du milieu réactionnel et à stabiliser le *consortium* microbien, limitant ainsi fortement le phénomène de lessivage des bactéries généralement observé sur les réacteurs fonctionnant en continu. En ce qui concerne la fonction de support de la croissance bactérienne des fibres, Renaudie *et al.* (2021a) ont mis en évidence la présence d'une couche bactérienne sur les fibres par microscopie électronique à balayage soulignant le rôle de la membrane pour la rétention de bactéries productrices d'hydrogène. La densité de cette couche était la plus importante dans la partie inférieure (près de l'entrée de l'alimentation). Concernant le rôle d'extraction des gaz produits, nous avons montré dans la partie précédente un plafonnement de l'extraction de l'H₂ par les fibres à DAS élevé et à productivité importante en H₂. Dans ce contexte, l'augmentation de la surface des fibres semble être un paramètre clé pour améliorer la capacité d'extraction des gaz *in situ*.

3.1. Effet de la surface de fibres sur la production d'hydrogène

Un nouveau module membranaire a été testé avec une surface de fibres doublée (0,49 m²) pour un volume utile de 300 mL soit une compacité (surface de contact divisée par le volume de bioréacteur) 3,3 fois supérieur au module de référence (1630 contre 500 m²/m³). Le bioréacteur a été inoculé en faisant circuler du fermentât issu du module de référence utilisé lors des tests précédents. Pour évaluer la capacité d'extraction des gaz liée à l'augmentation de la surface de fibres, un test sans extracteur L/G et un test avec extracteur L/G sont effectués. Le temps de séjour et le DAS sont légèrement différents selon le module utilisé : respectivement 3,0 h et 4,6 g/L/h pour le module de référence et 3,4 h et 4,1 g/L/h. Un DAS élevé *i.e.* un temps de séjour faible est choisi pour obtenir des débits de gaz importants.

Les profils de débit de production d'H₂ par litre de réacteur des deux tests avec et sans extracteur liquide-gaz pour les deux modules sont présentés sur la figure 40.



<u>Figure 40</u> : Effet de la surface des fibres creuses dans le BRM sur le débit de production d'H₂ par unité de volume du bioréacteur. Les temps de latence sont ajustés pour superposer les courbes de débits.

Les productions d'H₂ obtenues sur les profils sont relativement stables. Pour le test de fermentation avec le BRM à surface de fibres doublée (avec extracteur), l'augmentation du débit d'H₂ à 13 h correspond à une réduction du TSH de 6 h à 3 h (3,4 h, en réalité) pour être conforme aux autres essais. On note pour le BRM à surface doublée que l'effet de l'extracteur liquide-gaz sur le débit d'H₂ est toujours aussi important puisqu'il permet de stabiliser le débit à une valeur de 11 mL/L/min augmentée de 57 % par rapport à la configuration sans extracteur (7 mL/L/min).

Par rapport au module de référence, le module à surface de fibres doublée permet d'obtenir un débit de production d'H₂ légèrement supérieur (de 7 mL/L/min à 6 mL/L/min) ; notons que le DAS est 12 % plus faible pour le BRM à surface de fibres doublée. Le tableau 21 présente les performances de production d'H₂.

Extracteur liquide / gaz	Surface de fibres	Productivité en H ₂ (mL _{H2} /L/h)	Rendement H ₂ mol _{H2} /mol _{glucose ajouté}	H ₂ /CO ₂
Avec	Doublée	674	1,22	1,09
Sans	Doublée	425	0,77	0,80
Avec	Référence	536	0,86	1,02
Sans	Référence	342	0,55	0,99

Tableau 21 : Effet de la surface de fibres sur les performances de production d'H₂ des BRM testés avec et sans extracteur liquide/gaz

Le module à surface de fibres doublée permet d'augmenter la capacité d'extraction du réacteur puisqu'avec ou sans extracteur, la productivité et le rendement en H₂ obtenus sont supérieurs (+25 %) malgré un DAS moins élevé. L'augmentation de la surface de fibres ne semble pas impacter significativement le rapport molaire H₂/CO₂. Toutefois, quel que soit le module utilisé, l'ajout de l'extracteur liquide-gaz permet d'extraire 57 % d'H₂ en plus. Ainsi, dans le nouveau module, avec une surface de fibre doublée, une proportion d'H₂ similaire est extraite par l'effluent comparativement au module de référence. Les conditions hydrauliques du système pourraient expliquer ce phénomène. En effet, lors d'une production importante d'H₂ (> 6,5 L_{H2}/L/j), de la mousse est générée dans le système pouvant entraîner une partie des gaz dans l'effluent. La présence de mousse en sortie du BRM a été mise en évidence au chapitre II sous l'effet surfactant des résidus de microorganismes (lipides, protéines) et du gaz présent dans le milieu réactionnel. Les tests à TSH = 3 h sont caractérisés par un temps de séjour dans la calandre faible (1,5 h, du fait du taux de recirculation fixé à 1) et une circulation des liquides rapide pouvant favoriser le passage des gaz dans l'effluent. De plus, l'observation du module à surface de fibres doublée après fonctionnement (figure 41) fait apparaître des dépôts de matière dans la calandre pouvant être liés à des volumes morts.



Figure 41 : Photographie de l'intérieur de la calandre du module à taux de remplissage doublé de face (a) et de côté (b)

Après plusieurs dizaines d'heures de fonctionnement, les dépôts de matières observés de manière localisée dans la calandre sont d'aspects (granuleux ou lisses) et de couleurs (gris ou blanc). La vue de face (figure 41a) fait apparaître deux zones distinctes d'accumulation de la matière dans la partie basse et dans la partie haute de la calandre d'aspect granuleux qui s'apparenterait à des agrégats bactériens. Sur la vue de côté (figure 41b), on observe un dépôt important sur toute la hauteur de la calandre dont une zone blanche et d'aspect plutôt lisse.

Ainsi, la production de mousse, le flux rapide de liquide et sa circulation inhomogène dans le bioréacteur pourraient contribuer à une extraction partielle des gaz par les fibres creuses, le reste étant entraîné par l'effluent.

3.2. Effet de la surface de fibres sur le métabolisme fermentaire à TSH > 6 h

Les débits molaires de production de métabolites par unité de volume de bioréacteur et les indicateurs du métabolisme fermentaire en fonction de la surface de fibres sont présentés sur la figure 42 et dans le tableau <u>22</u>. Pour rappel, ces tests de fermentation étaient effectués à TSH = 3 ou 3,4 h et à DAS = 4,1 ou 4,7 g/L/h avec extracteur liquide gaz.



Figure 42 : Effet de la surface des fibres sur la production de métabolites et la consommation de glucose

Surface des fibres	Teneur en métabolites (g/L)	Consommation glucose (%)	B/A	$\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$	Homoacétogenèse (mmol _{acétate} /L/h)
Référence	5,3	90 %	1,1	0,52	3,3
Doublée	4,5	92 %	1,4	0,79	1,2

Tableau 22 : Effet de la surface des fibres sur les indicateurs métaboliques lors de la fermentation obscure en BRM.

Les deux tests produisent des quantités quasi similaires de butyrate. Le test avec la surface de fibres doublée présente un métabolisme plus favorable à la production d'H₂, qui se traduit par des rapports molaires B/A et $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ plus élevés malgré une plus faible vitesse de consommation du glucose et une diminution de la productivité en acétate lié à l'homoacétogenèse. Les voies de productions des autres métabolites sont peu exprimées : les productions d'éthanol, de lactate, de formiate et de propionate demeurent très faibles.

Ainsi, la différence de production d'H₂ s'expliquerait au niveau du métabolisme, celui-ci étant moins favorable à l'homoacétogenèse dans le module avec une surface de fibres doublée. La mise en place d'un tel métabolisme pourrait être liée à une réduction de la pression partielle en H₂ liée à l'augmentation de la surface de membrane dans la calandre et à un enrichissement du *consortium* en bactéries productrices d'H₂ sous forme d'agrégats ou de biofilm recouvrant les fibres et métabolisant efficacement le glucose. La

consommation partielle, mais efficace du glucose (90 - 92 % en moyenne, tableau 22) montre également que les *consortia* bactériens ne sont pas en carence de substrat. Enfin, les conditions hydrauliques ne permettent certes pas d'homogénéiser parfaitement le milieu, mais pourraient être plus favorables à la production d'H₂ quand les fibres sont plus nombreuses notamment par une rétention de la biomasse bactérienne plus efficace sur et entre les fibres, et par un lessivage « doux » des bactéries à faible TSH qui permet de maintenir les bactéries dans un état métabolique favorable à la production d'H₂ (*i.e.* le TSH serait légèrement supérieur au temps de doublement des bactéries).

4. Effet de l'ajout de lactate dans l'alimentation du BRM

L'ensilage de maïs est une biomasse contenant du lactate. Dans la perspective de mettre en œuvre cette biomasse pour une production continue, un substrat modèle d'une biomasse ensilée, composé de glucose (14 g/L), de lactate (1 g/L) et de nutriments est utilisé pour alimenter le BRM. L'objectif de cette étude est, à l'instar du chapitre III, de déterminer l'impact de l'ajout de lactate en termes de production et de métabolisme sur le fonctionnement du BRM. Le BRM (surface de fibre de référence) est opéré à TSH = 3 h représentant un débit d'alimentation en sucre de 4,6 g/L/h (25,6 mmol/L/h) et en lactate de 0,33 g/L/h (3,7 mmol/L/h).

4.1. Effet du lactate sur la production d'hydrogène en BRM

La figure 43 représente le profil de production d'H₂ du BRM alimenté avec substrat modèle supplémenté en lactate (1 g/L).



<u>Figure 43</u> : Effet de l'ajout de lactate sur le profil de production d'H₂ lors de la fermentation de substrat modèle. Les temps de latence sont ajustés pour superposer les courbes de débit d'hydrogène.

Le profil de production est stabilisé, de légères variations de la production sont observables à partir de 57 h de fermentation. On note que l'ajout de lactate impacte positivement la productivité en H_2 : des débits d' H_2 supérieurs à 10 mL/L/min sont atteints au cours de la fermentation. Les performances de production d' H_2 des tests sont présentées dans le tableau 23.

Lactate		Productivité en H ₂	Rendement H ₂	Consommation du glucose	H ₂ /CO ₂	
		(mL _{H2} /L/h)	mol _{H2} /mol _{glucose} (mol _{H2} /mol _{glucose + lactate ajouté})	(%)		
TSH = 3 h	0 g/L	536	0,86	90 %	1,02	
DAS = 4,6 g/L/h	1 g/L	628	1,07 (0,94)	81 %	1,04	

L'ajout de lactate permet d'atteindre une productivité de 628 mL/L/h soit un gain de +17 % par rapport à la référence, associé à un rapport molaire H_2/CO_2 proche de 1. Le rendement en H_2 par mole de glucose de 1,07 mol_{H2}/mol_{glucose} est supérieur à celui sans lactate alors que la consommation du glucose de 81,4 % est inférieure à celle de la référence.

4.2. Effet du lactate sur le métabolisme

Le métabolisme fermentaire des *consortia* et les indicateurs de production de métabolites sont présentés sur la figure 44 et dans le tableau 24.



Figure 44 : Effet du lactate sur la productivité des métabolites et la vitesse de consommation du glucose par litre de bioréacteur.

<u> Tableau 24</u> : Effet du lactate sur les indicateurs du métabolis	me fermentaire.
--	-----------------

TSH / DAS	Lactate	Métabolites (g/L)	B/A	$\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$	Homoacétogenèse mmol _{acétate} /L/h
3,0 / 4,7	0 g/L	5,5	1,11	0,52	3,3
	1 g/L	4,4	2,05	0,98	0,1

Sur le test avec l'alimentation supplémentée en lactate, notons qu'une partie du lactate est consommée au cours du régime de fonctionnement pseudo-stationnaire. La consommation du lactate représente en moyenne 2,1 mmol/L/h de lactate soit 56 % de l'apport en lactate par la solution d'alimentation. Les productions des acides co-produits avec l'H₂ sont assez variables : la productivité du butyrate de la référence

est dans la barre d'erreur du test avec lactate et la productivité de l'acétate est plus faible lors du test avec ajout de lactate. Notons toutefois qu'une partie de l'acétate produit peut être co-consommé avec le lactate de manière équimolaire comme présenté au chapitre III, soit environ 2,1 mmol/L/h, ce qui représenterait environ 45 % du débit moyen d'acétate produit. Il en résulte une augmentation du rapport molaire B/A, un phénomène similaire à ce qui avait été observé lors de la fermentation de l'ensilage de maïs en semi batch au Chapitre III. Les productivités en éthanol sont faibles et une partie du potentiel de production d'H₂ du test avec ajout de lactate est stocké sous forme de formiate. De manière remarquable, la concentration en acides organiques et en alcools est plus faible dans le fermentât du test avec lactate que dans la référence et ce malgré l'ajout initial de lactate. De plus, le métabolisme du test avec lactate est très favorable à la production d'H₂ : la production d'acétate par homoacétogenèse est négligeable et le rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ est très proche de 1. Notons également l'absence de propionate, qui peut être produit à partir du lactate, comme décrit au chapitre III (paragraphe 4.6) selon l'équation 5.1. proposée par Saady (2013).

$$Lactate + NADH \rightarrow Propionate + NAD^{+}$$
(Eq. 5.1)

Ainsi, l'ajout de lactate dans la solution d'alimentation permet une augmentation de la production d'H₂ par une réorientation du métabolisme vers la voie du butyrate (augmentation du rapport B/A) et une diminution de la production d'acétate sans co-production d'H₂. Au cours de la fermentation, les substrats (glucose et lactate) sont consommés partiellement. Dans la littérature, aucune étude n'a testé le potentiel de production d'H₂ de substrat modèle supplémenté avec de l'acide lactique en fermentation continue. La consommation du lactate n'a été observée, en mode de production d'H₂ continue, que dans des études avec des biomasses réelles contenant naturellement du lactate, par exemple, des vinasses de canne à sucre ou des déchets alimentaires (Alexandropoulou *et al.*, 2018 ; Bernal *et al.*, 2021). Le métabolisme du lactate au cours de la fermentation de biomasses réelles sera discuté au chapitre 8.

5. Analyse des corrélations

Une analyse statistique est réalisée sur l'ensemble des expériences de ce chapitre pour identifier des corrélations entre les différentes variables.

La figure 45 présente l'évolution de la productivité en H₂ en fonction du débit d'alimentation en substrat et une analyse en composante principale ciblant les variables d'alimentation, de production de métabolites et de gaz.



<u>Figure 45</u> : Effet du débit d'alimentation en substrat par litre de bioréacteur sur la productivité en H₂ (a) et analyse en composante principale des paramètres d'alimentation du BRM et des caractéristiques de production d'H₂ et du métabolisme (b). Les données de l'ACP ne prennent pas en compte les tests à DAS supérieurs à 2,3 g/L/h sans extracteur liquide-gaz.

D'après la figure 45a, l'augmentation du DAS a un effet positif sur la productivité en H₂. Celle-ci augmente avec le DAS de manière quasi linéaire entre 0,6 g/L/h et 2,3 g/L/h. À des DAS supérieurs, on note deux tendances : l'augmentation de la productivité en H₂ plafonne lors des tests de fermentation sans extracteur liquide/gaz et à l'inverse, elle continue d'augmenter lorsque l'extracteur est mis en place. Cette tendance pourrait être affinée avec des tests de fermentation à des DAS intermédiaires et suggérerait que des gains de productivité en H₂ peuvent être atteints avec le BRM alimenté avec des DAS plus élevés et en optimisant l'extraction des gaz par les fibres creuses.

Une analyse en composante principale (ACP) basée sur les corrélations de Pearson est effectuée en excluant les tests à DAS supérieurs à 2,3 g/L/h sans extracteur liquide-gaz (figure 45b). Les deux composantes F1 et F2 expliquent 75 % de la variabilité des données. D'après l'ACP, la productivité en H₂ est corrélée positivement avec le rapport molaire H₂/CO₂, la productivité en butyrate, le débit d'alimentation en substrat et la productivité en acétate. La corrélation entre le butyrate, l'acétate et la productivité en H₂ confirme que ces métabolites sont bien co-produits avec l'hydrogène même si la production d'acétate est partiellement corrélée avec l'homoacétogenèse. Le rapport molaire H₂/CO₂ augmente avec la productivité en H₂. Cette corrélation suggérerait un lien entre l'aspect quantitatif de la production, décrit par la productivité et l'aspect qualitatif dont l'indice est le rapport molaire H₂/CO₂. Notons que la productivité en éthanol, voie productrice de CO₂, est anti corrélée au rapport H₂/CO₂ et à la productivité en hydrogène.

Par ailleurs, la productivité en H₂ est corrélée négativement avec le TSH et le taux de consommation de glucose. La corrélation négative entre le taux de consommation du glucose et les variables de production

d'H₂ suggère qu'une quantité résiduelle doit rester dans le milieu réactionnel pour obtenir une productivité d'H₂ élevée. Si la consommation des sucres est totale, les bactéries peuvent souffrir d'une carence en substrat qui limiterait leur croissance et donc la production d'H₂. L'augmentation du DAS par réduction du TSH permettrait de conserver une quantité résiduelle de glucose en sortie du bioréacteur.

Le rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ est faiblement corrélé avec les rendements en H₂, ce qui permet de lier les variables d'efficacité du métabolisme pour la production d'acides à celle de l'efficacité de la conversion des sucres en H₂. Par ailleurs, le rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ est négativement corrélé avec l'homoacétogenèse. Cette observation est logique et conforme aux attentes puisque le rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ sert à évaluer l'efficacité du métabolisme en comparant la production d'H₂ à la production d'acides dont l'acétate.

6. Positionnement par rapport à la littérature

Les performances de production d'H₂ de cette étude sont présentées dans le tableau 25 et comparées à celle de la littérature sur la bioproduction d'H₂ en réacteur en mode continu à partir de substrat modèle.

Le tableau 25 regroupe plusieurs types de bioréacteurs mettant en œuvre une stratégie de rétention des bactéries (réacteur à boues granulaires, à lit fixe et bioréacteur membranaire). Les études citées ont optimisé la productivité et le rendement en H₂ de leur système en fonction du DAS. Les DAS optimaux s'échelonnent de 0,9 à 10 g/L/h. Ils sont mis en place grâce à des TSH faibles entre (0,8 et 8 h) et permettent ainsi d'obtenir des productivités importantes et démontrent le succès des méthodes employées pour maintenir les bactéries dans le bioréacteur.

L'utilisation de substrat modèle permet d'obtenir des rendements de conversion du glucose en H₂ compris entre 0,86 et 2,33. Le rendement en H₂ semble dépendre du type de bioréacteur. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des CSTR couplés à un module de filtration *ex-situ* (S/L) à membrane dynamique (Park *et al.*, 2018) ou avec CSTR qui comportent un module *in situ* d'immobilisation de la biomasse bactérienne (lit fixe) (Anburajan *et al.*, 2017 ; Pugazhendhi *et al.*, 2017).

Bioréacteur	<i>Inoculum</i> (Prétrait.) Température	DAS / TSH (g/L/h) / (h)	Productivité (mL/L/h)	Rendement mol _{H2} /mol _{substrat ajouté}	Référence
Boues granulaires	Boues anaérobies (100°C, 15 min)	1/8	183	1,47	Si <i>et al.</i> (2015)
Lit fixe	35°C	4 / 2	444	0,89	
Boues granulaires	Cultures mixtes enrichies	2,5 / 4	554	1,38	Kongjan et al. (2019)
Lit fixe	55°C	2,5 / 4	629	1,57	
Hybride CSTR/Lit fixe	Boues anaérobies* (90°C, 30 min) 37°C	7,5 / 2	2192	2,0	Anburajan et al. (2017)
Hybride CSTR/Lit fixe	Boues anaérobies* (90°C, 30 min) 37°C	10 / 1,5	3266	2,33	Pugazhendhi <i>et al</i> . (2017)
BRM Solide/Liquide	Boues de STEP (BES, 10 mM) 35°C	-	751	1,58	Noblecourt et al. (2017)
BRM Solide/Liquide	Boues anaérobies	1,2 / 8	155	0,95	Shen <i>et al</i> . (2010)
	23°C	0,9 / 8	191	1,57	
BRM Solide/Liquide	Boues de STEP (90°C, 20 min) 37°C	7,9 / 0,8	1670	1,00	Kim <i>et al</i> . (2006)
BRM Solide/Liquide	Boues de STEP (80°C, 20 min) 35°C	1,8 / 9	242	1,03	Lee <i>et al</i> . (2010)
Membrane dynamique Solide/Liquide	Boues anaérobies* (90°C, 30 min) 37°C	5/3	2038	2,80	Park <i>et al.</i> (2020)
BRM Liquide/Gaz	Pas d'inoculation (flore du réacteur)	4,6 / 3	536	0,86	Cette étude
(Surface de fibres doublée)	37°C	4,1 / 3,4	674	1,22	

Tableau 25 : Performances de production d'H₂ obtenues en BRM et comparaison avec la littérature

* Inoculum identique

Kongjan *et al.* (2019) et Si *et al.* (2015) comparent les performances de production de réacteurs à boues granulaires et à lit fixe. Les conclusions des études de Kongjan *et al.* (2019) et Si *et al.* (2015) semblent contradictoire : en condition mésophile, Si *et al.* (2015) montre que le réacteur à boues granulaires a une plage de fonctionnement limitée (DAS_{opti} = 1 g/L/h) par rapport au réacteur à lit fixe qui fonctionne à un DAS supérieur, produisant plus d'H₂, mais avec un moins bon rendement. En condition thermophile, Kongjan *et al.* (2019) obtiennent des performances de production d'H₂ plus favorables pour la configuration à lit fixe. Les rendements obtenus dans notre étude sont comparables au réacteur à lit fixe de Si *et al.* (2015) opéré en condition mésophile et sont inférieurs à ceux de Kongjan *et al.* (2019), montrant que la fermentation en condition thermophile permet d'augmenter le rendement en H₂ en contrepartie d'un coût énergétique plus important.
La configuration membranaire de BRM la plus utilisée dans la littérature est la séparation solide/liquide. Sur ce type de configuration, l'étude Noblecourt *et al.* (2017) présente les performances les plus proches des nôtres malgré une alimentation en mode semi-continue. Lee *et al.* (2010) et Shen *et al.* (2010) mettent en œuvre leur réacteur à faible DAS et obtiennent des rendements comparables aux nôtres. Les productivités en H₂ obtenues par Kim *et al.* (2006) sont élevées en raison d'un DAS élevé (7,9) ; le rendement est moins élevé que les autres études. La technologie de membranes dynamiques développée par Park *et al.* (2018) présente les meilleurs rendements et productivités en H₂ parmi les BRM à séparation solide/liquide. Cette technologie serait limitée à TSH faible (2 h) par les contraintes de cisaillement qui limitent la formation du biofilm qui constitue la membrane dynamique.

De manière remarquable, les BRM à séparation solide/liquide (hormis les membranes dynamiques) permettent d'obtenir des rendements s'échelonnant de 0,95 - 1,58, un intervalle identique aux réacteurs sans agitation (lit fixe et lit fluidisé).

D'après le tableau 25, plusieurs pistes pourraient permettre d'améliorer le rendement du BRM testé. Tout d'abord, notons que dans les études présentées, la productivité est corrélée positivement au DAS élevé. Ainsi, les données de la littérature suggèrent que l'augmentation du DAS par réduction du TSH ou à TSH constant en augmentant la concentration en glucose de la solution d'alimentation nous permettrait potentiellement d'améliorer encore la productivité en H₂ du BRM testé, d'autant plus que le réacteur ne présente pas de signes de « surcharge » (production de lactate) comme l'observent Si *et al.* (2015). Park *et al.* (2018) observent une amélioration significative du rendement en H₂ (de 1,7 à 2,8 mol_{H2}/mol_{substrat ajouté}) consécutivement à une réduction du TSH de 6 h à 3 h qui est expliquée par la mise en place de la membrane de séparation liquide/liquide. D'un point de vue métabolique, Si *et al.* (2015) notent une amélioration de la (2017), l'augmentation du DAS par réduction du TSH semble donc tout à fait envisageable malgré les risques de lessivage à des TSH proches de 1.

Park *et al.* (2018) et dans une moindre mesure Anburajan *et al.* (2017) présentent des DAS et TSH proches de ceux de notre étude, mais leurs rendements sont supérieurs aux nôtres. Cet écart pourrait s'expliquer d'un point de vue microbiologique : au cours des tests fermentaires, les auteurs de ces études identifient des *consortia* très riches en bactéries *Clostridium butyricum* (88 %). Ces bactéries proviennent du même *inoculum*, prétraité à 90°C pendant 30 min, issu d'un réacteur à lit de boues anaérobie pour l'épuration des eaux usées d'origine brassicole de Cheongju (Corée du Sud) d'où émergent ces bactéries qui ont des performances de production d'H₂ exceptionnelles (rendement supérieurs à 2 mol_{H2}/mol_{substrat ajouté}). Notons que dans notre cas, aucun ensemencement n'a été réalisé depuis le démarrage des travaux expérimentaux dans le BRM utilisé (soit 21 mois entre l'ensemencement et les premières fermentations de ce projet de thèse), un renouvellement des bactéries immobilisées dans le bioréacteur selon la méthode élaboré par Clion (2016) pourrait contribuer à améliorer le rendement de production de notre BRM.

D'un point de vue métabolique, Park *et al.* (2018) et Noblecourt *et al.* (2017) montrent le bénéfice des membranes de séparation solide/liquide sur le rendement de production. Même si les concentrations en métabolites observées dans notre étude (environ 5 g/L) sont très inférieures au seuil d'inhibition (12,5 g/L) déterminé par Noblecourt *et al.* (2017), l'extraction des acides pourrait favoriser les voies de production d'H₂.

Pour améliorer les performances fermentaires, l'optimisation du milieu réactionnel et notamment l'utilisation d'une solution d'oligoéléments, comprenant de manière non exhaustive du manganèse du cuivre et du cobalt qui sont utilisés par Anburajan *et al.* (2017), Park *et al.* (2018) et Pugazhendhi *et al.* (2017), pourrait être envisagé. Kim *et al.* (2006) utilisent un milieu empirique (ajout de peptone et d'extrait de levure) pour garantir un apport en nutriments au *consortium* fermentaire. L'ajout d'un désoxygénant comme la L - cystéine pourrait être considéré afin de maintenir des conditions anaérobies dans les bioréacteurs.

D'un point de vue technologique, les BRM à séparation solide/liquide et les CSTR à lits fixes permettent d'obtenir des rendements importants, ce qui souligne l'intérêt de concentrer la biomasse bactérienne dans le bioréacteur. En effet, d'après Shen *et al.* (2009), les performances des BRM sont supérieures à celles des CSTR à DAS élevés et à TSH faibles. Les BRM à séparation solide/liquide mis en œuvre dans la littérature nécessitent un système d'agitation qui n'est pas nécessaire pour notre module, mais qui permet une homogénéisation optimale du milieu. Ces BRM nécessitent également une maintenance rigoureuse en raison des risques de colmatage des membranes de filtration même si des technologies alternatives sont en développement avec l'utilisation de membranes dynamiques.

7. Conclusion

Cette étude sur le BRM L/G développé par le laboratoire, alimenté avec substrat modèle, a permis de mettre en évidence un gain de productivité (+20 %) grâce à l'utilisation de la boucle de recirculation pour un taux de recirculation de 1.

L'étude sur l'effet du temps de séjour a montré que le rendement H₂ pouvait être maintenu (> 1,1 mol_{H2}/mol_{glucose ajouté}) sur des temps de séjour de 6 h à 10 h. À TSH plus faible, la productivité en H₂ augmente, ce qui signifie que l'optimum de production n'a pas été encore atteint. Il serait donc intéressant d'approfondir le fonctionnement du BRM à un DAS supérieur par diminution du TSH ou par augmentation de la concentration en glucose de la solution d'alimentation.

Toutefois, le fonctionnement du BRM à DAS important (4,6 g/L/h) a fait apparaître des limites en termes de rendement en H₂ liées à une extraction partielle des gaz. Il a été montré que la capacité maximale d'extraction des gaz par les fibres a été atteinte et qu'une partie des gaz est évacuée par l'effluent.

Une première stratégie consistant à utiliser un dispositif additionnel d'extraction liquide-gaz a été testée et a permis de récupérer les gaz dans l'effluent quand la productivité en H_2 est supérieure à 340 mL_{H2}/L/h (8 L_{H2}/L/j). La seconde stratégie a été de doubler la surface des fibres dans le module, ce qui a permis un gain de rendement en H₂ de 40 % par rapport au module de référence. Couplé avec le dispositif d'extraction liquide/gaz, le nouveau module a amélioré significativement le rendement (1,22 mol_{H2}/mol_{sucres}, +121 %) et la productivité en H₂ (16,2 L_{H2}/L/j, +97 %).

Dans la perspective d'alimenter le BRM avec des biomasses ensilées contenant naturellement du lactate, l'ajout de lactate (1 g/L) dans la solution d'alimentation modèle a été testé et a eu un effet positif (+17 %) sur la productivité en H₂ du BRM. Ce résultat est remarquable puisque l'ajout de lactate n'avait pas eu d'impact sur la production d'H₂ d'une solution de substrat modèle en réacteur semi-batch.

Chapitre 5

Chapitre VI : Prétraitement pour le fractionnement de la biomasse

1. Introduction

Le fonctionnement du bioréacteur membranaire à séparation liquide/gaz (BRM) impose une contrainte technique avec l'utilisation d'un substrat nécessairement liquide, capable de circuler dans le bioréacteur. Le fractionnement par trempage solide liquide à froid, bien que facile à mettre en œuvre est peu développé dans la littérature. En se basant sur les connaissances propres du laboratoire, plusieurs protocoles sont proposés pour préparer la biomasse d'ensilage de maïs afin d'alimenter le BRM. La figure 46 présente le procédé de fractionnement de la biomasse étudié dans ce chapitre.



Ensilage de maïs Ensilage de seigle

Figure 46 : Préparation d'une solution d'alimentation du BRM par fractionnement de la biomasse

Le principe de la préparation de la biomasse est l'extraction des sucres et des éléments fermentescibles solubles par une étape de trempage dans l'eau, sous agitation suivie d'une étape de filtration. Une fraction liquide (filtrat) destinée au BRM et un résidu solide valorisable sont ainsi obtenus et pour lesquels le potentiel de production d'hydrogène sera testé en réacteur semi-batch.

La préparation de la biomasse inclut souvent une étape facultative de prétraitement pour améliorer l'extraction des sucres dans la phase liquide, l'un des inconvénients de la méthode d'extraction par l'eau étant que la concentration en sucres dans le filtrat extrait est généralement assez faible (Jia *et al.*, 2013). Ainsi, dans un objectif d'augmenter la teneur en matières facilement fermentescibles dans la phase soluble, le broyage est choisi comme prétraitement. En effet, le broyage détruit partiellement la structure de la fibre végétale et des tissus et réduit la taille des particules *i.e.* l'augmentation du rapport surface sur volume, (Ghimire *et al.*, 2015 ; Montgomery and Bochmann, 2014). D'après Jia *et al.* (2013) ; ces deux effets accélèrent et améliorent la diffusion des molécules solubles vers la phase liquide. D'un point de vue fermentaire, le broyage tend à améliorer la digestibilité du substrat en réduisant la taille des polymères et la cristallinité de la cellulose (Amin *et al.*, 2017). Nous nous attendons à ce que le broyage améliore d'une part, l'extraction des sucres vers la phase liquide et d'autre part, l'accès des bactéries et des enzymes au substrat conduisant à une augmentation substantielle de la production d'H₂ par voie fermentaire.

Ce chapitre propose donc d'étudier le potentiel de production d'H₂ des fractions obtenues à l'issue du trempage dans l'eau à partir de la biomasse d'ensilage de maïs, dans un premier temps et pour intensifier la méthode d'extraction par l'eau, de le comparer à des fractions obtenues après prétraitement mécanique de broyage de la biomasse. Ainsi, l'effet du broyage sur le potentiel de production d'H₂ sera étudié sur la biomasse entière puis sur les différentes fractions obtenues après trempage. Une démarche analogue sera appliquée à l'ensilage de seigle dans un second temps.

2. Utilisation du broyage comme prétraitement mécanique pour la fermentation

obscure

Même si le broyage est un prétraitement mécanique qui consomme de l'énergie pouvant être considéré économiquement non viable par Amin et al. (2017) lors d'un procédé de fermentation anaérobique (production de biohydrogène et de biogaz), force est de constater que le broyage est très fréquemment utilisé pour préparer la biomasse avant un prétraitement thermochimique ou biologique (Soares et al., 2020). Il contribue également à l'homogénéisation du stock de biomasse (Benito Martin et al., 2017). Notre choix d'utiliser le broyage de la biomasse est motivé par le nombre important d'études utilisant des constituants de la plante de maïs comme substrat pour la fermentation obscure et mettant en œuvre un broyage (Chapitre I). En outre, ce traitement présente l'avantage de n'utiliser aucune molécule chimique (intrants) ou de générer des effluents chimiques pouvant impacter négativement les performances de production d'hydrogène (Amin et al., 2017); il peut cependant potentiellement favoriser le relargage d'inhibiteurs naturellement présents dans la biomasse. Plusieurs outils de broyage sont décrits dans la littérature (Montgomery et Bochmann, 2014) : les broyeurs à lames génèrent des morceaux de petite taille et les broyeurs à marteaux produisent des morceaux fins et fibreux. Le paramètre étudié lors du broyage est la taille des particules, mesurée par le passage au travers d'un tamis. Elle est arbitrairement séparée en trois catégories : broyage grossier, broyage moyen de plusieurs millimètres, et broyage fin à l'échelle micrométrique.

Spécifiquement sur l'ensilage de maïs, en plus du hachage agricole lors de la récolte, d'autres prétraitements mécaniques sont effectués (tableau 26). Le tableau 26 présente les prétraitements mécaniques appliqués à l'ensilage de maïs avant la fermentation obscure.

Tableau 26 : Prétraitements mécaniques et rendement de production d'hydrogène de l'ensilage de maïs dans la
littérature (9 études).

Référence	Taille du broyage	Seuil de coupure	Inoculum	Rendement (L _{H2} /kg _{MS})
Nkemka <i>et al</i> . (2015)	Hachage initial	-	Boues de méthaniseur	56
Nikolajeva <i>et al</i> . (2015)	Hachage initial	-	Endogène	< 10
Kyazze <i>et al</i> . (2008)	Extracteur de jus	-	Boues de STEP	62,4
Cieciura-Włoch et Borowski (2019)	Moyen	0,3 - 13 mm	Boues de STEP prétraitée	260
Tenca <i>et al</i> . (2011)	Fin	1,0 mm	Inoculum mixte	108
Benito Martin <i>et al</i> . (2017)	Fin	0,75 mm	Boues anaérobies	32,6
Manzini <i>et al</i> . (2015)	Fin	0,5 mm	Inoculum mixte	106
Gómez-Camacho et al. (2021)	Fin	non précisé	Boues anaérobies	20
Dauptain <i>et al</i> . (2020)	Fin	non précisé	Endogène	143 ± 11

Deux études, Nikolajeva *et al.* (2015) et Nkemka *et al.* (2015), utilisent l'ensilage de maïs sans prétraitement pour la production d'hydrogène alors que la majorité des autres études effectue un broyage supplémentaire avant de mettre en œuvre le maïs ensilé. Notons l'utilisation d'un extracteur de jus utilisé par Kyazze *et al.* (2008), la biomasse testée étant le jus d'ensilage de maïs, facile à mettre en œuvre. Le broyage améliore le rendement de production en H₂ ;en effet, les rendements les plus importants sont obtenus après ce prétraitement (tableau 26). Cependant, à ce jour, aucune étude rigoureuse n'a été mise en œuvre pour attester de l'impact du broyage sur le potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de maïs. Nkemka *et al.* (2015) obtiennent par ailleurs un rendement intéressant (56 mL_{H2}/g_{M5}) avec de l'ensilage brut de maïs non broyé.

Plus le broyage est fin, plus il est difficile à mettre en œuvre, il convient donc de définir la taille critique à partir de laquelle le broyage n'améliore plus le rendement de production d'H₂. Song *et al.* (2014) étudient l'impact de la taille des particules sur la production d'hydrogène en utilisant des tamis permettant d'obtenir des particules de diamètre compris entre 149 et 420 µm. À ces ordres de grandeur, l'effet du broyage est insignifiant tant sur la production d'hydrogène (+2 %) que sur la phase de latence. Dumas *et al.* (2015) ont mené une démarche analogue en utilisant la paille de blé comme substrat. L'effet du broyage sur l'augmentation du rendement en biogaz (méthane) est maximal quand la taille des particules est réduite à 1 mm. Dans la littérature, le séchage de la biomasse est systématiquement réalisé avant broyage pour faciliter le prétraitement et obtenir des granulométries fines.

Le broyage apparaît nécessaire à mettre en œuvre pour la fermentation d'une biomasse. La granulométrie des particules pour optimiser la production d'H₂ semble donc le principal facteur à optimiser pour limiter le coût énergétique du broyage (Mosier, 2005).

Ainsi, sur la base de ces travaux, une taille de particules inférieure au millimètre est retenue pour déterminer l'impact du broyage sur les performances en fermentation de la biomasse entière et des différentes fractions (filtrat et résidu) avec pour notre étude, la spécificité d'un travail sans *inoculum* bactérien permettant la fois d'observer l'effet du broyage sur la biomasse (prétraitement mécanique) et sur la flore endogène (stress pendant le broyage : aération et conversion de l'énergie mécanique en énergie thermique).

3. Effet du broyage sur la fermentation endogène de l'ensilage de maïs frais et congelés

Préalablement aux expériences de trempage, l'effet du broyage sur la biomasse entière est testé. Pour chaque lot (lot 1 et lot 2), plusieurs biomasses avec des températures de stockage différentes (4°C, -20°C) sont prétraitées par le broyage.

3.1. Effet du broyage sur la fermentation obscure de l'ensilage de maïs (lot 1)

Deux biomasses issues du lot 1 d'ensilage de maïs ont été sélectionnées pour le prétraitement de broyage : de l'ensilage de maïs congelé et de l'ensilage de maïs stocké 70 - 80 jours à 4°C. L'ensilage de maïs stocké 70 - 80 jours à 4°C a été utilisé pour pouvoir tester l'effet du broyage sur un lot d'ensilage sortant du silo. Dans le chapitre IV, il a été montré que le stockage de la biomasse à 4°C pendant une durée de 70 jours avait un effet positif sur le potentiel H₂ de la biomasse d'ensilage.

3.1.1. Production d'hydrogène et métabolisme fermentaire

La figure 47 présente l'effet du broyage sur la production d'hydrogène en réacteur en mode semi batch par fermentation endogène des biomasses d'ensilage de maïs issues du lot 1.



<u>Figure 47</u> : Effet du broyage de la biomasse d'ensilage de maïs congelé ou stockée 70 - 80 jours à 4°C sur le potentiel de production d'hydrogène : production cumulée d'H₂ (a) et la production de métabolites (b) Les barres d'erreur rendent compte de la variabilité (n = 2, excepté pour l'échantillon congelé et broyé : n = 3).

Le tableau 27 présente l'effet du broyage sur les paramètres de performances de la production d'hydrogène par fermentation obscure et ceux de l'équation de Gompertz.

Charlinger	Tusitanaat	Production	Production Rendement		Productivité max	Rapport
Stockage	Traitement	$(mL_{H2}/L_{bioréacteur})$	(mL _{H2} /g _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	H ₂ /CO ₂
4°C (< 80 j)	Référence	920 ± 25	38,1 ± 1,0	0,41 ± 0,02	128 ± 21	0,62 ± 0,01
	Broyé	2460 ± 83	103,8 ± 3,5	1,07 ± 0,04	286 ± 58	1,15 ± 0,02
Congelé	Référence	690 ± 80	26,5 ± 1,3	0,27 ± 0,03	58 ± 15	0,59 ± 0,01
	Broyé	1300 ± 67	54,9 ± 2,9	0,57 ± 0,03	158 ± 44	0,68 ± 0,05

<u>Tableau 27</u> : Effet du broyage sur des biomasses d'ensilage de maïs stockées sous différentes conditions, paramètres de production d'hydrogène en fermentation obscure et paramètres de l'équation de Gompertz

Le broyage a une action significative sur le potentiel de production d'hydrogène de la biomasse, quel que soit le mode de stockage, et ce, à tous les niveaux : augmentation de la production, du rendement et de la productivité maximale en H₂ et du rapport molaire H₂/CO₂ (tableau 27). Pour la biomasse stockée à 4°C, cela s'explique notamment par une productivité initiale très importante, d'environ 250 mL/L_{H2}/h équivalente à des débits supérieurs à 3 mL/min et qui est maintenue entre 8 et 15 heures : le temps de latence (8 h) n'ayant pas été impacté par le broyage. La production d'hydrogène obtenue avec l'ensilage de maïs congelé et broyé est également supérieure à celle obtenue avec de l'ensilage congelé non broyé. La cinétique de production d'hydrogène à partir de l'ensilage de maïs congelé et broyé s'effectue en deux phases distinctes de production : une première phase intense qui dure 8 h qui est immédiatement suivie par une phase de production plus longue (environ 24 h) de plus faible productivité.

Les gains obtenus avec le broyage de la biomasse sont variables selon le mode de stockage. Sur la biomasse stockée à 4°C, le broyage améliore le rendement de production d'H₂ de 172 % et la productivité de 123 % par rapport à la référence non broyée. Sur la biomasse congelée, le broyage permet d'améliorer le rendement de 107 % et la productivité de 172 %. Le rapport molaire H₂/CO₂ obtenu avec les biomasses broyées (0,68 à 1,15) est supérieur à celui de la biomasse non broyé (0,59 à 0,62) mettant en évidence une amélioration du métabolisme microbien.

D'un point de vue métabolique (figure 47b), le butyrate et l'acétate sont les principaux métabolites analysés dans les échantillons prélevés. La quantité de butyrate produit par les ensilages broyés est significativement supérieure (39,3 mM et 36,0 mM) aux ensilages de référence (23,8 mM et 22,5 mM). Ainsi, lors de la fermentation de biomasse broyée, on assiste à une réorientation du métabolisme bactérien vers la voie du butyrate. Une diminution de l'activité des voies de l'acétate non productrices d'H₂ est également observée. Ce phénomène est particulièrement remarquable dans le cas de l'ensilage stocké à 4°C et broyé et est moins marqué lors de la fermentation de biomasse congelée et broyée. Cela se traduit par une augmentation du rapport molaire B/A lors de la fermentation de la biomasse broyée. broyage permet de réduire la production d'éthanol lors de la fermentation de biomasse stockée à 4°C et de réduire la production de propionate associée à une augmentation de la production d'acétate lors de la fermentation de la biomasse congelée.

3.1.2. Effet du broyage sur les consortia bactériens

L'objectif est d'analyser les effets du broyage sur les *consortia* bactériens développés lors de la fermentation obscure. La figure 48 présente un comparatif des *consortia* bactériens de l'ensilage de maïs (lot 1) selon les températures de stockage (4°C et -20°C) et le prétraitement par broyage de la biomasse.



Figure 48 : Effet du broyage sur les *consortia* bactériens issues de la fermentation de l'ensilage de maïs (lot 1) stocké 70 - 80 jours à 4°C et congelée (-20°C).

Au cours de la fermentation (prélèvements aux environs de 24 h), les *consortia* bactériens majoritaires appartiennent au genre *Clostridium* avec une abondance supérieure à 70 % à l'exception de celui de la biomasse congelée non broyée (46 %).

Concernant les expériences de la biomasse stockée à 4°C, la différence majeure entre les *consortia* est l'espèce bactérienne qui prédomine parmi les *Clostridii* : *Clostridium butyricum/ beijerinckii /diolis* (70 %) pour la référence (non broyée) et *Clostridium intestinale* (51 %) pour la biomasse broyée. Les principales différences sur l'abondance des espèces secondaires sont la présence *d'Enterobacter* (8 %) et l'absence de *Coprococcus sp.* dans la biomasse de référence et la présence de *Coprococcus sp.* (10 %) et de peu *d'Enterobacter* (< 5 %) pour la biomasse broyée alors que l'abondance relative des *Enterococcus spp.* est équivalente dans les deux échantillons.

Le *consortium* bactérien de la référence correspondant à l'ensilage de maïs congelée est dominée par un trio de genres : *Clostridium* (46 %), *Enterococcus* (29 %) et *Escherichia* (18 %) alors que pour le test congelé et broyé le genre majoritaire est *Clostridium* (74 %), accompagné par des *Coprococcus sp.* (12 %) ; les autres

genres étant moins abondants. En ce qui concerne les espèces du genre *Clostridium* des biomasses congelées, les échantillons broyés et non broyés présentent une proportion similaire de *Clostridium sp.* (26 %) et de *C. ljungdahlii* (7 %). En revanche, le *taxon Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis* est plus abondant dans la biomasse congelée et broyée, 40 %, contre 13 % pour la biomasse non broyée.

Ainsi, le prétraitement de la biomasse d'ensilage de maïs par broyage donne lieu, lors de la fermentation, au développement de bactéries appartenant au genre *Clostridium* (75 %), *Coprococcus* en proportion plus faible (10 -12 %) et de *taxons* secondaires différents suivant la température de stockage. Dans le cas de la biomasse stockée à 4°C, *Clostridium intestinale* est majoritaire avec *Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis* alors que pour la biomasse congelée, *Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis* domine avec *Clostridium sp. (26 %).* Les autres genres bactériens *Enterococcus, Escherichia* et *Enterobacter* restent minoritaires dans le *consortium* (inférieurs à 5 % d'abondance relative).

Ainsi, la production d'hydrogène à débit élevé de la biomasse congelée serait liée à la bactérie *Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis* et à la bactérie *Clostridium intestinale* pour la biomasse stockée à 4°C.

La présence de C. intestinale associée à d'excellentes performances de production d'hydrogène est remarquable. En effet, dans la littérature, les performances de Clostridium intestinale, bactérie aérotolérante (Gossner, 2006 ; Lee et al., 1989), pour la production d'hydrogène ont été assez peu étudiées par rapport aux autres Clostridii. Cette bactérie est productrice d'hydrogène par la voie du butyrate. Le manuel Bergey (De Vos et al., 2009) classe Clostridium intestinale parmi les bactéries les plus efficaces pour la production d'hydrogène. De surcroît, elle est proche génétiquement de bactéries plus étudiées pour la fermentation obscure : C. butyricum et C. beijerinckii (Lal et al., 2013). La souche Clostridium intestinale URNW, isolée par Ramachandran et al. (2011) dans un stock de cellulose contaminé a été caractérisée par Lal et al. (2013). Elle est capable de convertir des biomasses en bioéthanol ou en vecteur énergétique comme l'hydrogène avec un rendement de 1,3 mol_{H2}/mol_{hexose}. Cette bactérie gram positive anaérobie est également capable de se développer sur des substrats divers tels que la cellobiose, les hexoses et les polyols. Le temps de génération en croissance sur milieu cellobiose (2 g/L) est estimé à 1,5 h. Parmi les métabolites produits, Ramachandran et al. (2011) relèvent la présence de formiate, lactate, butyrate, acétate, pyruvate et éthanol, ce qui est cohérent avec les observations de Gossner (2006) sur une autre souche de Clostridium intestinale isolée dans des homogénats de racines Juncus roemerianus. Wu et al. (2006) rapportent la présence de C. intestinale en suspension dans un bioréacteur continu (temps de séjour liquide de 4h et teneur en substrat de 27g_{saccharose}/L) et plus récemment, les travaux de Rombouts (2020) relèvent l'enrichissement d'un inoculum de rumen de bovin en C. intestinale lors d'une fermentation de glucose et d'un mélange de glucose et xylose en bioréacteur continu. L'abondance de C. intestinale est corrélée le plus souvent avec la production de butyrate. Ces résultats suggèrent que la souche de C. intestinale est capable de fermenter le xylose, ce qui n'était pas le cas pour les souches décrites par Gossner (2006) et Ramachandran *et al.* (2011).

Le broyage est un prétraitement mécanique qui améliore nettement le potentiel hydrogène du lot 1 d'ensilage de maïs. Les fermentations obscures de l'ensilage de maïs broyé présentent un métabolisme plus favorable à la production d'hydrogène, qui repose sur une production de butyrate importante et une diminution de l'homoacétogenèse par rapport à la biomasse brute de référence. Ce métabolisme est associé, en cours de fermentation, à des *consortia* riches en *Clostridii*.

3.2. Effet du broyage sur l'ensilage de maïs lot 2.

Une démarche analogue est appliquée à l'ensilage de maïs lot 2. Les expériences avec la biomasse stockée à 4°C sont réalisées sur une période de 25 jours. Afin de prévenir tout risque de dégradation aérobie observé au chapitre IV, cette fois la biomasse a été conservée sous vide et à 4°C.

3.2.1. Production d'hydrogène et métabolisme fermentaire

La figure 49 présente la production d'hydrogène et de métabolites par fermentation endogène du lot 2 d'ensilage de maïs suivant les modalités de stockage et de broyage.



<u>Figure 49</u> : Effet du broyage de la biomasse d'ensilage de maïs congelé ou stockée à 4°C sur le potentiel hydrogène : production cumulée d'H₂ (a) et production de métabolites (b) Les barres d'erreur rendent compte de la variabilité (n = 2, excepté pour la référence stockée à 4°C : n = 3

Le tableau 28 présente l'effet du broyage sur les paramètres de performance de la production d'hydrogène par fermentation obscure et ceux de l'équation de Gompertz.

Cto alva ao	Tusitanaant	Production Rendement		Productivité max	Rapport	
Stockage	Traitement	(mLH2/Lbioréacteur)	(mL _{H2} /g _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	H ₂ /CO ₂
4°C (< 25 j)	Référence	970 ± 93	45,5 ± 4,4	0,47 ± 0,05	106 ± 36	0,63 ± 0,06
	Broyé	1700 ± 2,1	79,8 ± 0,1	0,79 ± 0,02	242 ± 13	0,85 ± 0,04
Congelé*	Broyé	2220 ± 110	104,2 ± 5,2	1,00 ± 0,03	293 ± 38	0,84 ± 0,02

<u>Tableau 28</u> : Effet du broyage sur des biomasses d'ensilage de maïs (lot 2) stockées sous différentes conditions, paramètres de production d'hydrogène en fermentation obscure et paramètres de l'équation de Gompertz.

Des volumes moyens d'hydrogène de 970 mL_{H2}/L_{bioréacteur} et de 1700 mL_{H2}/L_{bioréacteur} sont obtenus respectivement pour la biomasse non broyée et broyée, ce qui confirme l'effet positif du broyage sur le potentiel hydrogène de la biomasse (+75 %). L'excellente reproductibilité des productions montre que la conservation de la biomasse sous vide est un mode de stockage adéquat. La congélation permet d'augmenter le potentiel de production de l'ensilage congelé et broyé lot 2 dont le volume d'H₂ cumulé s'élève en moyenne à 2220 mL_{H2}/L_{réacteur}, soit un rendement de 104,2 L_{H2}/kg_{MS}. L'effet du broyage se caractérise également par une amélioration de la productivité maximale (+128 %) et dans une moindre mesure du rapport molaire H₂/CO₂ (+35 %, dans le cas de la biomasse fraîche).

En ce qui concerne le métabolisme, le butyrate et l'acétate sont les métabolites les plus produits, le lactate est consommé au cours des fermentations. La production d'éthanol, correspondant à une voie concurrente à la fermentation obscure, et celle de propionate, issue d'une voie consommatrice d'H₂, sont faibles. Lors des fermentations de la biomasse stockée à 4°C, l'augmentation de la production d'H₂ liée au broyage (+30,6 mM) s'accompagne d'une production de butyrate (+14,7 mM), soit un rapport molaire $\frac{H_2}{Butyrate}$ de 2,1 très proche de la stœchiométrie du bilan de la production d'H₂ par la voie du butyrate (Eq 6.1). Ces éléments soulignent la contribution de la voie du butyrate dans l'augmentation de la production d'H₂ à l'instar des observations réalisées sur le lot 1 d'ensilage de maïs congelé.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_3(CH_2)COOH + 2H_2 + 2CO_2$$
 (Eq. 6.1)

La production d'acétate ne semble pas impacter la production d'H₂ analysée en sortie du bioréacteur et reste stable malgré le broyage, ce qui montrerait que les voies de production de l'acétate sont peu impactées par le broyage.

Les rapports molaires B/A des ensilages de maïs broyé sont proche de 1. Cependant, le métabolisme fermentaire de la biomasse broyée et congelée semble s'orienter différemment en ce qui concerne la contribution respective de la voie de l'acétate et du butyrate pour la production d'H₂. En effet, lors de la fermentation de biomasse congelée, la production de butyrate ($26,8 \pm 8,1 \text{ mM}$) seule ne permet pas d'expliquer la production d'H₂ ($90,3 \pm 4,2 \text{ mM}$), signifiant qu'une partie de la production d'H₂ provient de la voie de l'acétate. Ainsi, lors de la fermentation de biomasse broyée et congelée, l'homoacétogenèse a été partiellement inhibée au profil de la voie métabolique aboutissant à la co-production d'acétate et d'H₂. Enfin, on observe une production totale de métabolites stable (60 à 75 mM) entre la biomasse broyée et non broyée confirmant que la production d'H₂ vient d'un meilleur métabolisme lors de la fermentation de biomasse broyée comme observé pour le lot 1.

3.2.2. Effet du broyage sur les consortia fermentaires

Des analyses microbiologiques sont conduites afin d'expliquer les phénomènes observés à l'échelle de la production de gaz et du métabolisme qui seraient liés à l'effet du broyage. La figure 50 présente les *consortia* de l'ensilage de maïs frais du lot 2. La référence est une biomasse non broyée, stockée à 4°C comparée à des biomasses broyées stockées à différentes températures (4°C et -20°C).





Pour la biomasse stockée à 4°C, le broyage permet d'enrichir le *consortia* en *Clostridium butyricum* (de 14 % à 65 %) et de diminuer fortement la diversité bactérienne, ce qui se traduit par une augmentation de l'indice de diversité de Simpson, de 0,17 pour la biomasse de référence à 0,43 pour la biomasse broyée. En contrepartie, nous notons le recul des bactéries productrices d'H₂ (*Enterococcus sp.* et *Veillonella sp.*) et du taxon apparenté aux bactéries lactiques non productrices d'H₂ (*Streptococcus sp.*). Des bactéries non productrices d'H₂ appartenant au genre *Lactobacillus* sont toutefois identifiées dans l'échantillon correspondant à l'ensilage stocké à 4°C et broyé en plus forte proportion que dans la référence. Ainsi, l'augmentation de la production d'H₂ par la voie du butyrate est cohérente avec l'augmentation de l'abondance de *Clostridium butyricum* dans le *consortium* bactérien au regard des résultats des chapitres précédents et de la littérature (Detman *et al.*, 2019 ; Lee *et al.*, 2012 ; Seppälä *et al.*, 2011 ; Stoeva *et al.*, 2021).

Au cours de la fermentation de la biomasse congelée, le *consortium* bactérien identifié semble très riche en bactéries productrices d'H₂ et se caractérise par l'absence de bactéries lactiques. L'abondance des *Clostridium butyricum* (50 %) est plus faible que lors de la fermentation de biomasse stocké à 4°C et broyée mais la présence du taxon appartenant à la famille des *Lachnosipraceae* (17 %) expliquerait la réorientation des voies de production d'acétate par homoacétogènese vers la voie avec coproduction d'H₂ et la légère surproduction d'éthanol. En effet, ce *taxon* présente 96 % d'homologie avec une bactérie du genre *Anaerocolumna*, productrice d'H₂, d'acétate et d'éthanol, identifiée et caractérisée par Ueki *et al.* (2016).

Sur le lot 2 d'ensilage de maïs, le broyage a modifié le développement du *consortium* bactérien en favorisant *Clostridium butyricum* au détriment des autres *taxons* producteurs présents lors de la fermentation de biomasse brute. Par rapport au lot 1, on ne retrouve pas le taxon correspondant à *Clostridium intestinale* qui était associé aux performances de production d'H₂ élevées. L'abondance des bactéries non productrices d'H₂ a été légèrement réduite : le taxon du genre *Lactobacillus* (14 %) remplaçant le *taxon Streptococcus sp.* (22 %). L'effet combiné de la congélation et du broyage a permis de réorienter le métabolisme de production d'A₂ en sélectionnant des bactéries productrices d'acétate (*Lachnosipraceae sp.*) et en inhibant les bactéries lactiques.

3.3. Bilan et comparaison des deux lots - Analyse des corrélations

Cette partie propose une synthèse des résultats précédents pour prendre la mesure des effets du broyage sur l'ensilage de maïs et comparer les performances des 2 lots d'ensilages de maïs prétraités.

Le tableau 29 récapitule les paramètres de performance de la production d'hydrogène par fermentation obscure et ceux l'équation de Gompertz à partir des tests de fermentation d'ensilage de maïs réalisés sur les lots 1 et 2.

Ensilage de			Production Rendement		ndement	Productivité max	Rapport
maïs	Stockage	Traitement	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(mL _{H2} /g _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	H ₂ /CO ₂
	4°C (< 90 i)	Référence	920 ± 25	38,1 ± 1,0	0,41 ± 0,02	128 ± 21	0,62 ± 0,01
Lot 1	4 C (< 80 J)	Broyé	2460 ± 83	103,8 ± 3,5	1,07 ± 0,04	286 ± 58	1,15 ± 0,02
	Congelé	Référence	690 ± 80	26,5 ± 1,3	0,27 ± 0,03	58 ± 15	0,59 ± 0,01
		Broyé	1300 ± 67	54,9 ± 2,9	0,57 ± 0,03	158 ± 44	0,68 ± 0,05
Lot 2		Référence	970 ± 93	45,5 ± 4,4	0,47 ± 0,05	106 ± 36	0,63 ± 0,06
	4 C (< 25 J)	Broyé	1700 ± 2,1	79,8 ± 0,1	0,79 ± 0,02	242 ± 13	0,85 ± 0,04
	Congelé	Broyé	2220 ± 110	104,2 ± 5,2	1,00 ± 0,03	293 ± 38	0,84 ± 0,02

<u>Tableau 29</u> : Effet du broyage sur les deux lots d'ensilage de maïs stockées sous différentes conditions, paramètres de production d'hydrogène en fermentation obscure et paramètres de l'équation de Gompertz.

Sur tous les lots d'ensilage de maïs testés et quelles que soient les modalités de stockage, le broyage a eu un effet très positif sur les performances de production d'H₂ à tous les niveaux : production, rendement,

productivité maximale et rapport molaire H₂/CO₂. Les rendements en H₂ obtenus après broyage de la biomasse sont variables, ils s'échelonnent de 54,9 à 104,2 L/kg_{MS}. Ces valeurs sont certes inférieures à celles obtenues par Cieciura-Włoch et Borowski (2019) utilisant des boues de STEP prétraitée comme *inoculum* (260 L/kg_{MS}) et par Dauptain *et al*. (2020) mettant en œuvre la biomasse broyée en fermentation endogène avec ajout de nutriments (146 L/kg_{MS}), mais elles sont dans le même ordre de grandeur que celles mesurées par Kyazze *et al*. (2008), Manzini *et al*. (2015), Nkemka *et al*. (2015) et Tenca *et al*. (2011) (tableau 26).

Des gains de production et des rendements en hydrogène différents ont été obtenus selon les lots et les modalités de stockage. Les deux références d'ensilage de maïs stockés à 4°C testées ont des rendements moyens proches 38,1 (lot 1) et 45,5 L/kg_{MS} (lot 2) ; le broyage a un effet supérieur sur le potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de maïs du lot 1 (+172 %) par rapport au lot 2 (+75 %). La dégradation aérobie de l'ensilage en intensifiant les effets du broyage pourrait expliquer ce bon résultat et soulignerait alors l'intérêt de combiner ces deux prétraitements. L'analyse des résultats du lot 2 montre également que les effets de la congélation se combinent à ceux du broyage en augmentant le rendement de 31 % par rapport à l'ensilage de maïs stocké à 4°C. Fait expérimental remarquable, les rendements litre d'en H₂ par gramme de matières sèches les plus élevés sont similaires pour le lot 1 et le lot 2, malgré des conditions de stockage différentes, mettant en évidence un possible optimum d'extractibles métabolisables en fermentation sous l'effet du broyage. De plus, ce résultat est cohérent avec les analyses des fractions biologiques du Chapitre III qui montraient une bonne homogénéité de la composition des deux lots d'ensilages de maïs.

Une analyse en composantes principales basée sur les corrélations de Pearson est effectuée avec les données fermentaires (production, métabolisme et *consortia* bactériens) collectées précédemment et normalisées, auquel a été ajouté le nombre de moles d'acétate produits par homoacétogénèse sur la base du calcul présenté dans le chapitre II. La représentation graphique de l'ACP est exposée sur la figure 51. La dénomination « Abondance des BPH » correspond à l'abondance relative des bactéries productrices d'hydrogène comprenant les taxons du genre *Clostridium* (excepté Clostridium ljungdahlii) et les taxons affiliés aux familles/genre/espèces comme *Enterobacter sp., Enterococcus sp., Veillonella sp. Lachnosipraceae sp, Escherichia coli et Coprococcus sp..*



<u>Figure 51</u> : Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques de production d'H₂ et des principaux métabolites produits au cours des fermentations des 2 lots d'ensilage de maïs brut ou broyé

Les deux composantes F1 et F2 de l'ACP présentées sur la figure 51 sont suffisantes pour expliquer plus de 72 % de la variabilité des données. Selon l'axe horizontal, on note plusieurs variables corrélées positivement à la variable broyage : la production de butyrate, le rapport molaire H₂/CO₂, le rapport molaire B/A, et la production d'H₂ et dans une moindre mesure la productivité maximale en hydrogène et la production de CO₂. Ces corrélations confirment les observations effectuées à partir du tableau 29 à propos des paramètres de production d'hydrogène en fermentation obscure et des paramètres de l'équation de Gompertz. Ces corrélations traduisent bien le rôle prépondérant de la voie du butyrate dans la production d'H₂ par fermentation endogène de l'ensilage de maïs.

De même, notons que la production d'acétate totale est corrélée au nombre de moles d'acétate produites par la voie de l'homoacétogenèse ; ces variables sont logiquement corrélées négativement avec la production d'H₂, elle-même corrélée au traitement de broyage .

De manière remarquable, le rendement en H₂ est corrélé avec l'abondance des bactéries productrices d'H₂ (BPH). Ces variables ne sont pas corrélées significativement avec le broyage mais dépendent davantage du lot de la biomasse, de ses caractéristiques (teneur en matières sèches et en sucres) ou du mode de stockage (congélation, stocké à 4°C sur une courte ou longue période), qui impactent le rendement en H₂ et la composition du *consortium* fermentaire indépendamment du broyage. Sur les deux lots testés, ces résultats montrent que le broyage a un effet très positif tant sur la production d'H₂ que sur le métabolisme bactérien par l'augmentation de la production de butyrate et la réduction de l'homoacétogenèse.

- 4. Effet du broyage sur le fractionnement de la biomasse d'ensilage de maïs congelé et les performances de production en hydrogène et métabolites
 - 4.1. Fractionnement de la biomasse d'ensilage de maïs congelé et performances de production d'hydrogène

Une première expérience de trempage est effectuée sur la biomasse d'ensilage de maïs congelé (lot 1) sans aucun prétraitement, sans addition de nutriments et sans ajout d'inoculum bactérien.

La figure 52 présente le potentiel de production d'hydrogène et la production en métabolites du filtrat ainsi que du résidu de filtration, ces essais sont comparés au potentiel hydrogène de la biomasse entière (ensilage de maïs congelé). Notons que le résidu a été dilué avant fermentation dans les mêmes proportions que la biomasse entière (71,6 g/L).



<u>Figure 52</u> : Production d'hydrogène de la biomasse d'ensilage de maïs congelé, entière et trempée avec l'obtention du résidu et du filtrat (a) et production de métabolites (b). Les barres d'erreur indiquent la variabilité (maïs entier, n = 4; résidu, n = 2; filtrat, n = 3).

Le filtrat présente le potentiel de production d'hydrogène le plus faible (moins de 150 mL d'H₂ (figure 52a), ce qui représente 33 % du potentiel H₂ de la biomasse entière. L'extraction des matières fermentescibles s'avère donc relativement réduite. Cependant de façon remarquable, on observe que le résidu de filtration présente un potentiel hydrogène très similaire à celui de la biomasse entière (production cumulée de 495

mL). Ainsi, le fractionnement de la biomasse a permis d'améliorer le potentiel de production global en H₂ de la biomasse d'ensilage de maïs de 30 %.

D'un point de vue métabolique, les principaux métabolites produits sont l'acide butyrique, l'acide acétique et l'éthanol en proportions très différentes d'une fraction de biomasse à l'autre (figure 52b). Lors de la fermentation du filtrat, le rapport molaire Butyrate/Acétate est le plus élevé (1,54). La consommation de lactate (-15,8 mM), présent initialement en quantité non négligeable dans le milieu fermentaire, explique ce métabolisme qui est cohérent avec les résultats du chapitre III, à savoir, une production importante de butyrate (12,4 mM) par rapport à l'acétate (8,0 mM), car ce dernier est co-fermenté avec le lactate, et une production d'éthanol réduite.

Les tests du résidu ont un métabolisme orienté différemment par rapport aux deux autres fractions. La voie de l'acétate (21,1 mM) semble contribuer de manière plus importante à la production d'H₂ puisque la production de butyrate est faible (7,0 mM). Notons également une production notable d'éthanol (6,3 mM) pouvant être co-produit avec l'acétate (Eq 6.2) (Li et Fang, 2007 ; Li *et al.*, 2019).

$$C_{6}H_{12}O_{6} + 2H_{2}O \to CH_{3}COOH + CH_{3}CH_{2}OH + 2H_{2} + 2CO_{2}$$
(Eq. 6.2)

La composition initiale du résidu, pauvre en acides et exempt de lactate, entraîne une absence de consommation de lactate puisque celui-ci a été extrait dans le filtrat et pourrait expliquer cette réorientation du métabolisme vers les voies de l'acétate.

Ainsi, les tests effectués sur les différentes fractions de la biomasse d'ensilage de maïs (congelé) montre qu'il est possible de conserver après fractionnement la même production d'hydrogène du résidu solide comparativement à la biomasse entière, la production d'hydrogène de la fraction liquide représentant un surplus de production. Ces travaux mettent également en évidence que le trempage de la biomasse seul permet de solubiliser des matières métabolisables mais en quantité relativement restreinte avec 1/3 du potentiel de production d'hydrogène. L'ensemble de ces résultats démontre un relargage à partir de la biomasse solide (entière et résidu) en cours de fermentation de substances métabolisables au bénéfice de la production d'hydrogène, avec comme démontré au chapitre III un phénomène d'hydrolyse de la biomasse conjoint à la production d'hydrogène. Connaissant l'impact positif du broyage de la biomasse préalablement à la fermentation, il est à ce stade intéressant de déterminer sur quelle fraction son effet sera le plus important.

4.2. Fractionnement de la biomasse d'ensilage de maïs congelé broyé et performances de production d'hydrogène

Dans le but d'améliorer l'extraction des matières fermentescibles dans le filtrat, la biomasse est broyée avant trempage. Le bénéfice du broyage par la réduction de la taille des particules pour solubiliser les sucres d'une biomasse lignocellulosique (paille de sorgho doux) a été établi par Jia *et al.* (2013). Les deux lots d'ensilage

de maïs broyé sont fractionnés selon la même procédure (seuil de coupure inférieur à 1 mm pour la filtration) que celle appliquée pour le lot 1 d'ensilage de maïs non broyé (voir *supra*, partie 4.1)

4.2.1 Production d'hydrogène et de métabolites à partir des fractions résultant du trempage de l'ensilage de maïs congelé et broyé (lot 1)

La figure 53 présente le potentiel hydrogène et la production en métabolites du filtrat ainsi que du résidu de filtration de l'ensilage de maïs congelé et broyé ; ces résultats seront comparés au potentiel hydrogène de la biomasse entière (ensilage de maïs congelé et broyé). Afin de superposer les courbes de production cumulée d'H₂, les temps de latence ont été ajustés.



<u>Figure 53</u> : Productions d'hydrogène (a) et de produits fermentaires (b) de la biomasse d'ensilage de maïs congelé, broyé et trempé (résidu et filtrat). Les barres d'erreur rendent compte de la variabilité (n = 2, excepté maïs broyé entier : n = 3). Les temps de latence ont été modifiés de manière à superposer les courbes de production cumulée d'H₂.

Le tableau 30 présente les paramètres de performance de production d'hydrogène et de l'équation de Gompertz après un trempage de la biomasse congelée non broyée et broyée avec la teneur en sucres totaux des différentes fractions.

<u>Tableau 30</u> : Impact du broyage et du trempage de l'ensilage de maïs congelé sur les paramètres de performance de production d'hydrogène et ceux de l'équation de Gompertz.

Biomasse		Matière sèche	Teneur en sucres	Production	Rendement	Productivité max	Latence	Rapport
		(%)	(g _{sucres} /L)	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	H ₂ /CO ₂
Fation	Non broyé	33,2 ± 1,2	18,7	690 ± 80	0,27 ± 0,03	58 ± 15	8,2 ± 0,1	0,59 ± 0,01
Entier	Broyé	33,2 ± 1,2	18,7	1300 ± 67	0,57 ± 0,03	158 ± 44	10,7 ± 1,7	0,68 ± 0,05
Filtrat	Non broyé	0,46 ± 0,01	0,9 ± 0,1	195 ± 7	1,64 ± 0,06	15 ± 1	8,9 ± 3,1	0,52 ± 0,01
Filtrat	Broyé	0,72 ± 0,05	7,1 ± 0,2	1101 ± 10	$1,14 \pm 0,01$	113 ± 1	8,1 ± 2,1	0,76 ± 0,01
Résidu	Non broyé	-	17,8*	698 ± 19	0,29 ± 0,03	29 ± 1	8,5 ± 4,5	0,60 ± 0,15
Residu	Broyé	16,2 ± 0,2	11,6*	587 ± 17	0,38 ± 0,03	38 ± 15	10,6 ± 3	0,83 ± 0,01

*valeur calculée

Pour rappel, un volume cumulé d'H₂ de 910 mL est obtenu à partir de l'ensilage de maïs broyé (1300 mL_{H2}/L_{bioréacteur}). Le filtrat obtenu par trempage de la biomasse broyée présente un très bon potentiel H₂ (770 mL, 1100 mL_{H2}/L_{bioréacteur}) proche de celui de la biomasse entière. Ainsi, le broyage a permis l'extraction de près de 85 % du potentiel de production d'H₂ dans le filtrat. La production d'H₂ s'effectue en deux phases caractérisées par une productivité élevée, comparable à celle la biomasse entière broyée (>100 mL_{H2}/L/h). Le résidu broyé présente un potentiel de production d'hydrogène plus faible (410 mL).

D'après le tableau 5, on observe que le broyage a permis d'accroître de manière très significative le potentiel hydrogène du filtrat notamment par la libération des sucres (x 7,9). Le filtrat obtenu par trempage de la biomasse broyée présente un potentiel H₂ très supérieur à celui obtenu avec de la biomasse non broyée (x 5,6), une productivité maximale importante (112 mL_{H2}/L/h) et un rapport molaire H₂/CO₂ supérieur à celui de la biomasse entière. Ces performances de production d'hydrogène à partir d'ensilage de maïs broyé seront favorables à la mise en œuvre du procédé continu (BRM).

Les résidus de trempage présentent tous deux une production d'hydrogène assez similaire et du même ordre de grandeur que celui de la référence « maïs entier » sans broyage (587 - 698 $mL_{H2}/L_{bioréacteur}$ contre 690 $mL_{H2}/L_{bioréacteur}$), avec un rapport molaire H_2/CO_2 légèrement supérieur mettant en évidence un métabolisme microbien mieux orienté pour la production d'hydrogène dans le résidu que dans la biomasse entière. Même si le résidu ne peut pas être utilisé dans le BRM, sa valorisation est envisageable en fermentation obscure en réacteur semi batch ou en méthanisation.

Concernant le rendement de conversion des sucres en H₂ on note une valeur très supérieure pour la fraction liquide (filtrat) comparativement à la fraction solide d'une part et à la biomasse entière d'autre part, ce qui montre bien que les composés facilement fermentescibles sont les solubles. Les sucres présents sous forme de polysaccharides dans la biomasse nécessitent d'être hydrolysés. Cette hydrolyse requiert la synthèse d'enzymes hydrolytiques et d'énergie chimique sous forme d'ATP, ce qui explique les rendements de

conversion plus faibles par rapport au filtrat. De plus, tous les sucres présents dans la biomasse ne sont pas hydrolysés au cours de la fermentation obscure, ce qui limite le rendement.

Le filtrat préparé à partir de biomasse broyée présente un rendement plus faible que celui de la biomasse non broyée, ce qui indiquerait que des polysaccharides et des sucres difficilement fermentescibles ont été extraits consécutivement au broyage. Cette observation est motivée par la présence deux phases de production sur la figure 9 qui seraient chacune associés à l'utilisation d'un substrat différent. L'extraction de sucres peu fermentescibles (cellulose cristalline) dans la phase liquide peut également justifier la diminution du rendement d'H₂.

Notons que le résidu biomasse broyé présente un rendement supérieur à celui du résidu non broyé. De manière cohérente avec la littérature, le broyage faciliterait l'hydrolyse de la partie solide de la biomasse.

En ce qui concerne le métabolisme, les tendances identifiées avec la biomasse non broyée se retrouvent avec les fractions obtenues avec l'ensilage broyé. La biomasse entière broyée présente les teneurs les plus importantes en métabolites (acétate, butyrate, éthanol) et son métabolisme est favorable à la production d'acétate par homoacétogenèse. Comme observé sur le rendement de production d'H₂, le métabolisme du filtrat est plus efficace et la production d'H₂ s'effectue essentiellement par la voie du butyrate (B/A = 1,75). La production d'H₂ du résidu s'effectue par la voie de l'acétate du fait de l'absence de lactate dans le milieu initial.

4.2.2 Impact du trempage sur les consortia fermentaires des fractions d'ensilage de maïs congelé et broyé (lot 1)

Les *consortia* fermentaires de l'ensilage de maïs broyé entier, provenant du filtrat et du résidu sont analysés par séquençage. Les abondances relatives des principaux taxons au cours de la fermentation sont présentées sur la figure 54.

Chapitre 6



<u>Figure 54</u> : Analyse des *consortia* lors de la fermentation d'ensilage de maïs (lot 1) congelé et broyé et des différentes fractions obtenues par trempage de cette biomasse.

Au cours de la fermentation obscure des différentes biomasses testées, on observe l'émergence de *consortia* bactériens dominés par les genres *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus* et la famille des *Lachnospiraceae* dont les voies métaboliques produiraient de l'hydrogène par la voie de l'acétate (Palomo-Briones *et al.*, 2017; Valdez-Vazquez *et al.*, 2015). Les bactéries non productrices d'H₂ (*Clostridium ljungdahlii et Lactobacillus brevis*) sont identifiées en faible proportion (< 5 %).

La biomasse entière et le filtrat présentent des abondances similaires de bactéries appartenant au genre Clostridium (72 %). Dans ces échantillons, le taxon correspondant à Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis est majoritaire (66 % dans le filtrat) et co-domine (40 %) avec Clostridium sp. (26 %) dans la biomasse entière. Parmi les autres Clostridii présentes en faible proportion, on retrouve la bactérie homoacétogène Clostridium ljungdahlii et la productrice d'H₂ Clostridium intestinale. Parmi les autres bactéries productrices d'H₂, la biomasse entière présente un nombre important de bactéries présentes en faible proportion (4 à 12 %) alors que dans le filtrat, on retrouve majoritairement des Enterococcus spp. (18 %). Dans le filtrat, on observe l'émergence de Lactobacillus brevis (3 %), une bactérie qui était absente des consortia lors des fermentations de biomasse congelée (Chapitre IV). Les bactéries fermentaires présentes dans le résidu sont différentes des autres fractions. Les Lachnospiraceae (37 %) sont majoritaires devant Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis (30 %), Enterobacter (15 %) et Enterococcus (9 %).

4.3. Conclusion sur l'effet du broyage sur le trempage d'ensilage de maïs

Deux alimentations liquides utilisables en BRM ont été préparées avec succès à partir de la biomasse broyée et non broyée. L'utilisation de l'ensilage de maïs entier a montré des limites en termes de solubilisation des sucres et de potentiel hydrogène par rapport à l'ensilage de maïs broyé. Les gains de production d'H₂ très substantiels (x 5,6) de la solution d'alimentation préparée avec de la biomasse broyée justifient pleinement

le recours au broyage. En effet, ce prétraitement permet une forte libération des sucres (x 7,9) par rapport au trempage de la biomasse non broyée.

Avec les données expérimentales, si l'on considère que le résidu peut être valorisé énergétiquement, le trempage de la biomasse et la fermentation séparée du filtrat et du résidu améliore le potentiel hydrogène de 30 % par rapport à une fermentation de la biomasse entière. Au terme de cette partie, il apparaît que le filtrat d'ensilage de maïs broyé est un bon candidat en tant que substrat d'alimentation du BRM.

5. Potentiel de production d'hydrogène d'ensilage de seigle fractionné et effet du broyage de la biomasse

5.1. Production d'hydrogène et métabolisme

Nous avons montré dans le chapitre III que la fermentation endogène de l'ensilage de seigle frais et congelé permettait d'obtenir des productions d'H₂ avec une productivité maximale élevée (autour de 100 mL/L/h) en raison de la présence de sucres solubles facilement métabolisables (glucose et fructose). La présence de ces composés est particulièrement intéressante en vue de la mise en œuvre de la biomasse en BRM en mode continu. Ainsi, pour récupérer les sucres fermentescibles de la biomasse, une extraction sous agitation par trempage dans l'eau a été réalisée, dans un premier temps avec l'ensilage de seigle congelé, puis dans un second temps, avec de la biomasse broyée pour intensifier l'extraction, selon le même protocole que pour la biomasse d'ensilage de maïs. Des données sont disponibles en annexes sur la stabilisation de l'ensilage de seigle à -20°C.

La figure 55 présente les volumes d'H₂ cumulés, la production des métabolites et la consommation des sucres à l'issue de la fermentation pour la biomasse d'ensilage de seigle (lot 1) entière non broyée et broyée et pour les filtrats obtenus dans chaque cas. Il est en effet à noter que seuls les tests à partir de la biomasse entière et des filtrats ont permis d'obtenir une production d'H₂ significative ; après 72 h de fermentation, aucune production d'H₂ n'a été détecté à partir des résidus de trempage (données non présentées).



Figure 55 : Production d'hydrogène (a) et de métabolites (b) lors la fermentation endogène de filtrats de seigle (lot 1) préparés à partir de biomasse congelée brute ou broyée. Les barres d'erreur indiquent la variabilité (n = 2)

Le tableau 31 présente les paramètres de performance de production d'hydrogène et de l'équation de Gompertz de ces tests de fermentation.

Tableau 31 : Paramètres de production d'hydrogène et de l'équation de Gompertz des fermentations de la biomasse
entière et des filtrats préparés à partir de l'ensilage de seigle congelé (lot 1).

Biomasse		Production mL _{H2} /L _{bioréacteur}	Rendement mL _{H2} /g _{MS}	Productivité max mL _{H2} /L/h	H ₂ /CO ₂
Entier		537 ± 17	28 ± 1	182 ± 12	0,7 ± 0,1
Filtrat	Non broyé	603 ± 3	29 ± 1	145 ± 28	0,8 ± 0,1
Entier	Dravá	615 ± 20	32 ± 1	149 ± 4	0,7 ± 0,1
Filtrat	вгоуе	628 ± 32	30 ± 2	150 ± 30	0,8 ± 0,1

Les filtrats présentent des productions cumulées d'H₂ légèrement supérieures aux tests avec la biomasse entière puisque 7,5 % de biomasse supplémentaire est mise en œuvre dans le bioréacteur (71,6 g/L pour les tests de biomasses entières et 77,0 g/L pour les tests de filtrats) (figure 55). De manière tout à fait remarquable, les rendements de production d'H₂ par gramme de matières sèches mis en œuvre sont maintenus entre les fermentations de filtrats seuls et de biomasse entière (tableau 31).

Il est à noter que la productivité maximale en H_2 et le rapport molaire H_2/CO_2 sont similaires pour les différents tests de fermentation. Les fermentations présentent des métabolismes proches, favorables à la production d' H_2 par la voie du butyrate avec des rapports molaires Butyrate/Acétate élevés (≈ 2).

Enfin, le broyage n'impacte que très légèrement le rendement de production d'H₂. Cet effet positif serait lié d'une part, à une meilleure solubilisation des sucres et du lactate dans le milieu réactionnel initial, ce qui se traduit sur la figure 55 par une consommation supérieure de ces molécules (en moyenne -12,4 mM dans la biomasse broyée et -9,4 mM dans biomasse brute) et d'autre part, à la réduction de production de propionate au cours des tests mettant en œuvre la biomasse broyée. Le broyage ne semble donc pas indispensable pour le fractionnement de la biomasse d'ensilage de seigle congelée.

5.2. Effet du fractionnement sur les consortia fermentaires de l'ensilage de seigle congelé

La figure 56 présente les espèces bactériennes identifiées lors de la fermentation du filtrat d'ensilage de seigle et de l'ensilage de seigle congelé entier. En raison des faibles gains de production d'H₂ générés par le broyage, les *consortia* bactériens des tests de fermentation de d'ensilage de seigle broyé n'ont pas été séquencés.



Figure 56 : Consortia fermentaires lors de la fermentation endogène d'ensilage de seigle congelé, biomasse entière et filtrat.

Les *consortia* identifiés sur la figure 56 sont très similaires. Ils sont constitués de quatre taxons majoritaires (*Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis, Enterobacter spp., Enterobacteriaceae sp., Enterococcus spp.*) dont l'abondance relative est relativement proche entre la biomasse entière et le filtrat. Ces compositions de *consortia* bactériens sont en accord avec les observations relatives aux métabolismes des tests de fermentation, qui étaient également très similaires en termes de rapport molaire B/A. Ainsi, le trempage de l'ensilage de seigle n'a pas impacté spécifiquement les *consortia* bactériens qui émergent au cours de la fermentation du filtrat par rapport à celui de la biomasse entière.

5.3. Discussion et conclusion sur le fractionnement de l'ensilage de seigle congelé

De façon remarquable, le fractionnement par trempage a permis d'extraire la quasi-totalité du potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de seigle dans une phase liquide, le filtrat ; pouvant servir d'alimentation pour le BRM. Le métabolisme de la fermentation et les *consortia* présents lors de la productions d'H₂ sont très proches entre les tests de la biomasse entière et les filtrats. La mise en œuvre d'un broyage n'est pas nécessaire pour le trempage de l'ensilage de seigle.

Plusieurs éléments pourraient expliquer le maintien et / ou l'amélioration du rendement de production d' H_2 dans les filtrats. Il semblerait que tous les composés fermentescibles de la biomasse soient solubles dans l'eau et que l'ensilage de seigle ait une structure végétale récalcitrante à l'hydrolyse bactérienne lors de la fermentation, c'est-à-dire contenant des sucres complexes difficilement hydrolysables par les bactéries comme le montre l'absence de production d' H_2 à partir du résidu.

Un autre élément serait le relargage de molécules d'inhibitrices issues de la lignine dans la phase liquide, au cours de la fermentation (Hendriks et Zeeman, 2009). Pour valider cette hypothèse, il faudrait comparer les valeurs expérimentales obtenues avec les filtrats avec la production d'H₂ d'ensilage de seigle trempé dont les fractions solide et liquide n'ont pas été séparées afin de vérifier que les potentiels de production d'H₂ soient semblables. Ainsi, la suppression de cette partie solide, pouvant contenir des inhibiteurs, induirait une production d'hydrogène plus élevée, ce qui faciliterait la mise en œuvre de la biomasse dans le bioréacteur membranaire. L'hydrolyse de ce résidu non producteur d'H₂ pourrait être envisagée afin d'améliorer le fractionnement de la biomasse, sous réserve que la libération des sucres facilement fermentescibles soit plus profitable que le relargage d'inhibiteurs. Cette perspective sera développée dans le chapitre suivant.

6. Conclusion sur le fractionnement et sur l'impact du broyage de la biomasse

Au cours de ce chapitre, il a été montré que l'extraction des molécules solubles de biomasses ensilées par trempage dans l'eau permet d'obtenir une phase liquide pouvant servir de substrat à la production d'H₂ par voie fermentaire endogène. Avec l'ensilage de seigle, le trempage permet d'extraire la totalité du potentiel de production d'H₂ dans le filtrat et pour l'ensilage de maïs, 85 % du potentiel de production d'H₂ de la biomasse entière est extrait. Le broyage de l'ensilage de maïs a permis d'améliorer la production d'H₂ avec un gain de production d'H₂ multiplié par 5, lié à une libération des sucres plus important (x 8) par rapport au trempage de la biomasse non broyée. Ce prétraitement a donc permis une très nette amélioration du métabolisme fermentaire et l'enrichissement du *consortia* en bactéries productrices d'H₂. Lors du fractionnement de l'ensilage de maïs, le broyage a permis d'obtenir un filtrat à haut potentiel de production d'H₂ (1,1 L_{H2}/L soit 142,0 L_{H2}/kg_{M5}) comparativement à la biomasse entière broyée (1,3 L_{H2}/L soit 54,9 L_{H2}/kg_{M5}). Il a pu être démontré que pour l'ensilage de seigle, le broyage n'est pas nécessaire pour la production d'H₂ à partir de biomasse entière ou pour l'extraction de la matière soluble fermentescible.

Dans la perspective d'intensifier le fractionnement de l'ensilage, des traitements hydrothermiques d'hydrolyse pourraient améliorer la solubilisation des sucres au risque de stériliser la biomasse (Datar *et al.*, 2007) et de rendre impossible toute fermentation par voie endogène. Ils sont envisagés au chapitre 7.

L'étude de Jia *et al.* (2013) propose des pistes d'amélioration pour le trempage : la réduction du taux d'humidité dans la biomasse pendant le stockage et l'augmentation de la température lors de l'extraction. La réduction de la taille des particules permet à la fois d'accélérer la cinétique de solubilisation des sucres et d'augmenter la teneur en sucres dans la phase liquide. Les auteurs préconisent également un recyclage de

l'eau pour l'extraction des solubles. Cette méthode a une efficacité en termes de quantité de sucres extraits par gramme de biomasse comparable à celle du recyclage de la biomasse en concentrant les sucres dans la solution. Cette stratégie revient à augmenter la concentration en biomasse pour préparer le filtrat. Elle sera envisagée dans le chapitre 8.

Chapitre VII : Intensification du fractionnement de la biomasse d'ensilage par prétraitements hydrothermiques – Fermentation par voie exogène

La technique d'extraction par trempage décrite au chapitre 6 a permis d'obtenir une solution contenant une quantité de sucres produisant de l'H₂ en bioréacteur semi batch. Sur l'ensilage de maïs (lot 2), les performances du filtrat ont conduit à une extraction d'environ 33 % du potentiel hydrogène total de la biomasse. Dans ce chapitre, nous proposons de mettre en œuvre des prétraitements hydrothermiques pour améliorer la libération des sucres dans la phase liquide et augmenter la production d'hydrogène de la biomasse en vue de la préparation d'une solution d'alimentation pour le BRM.

1. Introduction

Les biomasses lignocellulosiques sont des ressources renouvelables adaptées à la production de biohydrogène par fermentation grâce à leur forte teneur en saccharides contenus dans la cellulose et les hémicelluloses. Même si une hydrolyse bactérienne se produit généralement pendant le processus de fermentation de la biomasse (chapitre 3), le potentiel de production d'hydrogène de cette dernière est limitée par sa structure récalcitrante (Duque *et al.*, 2016). Le prétraitement de la biomasse est alors crucial pour libérer des sucres et améliorer le potentiel H₂ de la fermentation obscure (Hendriks et Zeeman, 2009).

Parmi les prétraitements existants pour faciliter l'accès des bactéries productrices d'hydrogène au substrat, l'explosion à la vapeur de la biomasse apparaît comme un procédé de choix de par sa faible consommation énergétique par rapport au broyage par exemple (Holtzapple *et al.* 1989) et à son impact environnemental limité du fait de l'utilisation optionnelle de produits chimiques. L'explosion à la vapeur se compose de deux étapes : une étape de vapocraquage où la biomasse est chauffée brièvement sous pression de vapeur saturante (1 min - 10 min à 160°C - 260°C), suivie d'une étape de décompression explosive consécutive à la dépressurisation rapide du réacteur dans l'exploseur (Duque *et al.*, 2016).

Plusieurs phénomènes physico-chimiques interviennent au cours de ces étapes. Pendant le vapocraquage, la biomasse s'imprègne de vapeur qui se condense et initie la libération d'acides organiques issus des groupes acétyles des hémicelluloses. Ces acides catalysent l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique de la biomasse et entraîne la libération de xylane et glucane dans le milieu (Jacquet *et al.*, 2010). Pendant la décompression explosive, une partie de l'eau condensée à l'intérieur de la biomasse est revaporisée. L'expansion rapide de l'eau en vapeur est suffisamment puissante pour faire éclater la biomasse.

En résumé, l'explosion à la vapeur combine des effets thermiques, chimiques et mécaniques pour l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique et la délignification de la biomasse.

Ce procédé a déjà été utilisé pour la production d'éthanol, de butanol, de méthane et d'hydrogène et à partir de substrats divers tels que le bois, la paille de maïs ou d'autres biomasses lignocellulosiques (Bhatia *et al.*, 2020 ; Datar *et al.*, 2007 ; Söderström *et al.*, 2002 ; Xia *et al.*, 2020). Le potentiel hydrogène des composants du maïs (paille, rafles, épis, feuilles, amidon) a été largement présenté (chapitre 1) et le prétraitement de la biomasse a démontré son efficacité pour atteindre un rendement de production élevé de H₂ (Cao *et al.*, 2009 ; Datar *et al.*, 2007). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a mis en œuvre des prétraitements efficaces pour l'hydrolyse de l'ensilage de maïs, qui contient une fraction lignocellulosique et une fraction amylacée, ce qui en fait un substrat approprié pour la bioproduction d'hydrogène (Dauptain *et al.*, 2020 ; Kyazze *et al.*, 2008).

Des prétraitements hydrothermaux (explosion de vapeur, microondes et autoclavage) ont été sélectionnés pour réaliser des hydrolyses sur les biomasses d'ensilages de seigle et de maïs. Dans la littérature, plusieurs études pointent la nécessité d'optimiser les paramètres de l'hydrolyse (Park *et al.*, 2013 ; Saratale *et al.*, 2019 ; Sivagurunathan *et al.*, 2017). Nous tenterons donc de déterminer les prétraitements et les paramètres d'hydrolyse associés susceptibles de maximiser le potentiel de production d'H₂ de la biomasse.

En raison des conditions de pression et de température élevées, ces prétraitements stérilisent la biomasse, ainsi, les hydrolysats ont été inoculés avec des bactéries productrices d'hydrogène obtenues à partir de la fermentation obscure endogène de la biomasse ciblée. Au terme de l'hydrolyse, une fraction équivalente à 50 g de biomasse brute est reconstituée puis est mise en œuvre en bioréacteur semi batch avec l'*inoculum* bactérien sélectionné. Nous examinerons également les effets des prétraitements sur le métabolisme fermentaire et les *consortia* bactériens qui se développent au cours de la fermentation à partir de l'*inoculum* exogène. La figure 57 présente la stratégie de mise en œuvre pour tester la production d'H₂ de la biomasse hydrolysée.



Figure 57 : Procédé de préparation de la biomasse hydrolysée (par explosion à la vapeur) pour la fermentation obscure en réacteur en mode semi-batch et analyses associées.

A l'issue du prétraitement, deux phases sont obtenues : un résidu solide et un hydrolysat liquide, riche en sucres. Les deux fractions sont séparées par filtration et pesées. Une fraction de biomasse équivalente à 50 g de matière brute est reconstituée à partir du résidu et d'hydrolysat puis diluée avec de l'eau pour atteindre les conditions standards de fermentation en réacteur semi batch (50 g/batch). Le milieu est ensuite inoculé pour fermentation.

La première partie de ce chapitre caractérisera les *inocula* bactériens qui seront utilisés pour la production d'H₂ à partir de la biomasse ensilée prétraitée. Deux prétraitements thermiques seront utilisés pour améliorer le potentiel de production de l'ensilage de maïs : l'explosion à la vapeur et l'autoclavage. L'effet des prétraitements sera d'abord étudié sur les sucres solubles extraits, sur les productions de gaz et de métabolites et enfin sur les *consortia* fermentaires. Une démarche similaire sera appliquée pour l'ensilage de seigle qui sera prétraité par microondes et autoclave. Enfin, une étude bibliographique sur les prétraitements des résidus du maïs et d'autres biomasses lignocellulosiques positionnera nos résultats parmi les travaux publiés dans la littérature.

2. Production et caractérisation des inocula bactériens

Afin d'adopter une démarche cohérente avec les tests de fermentation présentés au cours de ce manuscrit, les *inocula* bactériens utilisés spécifiquement dans ce chapitre proviennent de la fermentation endogène de nos deux biomasses ensilées. Cette approche se distingue des études habituellement publiées, qui utilisent souvent des *inocula* bactériens provenant de milieux qui n'ont *a priori* pas de lien avec la flore endogène de la biomasse, tels que des boues de méthaniseurs, des boues de STEP ou des boues de décharges (Dai *et al.*, 2021 ; Liu and Cheng, 2010 ; Wang *et al.*, 2012).

2.1. Production des inocula bactériens

La figure 58 présente les profils de production du débit d'H₂ des fermentations au cours desquelles ont été prélevés les *inocula* bactériens et la composition microbienne de ces derniers.



<u>Figure 58</u> : Profils des débits de production d'H₂ des fermentations pour la production des *inocula* bactériens (a) et composition microbiologique des *inocula* bactériens (b). L'arrêt de la fermentation pour le prélèvement est matérialisé par une flèche. La courbe en bleu claire représente la cinétique normale de débit H₂ qui n'est pas observé puisque la fermentation a été stoppée pour effectuer le prélèvement.

Pour l'ensilage de maïs, le prélèvement de l'*inoculum* a été fixé au cours de la période de production d'H₂, plus précisément lors de la phase où le débit d'H₂ augmente. D'après les données du chapitre 3, cette phase

de la cinétique de fermentation est associée à l'émergence et à la croissance des bactéries productrices d'H₂. Ainsi, *l'inoculum* bactérien issu du fermentât d'ensilage de maïs contient une proportion importante de *Clostridium butyricum* (39 %), des *taxons* affiliés aux *Clostridiaceae* (19 %), aux *Enterobacteriaceae* (16 %) et aux *Lachnosipraceae* (7 %). Notons également la présence en faible proportion d'autres bactéries productrices d'H₂ (*Veillonellaceae sp.* et *Coprococcus sp.*) ou à activité hydrolytique (*Ruminococcaceae sp.*).

Pour l'ensilage de seigle, *l'inoculum* est prélevé au terme de la fermentation d'un filtrat de biomasse congelée. Les résultats du chapitre 3 révélaient que les populations microbiennes qui émergent lors de fermentation d'ensilage de seigle sont, pour la majorité, identifiées comme des bactéries productrices d'H₂, ce qui est confirmé par l'analyse des données du séquençage. L'*inoculum* bactérien comprend 4 espèces dont l'abondance dépasse 5 % : *Clostridium butyricum* (46 %), *Enterococcus sp.* (21 %), *Enterobacter sp.* (20 %) et une espèce affiliée à la famille des *Enterobacteriaceae* (7 %). L'utilisation d'un filtrat d'ensilage de seigle a été choisie pour faciliter la collecte des bactéries, d'un point de vue technique.

Les *inocula* bactériens correspondent à un volume de 7 mL de digestat, qui ne sont pas prétraités thermiquement avant stockage à -20°C. Ils n'apportent aucun élément nutritif supplémentaire susceptible de modifier le potentiel de production d'H₂ de l'essai. De manière logique, les hydrolysats d'ensilage de maïs seront mis en œuvre avec l'*inoculum* bactérien provenant de la fermentation de l'ensilage de maïs (biomasse entière) et ceux d'ensilage de seigle opérés avec des bactéries provenant de la fermentation du filtrat d'ensilage de seigle. Préalablement aux tests sur biomasses réelles, le potentiel de production d'H₂ associé aux *inocula* bactériens est testé en utilisant un substrat modèle.

2.2. Production à partir de substrat modèle (glucose) et des inocula issus de fermentât de biomasses ensilées

2.2.1 Production de H₂ et des métabolites

Initialement, des expériences de fermentation de substrat modèle (solution de glucose supplémentée en nutriments) ont été effectuées pour évaluer la capacité de production d'H₂ des *consortia* microbiens prélevées en conditions de culture mésophiles (37°C). La quantité de glucose est fixée à 5 g/L. La figure 59 présente les profils de production cumulée d'H₂ et de métabolites au cours de la fermentation du substrat modèle inoculé avec chacun des deux *inocula* bactériens et le tableau 32 regroupe les paramètres de performances et de l'équation de Gompertz.



<u>Figure 59</u> : Production cumulée d'H₂ en mL (a) ; production des métabolites et consommation de glucose dans le milieu réactionnel en mmol/L (b) lors de la fermentation obscure de substrat modèle inoculé à partir de fermentât d'ensilage de maïs et de filtrat d'ensilage de seigle.

Tableau 32 : Performances de la production d'H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation
obscure de substrat modèle inoculé.

Inoculum	Production mL _{H2} /L _{bioréacteur}	Rendement (mol _{H2} /mol _{glucose})	Productivité max mL _{H2} /L/h	Rapport H_2/CO_2
Maïs	825	1,33	199	0,64
Seigle	852	1,34	195	0,65

La production d'H₂ est observée après une phase de latence d'environ 12 h pour *l'inoculum* bactérien obtenu à partir de fermentât d'ensilage de seigle et 17 h pour celui de maïs. Cette latence est probablement liée au temps nécessaire à la reprise de croissance des bactéries après congélation (Datar *et al.*, 2007). Les données du tableau 32 montrent que les deux *inocula* bactériens présentent des données très similaires en termes de production d'H₂ (en moyenne 838 ± 19 mL_{H2}/L), de productivité maximale en H₂ (en moyenne 197 ± 3 mL_{H2}/L/h) et de rapport molaire H₂/CO₂ (en moyenne 0,65 ± 0,01).

Les *inocula* bactériens ont des métabolismes très similaires (figure 59b), l'éthanol et l'acétate sont les principaux co-produits de la fermentation. Le métabolisme lié à la production d'H₂ semble efficace car l'H₂ est produit par la voie de l'acétate dont le rendement en H₂ correspond au rendement maximal *in vivo*, qui s'élève à 4 mol_{H2}/mol_{glucose}. La production de propionate, de formiate ou d'acétate par homoacétogenèse est très faible. Toutefois, une partie importante du glucose est utilisée pour la solvantogenèse comme le montre les productions importantes d'éthanol (27,8 et 24,9 mmol/L) associées à un rapport molaire H₂/CO₂ largement inférieur à 1. Ce métabolisme est différent de celui observé lors des fermentations de production d'H₂ s'effectuait majoritairement par la voie du butyrate avec une faible production d'éthanol.

Datar *et al.* (2007) obtiennent des rendements molaires en H₂ compris entre 2,2 à 3,2 mol_{H2}/mol_{glucose consommé} lors de la caractérisation de leur *inoculum* (boues anaérobie prétraitée à 15°C, 2 h) avec une solution de substrat modèle. Cet *inoculum* prétraité présente un métabolisme plus orienté vers la production du butyrate que vers la production d'éthanol, ce qui explique les rendements de conversion des sucres en H₂ plus élevée et le rapport molaire H₂/CO₂ proche de 1. Clion *et al.* (2015) établissent un constat similaire lors de la production d'H₂ à partir d'une solution de glucose inoculée avec des boues de STEP prétraitées (rendement en H₂ de 2,1 mol_{H2}/mol_{glucose consommé}) dans des conditions expérimentales très similaires aux nôtres. Nos *inocula* bactériens, non prétraités thermiquement, ne semblent donc pas être les plus adaptés pour la fermentation de solution de substrat modèle.

Les *inocula* bactériens de fermentât d'ensilage de maïs et de seigle permettent bien de produire de l' H_2 à partir d'une solution de substrat modèle. L'analyse du métabolisme montre une grande similitude quel que soit l'*inoculum* et un rendement de conversion du substrat en H_2 limité par la solvantogenèse.

2.2.2 Identification des consortia bactériens

L'ADN issu du milieu réactionnel prélevé à 22 h de fermentation est séquencé. La figure 60 présente l'abondance des *consortia* bactériens au cours de la fermentation de la solution de glucose inoculée avec du fermentât issu de la fermentation obscure d'ensilage de maïs et de seigle.



Figure 60 : Abondances relatives des séquences du gène codant pour l'ARN 16S des consortia bactériens de la fermentation obscure de substrat modèle inoculé.

Au cours de la fermentation du substrat modèle, deux espèces bactériennes, représentant 99 % de l'échantillon, sont identifiées avec des abondances significatives : *Enterobacteriaceae sp.* (> 61 %) et *Clostridium butyricum* (>26 %). Les autres *taxons* sont présents en très faible proportion (< 1 %). Fait remarquable, à partir des deux *inocula*, le *consortium* fermentaire qui se développe est très similaire et semble converger spontanément vers un système apparenté à une co-culture, et ce, malgré des populations

microbiennes initiales relativement différentes et diverses. L'analyse des populations microbiennes corrobore les observations précédentes tant en termes de production de gaz que de métabolisme.

En conclusion, les *inocula* bactériens produits à partir de fermentât d'ensilage de maïs et d'hydrolysat de seigle bien que différents d'un point de vue taxonomique sont capables de produire de l'H₂ à partir d'une solution de glucose avec un rendement identique de 1,33 et 1,34 mol_{H2}/mol_{glucose}. Sur ce type de substrat, ils présentent des caractéristiques très proches d'un point de vue fermentaire (coproduction d'acétate et d'éthanol) et microbiologique (coexistence de *Enterobacteriaceae sp.* et *Clostridium butyricum*).

3 Prétraitement de l'ensilage de maïs par explosion à la vapeur

L'optimisation du prétraitement d'explosion à la vapeur est effectuée par un plan d'expériences factoriel complet avec trois paramètres à deux facteurs. Les paramètres sélectionnés sont la température d'hydrolyse (170°C et 190°C), le temps d'hydrolyse (2 min et 10 min) et l'imprégnation ou non à l'acide sulfurique avant explosion pendant 24 h à 4°C. D'après l'équation 7.1 (Chornet et Overend, 2017 ; Chapitre 2), les conditions d'hydrolyse mises en œuvre présentent des facteurs de sévérité combinés (FSC) s'échelonnant de 4,0 à 10,5.

$$FSC = \log\left[t \times e^{\frac{T-T_r}{14,75}}\right] - pH$$
 (Eq 7.1)

avec FSC : facteur de sévérité combiné, T : température du processus (°C), Tr la température de référence (100°C) ; t : temps de séjour (min), le terme 14,75 est une constante basée sur l'énergie d'activation dans les conditions où la cinétique du processus est de premier ordre et obéit à la loi d'Arrhenius, pH : le pH du milieu réactionnel.

Le choix des conditions du prétraitement est crucial pour augmenter la digestibilité de la biomasse (Hendriks et Zeeman, 2009) et résulte d'un compromis puisque toutes les fractions de la biomasse ne sont pas solubles aux mêmes températures et que des inhibiteurs peuvent être générés au cours du prétraitement (Duque *et al.*, 2016).

Les paramètres d'hydrolyse ont été choisis d'après les connaissances propres au LERMAB (Université de Lorraine) sur la technologie d'explosion à la vapeur. Les températures de 170°C et 190°C semblent être un bon compromis entre hydrolyse et dégradation des sucres. En effet, la solubilisation des hémicelluloses a lieu entre 150°C et 180°C (Hendriks et Zeeman, 2009). A des températures plus élevées (proches de 195°C), les sucres, notamment le xylose, sont dégradés par déshydratation en composés furaniques. A de telles températures (190°C) et sur des durées courtes (1 min), plusieurs études montrent qu'il est possible d'hydrolyser une partie importante des hémicelluloses (Datar *et al.*, 2007 ; Esteghlalian *et al.*, 1997 ; Tucker *et al.*, 2003).

La production d'inhibiteurs est liée à la nature de la biomasse et à certains paramètres opératoires du prétraitement d'explosion à la vapeur telles que la température, la durée, la pression et l'utilisation de

catalyseurs comme des acides ou des bases. Les inhibiteurs principaux sont les dérivés furaniques (furfural, 5-hydroxy-méthyl-furufural (5-HMF)) issus de la dégradation (déshydratation) des hexoses et des pentoses contenus dans les fractions cellulosiques et hémicellulosiques. Ces molécules ont un effet bactériostatique décrit dans le chapitre 1 (1.4). Le vapocraquage libère les acides issus des groupes acétyles des hémicelluloses, les acides issus de la dégradation des dérivés furaniques (acide formique, acétique et lévulinique), capables de diminuer le pH intracellulaire et de modifier la pression osmotique (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000) et les acides phénoliques présents dans la lignine qui ont un effet antimicrobien (Kalinoski *et al.*, 2020).

Ainsi, plus la température du prétraitement est élevée, plus la biomasse est hydrolysée et plus les sucres s'accumulent dans la phase liquide. Toutefois, l'augmentation de température favorise la libération d'inhibiteurs. Il y a donc un équilibre à trouver en termes de température entre ces deux phénomènes antagonistes.

3.2 Effet des paramètres d'hydrolyse sur la composition du milieu réactionnel

Des analyses de sucres sont effectuées sur la phase liquide du bioréacteur semi batch avant fermentation. Les données obtenues correspondent à la teneur en sucres dans le milieu réactionnel avant fermentation d'une fraction de biomasse équivalente à 50 g de biomasse brute préparée dans les conditions standards de fermentation en réacteur semi-batch.

Le tableau 33 récapitule la liste des essais d'explosion à la vapeur effectués sur la biomasse d'ensilage de maïs et les teneurs en sucres solubles associées, détectées dans le milieu réactionnel.

Température (°C)	Temps (min)	Imprégnation	Facteur de sévérité combiné	Teneur en sucres totaux (g/L)	Rendement d'extraction des sucres (%)
170	2	Neutre*	4,0	1,5	13 %
170	10	Neutre*	6,3	4,1	49 %
170	2	Acide	5,9	3,0	26 %
170	10	Acide	8,2	5,6	36 %
190	2	Neutre*	6,3	5,1	45 %
190	10	Neutre*	8,6	5,4	48 %
190	2	Acide	8,2	2,6	23 %
190	10	Acide	10,5	7,0	62 %

<u>Tableau 33</u> : Paramètres du plan d'expériences pour l'optimisation du prétraitement d'explosion à la vapeur de la biomasse d'ensilage de maïs - teneur en sucres avant fermentation et rendement d'extraction des sucres.

*neutre = sans imprégnation acide

Les teneurs en sucres obtenues dans le milieu réactionnel s'échelonnent de 1,5 g/L à 7,0 g/L, ce qui représente des rendements d'extraction dans la phase liquide entre 13 % et 62 % par rapport à la quantité de sucres calculée (11,36 g/L, Chapitre III) à partir des fractions de la biomasse (cellulose, hémicelluloses, amidon contenues dans 50 g de biomasse brute. La température et le temps d'hydrolyse impactent positivement la teneur en sucres totaux, analysés dans le milieu.
Une analyse statistique est conduite sur le plan d'expériences factoriel des paramètres de l'explosion à la vapeur selon la teneur en sucres totaux dans le milieu réactionnel correspondant à 50 g de biomasse brute. L'analyse du plan d'expériences à 3 facteurs montre que le temps d'explosion a un impact significatif sur la concentration en sucres à un seuil de 95 % (p = 0,045). L'effet des autres facteurs (température et imprégnation acide) n'est pas validé par l'analyse de variance.

Par ailleurs, une corrélation est observée entre le facteur de sévérité combiné et la teneur en sucres totaux dans le milieu réactionnel. Celle-ci est présentée sur la figure 61.



<u>Figure 61</u> : Libération des sucres en fonction de la sévérité du prétraitement. Le point au contour rouge n'est pas utilisé pour le calcul de la droite de régression.

La quantité de sucres solubilisés dans le milieu réactionnel augmente avec le facteur de sévérité combiné associé à l'hydrolyse. La droite de régression est plutôt bien ajustée (R² proche de 0,9). Notons que les points correspondant aux essais à 190°C / 2 min avec et sans imprégnation sont repérables sur le graphique car ce sont les points les plus éloignées de la droite de régression.

Pour approfondir la composition du milieu réactionnel, une analyse des sucres monomériques par HPAEC-PAD (réalisée par le LERMAB) des différents hydrolysats est présentée sur la figure 62. La composition des hydrolysats est comparée aux biomasses de référence imprégnées ou non à l'acide et non explosées à la vapeur.

Chapitre 7



<u>Figure 62</u> : Analyse de la composition en sucres monomériques et en inhibiteurs par HPAEC-PAD dans les hydrolysats d'ensilage de maïs en fonction des paramètres de l'hydrolyse (température, durée et imprégnation acide ou non).

D'emblée, on observe que les teneurs en sucres monomériques sont très inférieurs aux teneurs en sucres totaux. Les conditions d'hydrolyse sélectionnées permettraient de solubiliser majoritairement des oligosaccharides dans le milieu réactionnel, l'hydrolyse des sucres en monomères demeurant limitée d'après les données observées (figure 62).

Les principaux sucres monomériques observés sont le glucose, le xylose, le rhamnose et l'arabinose (ces deux derniers étant co-élués sur les chromatogrammes de l'HPAEC-PAD), et de façon très minoritaire le galactose et le fucose. Les conditions d'hydrolyse qui permettent d'obtenir les concentrations en sucres les plus importantes dans le milieu réactionnel sont 10 min / 190°C / Acide. Cette hydrolyse favorise la solubilisation majeure de monomères de glucose (68 % massique) dans le milieu réactionnel. Notons que la composition de la phase liquide obtenue avec les biomasses de référence imprégnées ou non à l'acide est assez similaire : le xylose est le sucre le plus abondant avec de faibles teneurs en glucose, rhamnose et arabinose, ce qui est cohérent avec les résultats du chapitre 3 (ensilage de maïs frais).

Les essais correspondant à une durée de 2 min (2 min / 170°C / Neutre ; 2 min / 170°C / Acide ; 2 min / 190°C / Acide), quels que soient le mode d'imprégnation et la température présentent étonnamment des teneurs en sucres monomériques inférieures à celles de la référence, notamment en ce qui concerne le xylose (hormis pour le test à 190°C en milieu neutre. Les faibles teneurs en 5-HMF et furfural suggèreraient que les pertes de glucose et de xylose par déshydratation sont faibles (Jönsson et Martín, 2016). La perte pourrait avoir lieu lors de l'explosion à la vapeur lors de laquelle une partie des sucres serait entrainée à l'évent avec la vapeur. Lors de ces 3 essais, l'explosion à la vapeur permet de solubiliser des oligomères de sucres puisque la quantité de sucres solubles totaux augmente dans le milieu réactionnel (tableau 33) par rapport à la référence, mais

la durée du prétraitement ne permet pas d'augmenter la quantité de monomères de sucres dans le milieu réactionnel.

Dans les hydrolysats correspondant à une durée de 10 min (et celui à 2 min / 190°C / Neutre), des quantités supérieures de sucres monomériques sont observées par rapport aux références, ce qui montre que le prétraitement d'explosion à la vapeur permet d'hydrolyser les polymères de sucres en monomères avec une répartition équilibrée entre le glucose, le xylose et le rhamnose - arabinose. Fait surprenant, le xylose est détecté dans le milieu réactionnel dans des ordres de grandeur assez similaires aux références, ce qui suggèrerait soit que le xylane n'est pas hydrolysé jusqu'à l'échelle monomérique, soit qu'il y a des pertes de xylose via le flux de vapeur, soit que le xylose est dégradé en molécules non détectables par HPAEC-PAD.

Ces résultats sont assez cohérents d'un point de vue qualitatif avec les résultats de Thomsen *et al.* (2008), qui montrent que les sucres majoritaires résultant de l'hydrolyse de l'ensilage de maïs (185°C, 15 min) sont issus du glucane (glucose) et des hémicelluloses (xylose, arabinose). Ce constat est différent de celui de l'étude des sucres hydrolysés à partir de paille de maïs provenant majoritairement des hémicelluloses (Datar *et al.*, 2007 ; Shanmugam *et al.*, 2014 ; Tucker *et al.*, 2003).

Plusieurs études dans la littérature analysent l'effet des paramètres d'hydrolyse sur l'extraction des sucres. Dans nos essais, on observe quel que soit le mode d'imprégnation et pour une durée donnée, une augmentation de la quantité de sucres solubles en fonction de la température. Ceci est en accord avec les travaux de Song et al. (2020) lors de l'hydrolyse par explosion à la vapeur de la plante aquatique Alternanthera philoxeroides entre 75 et 135°C. De même, pour nos essais, la durée choisie pour l'explosion à la vapeur a un effet très positif ; dans la littérature, la durée d'hydrolyse est également corrélée à la concentration des sucres par Dai et al. (2021) lors du prétraitement de bambou à l'autoclave (121°C). Ce constat est partagé par Liu et Cheng (2010) avec de la paille de maïs. A haute température, Datar et al. (2007) notent l'augmentation générale de la solubilisation de la biomasse avec la durée et la température d'hydrolyse et l'apparition d'un optimum de concentration en sucres à des conditions bien précises, dépendantes de l'imprégnation de la biomasse. Ce résultat illustre aussi le phénomène de dégradation des sucres si le prétraitement est trop sévère, résultat retrouvé dans plusieurs études : Song et al. (2020) et Liu et Cheng (2010) observent à la fois un optimum de temps et de teneur en acides pour l'imprégnation de la biomasse. Yang et al. (2010), Dai et al. (2021), Wang et al. (2010) et Pan et al. (2011) obtiennent des résultats similaires en testant spécifiquement la quantité d'acide utilisée pour l'hydrolyse et dont l'optimum varie en fonction de la température.

Logiquement, la concentration en furfural semble augmenter avec la sévérité du prétraitement. Le 5-HMF n'est détecté dans le milieu réactionnel du test que pour le prétraitement le plus sévère (190°C / 10 min / Acide) et est associé à une libération significative du glucose. L'analyse des composés résultant de la déshydratation des sucres montre que les teneurs en 5-HMF et furfural, inhibiteurs de la

fermentation obscure, sont très faibles au regard de la littérature notamment par comparaison avec la paille de maïs (Cao *et al.*, 2009 ; Datar *et al.*, 2007) et avec des seuils d'inhibition d'environ 1 g/L observés par Akobi *et al.* (2016), Anburajan *et al.* (2018) et Muñoz-Páez *et al.* (2019). Ces deux composés sont analysés dans le milieux réactionnel avec des teneurs inférieurs à 15 mmol/L, ce qui ne devrait pas induire de phénomène d'inhibition au cours de la fermentation. En effet, d'après Quéméneur *et al.* (2012) et Sivagurunathan *et al.* (2017), le furfural peut inhiber la production d'H₂ à partir d'une solution de xylose dès 0,1 - 0,5 g/L. Le seuil d'inhibition varierait en fonction de la nature du *consortium* fermentaire d'autant plus qu'un effet de synergie entre les deux molécules potentialiserait l'effet inhibiteur (Liu *et al.*, 2015). Cao *et al.* (2009) observent un effet négatif de la présence de furfural sur la production d'H₂ à une concentration proche de 2 g/L dans le milieu réactionnel.

En conclusion, l'explosion à la vapeur a permis de solubiliser de manière significative des sucres présents dans la structure lignocellulosique de l'ensilage de maïs, le rendement maximal d'extraction de 62 % est atteint dans les conditions de sévérité maximales testées. Pour nos essais, le temps d'hydrolyse est identifié comme le facteur le plus impactant sur la solubilisation des sucres dans le milieu réactionnel. L'analyse des sucres monomériques montre que la majorité des sucres sont présents dans la phase liquide sous forme d'oligomères plutôt que de monomères. L'explosion à la vapeur aurait ainsi permis d'hydrolyser l'amidon et les hémicelluloses comme l'illustre l'augmentation de la teneur en glucose, rhamnose et arabinose après explosion à la vapeur mais elle ne permet pas d'améliorer significativement la teneur en xylose dans la phase liquide. Pendant le traitement à haute sévérité, des réactions secondaires notamment la déshydratation de sucres sont associées à des pertes de xylose converti en furfural et 5-HMF ; ce phénomène semble toutefois relativement faible. L'action de l'acide est donc à double tranchant : augmentation de la solubilisation des sucres mais aussi augmentation de la dégradation des sucres en inhibiteurs. Notons que les conditions de prétraitements testées n'ont pas permis de mettre en évidence un optimum pour l'extraction des sucres dans le milieu réactionnel.

3.3 Effet des paramètres d'hydrolyse par explosion à la vapeur sur la production d'hydrogène

Une fraction de biomasse équivalente à 50 g de biomasse brute est reconstituée à partir d'hydrolysat liquide (1,5 - 7,0 g_{sucres}/L) et de résidu solide d'hydrolyse et est inoculé avant fermentation en réacteur semi batch. Les tests de fermentation de référence sont effectués avec la biomasse inoculée mais non explosée.

La figure 63 présente les volumes d'hydrogène cumulés en fonction des conditions de prétraitement de la biomasse explosée à la vapeur.



<u>Figure 63</u> : Effet des paramètres d'explosion à la vapeur sur les productions cumulées d'H₂ obtenues avec de l'ensilage de maïs non imprégné à l'acide (imprégnation neutre) (a) et de l'ensilage imprégné à l'acide sulfurique (imprégnation à l'acide) (b).

L'analyse des profils de production d'hydrogène (résultats non présentés) met en évidence un pic de production dont le sommet est le plus souvent dédoublé. Le débit d'H₂ décroit ensuite rapidement, dans un premier temps, puis plus progressivement, dans un second temps. Les durées de fermentation (figure 63) s'échelonnent sur une durée totale de 23 à 30 h et le temps de latence moyen est d'environ 5 h, à l'exception des conditions de prétraitement les plus sévères (10 min avec imprégnation acide) où la fermentation est plus longue (38 h) et le temps de latence est sensiblement plus long (12 h) (figure 63). L'augmentation des temps de latence pourrait être corrélée à la présence de furfural d'après Muñoz-Páez *et al.* (2019) et Datar *et al.* (2007).

Les paramètres de performances de production d'H₂ et les paramètres de l'équation de Gompertz sont regroupées dans le tableau 34.

Terme				tue test.	
Devemètre d'avalacien	Production	Rendement	Productivité max	Latence	Rapport
Parametre d'explosion	L _{H2} /L _{bioréacteur}	L _{H2} /kg _{biomasse} initiale	mL _{H2} /L/h	h	H ₂ /CO ₂
Référence / Neutre	2,04	28,5	278	6,4	0,75
Référence / Acide	1,55	21,7	252	6,5	0,74
170°C / 2 min / Neutre	1,12	15,7	194	4,7	0,88
170°C / 10 min / Neutre	2,16	30,2	305	5,5	0,93
190°C / 2 min / Neutre	2,21	30,9	278	5,0	0,92
190°C / 10 min / Neutre	2,32	32,5	278	9,7	0,84
170°C / 2 min / Acide	1,91	26,7	286	4,8	0,91
170°C / 10 min / Acide	2,67	37,4	351	4,8	0,94
190°C / 2 min / Acide	1,27	17,8	194	4,5	0,89
190°C / 10 min / Acide	2,38	33,4	247	10,0	0,85

<u>Tableau 34</u> : Impact des conditions d'hydrolyse de l'ensilage de maïs par explosion à la vapeur sur les paramètres de performances de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz. Pour l'ensemble des tests, l'*inoculum* issu de la fermentation endogène de la biomasse, a été additionné en début de test.

Référence = pas de traitement d'explosion à la vapeur

Les productions d'H₂ obtenues sont comprises entre 1,12 et 2,67 $L_{H2}/L_{bioréacteur}$ correspondant à des rendements de production d'H₂ entre 15,7 et 37,4 $L_{H2}/kg_{biomasse}$. L'explosion à la vapeur a globalement un effet positif sur le rendement de production d'H₂ à l'exception de trois fermentations, qui présentent des rendements inférieurs à ceux de la référence sans imprégnation acide (les mêmes essais que ceux dont les monosaccharides étaient en concentrations inférieures aux tests de référence). Les productions d'H₂ les plus importantes sont obtenues à l'issue des prétraitements à forte sévérité qui sont associés à des teneurs en sucres totaux plus importantes dans le milieu réactionnel, ce qui souligne l'effet du prétraitement à la fois pour l'extraction des sucres et pour la production d'H₂. La figure 64 illustre la corrélation entre le rendement de production en H₂ et le facteur sévérité associé au prétraitement d'explosion à la vapeur.



Figure 64 : Effet du facteur de sévérité combiné sur le rendement en H₂ de la biomasse hydrolysée par explosion à la vapeur

L'augmentation du facteur de sévérité combinée entre 4 et 7 permet d'améliorer le rendement de conversion de la biomasse en H₂. A FSC > 6, le rendement en H₂ tend à se stabiliser à une valeur supérieure à 30 L_{H2}/kg_{MS}. Notons que sur le domaine expérimental testé, la valeur la plus élevée de production d'H₂ FSC = 8,2 est atteinte dans des conditions d'explosion à la vapeur (170°C / 10 min / Acide) différentes de celles permettant de maximiser la teneur en sucres dans le milieu réactionnel (190°C / 10 min / Acide). Cette dissociation des conditions optimales proviendrait de la libération de composés qui inhiberaient la production d'H₂. La référence en imprégnation neutre présente un rendement en H₂ supérieur à celui de la référence imprégnée à l'acide, ce qui montre que sans prétraitement d'explosion à la vapeur, l'imprégnation acide ne permet pas d'améliorer le potentiel H₂ de la biomasse alors que celle-ci permet d'améliorer systématiquement la production d'H₂ lors des hydrolyses à 170°C en catalysant l'hydrolyse de la biomasse. A 190°C, l'effet de l'imprégnation est moins significatif voire réduit la production d'H₂ pour les tests à 190°C / 2 min. Ainsi, l'imprégnation acide est recommandée à 170°C mais n'est pas utile à 190°C. L'augmentation de la durée d'hydrolyse améliore systématiquement le potentiel de production d'H₂ de la biomasse.

La productivité maximale en H₂ augmente à la fois avec le temps et la température en condition neutre, alors qu'en condition d'imprégnation acide, la productivité s'améliore avec le temps mais diminue avec la

température. D'après le tableau 34, la productivité en H_2 et le rapport molaire H_2/CO_2 les plus élevés (respectivement 351 mL_{H2}/L/h et 0,94) sont associés à la fermentation d'hydrolysat obtenu à 170°C pendant 10 min. A 10 min d'hydrolyse, l'augmentation de la température réduit la productivité maximale d' H_2 et le rapport H_2/CO_2 , ce qui suggèrerait des phénomènes d'inhibition de la fermentation. En effet, à ces conditions d'hydrolyse, on observe les teneurs les plus importantes en inhibiteurs dans le milieu réactionnel, notamment le furfural, liés à la sévérité du prétraitement.

Il apparaît donc que les conditions d'explosion à la vapeur optimales soient une température de 170°C, une durée de 10 min et une imprégnation acide. D'un point de vue industriel, si l'imprégnation à l'acide n'est pas sélectionnée en raison des contraintes liées au stockage de l'acide, les conditions d'explosion à la vapeur optimale pour mettre en œuvre le prétraitement seront 190°C et 10 min.

3.4 Effet des paramètres d'hydrolyse sur les métabolites produits

La figure 65 présente l'analyse des productions de métabolites dans le milieu réactionnel et permet d'évaluer l'impact des paramètres de l'explosion à la vapeur sur le métabolisme fermentaire .



Figure 65 : Effet des paramètres d'hydrolyse sur le métabolisme fermentaire

D'emblée, on remarque que les tests de références (pas de prétraitement) se caractérisent par un métabolisme équilibré entre la production d'acétate et de butyrate, ce qui se traduit par un rapport molaire B/A proche de 1. Les productions d'acétate observées pour les références sont les plus importantes dont près de la moitié provient de l'homoacétogenèse (respectivement 18,1 et 17,8 mmol/L).

Lors des fermentations d'hydrolysats, on note un métabolisme plus favorable à la production d'H₂ par la voie du butyrate et également une diminution de la production d'acétate par homoacétogenèse (<10 mmol/L). La production de butyrate est stable (40 à 50 mmol/L) sauf pour les 3 tests avec les concentrations en sucres les plus faibles (i.e. les productions d'H₂ les plus faibles). Les productions en acétate s'échelonnent entre 10 et 20 mmol/L sauf pour le test avec le prétraitement le plus sévère (30 mmol/L). Ainsi, la production d'acétate par homoacétogenèse est maximale lors de la fermentation de l'hydrolysat avec la sévérité la plus importante (190°C / 10 min / acide). Ce test correspond également à l'essai avec la plus haute teneur en sucres et en inhibiteurs dans le milieu réactionnel. L'augmentation de l'homoacétogenèse pourrait être liée à ces deux facteurs : la quantité de substrat et la présence d'inhibiteurs.

Les productions de métabolites issus de voies concurrentes à la production d'H₂ (éthanol) ou consommatrices d'H₂ (propionate) sont faibles, ce qui montre que l'association de l'*inoculum* exogène et des hydrolysats d'ensilage de maïs (filtrat + résidu) aboutit à un métabolisme fermentaire orienté vers les voies de production d'H₂. Le nombre de moles de lactate consommées est variable, il dépend de l'intensité de la phase de production de lactate, au cours du pic de production d'H₂, avant sa consommation totale.

Dans la littérature, Anburajan *et al.* (2018) relèvent une baisse de la production de butyrate et d'acétate en présence d'inhibiteurs (5-HMF) lors de la fermentation de galactose. Dans notre cas, nous notons également une diminution de la production d'acides organiques lors des fermentations des biomasses hydrolysées mais celle-ci est la conséquence d'un meilleur métabolisme et non d'un phénomène d'inhibition des voies de production d'H₂. Par ailleurs, Anburajan *et al.* (2018) relèvent également un changement d'orientation métabolique *i.e.* une augmentation de la production d'ethanol et de propionate en réponse à la toxicité du furfural (2,42 g/L). Aucun de ces effets n'est observé dans notre étude, ce qui montre que les quantités d'inhibiteurs sont trop faibles pour induire un stress sur le métabolisme des *consortia* bactériens.

En effectuant des ajouts dosés de composés furaniques, Liu *et al.* (2015) observent un effet net sur la réduction de la production d'H₂ mais n'identifient aucune tendance significative négative sur l'évolution du métabolisme fermentaire. Quéméneur *et al.* (2012) étudient l'effet de l'ajout de sous-produits d'hydrolyse au cours de la fermentation. Selon ces auteurs, les composés furaniques n'altèreraient pas le rapport molaire B/A. Cependant, les résultats qu'ils obtiennent en ajoutant des composées de la lignine ou des phénols, apportent un éclairage sur les phénomènes observés dans notre étude. En effet, l'augmentation du rapport molaire B/A observée dans notre étude, entre les tests de référence et les tests d'hydrolysats, pourrait être liée à la libération de composés phénoliques dans les hydrolysats. L'augmentation de la production d'acétate, spécifique à l'essai 190°C / 10 min / acide, serait liée à la présence de lignine dans le milieu réactionnel.

Ainsi, les variations de métabolismes observées lors des tests de fermentation d'hydrolysats sont d'abord liées aux variations de la quantité de substrat dans le milieu réactionnel, la libération de phytocomposés altérant les voies métaboliques interviendrait dans un second temps.

3.5 Analyse des corrélations

Une analyse en composantes principales est effectuée sur les données normalisées pour identifier les corrélations entre les paramètres de l'hydrolyse, les performances de production de gaz et les données métaboliques recueillies au cours des tests utilisant exclusivement la biomasse hydrolysée et inoculée, les données des tests de référence ne sont pas utilisées.



<u>Figure 66</u> : Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques de production d'H₂ et des principaux métabolites produits au cours des fermentations inoculées d'ensilage de maïs hydrolysé. Les données des fermentations de référence, de productions d'éthanol et de propionate ne sont pas utilisées.

Les deux composantes F1 et F2 de l'analyse en composantes principales présentées sur la figure 66 expliquent plus de 67,5 % de la variabilité des données. L'ACP fait apparaître une corrélation entre la durée d'hydrolyse, la production d'H₂ et la production de butyrate. La durée d'hydrolyse est le paramètre clé du prétraitement. Elle permet l'augmentation de la production d'H₂ co-produit avec le butyrate. La corrélation entre H₂ et butyrate montre à nouveau le rôle crucial de la voie butyrate lors de la fermentation de biomasses ensilées par des bactéries issues de ces biomasses.

Un autre ensemble de corrélations montre que le facteur de sévérité combiné, calculé à partir de la durée d'hydrolyse, la température et l'imprégnation, influence positivement la teneur du milieu réactionnel initial en composés solubles : les sucres monomériques, les sucres totaux, la consommation de lactate et, dans une moindre mesure, les inhibiteurs.

L'imprégnation par acide n'est pas bien représentée sur les axes choisis, ainsi aucune corrélation n'est possible avec ce paramètre d'hydrolyse.

Pour conclure, l'analyse des corrélations montre que la durée d'hydrolyse permet d'augmenter clairement la production d'H₂. Le facteur de sévérité combiné de l'explosion à la vapeur conditionne la quantité de sucres et la production d'inhibiteurs lors du prétraitement.

3.6 Effet des paramètres d'hydrolyse sur les consortia fermentaires

L'ADN présent dans le milieu réactionnel a été extrait et séquencé pour évaluer l'impact du prétraitement d'explosion à la vapeur sur les *consortia* fermentaires. La figure 67 présente les *consortia* bactériens observés au cours de la fermentation de la biomasse de référence (sans imprégnation acide) et ceux des biomasses explosées à la vapeur $170^{\circ}C/2$ min / neutre et $170^{\circ}C/10$ min / acide, qui présentent le potentiel de production d'H₂ le moins et le plus élevé, respectivement 1,12 et 2,67 L_{H2}/L_{bioréacteur}.



Figure 67 : Effet du prétraitement d'explosion à la vapeur sur les consortia fermentaires.

Les *taxons* majoritaires au cours des fermentations sont des producteurs d'H₂ parmi lesquels ont été identifiés : *Clostridium butyricum, Clostridium sp., Enterobacteriaceae* et *Enterococcus sp.*. La composition des hydrolysats semble donc tout à fait favorable au développement de bactéries productrices d'H₂ comme les données de productions d'H₂ et de métabolites le suggéraient : sur les échantillons séquencés, l'abondance des bactéries appartenant au genre *Clostridium* est répétable avec environ 75 % d'abondance pour les essais correspondant à la référence et aux biomasses hydrolysées. Au sein du genre *Clostridium*, le taxon *Clostridium butyricum* présente les abondances les plus élevées et sa proportion dans la population bactérienne augmente avec la sévérité du prétraitement : de 45 % d'abondance dans la biomasse non prétraitée par explosion à la vapeur à 74 % dans l'hydrolysat de biomasse imprégnée à l'acide et explosée pendant 10 min à 170°C. Une analyse de dissimilarité entre les échantillons montre que la composition du

consortium observé pendant la fermentation de la biomasse de référence est assez proche de *l'inoculum* : outre *Clostridium butyricum*, des taxons comme *Clostridium sp*, *Enterobacteriaceae sp.*, *Lachnospiraceae sp.*, *Veillonellaceae sp.* et *Coprococcus sp.* sont identifiés. Les populations bactériennes qui émergent lors de la fermentation des biomasses hydrolysées sont assez similaires. Notons toutefois que les conditions d'hydrolyse ne favorisent pas les mêmes taxons : le taxon *Enterobacteriaceae* est favorisé lors de la fermentation de biomasse hydrolysée avec un prétraitement à faible facteur de sévérité combiné (170°C / 2 min /neutre) (20 %) alors que la bactérie lactique *Enterococcus sp.* semble plus adaptée pour la fermentation de biomasse hydrolysée dans des conditions plus sévères (17 %).

Anburajan *et al.* (2018) montrent que la teneur en 5-HMF favorise l'émergence de bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Enterococcus*) par rapport aux *Clostridium* lors de la fermentation de galactose. Ces résultats obtenus à des teneurs en inhibiteurs largement supérieurs aux nôtres (1 g/L contre 10 mg/L) permettent, en partie, d'expliquer nos résultats en justifiant la présence du taxon des *Lactobacilliales* appartenant au genre *Enterococcus*. Par ailleurs, les expériences de Liu *et al.* (2015) sur de la paille de maïs mettent en évidence l'augmentation de la proportion de bactéries du genre *Clostridium* dans le milieu réactionnel à l'issue d'ajouts dosés de composés furaniques, ce qui correspond à nos observations. Muñoz-Páez *et al.* (2019) observent, suite à l'ajout d'inhibiteurs, l'enrichissement du *consortium* en *Clostridium* dont le taxon C. *butyricum*, et en bactéries lactiques, à nouveau en cohérence avec nos résultats. Ils soulignent le rôle de ces bactéries pour la détoxification du milieu *i.e.* la dégradation du 5-HMF et du furfural.

L'ensilage de maïs hydrolysé est donc une biomasse tout à fait favorable au développement de bactéries productrices d'hydrogène dont l'abondance est corrélée à la fois au potentiel de production d'H₂ de la biomasse et à la sévérité du prétraitement. Les bactéries productrices d'H₂ du consortium bactérien seraient également capables de dégrader les inhibiteurs présents dans le milieu.

3.7 Fractionnement de la biomasse par explosion à la vapeur

Dans le but de fractionner la biomasse afin de collecter un substrat liquide riche en sucres pour alimenter le BRM, le potentiel de production d'H₂ de l'hydrolysat d'ensilage de maïs (phase liquide) seul est testé en bioréacteur semi batch. Deux conditions d'hydrolyse sont étudiées dont les paramètres correspondant à l'optimum de solubilisation des sucres (190°C / 10 min / Acide) et à l'optimum de production d'H₂ (170°C / 10 min / Acide) avec la biomasse totale.

3.7.1 Production d'hydrogène

La figure 68 présente les volumes cumulés d'H₂ des hydrolysats de l'ensilage de maïs explosé à la vapeur avec pour comparaison, ceux de la biomasse entière, c'est-à-dire reconstituée (filtrat + résidu).

Chapitre 7



Figure 68 : Production cumulée d'H₂ lors de la fermentation de filtrats préparés à partir d'ensilage de maïs hydrolysé par explosion à la vapeur – Comparaison avec les biomasses entières (filtrat + résidu).

Les profils de débit d'H₂ sont assez similaires et présentent quelques différences en termes de cinétique de production. Le filtrat obtenu lors de l'explosion à 190°C est caractérisé par un temps de latence 11 h et un temps de fermentation de 38 h, plus longs que ceux du filtrat de la biomasse explosée à 170°C (7 h et 28 h), ce qui est cohérent avec les résultats des tests de fermentation avec la biomasse entière.

De façon remarquable, le profil de fermentation du filtrat est très proche de celui de la biomasse entière (filtrat + résidu), ce qui montre que la majorité des substances fermentescibles sont contenues dans le filtrat au terme de l'explosion.

Les paramètres de performance de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz correspondant aux filtrats des biomasses sont regroupées dans le tableau 35 et comparés à ceux des biomasses entières (filtrat + résidu). Lors de la fermentation des filtrats, un volume d'eau supplémentaire a été ajouté pour compenser l'absence du résidu solide.

Temp. ° C	Fraction	Sucres solubles totaux g/L	Production mL _{H2} /L _{bioréacteur}	$\begin{array}{c} Rendement\\ mL_{H2}/g_{biomasse initiale}\\ (mol_{H2}/mol_{sucres}) \end{array}$	Productivité maximale mL _{H2} /L/h	Rapport H ₂ /CO ₂
	Entière	-	2671	37,4	351	0,94
170°C	Filtrat	5,6	2316	32,5 (2,91)	309	0,90
	Entière	-	2383	33,4	247	0,85
190°C	Filtrat	7,0	2346	32,8 (2,50)	262	0,93

Tableau 35 : Effet du fractionnement de la biomasse explosée à la vapeur sur les paramètres de performances de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz.

Les résultats chiffrés confirment que les fermentations des filtrats seuls présentent des productions d'H₂ et des rendements tout à fait comparables aux fermentations de biomasse entière montrant le transfert quasi intégral du potentiel de production d'H₂ vers la phase liquide. A 170°C, le filtrat contient 87 % du potentiel

H₂ et à 190°C, 98 % du potentiel de production d'H₂ est présent dans le filtrat. Les rendements de conversion de sucres en H₂ obtenus lors de la fermentation des filtrats sont de 2,5 et 2,9 mol_{H2}/mol_{sucres} et rendent compte d'un très bon métabolisme pour la production d'H₂. Notons qu'à 190°C, la diminution du rendement en H₂ pourrait être liée à la présence dans le milieu réactionnel de composés issus de la lignine ou de la dégradation des sucres. Notons que le rendement en H₂ est nettement plus élevé que celui observé lors de la fermentation d'une solution de glucose à partir du même *inoculum* (1,33 mol_{H2}/mol_{sucres}). Ce résultat remarquable suggèrerait le lien étroit entre les conditions de fermentation liées à la biomasse tant au niveau du substrat (hexose, pentoses, lactate) que des autres solutés (acétate), l'*inoculum* utilisé et le rendement de production d'H₂. Dans la littérature, peu d'études observent un tel phénomène. Ausiello *et al.* (2017) montrent que leur *inoculum* est plus adapté à leur hydrolysat qu'à une solution de substrat modèle et Datar *et al.* (2007) obtiennent par contre des rendements très proches entre le substrat modèle (2,2 -3,2 mol_{H2}/mol_{sucres}) et leurs hydrolysats (2,8 – 3,0 mol_{H2}/mol_{sucres}).

A 170°C, la fermentation des filtrats présentent une productivité maximale en H_2 et un rapport molaire H_2/CO_2 légèrement inférieurs à ceux obtenus lors de fermentation de la biomasse entière (filtrat et résidu). A 190°C, le constat est inversé : c'est le filtrat qui présente la productivité maximale en H_2 et le rapport molaire H_2/CO_2 les plus élevés.

Ainsi, les hydrolysats d'ensilage de maïs présentent de très bons potentiels de production d'H₂ et rendements de conversion de sucres en H₂. Ces résultats soulignent également le succès du fractionnement de la biomasse par explosion à la vapeur dans les conditions de prétraitement testées. En effet, plus de 85 % du potentiel de production d'H₂ de la biomasse ont été extraits de l'hydrolysat après le prétraitement. Les conditions de prétraitement d'explosion de la biomasse imprégnée à l'acide pendant 10 min à 170°C semblent les plus intéressantes pour valoriser énergétiquement le substrat et le résidu. Le filtrat présente un potentiel H₂ équivalent à celui obtenu à 190°C et le résidu dont le potentiel énergétique serait plus élevé pourrait être valorisé par digestion anaérobie ou par fermentation obscure après par exemple, un prétraitement enzymatique.

3.7.2 Production de métabolites

La figure 69 présente l'analyse des productions de métabolites dans le milieu réactionnel lors de la fermentation du filtrat de biomasse d'ensilage de maïs imprégnée à l'acide et explosée à la vapeur pendant 10 min à 170°C et 190°C.



<u>Figure 69</u> : Effet de la température d'hydrolyse et du fractionnement de l'hydrolysat d'ensilage de maïs obtenu par explosion à la vapeur (entier et filtrat seul) sur le métabolisme fermentaire lors de la bioproduction d'H₂.

D'un point de vue qualitatif, les métabolismes des filtrats sont assez proches. Notons que pour le même volume en H₂ produit, le test du filtrat à 190°C a produit plus de butyrate que celui à 170°C. Dans ces conditions, les voies métaboliques non productrices d'H₂ sont légèrement plus actives. En effet, une petite production de propionate (4,8 mM) est observée lors de la fermentation du filtrat de biomasse explosée à 190°C par rapport au filtrat préparé avec de la biomasse explosée à 170°C. Cette production reste faible par rapport à la production de métabolites globale.

Lors de la fermentation de la biomasse entière, les productions de butyrate sont plus importantes et le métabolisme est légèrement plus favorable à l'homoacétogenèse que pour les filtrats, ce qui serait lié à la présence du résidu. La libération de composés phénoliques, inhibiteurs bactériens, provenant de la lignine dans la phase liquide pourraient générer un stress expliquant ce phénomène (Panagiotopoulos *et al.,* 2011 ; Quéméneur *et al.,* 2012). A 170°C, la présence initiale élevée d'acétate dans le milieu réactionnel expliquerait le rapport molaire B/A élevé par rapport à la fermentation du filtrat. A 190°C, la fermentation des filtrats améliore le rapport molaire B/A et réduit la production d'acétate par la voie de l'homoacétogenèse.

Pour conclure, le métabolisme des fermentations étudiées dans cette partie (biomasse imprégnée à l'acide et hydrolysée pendant 10 min) est orienté vers la production d'H₂ par la voie du butyrate et de l'acétate, tant pour la fraction liquide (filtrat) que pour la biomasse entière (filtrat + résidu). Ces données valident les rendements de conversion des sucres en H₂ élevés obtenus précédemment. Les voies métaboliques non associées à la production d'H₂ (homoacétogenèse, solvantogenèse, production de propionate) sont peu actives.

3.8 Conclusion sur l'impact du prétraitement d'explosion à la vapeur sur la fermentation obscure

L'ensilage de maïs a été prétraité par explosion vapeur sous plusieurs conditions permettant d'évaluer l'impact des paramètres du prétraitement (température, durée, imprégnation à l'acide) sur le potentiel de production d'H₂ de la biomasse inoculée.

Obtenu lors de la fermentation de biomasse imprégnée à l'acide et hydrolysée 10 min à 170°C, l'optimum de production d'H₂ est de 37,4 L_{H2}/kg_{biomasse initiale}. Il représente une augmentation de 30 % et par rapport aux tests avec la biomasse de référence non imprégnée et de 72 % par rapport à celle imprégnée à l'acide. L'analyse des *consortia* bactériens a mis en évidence la présence de bactéries productrices d'H₂, notamment de *Clostridium butyricum*, dans le milieu réactionnel.

L'explosion à la vapeur a permis de solubiliser significativement les sucres sous forme d'oligomères dans l'hydrolysat (1,5 - 7,0 g/L) par rapport à la biomasse non traitée (0,2 g/L).

Si le facteur de sévérité combiné du prétraitement a été identifié comme le paramètre permettant de rendre compte de la teneur en sucres solubilisés mais également celle en inhibiteurs, la production d'H₂ semble dépendre de la durée d'hydrolyse. Ainsi, les conditions de prétraitement d'hydrolyse optimales pour la production d'H₂ sont différentes de celles qui maximisent la quantité de sucres dans la phase liquide en raison de phénomènes d'inhibition lors de la production d'H₂ (Basak et al., 2020). Les inhibiteurs furaniques, de par leur faible concentration et par la nature du consortium résistant aux inhibiteurs, ne semblent pas expliquer la diminution de la production d'H₂ observée lors des prétraitements en conditions d'hydrolyse les plus sévères. Des analyses de teneur en composés phénoliques pourraient être effectuées pour quantifier la libération d'acides phénoliques contenus dans la lignine comme l'acide férulique et l'acide p-coumarique, qui sont présents en quantité remarquable dans la plante de maïs (Bento-Silva et al., 2018 ; Jönsson et Martín, 2016). Ces molécules ont des effets antimicrobiens avérés (Kalinoski et al., 2020) et pourraient diminuer le rendement de la production d'H₂ (Panagiotopoulos et al., 2009). L'effet inhibiteur du substrat sur la fermentation pourrait également expliquer la diminution du rendement en H₂. Plusieurs études ont montré que le rendement de production variait significativement en fonction de la charge de biomasse appliquée dans le réacteur batch (Datar et al., 2007 ; Guo et al., 2014 ; Pan et al., 2010 ; Panagiotopoulos et al., 2009 ; Zhang et al., 2015).

Enfin, on notera un transfert quasi-total du potentiel de production d'hydrogène vers la phase liquide à l'issue du traitement à l'explosion à la vapeur avec pour les filtrats des rendements de production en hydrogène élevé (2,5-2,9 mol_{H2}/mol_{sucres}), rendant compte d'un très bon métabolisme pour la production d'H₂.

4 Prétraitement de l'ensilage de maïs par autoclavage

Lors de la partie précédente, il est apparu que la durée d'hydrolyse s'avère être le facteur déterminant pour la production d'H₂ et que les conditions de prétraitement à haute température (190°C) favoriseraient la génération d'inhibiteurs. En conséquence, nous avons donc choisi de tester un autre prétraitement hydrothermique, l'hydrolyse par autoclavage, qui permet d'explorer des conditions d'hydrolyse à plus basses températures que celles de l'explosion vapeur *i.e.* comprises entre 80°C et 140°C et sur une plus longue durée (60 min).

4.2 Effet des paramètres d'hydrolyse sur la composition du milieu réactionnel

Un plan d'expériences a été conduit pour optimiser le prétraitement de l'ensilage de maïs par autoclavage en fonction de la température et de la quantité d'acide sulfurique additionnée à la biomasse avant le prétraitement. La durée d'hydrolyse sera maintenue constante (60 min). Le tableau 36 récapitule les conditions des essais d'hydrolyse en autoclave et les teneurs en sucres solubles détectées dans le milieu réactionnel.

Température (°C)	Teneur en acide (g/100g _{biomasse})	Facteur de sévérité combiné	Teneur en sucres totaux (g/L)	Rendement d'extraction (%)
80	0	0,1	1,7	15 %
80	1	2,7	3,3	29 %
80	2	3,0	4,8	42 %
80	3	3,2	6,4	56 %
120	0	4,0	2,1	19 %
120	1	6,6	5,4	47 %
120	2	6,9	5,9	52 %
120	3	7,1	6,9	61 %
140	0	5,9	6,3	56 %
140	1	8,5	7,1	62 %
140	2	8,8	7,6	67 %
140	3	10,5	7,9	69 %

Tableau 36 : Paramètres pour les tests de l'optimisation du prétraitement à l'autoclave.

Les teneurs en sucres contenues dans la phase liquide s'échelonnent de 1,7 g/L à 7,9 g/L équivalent à des rendements d'extraction des sucres dans la phase liquide entre 15 % et 69 % par rapport à la quantité de sucres (11,36 g/L) contenue dans la biomasse brute sous forme de cellulose, d'hémicelluloses et d'amidon. Ces valeurs sont exactement dans le même ordre de grandeur que les données obtenues lors du prétraitement de la biomasse par explosion à la vapeur, qui présentaient des facteurs de sévérité combiné similaires (de 4 à 10,5).

Le tableau 36 montre que la température et la quantité d'acide ajouté ont un effet positif sur l'extraction des sucres vers la phase liquide. La température augmente significativement la teneur en sucres des échantillons sans ajout d'acide notamment entre 120°C et 140°C avec une quantité de sucres triplée (de 2,1 à 6,3 g_{sucres}/L).

L'ajout d'acide permet d'augmenter la quantité de sucres en particulier quand la température est faible. A 140°C, la quantité de sucres augmente légèrement puis se stabilise avec l'ajout d'acide. Le rendement d'extraction des sucres supérieurs à 60 %, valeur correspondante à la proportion des hémicelluloses et de l'amidon, montrerait qu'une partie de la cellulose aurait été dégradée. Cette hypothèse pourrait être confirmée par des analyses de la structure du résidu.

Une analyse statistique est conduite pour analyser le plan d'expériences factoriel des paramètres d'hydrolyse selon la teneur en sucres totaux dans l'hydrolysat. La figure 70 présente les courbes d'isoréponse de la teneur en sucres totaux dans le milieu réactionnel en fonction de la température et de la teneur en acide et en fonction du facteur de sévérité combiné.



<u>Figure 70</u> : Graphique de contour de la concentration en sucres dans le milieu réactionnel en fonction des paramètres d'hydrolyse, de température et d'ajout d'acide (a) et effet du facteur sévérité combiné sur la teneur en sucres totaux dans l'hydrolysat (b). Les essais en rouge ne sont pas pris en compte pour le calcul de la régression linéaire.

L'analyse du plan d'expériences à deux facteurs montre que la teneur en acide ajoutée et la température d'hydrolyse ont un effet significatif sur la teneur en sucres à un seuil de 95 % validé par l'analyse de variance. D'après la valeur de T et le diagramme Pareto des effets normalisés, l'acide semble avoir un effet plus important que la température (les valeurs des effets normalisés étant respectivement de 5,44 et 4,87). Le terme d'interaction n'a pas d'effet significatif sur la réponse mais son inclusion dans l'analyse du plan permet d'augmenter le pourvoir prédictif du modèle. Sous cette hypothèse, le modèle linéaire résultant de l'analyse du plan factoriel permet d'expliquer plus de 87 % de la variance et présente un bon pouvoir prédictif (72,5 %) malgré l'allure des courbes d'isoréponse. Comme pour l'explosion à la vapeur, les courbes d'isoréponse montrent que les conditions les plus sévères permettent d'obtenir les quantités de sucres dans le milieu réactionnel les plus importantes.

En effet, le facteur de sévérité combiné et la teneur en sucres totaux solubilisés dans le milieu réaction sont corrélés de façon linéaire (figure 70b). La droite de régression est bien ajustée (R² = 0,92). Notons que les essais sans acide à 120°C et 140°C se distinguent de la droite de régression.

Les analyses par HPLC muni d'un détecteur à indice de réfraction ont montré la présence des molécules correspondantes à des inhibiteurs dans les échantillons prélevés dans les conditions les plus sévères (FSC = 10,5).

Ainsi, le prétraitement de l'ensilage de maïs par autoclave est une méthode efficace pour solubiliser les sucres dans la phase liquide. Parmi les conditions testées, l'hydrolyse à 140°C avec ou sans acide semble prometteuse pour la préparation d'un substrat pour le BRM et permet d'obtenir des teneurs en sucres comparables aux essais d'explosion à la vapeur.

4.3 Effet du prétraitement de la biomasse d'ensilage de maïs par autoclavage sur la production de H₂

Pour comparer les prétraitements d'hydrolyse par explosion à la vapeur et par autoclavage, la production d'H₂ d'hydrolysats d'ensilage de maïs (avec et sans imprégnation à l'acide dans les mêmes conditions que celle de l'explosion à la vapeur) sera testé en fermentation semi-batch, selon la procédure appliquée dans la partie 3.2 pour les hydrolysats d'explosion à la vapeur. Notons que le même *inoculum* bactérien est additionné au milieu réactionnel en début de fermentation pour l'ensemble des tests.

L'allure des profils de production d'H₂ (non présentés ici) est très similaire à ceux qui ont été observés pour l'explosion à la vapeur : après un temps de latence d'environ 7 h, la production d'H₂ démarre et le débit d'H₂ décrit un pic de production dont le sommet est dédoublé. Les temps de fermentation sont de 35 h, ce qui est similaire au temps de fermentation de l'ensilage prétraité 10 min à 190°C par explosion à la vapeur (38 h de fermentation). L'imprégnation à l'acide ne semble pas modifier significativement le temps de latence (en moyenne 7 h pour les deux tests).

Le tableau 37 présente les paramètres de performances de production d'H₂ et les paramètres de l'équation de Gompertz des tests de fermentation à partir d'ensilage de maïs autoclavé.

Paramètres de prétraitement	Facteur de sévérité combiné	Rendement L _{H2} /kg _{biomasse initiale}	Productivité max mL _{H2} /L/h	Rapport H_2/CO_2
Référence / Neutre	-	28,5	278	0,75
Référence / Acide	-	21,7	252	0,74
140°C / 60 min / Neutre	5,9	37,5	389	0,94
140°C / 60 min / Acide	7,8	46,0	463	0,93

Tableau 37 : Impact de l'hydrolyse de l'ensilage de maïs par autoclavage sur les paramètres de performance de production d'H₂ et de l'équation de Gompertz.

L'hydrolyse en autoclave à 140°C sans ajout d'acide pendant 60 minutes a amélioré avec succès la production de H₂ par rapport aux références (37,5 L/g_{biomasse} soit 120 L_{H2} / kg_{MS}). L'imprégnation acide associée à l'hydrolyse en autoclave a intensifié la production d'H₂ (46,0 L/g_{biomasse} soit 147 L_{H2}/kg_{MS}). Les fermentations avec la biomasse autoclavée se caractérisent par une productivité maximale et un rapport molaire H₂/CO₂ proche de 1, supérieurs à ceux des références (biomasse non traitée).

4.4 Métabolisme

La figure 71 présente l'analyse des productions de métabolites dans le milieu réactionnel et permet d'évaluer l'impact des paramètres de l'hydrolyse en autoclave sur le métabolisme fermentaire.



Figure 71 : Effet de l'hydrolyse par l'autoclave sur le métabolisme fermentaire de l'ensilage de maïs.

Le métabolisme fermentaire des tests avec la biomasse hydrolysée est favorable à la production d'H₂ avec la diminution de l'homoacétogenèse et un maintien de la voie butyrate (respectivement 37,6 et 43,2 mM) comme le souligne le rapport molaire B/A supérieur à 1,5. L'hydrolyse améliore donc le rendement par rapport à la référence. Contrairement au métabolisme des tests de référence dont la production d'acétate par homoacétogenèse est importante, les voies concurrentes et consommatrices d'H₂ sont peu actives dans les tests de biomasse hydrolysée. En effet, les productions d'H₂ et de métabolites sont très proches de la stœchiométrie théorique (rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ proche de 1). Ces indicateurs témoignent d'un métabolisme bien orienté vers la production d'H₂ quand la biomasse est hydrolysée par autoclavage.

Concernant la consommation du lactate, les valeurs obtenues au cours des tests avec biomasses hydrolysées et les biomasses de référence sont très proches, ce qui montre que la consommation de ce substrat n'est pas impactée par l'hydrolyse.

4.5 Conclusion

Les conditions de prétraitement d'hydrolyse par autoclavage testées ont permis de solubiliser une quantité significative de sucres dans la phase liquide par rapport à la biomasse de référence. L'ajout d'acide sulfurique (1 - 3 g pour 31,4 g_{MS}) a été déterminant pour hydrolyser les sucres.

La figure 72 présente les rendements en hydrogène obtenus à l'issue de la fermentation des biomasses prétraitées et inoculées.



<u>Figure 72</u>: Effet des prétraitements d'hydrolyse sur le rendement de production d'H₂ lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs.

Les prétraitements mis en œuvre ont permis d'améliorer le rendement de production d'H₂ de la biomasse. L'hydrolyse en autoclave et catalysée à l'acide a permis d'obtenir le meilleur rendement en H₂ (46 L_{H2}/kg_{biomasse} équivalent à 147 L_{H2}/kg_{MS}). Avec le prétraitement d'explosion à la vapeur pendant une durée de 10 min, des rendements de production de H₂ allant de 96 à 119 L_{H2}/kg_{MS} ont été obtenus à partir de la biomasse hydrolysée ; en comparaison, le potentiel de production de la biomasse de référence est de 91 L_{H2}/kg_{MS}. L'imprégnation à l'acide a amélioré la production de H₂ à partir d'hydrolysats (filtrat + résidu) préparés par autoclavage à 140°C (+28 %) et par explosion à la vapeur à 170°C (+24 %), alors qu'il n'a eu que peu d'impact à 190°C (+3 %) sur la biomasse explosée.

Notons que des rendements similaires ont été obtenus lors des tests avec la biomasse autoclavée à 140°C, sans acide, pendant une heure et avec la biomasse imprégnée à l'acide et explosée à la vapeur à 170°C. Ce résultat ouvre une alternative pour le choix de prétraitement entre autoclavage et explosion à la vapeur pour la mise en œuvre à l'échelle industrielle. Enfin, rappelons les potentiels de production d'H₂ de l'ensilage de maïs broyé obtenus au chapitre 6 par fermentation endogène : 79,8 L_{H2}/kg_{MS} pour la biomasse fraîche et 104 L_{H2}/kg_{MS} pour la biomasse congelée et broyée, ce qui montre que les performances de productions d'H₂ de la biomasse initiale, déjà élevées, peuvent être améliorées par des procédés d'hydrolyse hydrothermique.

Dans les conditions testées et au regard de l'état actuel de nos compétences en prétraitement, l'hydrolyse en autoclave semble plus appropriée que l'explosion à la vapeur pour la préparation de la biomasse d'ensilage de maïs. La raison principale est la limitation des pertes de matières sèches et les rendements plus élevés d'H₂ obtenus lors de l'hydrolyse en autoclave. Le prétraitement à l'autoclave, mis en œuvre à une température plus basse que l'explosion vapeur et sur une durée plus longue, semble libérer autant de matière fermentescible et une quantité plus réduite d'inhibiteurs.

5 Prétraitement du seigle congelé

Dans la perspective d'améliorer le potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de seigle (lot 1), deux prétraitements ont été appliqués à cette biomasse stockée à -20°C pendant une durée supérieure à 350 jours : une hydrolyse en autoclave (115°C, 20 min, 1-2 bar) et une hydrolyse en réacteur micro-ondes à 200°C sous un maximum de 20 bar de pression. La mise en œuvre pour la production d'H₂ de ces deux prétraitements nécessite d'inoculer le bioréacteur car les bactéries ne peuvent survivre à ces conditions de température et de pression. Un culot bactérien issu de la fermentation de filtrat d'ensilage de seigle caractérisé dans la partie 2.2 est utilisé comme *inoculum*. La biomasse de référence est non inoculée (fermentation endogène).

A l'issue des prétraitements, une analyse de la teneur en sucres de la phase liquide du substrat a été réalisée ; les résultats sont présentés dans le tableau 38.

Prétraitement	Inoculum	Teneur en sucres solubles	Production	Rendement	H_2/CO_2
(Fact. Sév. Comb.)		g _{sucres} /L	$L_{H2}/g_{biomasse}$	L _{H2} /kg _{MS}	
Référence	Endogène	0,8	537 ± 17	28 ± 1	0,7 ± 0,1
Autoclavage (1,3)	Inoculé	1,1	560 ± 50	29 ± 3	0,9 ± 0,2
Micro-ondes (7,2)	Inoculé	2,0	916	47,5	0,7

Tableau 38 : Résultats de la fermentation de l'ensilage de seigle en fonction des différents prétraitements.

La quantité de sucres obtenue dans le filtrat, après trempage, sert de valeur de référence. Ainsi, la quantité de sucres solubles dans le milieu réactionnel augmente de 37 % après autoclavage et de 150 % après le traitement aux micro-ondes.

Les productions d'H₂ cumulées et des métabolites au cours de la fermentation des biomasses prétraitées sont présentées sur la figure 73.



<u>Figure 73 :</u> Production d'hydrogène cumulée et production de métabolites au cours de la fermentation obscure de l'ensilage de seigle prétraitée. Les barres d'erreur rendent compte de la variabilité (n = 2 pour la référence et n = 3 pour la biomasse prétraitée à l'autoclave).

Le prétraitement par autoclavage montre une production similaire à la référence tandis que l'hydrolyse au micro-ondes permet d'obtenir la performance de production d'H₂ la plus élevée. Ce résultat était attendu au regard de l'analyse des sucres totaux.

Les fermentations présentent également des métabolismes relativement proches et favorables à la production d'H₂ par la voie du butyrate avec des rapports molaires Butyrate/Acétate élevés (> 2). Les prétraitements améliorent le rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ qui passe de 0,47 à 0,55 entre la référence et le prétraitement à l'autoclave et à 0,65 avec celui aux micro-ondes. La production d'acétate par homoacétogenèse reste stable (3,1 – 3,8 mM) au cours des conditions testées et ne semble donc pas significativement impactée par le prétraitement.

En revanche, ces prétraitements favorisent l'activité métabolique de la voie de la solvantogenèse lors de la fermentation. En effet, les teneurs significatives en éthanol obtenues (6,0 et 7,1 mM) pourraient être liées (i) à un stress consécutif à la libération de molécules inhibitrices dans la phase liquide (Anburajan *et al.*, 2018), (ii) à l'augmentation de la quantité de substrat présent dans le milieu réactionnel par rapport à la référence (de Amorim *et al.*, 2012) voire (iii) à un phénomène lié à l'inoculation du milieu réactionnel avec des bactéries prélevées en fin de fermentation et dont le métabolisme serait plus favorable à la production d'éthanol. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible ; en effet, ce phénomène a été observé par Liu *et al.* (2019) lors de la fermentation par la bactérie *Clostridium acetobutylicum* immobilisée sur support. A l'inverse, Ausiello *et al.*, (2017) considèrent les inoculations successives comme une méthode destinée à sélectionner un *consortium* efficace pour la production d'A₂. Il n'y a pas de consensus sur l'effet de la réinoculation à propos de l'augmentation de la production d'éthanol.

En résumé, les productions en H₂ les plus élevées sont obtenues dans l'ordre suivant : biomasse traitée par micro-ondes, biomasse autoclavée et biomasse non traitée. Ainsi, quel que soit le prétraitement, la production de H₂ est maintenue ou améliorée avec un effet significatif pour le prétraitement micro-ondes (+70 %) qui a permis la libération d'une teneur en sucre supérieure (+150 %) à celle de l'échantillon de référence.

En conclusion, dans le cas de l'ensilage de seigle, le prétraitement à l'autoclave, dans les conditions testées, n'a pas prouvé son efficacité pour augmenter le potentiel H₂ de la biomasse malgré la libération des sucres mesurée (+37 %) par rapport à la référence. La température et la teneur en acides endogènes à la biomasse lors de l'hydrolyse en autoclave sont faibles par rapport à l'hydrolyse aux micro-ondes. Ces différences pourraient expliquer l'efficacité limitée du prétraitement à l'autoclave. Le prétraitement par micro-ondes s'effectue à une température de 200°C permettant de solubiliser les sucres contenus dans les hémicelluloses d'après Hendriks et Zeeman (2009). Les travaux de Sun et Cheng (2005) ont montré l'efficacité d'un prétraitement d'hydrolyse à chaud (121°C) de la paille de ensilage de seigle avec un acide (H₂SO₄) dilué. La mise en œuvre de ce prétraitement pourrait constituer une piste pour améliorer la libération des sucres dans le milieu réactionnel. Une autre option envisageable serait l'augmentation de la charge de biomasse (g_{MS}/L) au moment du prétraitement pour hydrolyser la biomasse dans ses propres acides (autolyse), ce qui serait une alternative à l'utilisation de l'acide sulfurique dilué.

6 Positionnement par rapport à la littérature

Le tableau 39 présente une comparaison des performances de production d'H₂ des biomasses hydrolysées mise en œuvre dans cette étude avec les travaux de la littérature avec une sélection des biomasses correspondante à des co-produits de la plante de maïs et d'autres biomasses lignocellulosiques prétraitées. Les rendements présentés dans le tableau 39 sont exprimés soit en mol_{H2}/mol_{sucres} dans les études qui fermentent exclusivement l'hydrolysat liquide et en L_{H2}/kg_{MS} quand l'intégralité de la biomasse est mise en œuvre.

Tableau 39 : Prétraitements d'hydrolyse pour la fermentation de biomasse lignocellulosique	
--	--

			Rendement en H ₂	
Biomasse	Prétraitement de la biomasse	Inoculum	mol _{H2} /mol _{sucres} Production en H ₂ L _{H2} /kg _{MS}	Référence
Biomasse de maïs				
Paille de maïs	Explosion à la vapeur : 200°C, 1 min, H ₂ SO4	Boues de digesteur	3,00	Datar <i>et al</i> . (2007)
Paille de maïs	Explosion à la vapeur : 198°C, 1,5 min	Clostridium cellulolyticum Citrobacter amalonaticus	1,97 52 L _{H2} /kg _{MS}	Zhang <i>et al</i> . (2016)
Paille de maïs	Autoclavage : 121°C, 117 min, H ₂ SO ₄	T. thermosaccharolyticum W16	2,24	Cao <i>et al</i> . (2009)
Paille de maïs	Autoclavage : 120°C, 60 min, H ₂ SO ₄	Fumier composté	143 L _{H2} /kg _{MS}	Li et al. (2014)
Paille de maïs	Autoclavage : 121°C, 60 min, H ₂ SO ₄	Fumier composté	104 L _{H2} /kg _{MS}	Guo et al. (2014)
Paille de maïs	Microondes : 90 min Microondes : 45 min, H ₂ SO ₄ 100°C, 90 min, H ₂ SO ₄	Boues de digesteur thermophile	1,11 1,53 1,17	Liu et Cheng (2010)
Paille de maïs	Ultrasons : 90 min Autoclavage : 120°C, 30 min, H ₂ SO ₄	Boues de STEP	153 L _{H2} /kg _{MS} 138 L _{H2} /kg _{MS}	Wang <i>et al</i> . (2012)
Rafle de maïs	Autoclavage :120°C, 20 min, H ₂ SO ₄	Clostridium hydrogeniproducens HR-1	42 L _{H2} /kg _{MS}	Tang <i>et al</i> . (2013)
Ensilage de maïs	Extracteur de jus	Boue de STEP	1,74	Kyazze <i>et al</i> . (2008)
Ensilage de maïs	Broyage	Endogène (congelé)	104 L _{H2} /kg _{MS}	Cette étude
	Autoclavage : 140° C, 60 min, H ₂ SO ₄	Fermentât d'ensilage de maïs	147 L _{H2} /kg _{MS}	
	Explosion à la vapeur : 170°C, 10 min, H ₂ SO ₄		119 L _{H2} /kg _{MS} (2,91)	
Autres biomasses				
Alternanthera philoxeroides	Explosion à la vapeur : 135°C, 15 min, H ₂ SO ₄ , + traitement enzymatique	Enterobacter aerogenes ZJU1	83,9 L _{H2} /kg _{MS}	Song <i>et al</i> . (2020)
Arundo donax	Explosion à la vapeur : 210°C, 6 min +traitement	Boues de STEP enrichies sur hydrolysat	2,59	Ausiello <i>et al</i> . (2017)
Bambusa stenostachya	Autoclavage : 121°C, 60 min, H ₂ SO ₄	Boue de décharge	1,29	Dai <i>et al</i> . (2021)
	Explosion à la vapeur : 230°C 3 min H_2SO_4		1,70	
Déchets de fruits et de légumes, paille de maïs	Autoclavage : 120°C, 120 min, HCl	Boues anaérobies	1,91	Rodríguez- Valderrama <i>et al</i> . (2020)
Ensilage de seigle	200°C (micro-ondes), 3 min	Fermentât d'ensilage de seigle	47,5 L _{H2} /kg _{MS}	Cette étude

Parmi les biomasses, de nombreuses d'études ont été réalisées sur la paille de maïs, qui est une ressource lignocellulosique très abondante notamment en Chine avec 200 millions de tonnes produites (Zhang *et al.*, 2011, 2015), expliquant l'intérêt des chercheurs de ce pays pour cette biomasse. La paille de maïs est composée de cellulose (30 - 40 %), d'hémicelluloses (30 - 40 %) et de lignine (10 - 20 %) sans fraction d'amidon (Guo *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2014 ; Liu et Cheng, 2010). De nombreux prétraitements ont été appliqués à la paille de maïs, qui donne de faibles rendements en H₂ (3,3 - 9 L_{H2}/kg_{biomasse}) sans prétraitement selon Zhang

et al. (2007) et Yang *et al.* (2015). Rappelons que dans notre cas, nous obtenons pour l'ensilage de maïs 22 - 46 L_{H2}/kg_{biomasse} (grains, tiges, spathes, feuilles). Concernant les autres biomasses, nous avons choisi des études récentes sur des biomasses peu étudiées mais intéressantes à l'échelle locale : *Alternanthera philoxeroides* est une plante aquatique invasive, *Arundo donax* est une culture intermédiaire à valorisation énergétique alternative au maïs ; le bambou est une biomasse abondante en Asie, enfin, le mélange de déchets de fruits et légumes et paille de maïs utilisé par Rodríguez-Valderrama *et al.* (2020) est représentatif de biomasses disponibles dans des régions agricoles. Hormis ce mélange et les biomasses d'ensilage de maïs, qui contiennent une fraction d'amidon, ces biomasses ont des compositions assez similaires.

Parmi les prétraitements hydrothermiques, les rendements obtenus par explosion à vapeur d'ensilage de maïs dans notre étude comptent parmi les plus élevés de la littérature et sont comparables à ceux de l'étude de Datar *et al.* (2007), qui hydrolysent la paille de maïs imprégnée à l'acide pendant 1 min à 200°C. Ces rendements en H₂ sont proches du rendement maximum atteignable *in vivo* par conversion des pentoses en H₂, soit 3,33 mol/mol_{pentoses}. Ces résultats montrent la bonne fermentescibilité de l'hydrolysat généré par explosion à la vapeur. Il est toutefois probable que ceux-ci soient légèrement surestimés en raison de la procédure de dosage des sucres à l'anthrone. En effet, cette méthode colorimétrique ne permet pas de discriminer les sucres en fonction de leur nombre d'atomes de carbone. La présence de pentoses d'une masse molaire inférieure aux hexoses pourrait impacter le calcul des rendements.

Concernant les rendements de production d'H₂ par quantité de matières sèches *i.e.* sur les biomasses entières, nos résultats (119 et 147 L_{H_2}/kg_{MS}) sont dans l'ordre de grandeur des études présentées dans le tableau 39, notamment sur la paille de maïs prétraitées dont les rendements s'échelonnent de 104 à 153 L_{H_2}/kg_{MS} . La plupart des études mettent en œuvre un prétraitement hydrothermique en autoclave catalysé à l'acide sulfurique à 120°C. De telles conditions avait permis dans la partie 4.1 de ce chapitre d'obtenir des hydrolysats riches en sucres (> 5 g/L) avec, potentiellement, un bon rendement en H₂.

On remarque que la paille de maïs et l'ensilage de maïs présentent des rendements assez proches. A première vue, ce résultat semble surprenant puisque l'ensilage de maïs contient de l'amidon *a priori* facilement fermentescible. Il contient également de la rafle et de la feuille de maïs. Or, d'après la littérature, ces éléments sont difficilement hydrolysables. En effet, la rafle de maïs présente un rendement assez faible (42 L_{H2}/kg_{MS}) malgré une hydrolyse acide (Tang *et al.*, 2013). Ivanova *et al.* (2009) montrent que le prétraitement à l'autoclave n'a pas d'impact significatif sur le potentiel de production H₂ de la feuille de maïs, ce qui expliquerait la similitude entre les rendements en H₂ de l'ensilage et de la paille de maïs. Notons qu'il existe une variabilité importante entre les études utilisant la paille de maïs.

Le prétraitement thermochimique peut également être couplé à une hydrolyse enzymatique. A titre d'exemple, Ausiello *et al.* (2017) et Song *et al.* (2020) mettent en œuvre une explosion à la vapeur à respectivement à 210°C et 135°C, couplée à une hydrolyse enzymatique du résidu. Pour Ausiello *et al.* (2017),

ce prétraitement est nécessaire puisqu'une étude précédente avait montré que la fermentation de *Arundo donax* explosée et sans hydrolyse enzymatique ne permettait pas de produire de l'H₂ à partir de leur *inoculum* (boues de STEP) à cause de la présence de bactéries lactiques (Toscano *et al.*, 2014). Ce couplage pourrait être intéressant à tester sur nos biomasses et notamment pour valoriser la fraction solide et augmenter le rendement en H₂ par gramme de matières sèches. Les rendements en H₂ obtenus par couplage de l'explosion vapeur et de l'hydrolyse enzymatique sur *Alternanthera philoxeroides* et *Arundo donax* sont légèrement inférieurs aux performances de l'ensilage de maïs prétraité par explosion à la vapeur.

Notons que l'explosion à la vapeur permet d'obtenir un meilleur rendement avec de l'ensilage de maïs qu'avec un extracteur de jus (Kyazze *et al.*, 2008) dont le rendement est lui-même supérieur à celui des hydrolysats obtenus par prétraitement aux microondes (Liu and Cheng, 2010b). Ces résultats montrent le potentiel du prétraitement par l'extracteur à jus par rapport à certains prétraitements hydrothermiques pour obtenir une biomasse liquide pour la fermentation en procédé continu.

7 Conclusion

Cette étude a démontré avec succès la possibilité de produire de l'hydrogène à partir de biomasses ensilées et hydrolysées par des prétraitements hydrothermiques (explosion à la vapeur, autoclavage et micro-ondes) avec un *inoculum* issu d'une fermentation endogène des biomasses d'ensilage, s'apparentant à un réensemencement. Ces prétraitements ont permis de solubiliser les sucres de la biomasse dans la phase liquide de manière significative par rapport à la biomasse non traitée. Dans les conditions testées, la durée et la température sont respectivement les paramètres clés de l'hydrolyse par explosion à la vapeur et par autoclavage. L'utilisation d'acide s'avère nécessaire pour intensifier le prétraitement. Il se traduit par l'augmentation de la concentration en monosaccharides dans le milieu réactionnel. Les expériences de prétraitement avec l'explosion à la vapeur montrent que les quantités de sucres et d'inhibiteurs sont étroitement liées au facteur de sévérité combiné du prétraitement. Ainsi, les conditions les plus favorables à l'hydrolyse ne sont pas les mêmes que celles qui maximisent la production d'H₂. Ce résultat souligne la nécessité du travail d'optimisation des paramètres du prétraitement. Les conditions de prétraitement, qui ont abouti aux rendements en H₂ les plus élevés, sont listées dans le tableau 40.

Tableau 40 : Conditions de prétraitement et meilleurs rendements en H₂ par rapport à la biomasse de référence (en %)

Biomasse	Prétraitement de la biomasse	Inoculum	Rendement en H ₂ L _{H2} /kg _{MS}
Encilaça da maïa	140°C (autoclave), 60 min, H_2SO_4	Fermentât d'ensilage de maïs	147,0 (+61 %)
Ensliage de mais	170°C (expl. vapeur), 10 min, H_2SO_4	Fermentât d'ensilage de maïs	119,1 (+31 %)
Ensilage de seigle	200°C (micro-ondes), 3 min	Fermentât d'ensilage de seigle	47,5 (+70 %)

L'augmentation de la production d'H₂ consécutive au prétraitement est associée à des métabolismes plus efficaces dans lesquels la production d'H₂ par la voie du butyrate joue un rôle prépondérant. La présence

d'inhibiteurs liées à la déshydratation des sucres ou à la dégradation de la lignine pendant le prétraitement favoriserait la production d'acétate par la voie de l'homoacétogenèse, une voie consommatrice d'H₂. Lors de la fermentation d'ensilage de seigle prétraitée par autoclavage, nous avons observé des productions d'éthanol supérieures aux expériences de références, ce qui montrerait que l'hydrolyse de cette biomasse stimule la solvantogenèse.

Le prétraitement de l'explosion à la vapeur de l'ensilage de maïs a favorisé l'abondance des bactéries *Clostridium butyricum* dans le milieu réactionnel passant de 45 % dans la référence à plus de 65 % lors de fermentation de biomasse hydrolysée. A une température d'hydrolyse de 170°C, l'impact de la sévérité du prétraitement s'est illustré sur les bactéries minoritaires avec l'émergence de bactéries lactiques productrices d'H₂ appartenant au genre *Enterococcus* au détriment des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* qui étaient présentes dans la référence et dans l'essai d'hydrolyse à faible sévérité.

Le prétraitement par explosion à la vapeur pour fractionner la biomasse s'est imposée lors des essais de fermentation de l'hydrolysat liquide seul (filtrat). Il a permis d'obtenir des performances de production en H₂ proches de celles de la biomasse totale. Ces hydrolysats liquides ont été fermentés avec des rendements élevés (> 2,5 mol_{H2}/mol_{sucres}), supérieurs à ceux obtenus avec une solution modèle de glucose (1,33 mol_{H2}/mol_{sucres}). Ces faits expérimentaux soulignent la bonne adéquation entre l'*inoculum* et le substrat.

Pour alimenter le BRM, le prétraitement sélectionné sera l'hydrolyse par autoclave (140 °C, 60 min sans imprégnation à l'acide).

Chapitre 7

Chapitre VIII : Optimisation de la production d'H₂ en bioréacteur membranaire (BRM) à partir de l'ensilage de maïs

1. Introduction

La mise en œuvre de procédés continus pour la bioproduction d'H₂ permettrait de réaliser des gains de productivité à plus grande échelle par rapport aux procédés discontinus ou semi-continus (Clion, 2016 ; van Groenestijn, 2002 ; Ramírez-Morales *et al.*, 2015). Tout d'abord, les procédés continus permettent une production d'hydrogène stable, ce qui est essentiel pour les applications commerciales (Hawkes *et al.*, 2007). Le fonctionnement en continu permet aussi de supprimer le temps de latence des microorganismes et les temps de vidange, de nettoyage et de remplissage des réacteurs, temps spécifiques aux procédés discontinus (Crespo *et al.*, 2012). De plus, les procédés continus sont justifiés dans un contexte industriel pour des raisons pratiques de gestion des intrants (Trably *et al.*, 2018).

Technologiquement, la conception des bioréacteurs joue un rôle prépondérant pour une production efficace d'hydrogène en mode continu. Deux paramètres majeurs pour le fonctionnement des bioréacteurs continus ont été identifiés dans la littérature : le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène dans le milieu réactionnel (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012) et la stabilisation d'un *consortium* bactérien robuste et riche en bactéries productrices d'hydrogène dans le bioréacteur (Ramírez-Morales *et al.*, 2015). La configuration en mode continu des bioréacteurs peut être adaptée à l'extraction en continu de l'hydrogène pour éviter son accumulation dans le milieu réactionnel ou en tête de réacteur. De plus, une concentration de biomasse bactérienne plus élevée peut être maintenue sous forme de biofilms, d'agrégats ou de granules bactériennes par rapport à des systèmes de fermentation discontinue, ceci permettant d'obtenir des productivités et des rendements plus élevés en hydrogène (Carolin Christopher *et al.*, 2020) et d'augmenter la résistance des populations bactériennes aux changements de conditions dans le milieu réactionnel et aux inhibiteurs (Brethauer et Wyman, 2010). Le design du bioréacteur membranaire (BRM) développé au laboratoire (Ernst *et al.*, 2016; Renaudie *et al.*, 2021a, 2021b) intègre ces deux paramètres et permet une production d'hydrogène à partir d'une solution de substrat modèle dans des conditions optimisées (Chapitre V).

Le principal défi est la mise œuvre de réacteurs en fonctionnement continu avec des biomasses complexes comme l'ensilage de maïs. Cieciura-Włoch et Borowski (2019) ont rapporté que cette biomasse colmate très facilement les circulations de liquide, raison pour laquelle la majorité des dispositifs de production biologique d'H₂ utilisant cette biomasse, effectuent une fermentation à l'état solide en mode continu pour la production d'H₂ couplée à une digestion anaérobie pour la production de méthane (Benito Martin *et al.*, 2017 ; Nkemka *et al.*, 2015 ; Sträuber *et al.*, 2016). Les productions de gaz obtenues par ces études sont présentées dans le tableau 41.

Production d'H ₂ L _{H2} /kg _{MS}	Production de CH4 LCH4/kgMs	Rapport H ₂ /CH ₄	Référence
56	309	0,18	Nkemka <i>et al</i> . (2015)
12	112	0,11	Sträuber <i>et al</i> . (2016)
33 ± 16,5	128	0,26	Benito Martin <i>et al</i> . (2017)

Tableau 41 : Production d'H₂ et de CH₄ en mode continu par la fermentation en deux étapes d'ensilage de maïs .

L'étude de Nkemka *et al.*, 2015 présente les meilleurs rendements de production de gaz avec une production d'H₂ de 56 L_{H2}/kg_{MS} comparable au rendement de production obtenue dans notre étude sur le lot 2 d'ensilage de maïs à la sortie du silo en mode discontinu (46 L_{H2}/kg_{MS}).

Les performances de production de gaz de Benito Martin *et al.* (2017) et Sträuber *et al.* (2016) sont assez proches en raison de paramètres d'alimentation en charge organique similaires respectivement 5,6 et 5,8 g_{MV}/L/j. Dans ces études, les temps de séjour en fermentation solide sont longs (de 1,7 à 16,3 jours) en comparaison de ceux mis en œuvre dans le cas du BRM (2 - 10 h). La récalcitrance de la biomasse impose des débits de charge organique faibles, ce qui pourrait expliquer les faibles productivités en H₂ (0,178 L_{H2}/L/j, Benito Martin *et al.*, 2017). De plus, Nkemka *et al.* (2015) analysent une production de CH₄ provenant du fermentât du réacteur de fermentation obscure et Sträuber *et al.* (2016) observent, au niveau du réacteur de fermentation obscure, une alternance entre des phases de production d'H₂ et des phases de production de lactate, qui sont associées à des changements d'abondance des espèces bactériennes identifiées dans le percolât : bactéries lactiques et bactéries productrices d'H₂. Ces faits expérimentaux soulignent la difficulté d'obtenir une production stable d'H₂ en fermentation à l'état solide avec des réacteurs à percolation. Une façon de limiter ces contraintes est d'utiliser une solution d'alimentation liquide extraite de la biomasse d'ensilage pour une mise en œuvre en continu ; celle-ci étant tout à fait adaptée au fonctionnement du bioréacteur membranaire.

Pris ensemble, ces éléments (récalcitrance de la biomasse, difficulté de stabiliser la production d'H₂ et nécessité d'utiliser un substrat liquide) justifient donc l'utilisation d'un prétraitement d'hydrolyse de la biomasse. Les méthodes d'hydrolyse de la biomasse par autoclavage décrites dans le chapitre 7 confortent ce choix. En effet, ces prétraitements (hydrolyse par explosion vapeur et autoclavage) ont permis d'obtenir des substrats riches en sucres et présentant de bonnes performances de production d'H₂.

Ainsi, dans cette étude, le prétraitement d'hydrolyse en autoclave est utilisé pour hydrolyser l'ensilage de maïs en vue d'une fermentation en BRM en mode continu. Ce chapitre est dédié à l'optimisation du fonctionnement du BRM alimenté avec ce substrat. Le temps de séjour hydraulique (TSH) dans le bioréacteur et la concentration de la solution d'hydrolysat d'ensilage de maïs ont été définis en tant que paramètres clés pour la production continue d'H₂. Notre objectif est donc de déterminer les conditions optimales de

fonctionnement du BRM par la mise en place d'un plan d'expériences factoriel pour répondre aux questions suivantes :

- quel est l'effet du TSH (2 6 h) sur les performances de production d'H₂ dans le BRM ?
- quel est l'effet de la concentration en biomasse (100 300 g/L) sur les performances de production d'H₂ ?

Les conditions testées permettront de faire fonctionner le BRM avec une large gamme de DAS $(1 - 7 g_{sucres}/L/h)$. Les 3 essais effectués au même DAS, $(3,5 g_{sucres}/L/h)$ correspondant à un apport de 50 $g_{biomasse}/L/h$), permettront de répondre à la question suivante :

 quelle est la meilleure combinaison de TSH et de concentration de la solution d'hydrolysat de la biomasse dans la solution d'alimentation pour maximiser la production d'H₂ à DAS fixé ?

Pour répondre à ces trois questions, nous caractériserons, dans une première partie, les trois substrats d'alimentation en production semi-batch. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à la stratégie expérimentale et aux essais à réaliser. Les deux parties suivantes seront dédiées aux trois problématiques pour lesquelles, le suivi des productions de gaz et de métabolites permettra d'apporter des éléments de réponses. L'analyse de la composition des communautés bactériennes en suspension dans la phase liquide fera l'objet d'une partie à part entière et permettra de comparer les populations bactériennes du BRM en fonction des paramètres d'alimentation et des substrats d'alimentation testés. Les données des parties précédentes seront traitées par analyse statistique pour identifier les corrélations entre les différentes variables du système. Enfin, nous discuterons des différentes voies de valorisation énergétique de l'ensilage de maïs.

La figure 74 récapitule l'enchaînement des opérations pour l'optimisation de la fermentation d'hydrolysat d'ensilage de maïs en BRM.



<u>Figure 74</u> : Procédé de préparation de la solution d'alimentation à partir de la biomasse d'ensilage de maïs et paramètres d'alimentation pour la fermentation obscure en BRM.

A partir de l'ensilage de maïs (lot 2) hydrolysé en autoclave et dilué dans l'eau au cours d'un trempage bref (mise en solution, 1 h), nous obtenons une solution caractérisée par sa concentration initiale en biomasse (100 - 300 g/L). Celle-ci est filtrée à 5 μm. Le filtrat de l'hydrolysat servira de solution d'alimentation pour le BRM qui sera opéré à différents TSH (de 2 à 6 h). Le potentiel de production d'H₂ des fractions hydrolysées (résidus et filtrats) sera aussi testé individuellement en réacteur semi-batch.

2. Opérations préalables

Avant de présenter le plan d'optimisation de la production d'hydrogène en BRM, une série d'expériences est réalisée pour caractériser les solutions d'alimentation (filtrats de l'hydrolysat d'ensilage de maïs) utilisées dans cette étude.

2.1. Caractérisation des solutions d'alimentation

Les principaux constituants des solutions d'alimentation (filtrats d'hydrolysat) utilisées dans cette étude sont présentés dans le tableau 42.

<u>Tableau 42</u> : Composition des solutions d'alimentation du BRM préparées à partir d'hydrolysats d'ensilage de maïs. Les mesures sont réalisées en duplicat (n = 2).

Composition (g _{biomasse} /L)	100 ± 5	200 ± 5	300 ± 5
Sucres	6,6 ± 0,5	16,5 ± 2,2	27,9 ± 0,1
Lactate	1,9 ± 0,1	$4,1 \pm 0,4$	5,3 ± 0,5
Autres acides organiques	2,9 ± 0,3	5,6 ± 1,1	7,7 ± 1,5
DCO	17,1 ± 0,7	23,9 ± 0,8	41,7 ± 9,1

La composition des solutions de filtrat d'hydrolysat est relativement proportionnelle à la quantité d'ensilage utilisée pour la préparation. L'augmentation de la concentration initiale en biomasse de 200 à 300 g/L dans la solution d'alimentation semble améliorer le rendement d'extraction des sucres dans la phase liquide par rapport à la solution à 100 g/L. Ce phénomène aura un impact sur les DAS des tests de fermentation à venir. Notons que les solutions d'alimentation ne sont pas exclusivement composées de sucres, elles contiennent du lactate ainsi que d'autres acides organiques tels que l'acétate, le succinate et le formiate qui pourraient avoir également un impact sur le métabolisme fermentaire.

2.2. Production d'hydrogène en réacteur semi batch à partir des solutions d'alimentation (filtrat d'hydrolysat) du BRM

Le potentiel de production des solutions d'alimentation (filtrats) préparées à partir d'hydrolysat contenant 100 et 200 g/L d'ensilage de maïs est testé en réacteur semi-batch. Les tests de fermentation sont inoculés avec *l'inoculum* bactérien présenté au chapitre 7. La figure 75 présente le comparatif des productions cumulées d'H₂ et des métabolites produits en réacteur semi batch à partir de deux solutions d'alimentation pour le BRM (100 et 200 g/L). Les paramètres de performance de production et les paramètres de l'équation de Gompertz sont regroupés dans le tableau 43.



<u>Figure 75</u> : Production cumulée d'H₂ (a) et de métabolites (b) lors de la fermentation des solutions d'alimentation préparées par filtration de l'hydrolysat d'ensilage de maïs en réacteur en mode semi-batch.

Tableau 43 : Performances de la production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure des solutions d'alimentation du BRM en réacteur semi-batch (100 et 200 g/L).

Biomasse	Sucres	Production	Rendement	Productivité max	Rapport Ha/COa
(g _{biomasse} /L)	(g _{sucres} /L)	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	
100	6,6	1450	1,64	319,9	0,89
200	16,6	5177	2,35	1011,6	1,01

Des productions importantes d'H₂ sont obtenues à partir des solutions d'alimentation. De manière remarquable, la solution d'alimentation correspondant à 200 g_{biomasse}/L présente des performances de production d'H₂ (volume cumulé et productivité) très élevées associées à un rendement de conversion des sucres en H₂ et à un rapport H₂/CO₂ supérieurs à ceux obtenus pour la solution à 100 g/L (Tableau 43). Notons que la fermentation de la solution d'alimentation à 200 g/L atteint une productivité maximale supérieure à 1 L_{H2}/L/h. Les rendements en H₂ (1,6 - 2,3 mol_{H2}/mol_{sucres}) témoignent d'un métabolisme orienté vers la production d'H₂. Ces données sont confirmées par l'analyse des productions de métabolites dans le milieu réactionnel présentée sur la figure 75b. En effet, le butyrate est le métabolite majoritaire dans le milieu réactionnel et la production d'acétate semble intégralement associée à la production d'hydrogène (rapports molaires $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ proche de 1). Les productions de métabolites issus de voies métaboliques concurrentes à la production d'H₂ sont faibles (respectivement 2 et 14 mmol/L pour les filtrats à 100 et 200 g/L).

A titre de comparaison avec les fractions liquides obtenues au chapitre VI (71,6 g_{biomasse}/L), les solutions d'alimentation destinées au BRM présentent des rendements en hydrogène par mole de sucres supérieurs (1,6-2,3 mol_{H2}/mol_{sucres} contre 1,1 mol_{H2}/mol_{sucres}) avec des teneurs en sucres similaires ou supérieures (7,1 g_{sucres}/L pour les fractions liquides). Ainsi, les substrats obtenus présentent d'excellentes performances

de production d'H₂ par rapport à ceux du chapitre VI et semblent tout à fait appropriés pour la production d'H₂ en réacteur continu. Par rapport aux résultats du chapitre VII, les rendements en H₂ du filtrat obtenu (14,5 et 25,9 L_{H2}/kg_{biomasse} respectivement à 100 et 200 g/L) à partir de la biomasse autoclavée sont inférieurs aux hydrolysats filtrés obtenus par explosion à la vapeur de la biomasse imprégnée à l'acide (37,4 L_{H2}/kg_{biomasse} à 170°C et 33,4 L_{H2}/kg_{biomasse} à 190°C). Le prétraitement par autoclave permettrait donc d'obtenir un filtrat moins digestible que par le prétraitement à l'explosion à la vapeur.

2.3. Plan expérimental

La production d'H₂ est réalisée en utilisant la microflore mixte anaérobie stabilisée dans le BRM (Chapitre 5) dans des conditions mésophiles (37°C) et avec recirculation de la phase liquide.

Le tableau 44 présente les paramètres expérimentaux des tests de fermentation effectués pour optimiser la production d'H₂ en BRM alimenté avec du filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs. Notons qu'un essai correspond à un test de fermentation comprenant la montée en charge du bioréacteur par palier de TSH (sans inoculation préalable), la stabilisation de la productivité en H₂ correspondant à un régime pseudo-stable sur une durée de plusieurs TSH et l'arrêt de la fermentation, ainsi que le démontage du BRM.

Essai	TSH (h)	Concentration en biomasse (g/L)	DAS (g _{sucres} /L/h)
1	6	100	1.1
2	6	200	2,8
3	4	100	1,7
4	4	200	4,1
5	3	100	2,2
6	3	200	5,5
7	2	100	3,3
8	2	200	8,3
9	6	300	4,7
10	4	300	7,0

<u>Tableau 44</u>: Plan d'expériences des tests de fermentation selon le TSH et les paramètres d'alimentation (concentration en biomasse et DAS) pour l'optimisation de la production d'H₂ du BRM

Une première série de 8 tests (essais de 1 à 8) est effectuée pour déterminer l'impact de quatre TSH allant de 2 h à 6 h sur les performances fermentaires du BRM alimenté avec deux solutions d'alimentation préparées avec 100 et 200 g/L d'hydrolysat d'ensilage de maïs. Les TSH sont choisis entre 2 h et 6 h pour avoir une bonne vision du fonctionnement du BRM sur le plan expérimental. Les DAS associés s'échelonnent ainsi entre 1,1 et 8,3 g_{sucres}/L/h équivalent à 2,9 et 12 g_{DCO}/L/h.

Pour les tests 9 et 10, le BRM est alimenté avec une solution à 300 g/L. Ces essais permettront d'approfondir l'effet d'une forte concentration en biomasse dans la solution sur la productivité en H₂ du BRM. En raison d'une quantité de biomasse limitée, les essais à TSH inférieurs n'ont pas été réalisés avec la solution à 300 g/L/h.

3. Effet du TSH sur la production en hydrogène en BRM à partir des filtrats d'hydrolysat de la biomasse d'ensilage de maïs

Dans la littérature, l'effet du TSH sur la productivité en H₂ a été étudié sur les systèmes fermentaires alimentés en biomasses réelles (vinasses de canne à sucre, Bernal *et al.*, 2021 ; sirop de canne à sucre, Nualsri *et al.*, 2016 ; déchets organiques, Salem *et al.*, 2018). De façon générale, le TSH est un facteur qui affecte les performances de production à plusieurs niveaux : d'une part, le TSH régit le temps de contact entre les bactéries et le substrat, ce qui affecte le taux de consommation du substrat et d'autre part, pour une même concentration d'alimentation en substrat, la réduction du TSH est associée à une augmentation du DAS, ce qui a un impact sur les populations microbiennes et sur les voies métaboliques empruntées (García-Depraect *et al.*, 2020; Santiago *et al.*, 2019). D'un point de vue technologique, le TSH est directement lié aux coûts d'investissement, car des TSH courts permettent de réduire la dimension des réacteurs et de fonctionner avec des taux de charges élevés (Schmidt *et al.*, 2014).

3.1. Effet du TSH sur la production de gaz et la conversion du substrat

en BRM

La figure 76 présente l'effet du TSH compris entre 2 h et 6 h sur la production d' H_2 pour des filtrats d'hydrolysat de biomasses concentrées à 100 et 200 g/L.



<u>Figure 76</u>: Effet du TSH sur les profils de débit de production d' H_2 par litre de réacteur à deux concentrations en biomasse dans la solution d'alimentation. N.B. : les profils de fermentation ont été superposés (normalisation du temps de latence par rapport au test à TSH = 2 h pour 100 g/L et à 6 h pour 200 g/L)

Les paramètres de performance de production d'H₂ sont regroupés dans le tableau 45 pour des TSH de 2 à 6 h pour deux concentrations de la solution d'alimentation en biomasse (100 et 200 g/L). Ces paramètres sont calculés sur la base d'une quarantaine d'heures correspondant à un renouvellement du milieu de 6,7, 10, 13,3 et 20 fois pour des temps de séjours respectifs de 6, 4, 3 et 2 h.

<u>Tableau 45</u> : Effet du TSH sur les paramètres de production de gaz et de conversion du substrat pour le filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs.

	TSH (h)	DAS (g _{sucres} /L/h)	Productivité (mL _{H2} /L/h)	H ₂ /CO ₂	Rendement (mol _{H2} /mol _{sucres})	Consommation des sucres (% _{mol sucres})
100 g/L	6	1,1	182	0,92	1,33	65 %
	4	1,7	204	0,99	0,98	67 %
	3	2,2	226	1,02	0,81	50 %
	2	3,3	144	1,03	0,34	57 %
200 g/L	6	2,8	204	0,88	0,58	85 %
	4	4,1	314	0,82	0,67	82 %
	3	5,5	326	1,05	0,43	73 %
	2	8.3	144	0,70	0,12	64 %

D'après le tableau 45, la réduction du temps de séjour jusqu'à 3 h a un effet positif sur la productivité en H₂. En effet, les productivités optimales sont atteintes à un TSH de 3 h, quelle que soit la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation. L'augmentation de la productivité en H₂ (hormis à TSH = 6 h pour 200 g_{biomasse}/L) est associée à une augmentation du rapport molaire H₂/CO₂ et à une diminution du rendement en H₂ et de la consommation des sucres présents dans le filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs. Cette diminution est liée au fait que les gains de productivité en H₂ sont plus faibles proportionnellement à la quantité de substrat ajoutée par la réduction du temps de séjour. La faible consommation des sucres (50 % au minimum et 85 % au maximum) comparée au test avec un substrat modèle (glucose) dans les mêmes conditions (92 %) suggère que la consommation bactérienne du substrat est limitée (faible fermentescibilité) et ce, malgré le prétraitement d'hydrolyse de la biomasse en autoclave. Rappelons aussi que la teneur en sucres totaux établie expérimentalement par analyse colorimétrique (méthode à l'anthrone) comprend les sucres non fermentescibles par les bactéries, qui sont libérés lors de l'hydrolyse acide pour la réaction du dosage.

La figure 77 représente les principales corrélations entre les paramètres d'alimentation et de performance du BRM.


<u>Figure 77</u>: Effet du TSH sur la productivité en H₂ (a) et effet des paramètres d'alimentation du BRM (DAS) sur le taux de consommation des sucres (b) et sur le rendement de production en H₂ (c).

La figure 77a illustre bien les *optima* de TSH sur la productivité en H2 qui semblent être compris entre 3 et 4 h. L'augmentation de la concentration en biomasse de la solution permet également d'augmenter la productivité en H₂ (hormis à TSH = 2 h). Le taux de consommation des sucres diminue de manière linéaire (spécifiquement pour 200 g_{biomasse}/L) avec le DAS (figure 77b) pour les tests à concentration en biomasse fixée dans l'alimentation. Paradoxalement, à DAS équivalent, les tests de fermentation avec la solution d'alimentation à 200 g/L présentent des taux de consommation de sucres plus élevés que les tests avec la solution d'alimentation à 100 g/L. D'après la figure 77c, le rendement de conversion des sucres en H₂ est globalement corrélé négativement au DAS. Avec la solution d'alimentation à 100 g/L, la relation est parfaitement linéaire, ce qui suggère qu'une diminution du DAS permettrait d'améliorer le rendement en H₂ en mol_{H2}/mol_{sucres} et d'atteindre l'optimum à un DAS inférieur à 1 g/L/h.

L'augmentation de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation de 100 à 200 g/L augmente la productivité en hydrogène (Figure 76) et réduit le rendement de façon significative. Un maximum de productivité en H₂ de 7,8 L_{H2}/L/j est obtenu à un TSH de 3 h et à une concentration de 200 g/L. De plus, à cette même concentration, le TSH semble avoir un impact plus important sur la productivité qu'avec la solution d'alimentation à 100 g/L. La réduction du TSH à 2 h ne permet pas d'améliorer la productivité en H₂. Etonnamment, des productivités similaires en H₂ de 3,5 L_{H2}/L/h sont obtenues à 100 g_{biomasse}/L et 200 g_{biomasse}/L.

Dans la littérature, plusieurs études ont mis en évidence des effets du TSH sur les performances de production d'H₂ comparables à nos observations. Chang *et al.* (2008) obtiennent une augmentation de la productivité en H₂ avec la diminution du TSH associée à une diminution du rendement de conversion des sucres en H₂ lors de la fermentation en CSTR de composés solubles de mélasses riches en glutamate. De même, Arooj *et al.* (2008) trouvent pour la fermentation de l'amidon en CSTR un optimum de productivité en H₂ (5,6 L/L/j à TSH = 6 h) dissocié du rendement maximal de conversion des sucres en H₂ (0,92 mol_{H2}/mol_{glucose} à TSH = 12 h). En réacteur à lit fixe et à flux ascendant et pour une biomasse d'hydrolysat de farine de blé proche de la nôtre, Karaosmanoglu Gorgeç et Karapinar (2019) observent une

variation du rapport H₂/CO₂ en fonction du TSH avec un optimum à TSH = 6 h (H₂/CO₂ = 1,36). La productivité atteint un optimum à TSH = 3 h, ce qui est en accord avec notre étude. Ils supposent également qu'à TSH < 3 h, la productivité du système est limitée par un lessivage des bactéries. Notons que par rapport à Karaosmanoglu Gorgeç et Karapinar (2019), qui utilisent un réacteur à lit fixe et à flux ascendant, l'extraction des gaz *in situ* par les membranes du BRM permet une augmentation substantielle de la productivité en H₂ du procédé : 7,8 (pour notre étude) contre 2,5 L_{H2}/L/j, à DAS et teneur en sucres similaires.

Lors de la fermentation de biomasses réelles et de manière cohérente avec ce qui avait été observé pour les substrats modèles dans la littérature, les CSTR sont opérés sur des temps de séjour plus longs (6 - 12 h) et à des DAS plus faibles que les réacteurs à rétention de bactéries. A TSH compris entre 7,2 h et 24 h, Mariakakis et al. (2012) obtiennent un très bon rendement de production d'H₂ par sucres consommés (1,72 mol_{H2}/mol_{sucres consommés} ; 2,05 mol_{H2}/mol_{sucres consommés} dans notre cas) à un DAS relativement similaire à notre DAS le plus faible (0,83 g_{sucres}/L/h contre 1,1 g_{sucres}/L/h dans notre étude) lors de la fermentation de mélasse de betterave sucrière, riche en sucres facilement métabolisables. Salem et al. (2018) montrent que la réduction du TSH de 24 à 12 h d'une solution de pommes de terre broyées permet d'améliorer la productivité en H₂ de 0,92 L_{H2}/L/h à 2,5 L_{H2}/L/h en réacteur CSTR alors que dans le même temps, les auteurs n'observent pas de variation significative du rapport molaire H₂/CO₂ (entre 0,85 et 0,92) avec la réduction du TSH. Kim et al. (2011) montrent que l'utilisation d'un module membranaire de séparation solide/liquide couplé à un CSTR permet d'augmenter la charge en substrat par réduction du TSH et d'améliorer la productivité en H₂ par rapport à un simple CSTR. Les auteurs montrent ainsi le bénéfice de la rétention des consortia bactériens, établie par quantification de l'ARN dans le milieu réactionnel. Toutefois, à TSH = 2 h, la productivité en H₂ diminue à cause d'un taux de dilution trop important donnant lieu à une inhibition de la fermentation par le substrat.

En ce qui concerne, le taux de consommation des sucres lors de la fermentation de biomasses réelles à TSH courts, Rego *et al.* (2020) observent pour un réacteur à lit fluidisé une diminution de la consommation des sucres avec un effluent de vinasses (3,9 g_{sucres}/L) sous l'effet de la réduction du TSH de 2 h à 1 h. Ce phénomène pourrait être lié au lessivage des *consortia* bactériens. En effet, Davila-Vazquez *et al.* (2009) et Zhu *et al.* (2008) notent également une diminution de la consommation des sucres et à un lessivage des *consortia* bactériens à des TSH inférieurs à 6 h lors de la fermentation de poudre de lactosérum (lactose) et de déchets de pomme de terre en réacteur CSTR.

Par ailleurs, nos valeurs sont dans l'ordre de grandeur des taux de consommation de sucres observés par Bernal *et al.* (2021) (entre 60 % à 80 %) lors de la fermentation de vinasses de canne à sucres en réacteur à boues expansées (charge organique maximale de 30 $g_{DCO}/L/h$, 12 $g_{DCO}/L/h$ dans notre étude). De manière surprenante, les auteurs de l'étude n'observent pas de variation significative de la consommation des sucres en fonction de la concentration en substrat ou du TSH, contrairement à nos résultats. Les taux de consommation des sucres observés dans notre étude sont du même ordre de grandeur que ceux des réacteurs à boues expansées opérés en conditions thermophiles, ce qui met en évidence que le BRM est capable de fonctionner à des DAS élevés au regard de la littérature et avec des taux de conversion de sucres intéressants pour une biomasse lignocellulosique complexe.

3.2. Effet du TSH sur la production de métabolites en BRM

La figure 78 présente les débits de production de métabolites et de l'H₂ ainsi que la consommation des molécules solubles en fonction des variations du TSH dans la calandre du BRM pour les deux concentrations de solution d'alimentation (100 et 200 g_{biomasse}/L). Le Tableau 46 expose la concentration en sucres solubles, la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel en sortie du bioréacteur (acides organiques et alcools) et les indicateurs de performances du métabolisme en fonction du TSH et de la concentration de la solution d'alimentation. Dans le tableau 46, le calcul de l'homoacétogenèse ne tient pas compte du métabolisme lié à la consommation du lactate.



<u>Figure 78</u> : Effet du TSH sur les productions de gaz et de métabolites et sur la consommation des molécules présentes dans le milieu réactionnel. Les barres d'erreur représentent la variabilité des productions des métabolites sur plusieurs prélèvements pendant la période au cours de laquelle les productions de gaz sont stables.

TSH / Conc.	Concentration en métabolites produits	Sucres non consommés B/A		<i>H</i> ₂	Homoacétogenèse	
	(g/L)	(g/L)	2,71	$2 \times (B + A)$	(mmol _{acétate} /L/h)	
6h / 100 g/L	4,9	2,2	2,7	0,65	0,6	
4h / 100 g/L	5,2	1,8	1,5	0,43	1,8	
3h / 100 g/L	4,9	3,2	2,1	0,43	1,9	
2h / 100 g/L	3,5	3,0	1,3	0,35	1,7	
6h/ 200 g/L	13,5	2,6	1,5	0,29	2,7	
4h/ 200 g/L	7,0	2,4	1,8	0,55	1,5	
3h/ 200 g/L	9,1	4,6	1,4	0,43	1,8	
2h/ 200 g/L	6,6	7,7	2,0	0,17	3,8	

<u>Tableau 46</u> : Effet du TSH sur la concentration en métabolites produits et en sucres non consommés dans le fermentât et sur les indicateurs d'efficacité du métabolisme.

Chapitre 8

L'acétate et le butyrate sont les principaux métabolites produits, indiquant l'orientation du métabolisme vers la production d'hydrogène (figure 78).

Le TSH a un effet global sur la consommation de glucose et de lactate. En effet, la consommation de ces molécules augmente avec la réduction du TSH associée à un débit de solution entrante plus important. Ces substrats ne sont pas convertis intégralement en H_2 puisque le rendement en H_2 (mol_{H2}/mol_{sucres}) diminue avec le TSH.

Une consommation significative du lactate initialement présent dans le filtrat d'hydrolysat a été observée. En effet, l'élimination du lactate atteint 70 % à un TSH de 6 h et 50 % à un TSH de 2 h. En lien en partie avec la consommation de lactate, les rapports molaires B/A sont supérieurs à 1, ce qui signifie que le butyrate est le métabolite clé pour la production d'H₂. En effet, la conversion du lactate avec ou sans acétate est une voie potentielle pour la production d'hydrogène par la voie du butyrate, ce qui explique cette orientation du métabolisme fermentaire (Chapitre III).

Avec la solution d'alimentation à 100 g/L, l'évolution du métabolisme suit une tendance nette d'après la figure 78 : le débit de production de métabolites augmente avec la réduction du TSH et atteint un optimum à TSH = 3 h, ce qui correspond à l'optimum de productivité en H₂. Ainsi, la productivité en H₂ est associée à la production de butyrate, ce qui est cohérent avec les observations précédentes. Si les débits de production de métabolites varient avec le TSH, la concentration en métabolites dans le fermentât est assez stable et ne semble donc pas dépendre du TSH à cette concentration en biomasse dans la solution d'alimentation d'après le tableau 46. A TSH = 2 h, la concentration en métabolites est la plus faible. Les indicateurs du métabolisme sont cohérents avec les variations de rendement en H₂ observées : le métabolisme à TSH = 6 h est le mieux orienté vers la production d'H₂ (meilleurs rapports molaires B/A et $\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$ et faible production d'acétate par homoacétogenèse), ce qui explique son rendement élevé (1,33 mol_{H2}/mol_{sucres}). Malgré un métabolisme un peu moins efficace, les fermentations à TSH de 3 et 4 h ont des productivités plus élevées. En effet, avec la solution d'alimentation à 100 g/L, on observe que l'augmentation du DAS par réduction du TSH diversifie le métabolisme fermentaire (solvantogenèse, homoacétogenèse, production de propionate).

Avec la solution d'alimentation à 200 g/L, l'effet du TSH sur le métabolisme est plus variable. Globalement, la production de métabolites et la consommation de sucres augmentent avec la réduction du TSH (figure 78). Un optimum de métabolisme est observé à TSH = 4 h : les productions de métabolites associées à des voies non productrices d'H₂ (acétate par homoacétogenèse, éthanol, formiate, propionate) sont faibles. A TSH inférieur ou supérieur à 4 h, le métabolisme se diversifie au profit de voie non productrices d'H₂ et une partie importante du potentiel H₂ (protons) a été utilisée pour la production de propionate et/ou stockée sous forme de formiate. A faible TSH, cette diversification du métabolisme semble possible grâce à la présence abondante de sucres non consommés dans le milieu réactionnel à TSH courts (4,6 et 7,7 g/L) et à TSH plus longs par une concentration en acides organiques assez élevée dans le milieu réactionnel (13,5 g/L). Notons qu'à TSH = 3 h, l'optimum de productivité en H₂ est associé à une faible production d'acétate par homoacétogenèse (Tableau 46). A TSH = 2 h, on observe la même tendance qu'avec la solution d'alimentation à 100 g/L : une diminution de la concentration en métabolites produits et une augmentation de la teneur en sucres non consommés dans le fermentât.

Ainsi, les effets du TSH sur le métabolisme des *consortia* fermentaires varient selon la concentration en substrat dans l'alimentation. A 100 g/L, la réduction du TSH augmente la productivité en H₂ mais réduit l'efficacité du métabolisme. A 200 g/L, le métabolisme s'améliore avec la productivité en H₂, des *optima* sont obtenus à TSH = 3 et 4 h. Les tests de fermentations (200 g/L à TSH de 2 h ou de 3 h) avec les DAS les plus importants (supérieurs à 5,5 g/L/h) présentent un métabolisme diversifié avec l'émergence de voies consommatrices d'H₂ témoignant potentiellement d'un stress dans le milieu réactionnel lié à une quantité en substrat disponible trop importante, à l'augmentation de la concentration en acides ou à l'émergence de bactéries non productrices d'H₂ grâce à la présence abondante de substrat pour leur croissance. A TSH = 2 h, des concentrations en métabolites faibles ou des teneurs en sucres non consommés importantes (*i.e.* diminution du taux de consommation des sucres) sont observées signifiant que le renouvellement du milieu est plus rapide que la production de métabolites et que la consommation du substrat, avec un métabolisme peu orienté vers la production d'H₂ (rapport molaire $\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$ faible).

Dans la littérature, la plupart des études s'intéresse à la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel plutôt qu'au débit de production par litre de réacteur (mmol/L/h), qui est plus approprié pour le calcul des flux métaboliques. La concentration en métabolites dans le milieu réactionnel est souvent corrélée positivement à la productivité en H₂ indépendamment des variations du TSH. Par exemple, Lee *et al*. (2014) et Salem *et al*. (2018) montrent que l'augmentation de la productivité en H₂ suite à la réduction du temps de séjour est associée à une augmentation de la concentration totale en métabolites dans le milieu réactionnel.

Arooj *et al.* (2008) observent des variations du métabolisme global de la fermentation d'amidon en CSTR avec les variations du TSH : les TSH longs (12 - 18 h) sont favorables à l'accumulation d'acides dans le milieu réactionnel liée au manque de renouvellement du milieu et les TSH courts (4 - 6 h) sont favorables à l'homoacétogenèse. La production d'H₂ dans leur étude est étroitement liée à la production de butyrate et au rapport molaire B/A, qui varie sensiblement en fonction du TSH. Ainsi, l'optimisation du TSH permettrait d'améliorer la production d'H₂ et le métabolisme fermentaire. Sur le même type de biomasse (farine de blé), Karaosmanoglu Gorgeç et Karapinar (2019) observent un optimum de concentration en acides gras volatils d'environ 5,7 g/L à TSH = 4,5 h. A TSH plus long, le métabolisme bactérien n'est pas suffisamment efficace pour produire des acides et à TSH plus faible, le taux de dilution réduit la concentration en acides détectée dans le milieu réactionnel. Cet effet du taux de dilution est aussi observé par Kim *et al.* (2011). Lors de la fermentation de pulpe de soja hydrolysée avec un métabolisme favorable à la production d'H₂ par la voie de l'acétate, la concentration en métabolites dans le milieu réactionnel est corrélée à la réduction du TSH entre 6 et 8 h. A partir de TSH = 4 h, le taux renouvellement du milieu est plus rapide que le temps de génération des acides d'où une réduction de la concentration en acides dans le milieu réactionnel (Kim *et al.*, 2011).

En plus de réduire la concentration en acides dans le milieu réactionnel, la diminution du TSH peut modifier le métabolisme fermentaire. Dans l'étude de Davila-Vazquez *et al.* (2009) qui fermentent du lactosérum avec un consortium dont le métabolisme est favorable à la production d'H₂ par la voie du butyrate (B/A = 2,4 à TSH de 6 h et 10 h), la diminution du TSH à 4 h déclenche la production de propionate et une réduction de la production d'acides organiques ainsi qu'une réorientation du métabolisme vers la production d'acétate (B/A = 1).

Concernant la consommation du lactate au cours de la fermentation, ce phénomène a été observé dans plusieurs études qui utilisent des substrats contenant du lactate (résidus de l'industrie sucrière). Mariakakis et al. (2012) montrent une consommation significative du lactate lors de la fermentation de mélasses issues de betteraves sucrières consécutive à la réduction du temps de séjour à des durées inférieures à 24 h. Cette biomasse est dominée à la fois par des bactéries lactiques et des bactéries productrices d'hydrogène. Les auteurs suggèrent que le choix du TSH impacte la relation symbiotique entre les bactéries. En effet, à des TSH supérieurs à 24 h, i.e. à faibles DAS, les bactéries lactiques sont dominantes, ce qui est cohérent avec les travaux de Park et al. (2018) montrant la capacité des bactéries lactiques à concurrencer les Clostridii, à faible concentration en substrat dans le milieu réactionnel. Lors de la fermentation de vinasses de canne à sucre, Bernal et al. (2021) constatent également que la consommation du lactate et le taux de consommation du lactate semblent liés au DAS. En effet, la consommation de lactate est totale au cours de la plupart des tests de fermentation alors qu'aux DAS les plus élevés (à TSH courts, 1 h et 2 h), la consommation du lactate et des sucres est partielle (environ 60 %). Le métabolisme observé au cours de cette étude est remarquable. Malgré la consommation du lactate, il est très favorable à la production d'acétate dont 18 à 45 % de la production totale s'effectue par la voie de l'homoacétogenèse (la consommation de lactate n'est pas prise en compte dans le calcul de l'homoacétogenèse). Parmi les métabolites observés, les auteurs notent la production de butyrate et une quantité importante de propionate dans le milieu réactionnel, ce qui est cohérent avec nos données. Dans notre étude, l'augmentation du DAS par augmentation de la concentration en biomasse est associée à une augmentation de la production en butyrate et en propionate, en particulier avec les tests de fermentation avec l'alimentation à 200 g/L. L'homoacétogenèse est stimulée à faible TSH, phénomène lié à une augmentation de la teneur en solides suspendus dans le bioréacteur d'après Bernal et al. (2021). Nos résultats sont similaires à ce constat ainsi que ceux de Baima Ferreira Freitas et al. (2020) avec un bioréacteur à boues expansées.

Ainsi, en bioréacteur continu, une proportion importante de la production d'acétate s'effectue par l'homoacétogenèse ; ce phénomène n'est pas spécifique à la fermentation de filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs puisqu'il est également rapporté par les études fermentant des co-produits de l'industrie sucrière.

Sur la base de ces résultats, on peut souligner que le temps de séjour hydraulique est un instrument efficace pour orienter le métabolisme fermentaire : les TSH longs favorisent l'augmentation de la concentration en acides organiques (butyrate et acétate) *et al*cools, ce qui limite la production d'H₂. A l'inverse, à faible TSH (2 h), la vitesse de circulation des liquides est élevée, ce qui engendre la dilution du milieu réactionnel (liée à la boucle de recirculation du milieu réactionnel), une inhibition des bactéries par un apport de substrat trop élevé (augmentation du DAS) et l'intensification des forces de cisaillement voire la modification du régime d'écoulement des liquides, ce qui peut, dans notre cas, favoriser le lessivage des bactéries par décollement du biofilm du support. Pour Karaosmanoglu Gorgeç et Karapinar (2019), le TSH optimal dépend de la capacité du réacteur à maintenir les bactéries dans le milieu réactionnel, ce qui explique les différences de TSH optimal en fonction des études.

3.3. Conclusion sur l'effet du TSH sur la production d'hydrogène

Une analyse du plan factoriel des effets du TSH sur la productivité et sur le rendement de production en H₂ a été effectuée, les données détaillées du plan d'expériences sont données en annexe. La figure 79 présente les graphiques de contour associés.



<u>Figure 79</u>: Graphique de contour de l'impact du TSH et de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation du BRM sur la productivité en H_2 (a) et le rendement en H_2 (b).

D'après la figure 79, on note une légère tendance entre l'augmentation de la concentration en biomasse et la productivité en H₂ avec un optimum de productivité à TSH compris entre 3 - 4 h. Aux TSH extrêmes (2h et 6h), l'effet de la concentration en biomasse est peu marqué. De plus, à une concentration en alimentation de 100 g/L, l'effet du TSH est faiblement marqué. Enfin, notons qu'à 200 g/L, le TSH a un effet marqué sur la productivité en H₂.

L'analyse du plan factoriel n'est pas pertinente pour les effets du TSH et de la concentration en biomasse sur la productivité d'H₂. En effet, l'allure des courbes d'isoréponses en forme de parabole suggère que le modèle mathématique est quadratique. Or le plan factoriel mis en en œuvre est limité à la détermination de modèles linéaires et n'est donc pas adapté.

Le plan factoriel est analysé par rapport au rendement en H₂. L'analyse de variance valide l'effet significatif du TSH et de la concentration en biomasse sur le rendement en H₂ à un seuil de significativité de 5 %. D'après le diagramme des effets de Pareto, le TSH présente logiquement un effet plus important que la concentration. Le modèle présenté à l'équation 8.1 est relativement bien ajusté. Il explique 82 % de la variabilité du système mais son pouvoir prédictif est faible (42,8 %).

Rendement en $H_2 = 0,643 + 0,1700 \text{ TSH} - 0,00415 \text{ Concentration}$ (Eq. 8.1)

Ainsi, le graphique de contour suggère que la productivité en H₂ varie en fonction du TSH et de la concentration en biomasse dans l'alimentation de manière non linéaire puisqu'un optimum de productivité est atteint à un TSH compris entre 3 et 4 h. Ces conditions correspondent également à des métabolismes efficaces. Le plan d'expériences sur le rendement a permis d'établir un modèle préliminaire pour caractériser les variations de rendement en H₂ sur le domaine expérimental testé.

4. Effet de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation sur la production d'hydrogène

Au cours de la partie précédente et sur le domaine expérimental choisi, il apparaît que la concentration en biomasse dans la solution est le facteur qui a le plus d'impact sur les performances de production en H₂. Cette partie vise à approfondir l'effet de la concentration en biomasse dans l'alimentation (de 100 à 300 g/L) à deux TSH (4 h et 6 h).

4.1. Effet de la concentration en biomasse sur la production de gaz et la conversion du substrat

La figure 80 présente l'effet de la concentration en biomasse dans l'alimentation à TSH constant sur le débit de production en H₂ par litre de réacteur.

Chapitre 8



<u>Figure 80</u> : Effet de la concentration en biomasse sur le profil des débits de production d'H₂ par litre de réacteur. N.B. : les profils de fermentation ont été superposés.

Les paramètres de performance de production d'H₂ sont regroupés dans le tableau 47.

Tableau 47 : Effet de la concentration en biomasse sur les paramètres de production de gaz et de conversion du
substrat à TSH constants (4 h et 6 h).

TSH	Conc.	DAS	Productivité	11 /00	Rendement	C %
(h)	(g _{biomasse} /L)	(g _{sucres} /L/h)	(mL _{H2} /L/h)	H_2/CO_2	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(% _{sucres})
	100	1,1	182	0,92	1,33	65 %
6 h	200	2,8	204	0,88	0,58	85 %
	300	4,6	324	0,70	0,57	87 %
	100	1,6	204	0,99	0,98	67 %
4 h	200	4,1	314	0,82	0,67	82 %
	300	7,0	360	1,19	0,39	76 %

A TSH = 6 h, l'augmentation de la concentration en biomasse permet d'améliorer la productivité en H₂ du BRM. Cela est particulièrement notable à 300 g/L. Le taux de consommation des sucres augmente également de 65 % à 100 g/L à 85 % et 87 % respectivement avec une solution d'alimentation à 200 et 300 g/L. Le rapport molaire H₂/CO₂ et le rendement de conversion des sucres en H₂ diminuent cependant avec l'augmentation de la concentration en biomasse montrant une réorientation du métabolisme vers des voies non productrices d'H₂ et ce malgré une productivité en H₂ améliorée. Ainsi, l'augmentation de la productivité est plus faible par rapport à l'augmentation du DAS.

A TSH = 4 h, des phénomènes similaires sont observés concernant l'effet de la concentration en biomasse sur la productivité en H₂ et le rendement en H₂, ceux-ci restant corrélés négativement entre eux. Notons que les tests à 200 et 300 g/L présentent des productivités en H₂ assez proches. Le rapport molaire H₂/CO₂ atteint un minimum à une concentration de 200 g/L dans l'alimentation alors que cette concentration correspond au maximum du taux de consommation des sucres.

Les corrélations entre le DAS et les indicateurs de performances de fermentation en BRM sont représentées sur la figure 81.



<u>Figure 81</u> : Corrélation entre le DAS et les indicateurs de fermentation en BRM : productivité en H₂ (a), rendement de conversion des sucres (b), taux de consommation des sucres (c) et rapport molaire H₂/CO₂ (d).

De manière cohérente avec les résultats de la partie précédente, la figure 81 fait apparaître la corrélation positive entre la productivité en H₂ et le DAS (figure 81a) et la corrélation négative entre le rendement en H₂ et le DAS (figure 81b). Ainsi, un équilibre doit être trouvé entre ces deux paramètres de performances pour la mise en œuvre du BRM.

Le taux de consommation des sucres varie également en fonction du DAS et il semblerait que la consommation des sucres soit optimale à un DAS compris entre 2,8 et 4,6 $g_{sucres}/L/h$ (figure 81c), ce qui correspond aux tests à 6 h / 200 g/L, 4 h / 200 g/L et 6 h / 300 g/L.

L'effet du DAS sur le rapport molaire H_2/CO_2 est variable (figure 81d). Le rapport molaire H_2/CO_2 augmente très légèrement avec le DAS (réduction du TSH) lors des tests à 100 g/L. Il diminue avec l'augmentation du DAS liée à l'augmentation de la concentration en biomasse dans l'alimentation et à la réduction du TSH. Enfin, le test à 4 h / 300 g/L avec le rapport molaire H_2/CO_2 le plus élevé (1,19) fait figure d'exception. Dans la littérature, l'effet de la teneur en substrat de la solution d'alimentation sur la production a été moins étudié que l'effet du TSH. Saleem *et al.* (2018) ont évalué l'effet de la concentration en substrat avec un substrat synthétique en bioréacteur à membrane dynamique en configuration *ex situ*. Ils montrent que la concentration en DCO de leur solution d'alimentation est un paramètre qui affecte le fonctionnement de leur réacteur et notamment la capacité de filtration du module membranaire. Ils obtiennent une plage de fonctionnement optimale entre 10 et 30 g_{DCO}/L à TSH = 24 h. L'augmentation de la concentration en DCO de l'alimentation permet d'augmenter la productivité en H₂, ce qui valide nos observations sur l'effet de la concentration en biomasse sur la productivité en H₂. Par ailleurs, notons que la configuration de notre BRM permet de traiter des charges de DCO équivalentes (entre 17,1 et 41,7 g_{DCO}/L) sur des temps de séjour beaucoup plus courts (3 h contre 24 h) et permet d'obtenir des productivités plus élevées par rapport à leur productivité maximale qui s'élève à 104 L_{H2}/L/h.

Davila-Vazquez *et al.* (2009) testent l'effet d'une augmentation de la concentration de la solution d'alimentation en poudre de lactosérum à TSH = 6 h, qui correspond au TSH optimal de leur système. Ils obtiennent un optimum de production de 1400 mL_{H2}/L/h un débit d'alimentation de 5,7 g_{lactose}/L/h (5,7 g_{DCO}/L/h). L'augmentation de la charge leur permet de se rapprocher des taux de charge maximaux déterminés par Guo *et al.* (2008) avec des mélasses (8 g_{DCO}/L/h) tout en maintenant la productivité en H₂ (1360 mL_{H2}/L/h.)

En CSTR à TSH = 6 h, Arellano-García *et al.* (2021) testent différentes solutions d'alimentation préparées à partir de vinasses de tequila, très riches en acides organiques (formiate, lactate, acétate, valérate). L'augmentation de la charge organique du système permet d'obtenir un optimum de production d'H₂ (87,5 mL_{H2}/L/h). En revanche, l'utilisation des vinasses brutes crée un choc d'alimentation en acides gras volatils non favorable à la production d'H₂. En effet, l'utilisation de la solution brute inhibe la production d'H₂ et réduit la consommation des solubles qui peuvent être utilisés comme substrat (sucres, formiate, lactate). A l'inverse, la solution brute favorise la dominance des bactéries lactiques appartenant à la famille des *Sporolactobacillus*. Les auteurs soulignent donc l'effet de la composition de l'alimentation sur la production d'H₂, le métabolisme et les *consortia* bactériens indépendamment du TSH. Cette étude montre en effet qu'un substrat trop riche en acides organiques, c'est-à-dire dont la quantité est similaire à celle des sucres, peut inhiber la fermentation obscure.

Ainsi, sur cette série d'expériences, nous avons montré l'effet prépondérant du DAS sur la productivité en H_2 du BRM par rapport à la concentration en biomasse dans l'alimentation et le TSH.

4.2. Effet de la concentration en biomasse sur la production de métabolites

L'analyse de la composition de l'effluent permet de déterminer les débits de production de métabolites et de consommation des substrats. La figure 82 et le tableau 48 présentent l'effet de la concentration en biomasse sur le métabolisme fermentaire à 2 TSH (4 et 6 h).



<u>Figure 82</u> : Effet de la concentration en biomasse sur les productions d'H₂ et de métabolites et sur la consommation des solubles présents dans le milieu réactionnel. Les barres d'erreur représentent la variabilité des productions des métabolites sur plusieurs prélèvements pendant la période de régime pseudo stable lors de laquelle les productions de gaz ont été calculées.

<u>Tableau 48</u> : Effet de la concentration en biomasse sur la teneur totale en métabolites et en sucres dans le fermentât et sur les indicateurs d'efficacité du métabolisme.

TSH / Conc.	DAS (g _{sucres} /L/h)	Concentration en métabolites produits (g/L)	Sucres non consommés (g/L)	B/A	$\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$	Homoacétogenèse (mmol _{acétate} /L/h)
6h / 100 g/L	1,1	4,9	2,2	2,7	0,65	0,6
6h/ 200 g/L	2,8	13,5	2,6	1,5	0,29	2,7
6h / 300g/L	4,6	9,3	3,5	6,5	0,59	1,6
4h / 100 g/L	1,6	5,2	1,8	1,5	0,43	1,8
4h/ 200 g/L	4,1	7,0	2,4	1,8	0,55	1,5
4h / 300g/L	7,0	14,2	6,8	2,3	0,54	1,3

A TSH fixés, l'augmentation de la concentration en biomasse est associée à une augmentation du DAS. Sur la figure 82, on observe les phénomènes caractéristiques de l'augmentation du DAS tels que l'augmentation de

la consommation des substrats, à savoir les sucres et le lactate (sauf pour le test à un TSH de 4 h et à une concentration de 300 g/L).

A TSH = 6 h, l'augmentation de la concentration en biomasse augmente la production d'H₂ par la voie du butyrate avec une production stable et faible d'acétate, à l'exception du test à 200 g/L dont le métabolisme est très différent (production de propionate, de formiate et d'une quantité importante d'acétate). Les voies métaboliques non productrices d'H₂ sont peu actives comme le suggèrent les faibles teneurs en éthanol et en acétate observées lors des tests à 100 et 300 g/L (figure 82).

A TSH = 4 h, l'effet de la concentration en biomasse est net. La production de butyrate et d'H₂ augmentent alors que la production d'acétate reste stable, ce qui se traduit par une augmentation du rapport molaire B/A. Par ailleurs, l'augmentation du DAS diversifie le métabolisme : la production d'éthanol par solvantogenèse et la réduction du CO₂ sous forme de formiate augmente avec la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation et l'homoacétogenèse tend à diminuer. Nous notons également l'augmentation de la production de propionate avec le DAS à l'instar des résultats de Oh *et al.* (2004).

Hormis le test à 6 h / 200 g/L, le rapport $\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$ est stable autour de 0,5 - 0,6 montrant l'homogénéité globale des résultats de production d'H₂.

Excepté le test à 6 h / 200 g/L, la teneur en métabolites produits augmente avec la concentration en biomasse, un constat qui est partagé dans la littérature par Saleem et al. (2018) et Davila-Vazquez et al. (2009) qui observent une augmentation de la concentration des acides gras volatils dans le milieu réactionnel en fonction de la production d'H₂ et de la charge en DCO de la solution d'alimentation. Saleem *et al.* (2018) notent toutefois un effet inhibiteur des acides gras volatils à une concentration supérieure à 60 mM qui déclencherait un shift métabolique vers la production d'éthanol par la voie de solvantogenèse. Dans nos conditions, une production de formiate et une production plus importante d'éthanol sont observées dans les tests de fermentation où la concentration en métabolites est élevée (hormis pour la production d'acide formique du test à TSH = 6 h et 300 g/L). En condition de surcharge en substrat (DAS = 7,8 $g_{lactose}/L/h$), Davila-Vazquez et al. (2009) observent une augmentation de la production d'acétate résultant de la consommation de l'H₂ par des organismes acétogènes, ce qui contraste avec les productions d'acétate plutôt faibles que nous observons dans les tests avec la solution d'alimentation à 300 g/L. Nous n'avons sans doute pas atteint les conditions menant à ce shift métabolique dans notre réacteur. Par ailleurs, notons que deux tests fermentaires dépassent la valeur seuil des 12,5 g/L d'acides organiques dans le fermentât déterminée par Noblecourt et al. (2017). Ce fait expérimental pourrait justifier la mise en place d'un système de séparation membranaire (solide/liquide ou liquide/liquide) pour réduire la teneur en acides dans le milieu réactionnel et éviter l'inhibition de la production en H_2 des déviations métaboliques (production d'éthanol, de propionate et de formiate) ou simplement dans notre système l'augmentation du DAS pour diminuer le débit de métabolites dans le milieu réactionnel.

Au même titre que le TSH, la concentration en substrat dans l'alimentation impacte étroitement les performances de production d'H₂ des bactéries du bioréacteur par des effets d'inhibition ou d'activation liés à la fois à la teneur en sucres et en acides. Dans notre étude, l'augmentation de la concentration en ensilage de maïs dans le filtrat d'alimentation a permis d'améliorer les productivités en H₂. Un effet inhibiteur de l'augmentation du DAS a été observé sur le rendement en H₂ et sur l'homoacétogenèse. L'accumulation d'acides organiques dans le bioréacteur peut en effet conduire à des changements métaboliques (Oh *et al.,* 2004 ; Saady, 2013). On note une diversification du métabolisme avec l'augmentation du DAS qui se traduit par une modification du métabolisme vers la production d'éthanol ou l'utilisation du potentiel H₂ pour la production de formiate et de propionate.

Sur cette série d'expériences, il a été montré que, plus que la concentration en biomasse dans l'alimentation et le TSH, le débit d'alimentation en substrat (sucres totaux) a un effet prépondérant sur la productivité d'hydrogène en BRM avec une corrélation linéaire entre productivité et DAS indépendamment de la teneur en biomasse de départ et du TSH.

4.3. Effet d'un DAS constant à TSH et charge en biomasse variables sur les paramètres de performances de production d'hydrogène

La charge de biomasse administrée au BRM dépend du TSH et de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation. L'objectif de cette partie est de déterminer les valeurs du couple TSH, concentration en biomasse qui permet de maximiser les performances de production en H₂ du BRM. Cette démarche est assez originale parmi les travaux recensés dans la littérature qui n'optimisent qu'un seul paramètre d'alimentation à la fois (Renaudie *et al.*, 2021b).

Initialement, la charge de biomasse pour l'optimisation a été fixée à 50 g_{biomasse brute}/L/h et correspond à un point central dans le domaine expérimental de l'étude compris entre 16,7 et 150 g_{biomasse brute}/L/h. Les variations de la teneur en sucres dans la composition des solutions d'alimentation en fonction de la quantité de biomasse nous permettent de disposer d'un jeu de données avec deux tests à iso-débit d'alimentation en substrat (sucres) (environ 4,4 g_{sucres}/L/h) (voir tableau 49).

La figure 83 présente les débits d'H₂ obtenus au cours du temps pour ces deux tests.



<u>Figure 83</u> : Effet de la concentration en biomasse sur le profil des débits de production d'H₂. N.B. : les profils de fermentation ont été superposés.

Les profils présentés sur la figure 83 montrent des débits de production d'H₂ bien stabilisés au cours du temps et un régime pseudo stationnaire atteint. On observe des productivités en H₂ similaires pour les tests de fermentation à TSH de 4 h et 6 h. Le rendement le plus élevé en H₂ (0,67 mol_{H2}/mol_{sucres}) est obtenu à TSH = 4 h ; ce test de fermentation présente également un bon rapport H₂/CO₂, qui diminue avec l'augmentation du TSH et un taux de conversion des sucres élevé (82 %) légèrement croissant avec le TSH (tableau 49).

Ces résultats correspondent bien aux observations de Davila-Vazquez *et al.* (2009). En effet, à DAS équivalent, les auteurs observent une variation de la production d' H_2 d'un facteur 1 à 10 en fonction du TSH (6 h et 4 h), ce qui montre bien l'effet du TSH sur la production d' H_2 et notamment sa contribution au lessivage des consortia bactériens.

Les métabolismes des tests de fermentation à charge de biomasse égale et DAS constants ont été exposés sur la figure 83 et dans le tableau 49.

TSH / Conc.	DAS	Métabolites produits	Sucres non consommés	B/A	$\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$	Homoacétogenèse
	g/L/n	(g/L)	(g/L)			(mmol _{acétate} /L/h)
4 h/ 200 g/L	4,2	7,0	2,4	1,8	0,55	1,5
6 h / 300g/L	4,7	9,3	3,5	6,5	0,59	1,6

<u>Tableau 49</u> : Effet des paramètres d'alimentation sur la teneur totale en métabolites et en sucres dans le fermentât et sur les indicateurs d'efficacité du métabolisme à charge en biomasse constante.

Le nombre de moles de substrat consommées augmente avec le TSH et la production de butyrate suit également cette tendance à l'inverse de l'acétate qui est très faiblement produit dans le test à TSH = 6 h. Le test de fermentation à TSH = 4 h présente le plus important débit de production de métabolites (16 mmol/L/h). Les teneurs en sucres non consommées représentent 10 à 15 % de la teneur en sucres de

l'alimentation. En ce qui concerne les voies métaboliques secondaires, celles-ci semblent peu actives au cours des fermentations ainsi que le traduit la faible production d'éthanol et de propionate. Notons que le nombre de moles d'acétate produites par homoacétogenèse est stable parmi les tests de fermentation traduisant une baisse de rendement de cette voie métabolique.

Au terme de de cette partie, nous avons déterminé deux conditions d'alimentation du BRM avec une charge en biomasse fixe qui permettent d'obtenir une productivité élevée en H₂ et un métabolisme fermentaire efficace. Les conditions optimales sont 4 h / 200 g/L. En effet, cette configuration permet de produire de l'H₂ à un débit élevé et avec un meilleur rendement que les autres tests.

4.4. Conclusion sur l'effet de la concentration en biomasse sur la production d'hydrogène

Une analyse statistique est conduite pour analyser le plan d'expériences factoriel consistant à optimiser la productivité et le rendement en H₂ à partir des paramètres d'alimentation du BRM, les données détaillées d'analyse du plan d'expériences sont placées en annexe. La figure 84 présente les graphiques de contour associés.



<u>Figure 84</u> : Effet de la concentration en biomasse sur la productivité en H₂ (a) et le rendement en H₂ (b).

Sur les graphiques de contour de la figure 84a, la productivité en H₂ augmente avec la concentration en biomasse et la réduction du TSH *i.e.* l'augmentation du DAS. L'analyse de la variance montre que la valeur de p pour la concentration en biomasse est significative au seuil de 0,05 (p = 0,013), ce qui permet de conclure à un effet significatif de ce facteur sur la productivité en H₂. L'effet du TSH n'est pas validé par l'analyse de la variance. Par ailleurs, le modèle associé au plan d'expériences factoriel (Eq. 8.2) présente un R² élevé qui permet d'expliquer 92,02 % de la variance de la productivité en H₂ et une bonne capacité de prévision (73,33 %).

Productivité en H₂ = 255,7 + 0,745 Concentration - 28,0 TSH

(Eq. 8.2)

Le graphique de contour du rendement en H_2 (figure 84b) présente un gradient qui est logiquement inversé par rapport à celui de la productivité en H_2 , les rendements les plus élevés étant obtenus à des concentrations en biomasse faibles dans l'alimentation et à TSH longs (DAS faible). L'analyse de la variance montre que la concentration en biomasse et le TSH ont un effet significatif sur le rendement en H_2 avec un seuil de 0,05. Notons également que le terme d'interaction entre les deux facteurs est aussi significatif. Le modèle proposé (Eq. 8.3) présente un R² proche de 1 (99,87 %) et une très bonne capacité de prévision (98,26 %).

Rendement en $H_2 = 0.370 - 0.001250$ Concentration + 0.2250 TSH - 0.000425 Concentration * TSH (Eq. 8.3)

Ainsi, ce plan d'expériences a permis de mettre en évidence l'effet positif et significatif de la concentration en biomasse (*i.e.* de la quantité de sucres) dans l'alimentation sur la productivité en H₂ du BRM. A l'échelle métabolique, ce phénomène est associé à une augmentation du débit de production de butyrate et à une diversification du métabolisme lors des expériences à un TSH de 4 h.

5. Analyses microbiologiques

Le recours au séquençage des consortia bactériens présents dans le milieu réactionnel a pour objectif de répondre à plusieurs questions :

- quel est l'effet de la composition de la solution d'alimentation, notamment la concentration en sucres et en métabolites solubles (lactate et acétate) sur les *consortia* bactériens ?
- quel est l'effet du TSH (taux de renouvellement du milieu ou taux de dilution) qui influe sur les conditions d'hydrodynamisme dans la calandre sur les consortia bactériens ?
- quel est l'effet de la nature du substrat utilisé pour alimenter le BRM (solution de glucose supplémentée en nutriments, filtrat d'ensilage de maïs, hydrolysat d'ensilage de maïs autoclavé) sur les consortia bactériens ?

Pour ce faire, l'ADN des *consortia* bactériens présents dans la boucle de recirculation en sortie du BRM a été extrait, séquencé et quantifié. En outre, ces données permettent de compléter les observations sur les productions de gaz et le métabolisme.

Tout d'abord, les caractéristiques des tests de fermentation au cours desquels les échantillons ont été prélevés seront présentées. La comparaison de l'abondance relative des familles et des espèces microbiennes entre les tests fermentaires permettra ensuite d'expliquer les effets des paramètres d'alimentation testés sur la production d'hydrogène. Enfin, plusieurs corrélations issues d'une analyse statistique seront proposées pour compléter la synthèse des résultats.

5.1. Description des échantillons : paramètres expérimentaux et performance de production d'H₂

Le tableau 50 présente les caractéristiques et la productivité en H₂ des échantillons séquencés.

TSH	Concentration	Prétraitement	Substrat	Charge (g	/L/h)	Productivité
(h)	(g/L)			Biomasse	Sucres	(mL _{H2} /L/h)
6	100	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	16,7	1,1	182
4	100	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	25	1,7	204
2	100	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	50	3,3	144
6	200	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	33,3	2,8	204
4	200	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	50	4,1	314
6	300	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	50	4,7	324
4	300	Autoclave	Filtrat d'hydrolysat	71,6	7,0	360
10	75	Trempage	Filtrat	7,5	0,12	27
6	14	-	Glucose	-	2,3	328

Tableau 50 : Description des échantillons dont les consortia bactériens ont été séquencés.

L'effet du TSH (2 - 6 h) sur les *consortia* sera observé avec les expériences dont l'alimentation contient 100 g_{biomasse}/L. Les tests de fermentation sur l'effet de la concentration en biomasse dans l'alimentation (100 - 200 – 300 g/L, TSH = 4 h et 6 h) ont été séquencés ainsi que les trois essais à charge de biomasse constante (50 g/L/h) (tableau 50). Enfin, dans l'optique de montrer les effets de la nature de la solution d'alimentation sur les communautés microbiennes, les *consortia* bactériens des essais du plan d'expériences seront comparés à ceux des tests de fermentation effectués avec du filtrat issu du trempage d'ensilage de maïs broyé (non autoclavé) et avec du substrat modèle (glucose) dont les paramètres et productivité en H₂ seront présentés dans le tableau 50.

5.2. Analyse de la diversité alpha des échantillons

La première analyse s'intéresse à la diversité taxonomique des *consortia* microbiens. En effet, plusieurs variations de populations sont attendues selon les échantillons en fonction des paramètres d'alimentation. La charge en biomasse tend de façon générale à modifier les populations de microorganismes (Arellano-García *et al.*, 2021 ; Hafez *et al.*, 2010 ; Mariakakis *et al.*, 2012 ; Renaudie *et al.*, 2021a). La charge de biomasse a été même utilisée comme un prétraitement de *l'inoculum* bactérien par Benito Martin *et al.* (2017), O-Thong *et al.* (2009) et Pakarinen *et al.* (2011). La biodisponibilité du substrat joue également un rôle sur la diversité (O-Thong *et al.*, 2009). En effet, un substrat abondant et facilement fermentescible pourrait promouvoir une plus grande biodiversité qu'un substrat peu abondant et requérant des enzymes spécifiques pour être hydrolysé et métabolisé, favorisant ainsi les microorganismes hydrolytiques (Chen *et al.*, 2012). Enfin, le fonctionnement en BRM à temps de séjour variable permettrait le développement de bactéries avec des taux de croissance variés et la sélection de celles dont le taux de croissance est le plus

adapté au TSH imposé. La diversité taxonomique peut être appréhendée par la richesse spécifique d'un milieu donné (Vigliotti, 2017; Whittaker, 1960, 1972) et peut être établie selon trois aspects :

- la diversité alpha correspondant au nombre d'espèces (ou d'OTU) qui coexistent dans un milieu donné (ici, le bioréacteur à un instant donné) (Whittaker, 1960);
- la diversité bêta correspondant à la différence de diversité des espèces entre plusieurs milieux (Whittaker, 1960) par exemple, un milieu correspondant à un BRM alimenté avec du substrat modèle ou de l'hydrolysat d'ensilage de maïs. Il s'agit donc de comparer le nombre de *taxa* (*phyla* ou genres, ...) exclusifs et partagés entre différents milieux. L'analyse de cette diversité sera l'objet de la partie 5.3.

Dans cette étude, la diversité alpha, estimée *via* l'indice de Simpson, permettra de connaître la richesse spécifique d'un *consortia* bactérien.

L'indice de Simpson (Simpson, 1949) est une mesure de régularité représentant la probabilité que deux individus pris au hasard appartiennent à la même espèce (Vigliotti, 2017). Ainsi, plus l'indice est proche de 1, plus l'inégalité d'abondance entre espèces est grande et plus la diversité est faible. L'indice de Simpson est sensible aux variations des espèces les plus abondantes (Peet, 1974). L'indice de diversité de Shannon, qui est plus sensible aux variations des espèces minoritaires, donne exactement les mêmes tendances en termes de diversité que ceux de l'indice de Simpson et ne sera donc pas présenté dans cette étude. Les indices de diversité des échantillons de fermentât du BRM sont exposés dans le tableau 51.

TSH / Concontration	DAS	Nombre d'OTU	Indice de diversité de
ISH / Concentration	(g _{sucres} /L/h)		Simpson
6 h / 100 g/L	1,1	64	0,30
4 h / 100 g/L	1,7	45	0,19
2 h / 100 g/L	3,3	41	0,26
6 h / 200 g/L	2,8	65	0,22
4 h / 200 g/L	4,1	59	0,21
6 h / 300 g/L	4,7	61	0,16
4 h / 300 g/L	7,0	57	0,36
10 h / 71,6 g/L	0,12	75	0,27
Substrat modèle	2,3	39	0,31

Tableau 51 : Indice de Simpson caractérisant la diversité bactérienne des échantillons analysés par séquençage du gène d'ARN 16S

D'après le tableau 51, le nombre d'OTU varie du simple au double en fonction des paramètres d'alimentation du BRM et du substrat utilisé. Il en est de même pour l'indice de Simpson, qui varie entre 0,16 et 0,36 et qui est faible. L'indice de Simpson n'est par corrélé au nombre d'OTU.

Le nombre maximal d'OTU dans la recirculation est observé au cours de la fermentation du filtrat. Ce constat peut sembler logique puisque le filtrat est à la fois source de bactéries et de substrat. Notons que cela correspond à la fermentation dont l'alimentation est la moins concentrée en sucres. L'indice de Simpson est dans la moyenne des échantillons séquencés (0,27). Le nombre minimal d'OTU est observé lors de la fermentation de substrat modèle, ce qui suggère que la biodisponibilité du substrat ne serait pas directement corrélée au nombre d'OTU. L'indice de Simpson de ce test de fermentation est l'un des plus élevés (0,31) mais n'est pas très différent de celui des autres substrats indiquant que l'utilisation de substrat modèle n'affecte pas significativement la diversité du *consortium* installé dans le BRM.

Pour les tests utilisant l'hydrolysat d'ensilage de maïs, le nombre d'OTU varie de 41 à 65 et reste assez stable d'une concentration en biomasse à l'autre. On observe une tendance entre le nombre d'OTU et le temps de séjour, en effet, le nombre d'OTU semble diminuer avec le temps de séjour. L'effet du TSH est marqué entre 4 et 6 h à une concentration de 100 g/L et est plus faible pour les tests avec une alimentation à 200 g/L ou 300 g/L. Ainsi, la diminution du TSH serait défavorable à certaines bactéries qui pourraient être lessivées en raison de l'augmentation de la vitesse de circulation des liquides. L'indice de Simpson ne semble pas corrélé aux paramètres d'alimentation.

Ainsi, du point de vue de la diversité alpha, les *consortia* analysés semblent relativement homogènes malgré des paramètres d'alimentation très différents (teneur en sucres, TSH).

5.3. Variations de la composition bactérienne en fonction des paramètres d'alimentation du BRM : analyse de la diversité béta

La figure 85 présente l'évolution des populations microbiennes en sortie du BRM, prélevées dans la boucle recirculation, en fonction des paramètres d'alimentation du BRM.



<u>Figure 85</u> : Variations de l'abondance relative des espèces bactériennes dans le fermentât en fonction des paramètres d'alimentation en filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs autoclavé du BRM (comparaison avec le filtrat non autoclavé et le substrat modèle).

5.3.1. Effet de la nature du substrat sur la composition des consortia bactériens

Sur la figure 85, on observe deux types de bactéries majoritaires : les bactéries productrices d'H₂ (*Clostridium* pour la plupart des échantillons et spécifiquement Ethanoligenens pour le substrat modèle) et les bactéries lactiques (genres Lactococcus et Lactobacillus). De manière ponctuelle, on note la présence de taxons apparentés à Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Runinococcus et à Acinetobacter. Les bactéries du genre Pseudomonas ont été décrites comme productrices d'H₂ (Goud et al., 2014 ; Porwal et al., 2008 ; Shiyan et Krishnaveni, 2013 ; Ziara et al., 2019), ainsi que le taxon apparenté aux Enterobacteriaceae (Chapitre 3). La présence de bactéries du genre Pseudomonas a été relevée dans un consortium bactérien fermentant un hydrolysat de paille de riz avec une productivité en H₂ très élevée (680 mL_{H2}/L/j, Liu *et al.*, 2014). Des Runiminococcus ont été décrites comme des bactéries hydrolytiques par Chatellard et al. (2016) et ont été sélectionnés au cours de fermentations avec des substrats lignocellulosiques complexes (cellulose, xylane, paille de blé). La présence de ce taxon lors de la fermentation d'hydrolysat d'ensilage de maïs est donc cohérente. Le rôle de Acinetobacter est plus complexe à évaluer. Dans la littérature, les capacités de la souche Acinetobacter junii-AH4 à produire de l'H2 ont été montrées par Murugan et al. (2021). Les auteurs obtiennent de bons rendements de production d'H₂ (1,4 mol_{H2}/mol_{sucres}) à partir de co-produits de moulin à riz. Dans nos travaux, le taxon identifié dans la recirculation du BRM présente plus de 98 % d'homologie avec des souches d'Acinetobacter (Acinetobacter harbinensis, Acinetobacter terrae, Acinetobacter terrestri) isolées à partir d'échantillons de sols ou d'écosystèmes aquatiques (Krizova et al., 2015 ; Li et al., 2014 ; Nemec et al., 2021). Ces souches anaérobies strictes difficilement cultivables en condition mésophile ne sont pas capables de produire d'acides à partir du glucose mais utilisent l'acétate, le lactate (Krizova et al., 2015 ; Li *et al.*, 2014) ou encore l'éthanol (Nemec *et al.*, 2021) comme source de carbone.

De manière remarquable, la composition des *consortia* fermentaires du filtrat est tout à fait cohérente avec les résultats de Sträuber *et al.* (2016) qui fermentent de l'ensilage de maïs en réacteur à percolation (fermentation à l'état solide) en mode d'alimentation semi continu. Les auteurs observent, comme dans notre cas, une coexistence entre les bactéries lactiques du genre lactobacillus et les bactéries productrices d'H₂ du genre *Clostridium*.

De façon logique, la biomasse d'ensilage de maïs favorise le développement des bactéries lactiques, initialement présentes dans la biomasse, alors que dans le BRM alimenté en substrat modèle, on note très peu de bactéries lactiques mais une présence de *Ethanoligenens* dont la prolifération semble être inhibée par le filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs. Cette bactérie a été identifiée comme capable de fermenter des monosaccharides et ne semble pas être capable d'hydrolyser des substrats lignocellulosiques complexes. Dans la littérature, *Ethanoligenens* a été sélectionnée pour conduire des expériences de saccharification enzymatique et de fermentation en simultanée pour la production d'H₂ à partir d'hydrolysat de paille de maïs (Xu *et al.*, 2010) ou associée à une bactérie hydrolytique (*Clostridium acetobutylicum*, par exemple) dans le cadre d'une co-culture pour la digestion d'un substrat complexe (Bao *et al.*, 2016 ; Wang, 2008). Ainsi, il est

surprenant de ne pas la détecter dans la boucle de circulation lors de la fermentation d'hydrolysat d'ensilage de maïs. Bien que non sporulante, cette bactérie semble avoir de remarquables capacités à survivre dans le BRM malgré des substrats peu favorables. En effet, le test en substrat modèle a été effectué pendant la campagne de tests avec l'hydrolysat d'ensilage de maïs. Par ailleurs, cette bactérie a été identifiée en faible proportion (3,3 % d'abondance) dans le BRM opéré par Renaudie *et al.* (2021b) qui suggéraient une implication de cette bactérie dans la formation d'agrégats bactériens (Ren *et al.*, 2009). Enfin, la composition de nos *consortia* bactériens est cohérente avec celles des communautés bactériennes observées par Si *et al.* (2015) en bioréacteur à lit de boues et à lit fixe, tant en termes de diversité (indice de Simpson compris entre 0,15 et 0,36) qu'en terme qualitatif : présence de *Clostridium* majoritaire et *d'Ethanoligenens* en plus faible proportion.

5.3.2. Effet du TSH sur les consortia bactériens

Avec la solution d'alimentation à 100 g/L, on note un recul de l'abondance des bactéries *Clostridium butyricum* avec la diminution du TSH au profit de *Clostridium acetobutylicum* (figure 13a). Dans les tests à différents TSH, l'abondance relative de bactéries productrices d'H₂ reste assez stable par rapport aux bactéries lactiques. A TSH = 4 h, on note une augmentation de la diversité des bactéries en sortie de réacteur dans la boucle de recirculation (indice de Simpson faible, 0,16) avec l'émergence de *Ruminococus sp.* et *Acinetobacter sp.*.

Avec la solution d'alimentation à 200 g/L, l'alternance entre *Clostridium butyricum* et *Clostridium acetobutylicum* dans le milieu réactionnel est confirmée (figure 13a). On note une réduction de la quantité de bactéries lactiques et l'émergence de *Ruminococus* à TSH = 4 h. La diversité n'est pas impactée par la réduction du TSH (indice de Simpson 0,22 à 6h et 0,21 à 4h).

Les tests avec la solution d'alimentation à 300 g/L semblent plus favorables au développement de *Clostridium butyricum* par rapport à *Clostridium acetobutylicum*. La réduction du TSH de 6 h à 4 h réduit significativement la diversité bactérienne (l'indice de Simpson passe de 0,16 à 0,36) au profit de l'abondance de *Clostridium butyricum*.

5.3.3. Effet de la concentration et de la charge en biomasse sur les *consortia* bactériens

A TSH = 6 h, la proportion de *Clostridium* dans le *consortium* bactérien est optimale à 100 g/L (72 %) puis décroît avec la concentration en biomasse utilisée pour générer l'hydrolysat (44 %, 51 % respectivement à 200 g/L et 300 g/L).

A TSH à 4 h, quelle que soit la concentration en biomasse dans l'hydrolysat, on observe une augmentation de l'abondance relative des *Clostridium* assez stable (62 % à 70 %), tout comme celle des bactéries lactiques (20 à 21 %).

5.3.4. Evolution de l'abondance absolue des bactéries en fonction des paramètres d'alimentation

En plus du séquençage, une quantification du nombre de copies du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomique des procaryotes a été effectuée par qPCR. Ces données permettent de déduire la quantité d'ADN procaryote totale de l'échantillon donnant ainsi un ordre de grandeur de la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon. La figure 86 présente les variations du nombre de copies du gène en fonction des paramètres d'alimentation du BRM.



<u>Figure 86</u> : Variations du nombre (a) et du débit (b) de copies du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomique des procaryotes dans le milieu réactionnel en fonction des paramètres d'alimentation du BRM (concentration en biomasse dans l'alimentation et TSH). Le débit correspond au nombre de copies du gène normalisé par le TSH.

D'un point de vue quantitatif, le nombre et le débit de copies du gène dans le milieu liquide augmentent d'une part avec la concentration en biomasse (Figure 13) et d'autre part avec le TSH. Le nombre de copies du gène augmente avec le DAS et l'essai 4 h / 300 g/L présente le nombre de copies du gène le plus élevé dans le milieu réactionnel. Le débit donne une information sur la production du nombre de copies du gène par heure. Cet indicateur permet de caractériser les consortia et est l'équivalent microbiologique de la productivité en H₂ pour la production de gaz et du débit de production de métabolites pour le métabolisme. Logiquement, le débit du nombre de copies semble plus influencé par le TSH. En effet, l'essai 2 h / 100 g/L présente le débit de copies du gène le plus élevé malgré un DAS intermédiaire (3,3 sur une échelle de 1 à 7 g/L/h).

La figure 87 présente l'évolution des populations microbiennes en sortie du BRM, prélevées dans la boucle recirculation en fonction des paramètres d'alimentation du BRM.

Chapitre 8



Figure 87 : Variations de l'abondance absolue *i.e.* du débit des espèces bactériennes dans le fermentât en fonction des paramètres d'alimentation en filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs autoclavé du BRM (comparaison avec le filtrat non autoclavé et le substrat modèle).

A TSH = 6 h, les *consortia* dans le fermentât sont assez similaires en termes de débit, notamment en ce qui concerne le nombre de copies du gène associé au genre *Clostridium* (environ 80 millions de copies du gène/ μ L/h, figure 87). Dans ces conditions, il semblerait que l'augmentation de la productivité en H₂ associée à l'augmentation de la concentration en biomasse serait liée à une prolifération des bactéries retenues dans la calandre *i.e.* celles qui sont fixées sur les fibres ou qui sédimentent au fond du réacteur et qui ne sont donc pas détectables dans la recirculation.

A TSH = 6 h, on note des variations dans le *consortium* fermentaire par rapport à TSH = 4 h, avec le doublement du nombre de copies de gènes par heure (sauf pour *Acinetobacter sp.* en rose). Cette augmentation dans l'effluent peut être liée à deux phénomènes : d'une part l'augmentation du DAS a permis un développement bactérien plus important dans la calandre et d'autre part, la diminution du TSH modifie les conditions hydrodynamiques avec un débit de circulation plus rapide dans le réacteur, ce qui diminue les capacités de rétention de bactéries du BRM et contribue à la mise en suspension *i.e.* au lessivage d'un plus grand nombre de bactéries. Notons également que le débit des bactéries dépend de la concentration en biomasse dans la solution d'alimentation, ce qui était moins prononcée dans le cas à TSH = 6 h. A TSH équivalent, plus la concentration en biomasse (représentée par le DAS) augmente, plus la quantité de bactéries est importante. L'évacuation des bactéries hors du bioréacteur n'impacte pas significativement la productivité en H₂, ce qui signifie que le débit de bactéries extraites est inférieur au temps de génération des bactéries, mettant en évidence à cette valeur de TSH, la probable quasi absence de phénomène de lessivage.

A TSH = 2 h, les données de la qPCR montrent que la quantité de bactéries dans la recirculation continue d'augmenter par rapport aux tests à TSH plus long mais de façon moindre et non proportionnelle (figure 13a). En effet, entre un TSH de 6h et 4h, la quantité est doublée alors qu'entre un TSH de 4 h et 2 h, elle n'est augmentée que de 17 %. La productivité en H₂ de ce test est la plus faible, cela met en évidence un lessivage des bactéries productrices d'H₂ impactant leurs capacités à produire. Le taux de croissance des bactéries dans la calandre est sans doute inférieur au taux de renouvellement du milieu. Le lessivage est également confirmé en comparant le séquençage des *consortia* du test 2 h / 100 g/L aux autres tests à DAS « équivalent » dans lesquels le débit des bactéries dans la recirculation est plus faible.

De façon intéressante, on observe qu'à charge en biomasse constante, l'abondance absolue (qPCR) et le débit des bactéries du genre *Clostridium* est inversement proportionnelle au TSH.

L'augmentation du DAS par la réduction du TSH permet le développement d'une quantité plus importante de bactéries en suspension dans le milieu. Cette information est à double tranchant puisqu'elle signifie à la fois qu'il y a une augmentation de la quantité de bactéries productrices d'H₂ en suspension dans le milieu réactionnel, augmentation qui peut potentiellement être associée à un phénomène de lessivage plus important des bactéries dans le cas où la croissance bactérienne ne peut être maintenue dans le bioréacteur. Les données de la qPCR ont permis de mettre en évidence que quand le TSH est supérieur au temps de génération des populations microbiennes, les bactéries sont lessivées et la production d'H₂ est impactée (TSH = 2 h).

5.3.5. Discussion

Dans la littérature, peu d'études observent les variations des *consortia* bactériens en fonction des paramètres d'alimentation du bioréacteur.

Nos observations sont assez proches de celles de Davila-Vazquez *et al.* (2009) et Santiago *et al.* (2019) qui étudient les performances fermentaires de leur système en fonction du TSH en CSTR et en réacteur batch en mode d'alimentation séquentielle. De manière cohérente avec leur production d'H₂, les bactéries du genre *Clostridium* sont majoritaires aux TSH favorables à la production d'H₂. A l'inverse quand le TSH entraîne la réduction de la production d'H₂ à cause du lessivage des *consortia* ou d'une surcharge en substrat, les auteurs notent une diminution de l'abondance des *Clostridium* associée à un métabolisme moins favorable à la production d'H₂ (production de lactate et de propionate).

L'étude de Chang *et al.* (2008) montre que l'augmentation du DAS lié à la réduction du TSH peut induire une sélection parmi les communautés bactériennes. Dans leur étude avec des mélasses riches en glutamate, la réduction du TSH sélectionne des bactéries adaptées au substrat (*Acidaminococcus*) au détriment des *Clostridium* qui consomment le glutamate moins efficacement. Un phénomène semblable a lieu dans notre étude avec la bactérie *C. acetobutylicum* qui est inhibée à DAS et à concentration en biomasse élevée. De

même, avec une biomasse lignocellulosique hydrolysée (paille de blé), Liu *et al.* (2014) obtiennent un *consortium* très favorable à la production d'H₂. La réduction du TSH de 8 h à 4 h favorise, dans leur étude, l'émergence d'une bactérie hydrolytique d'où une amélioration significative de la productivité et du rendement en H₂ entre ces deux TSH (facteur 3). Dans notre cas, on note aussi l'émergence de *Ruminococcus,* un genre de bactéries associé à une activité hydrolytique (Chatellard, 2016), mais le rendement n'est pas amélioré pour autant.

L'une des spécificités de notre étude est la coexistence entre bactéries lactiques et *Clostridium*. La présence des bactéries lactiques et le rôle du lactate dans la fermentation est au cœur des discussions dans les études qui alimentent des bioréacteurs en mode continu avec des biomasses réelles (Arellano-García et al., 2021 ; García-Depraect et al., 2020 ; Mariakakis et al., 2012 ; Palomo-Briones et al., 2021). Des bactéries lactiques ont été identifiées dans des systèmes fermentaires stables et pourraient être à l'origine d'interactions positives avec les bactéries productrices d'H2. Ohnishi *et al*. (2012) et García-Depraect et León-Becerril (2018) suggèrent une symbiose entre les bactéries lactiques et les bactéries productrices d'H₂ dont le bénéfice sur la production d'H₂ dépendrait du TSH. A TSH long (*i.e.* supérieur à 24 h), la fermentation lactique pourrait inhiber la production d'H₂ notamment par la capacité des bactéries lactiques à produire des bactériocines comme suggérée au chapitre 4 et par Noike et al. (2002). A TSH plus court, les bactéries lactiques pourraient avoir une action bénéfique pour la production d'H₂ à savoir, détoxifier le milieu en O₂ (Hung *et al.*, 2011a). De plus, le lactate produit par ces bactéries peut également servir de substrat pour la production d'H₂ (chapitre 3) et les bactéries lactiques pourraient jouer un rôle dans la formation des agrégats et granules productrices d'H₂ (Hung et al., 2011b). Ce résultat est également confirmé par Palomo-Briones et al. (2017), en CSTR, avec du lactose comme substrat : les temps de séjour inférieurs à 12 h permettent d'enrichir le consortium en bactéries productrices d'H₂ aux dépens des bactéries lactiques et d'orienter le métabolisme vers les voies productrices d'H2. Dans notre étude, nous avons observé que le développement de bactéries lactiques dans le fermentât est favorisé quand le BRM est alimenté avec un filtrat très pauvre en sucres (1,2 g/L), ce qui est aussi cohérent avec l'étude de Park et al. (2018). Avec l'hydrolysat d'ensilage de maïs l'abondance des bactéries lactiques est plus faible (environ 20 % d'abondance) et semble diminuer avec l'augmentation du DAS.

5.3.6. Conclusion

Le séquençage des consortia bactériens présents en sortie de réacteur dans la boucle de recirculation du BRM a mis en évidence la présence de *Clostridium* en abondance coexistant avec des bactéries lactiques. La réduction du TSH et conséquemment l'augmentation du DAS ont permis, dans la plupart des cas, d'augmenter l'abondance relative et le débit des bactéries productrices d'H₂ dans le fermentât. L'analyse du nombre de copies de gènes mise en relation avec les productions de gaz et de métabolites ont permis de mettre en évidence le lessivage des bactéries de la calandre à TSH = 2 h. Ce travail renforce la certitude

qu'une connaissance fine et un ajustement judicieux des paramètres d'alimentation du bioréacteur sont nécessaires pour obtenir une productivité en H₂ élevée et stable avec l'existence d'un optimum.

En effet, dans la littérature, il a été montré que dans les systèmes à faible DAS, la fermentation obscure peut être concurrencée à la fois par la fermentation lactique et par la méthanogenèse (à TSH très longs 24 – 48 h) ; à l'inverse, pour des TSH courts, le risque de lessivage des bactéries prédomine. Dans notre étude, le lessivage est très faible pour les temps de séjour supérieur à 2 h. Le suivi en temps réel de la quantité de bactéries dans la recirculation pourrait être un indicateur efficace pour déterminer quand et à partir de quel TSH le bioréacteur subit un lessivage, d'autant plus que le TSH associé au lessivage pourrait dépendre de la nature du substrat qui influe sur le taux de croissance des bactéries.

6. Analyse des corrélations

Les paramètres d'alimentation du BRM impactent étroitement les performances de production d'H₂ du BRM. Sur l'ensemble des fermentations dont nous disposons, une analyse en composantes principales (ACP) basée sur les corrélations de Pearson avec des données normalisées est effectuée pour identifier des corrélations entre les paramètres d'alimentation et les variables fermentaires (productions de gaz, métabolites et composition du *consortium* bactérien (*Clostridium* et bactéries lactiques du fermentât, qualitatif et quantitatif (qPCR)). La figure 88 présente l'ACP obtenue.



Variables (axes F1 et F2 : 71,09 %)

<u>Figure 88</u> : Analyse en composantes principales (ACP) des différentes variables et paramètres d'alimentation lors de la fermentation obscure d'hydrolysat d'ensilage de maïs en BRM.

Chapitre 8

Les deux composantes F1 et F2 de l'ACP présentées sur la figure 88 expliquent plus de 70 % de la variabilité des données.

L'ACP fait apparaître un cluster de variables corrélées positivement selon l'axe horizontal parmi lesquelles on trouve les variables relatives à la consommation des sucres, le DAS, la production d'éthanol, la productivité en H₂, la production de butyrate, la concentration en métabolites et la teneur en sucres initiale. La corrélation entre productivité en H₂ et production de butyrate souligne une nouvelle fois le rôle fondamental de la voie du butyrate dans la production d'H₂. Ce cluster de corrélations montre le lien entre l'augmentation de la teneur en sucres dans le milieu réactionnel et l'intensification du métabolites tels que le butyrate et l'éthanol. De manière remarquable, la production d'éthanol est corrélée à la production d'H₂, ce qui n'était pas le cas dans le chapitre 3. Cependant, cette corrélation peut être la conséquence de l'accumulation de métabolites dans le milieu réactionnel (Amador-Noguez *et al.*, 2011 ; Saady, 2013 ; Yoo, 2016) qui par ailleurs augmente avec le DAS et la productivité en H₂.

Notons que le rendement est corrélé négativement avec le DAS. Ainsi, un compromis doit être trouvé entre un DAS important qui favorise des productivités élevées en H₂ et le rendement de conversion des sucres en H₂ qui est élevé à DAS faible. Plusieurs facteurs pourraient expliquer la diminution du rendement en H₂ consécutivement à l'augmentation du DAS : inhibition des *consortia* bactériens par le substrat, dégénérescence des bactéries (Liu *et al.*, 2019), changement de communautés bactériennes dans la calandre et récalcitrance du substrat limitant son utilisation à DAS élevé et donc à TSH faible. Enfin, le substrat n'a pas le temps d'être hydrolysé et métabolisé au cours de son passage dans le module membranaire expliquant notamment la différence de productivité en H₂ en réacteur semi-batch et en BRM.

Selon l'axe vertical, l'abondance des bactéries *Clostridium* est corrélée positivement avec le rapport molaire H₂/CO₂ et les données de la qPCR. Cette corrélation est intéressante puisqu'elle permet de montrer un lien entre la qualité du gaz fermentaire et la qualité du *consortium* bactérien (*i.e.* l'abondance des *Clostridium* dans le fermentât). Ces variables sont corrélées négativement au TSH, ce qui suggère que la réduction du TSH augmente l'abondance des *Clostridium* dans le fermentât, stimulant la croissance bactérienne et améliore la qualité du gaz fermentaire. Ces variables sont aussi corrélées négativement à des variables qui ne sont pas associées à la production d'H₂. La corrélation négative entre l'abondance des bactéries lactiques et des *Clostridia* est logique puisque ces deux types de bactéries sont les espèces majoritaires dans le fermentât. Les bactéries lactiques ne produisent pas d'H₂ d'où une corrélation négative avec le rapport molaire H₂/CO₂. Les bactéries lactiques sont associées à la production d'acétate par homoacétogenèse ; ainsi, ces bactéries pourraient être à l'origine d'une production d'acétate sans coproduction d'H₂ (métabolisme hétérofermentaire) ou pourraient stimuler les voies de

l'homoacétogenèse des *Clostridium* par l'induction d'un stress (bactériocines), ce qui a été déjà montré pour la solvantogénèse (Megret *et al.*, 2015 ; Noike *et al.*, 2002). Enfin la corrélation positive entre le TSH, la production d'acétate par homoacétogenèse et les bactéries lactiques montre que l'allongement du TSH favorise la compétition entre bactéries lactiques et *Clostridium* dans le fermentât, ce qui a été montré sur des biomasses différentes : des vinasses (García-Depraect et León-Becerril, 2018), du lactose (Palomo-Briones *et al.*, 2017) et du glycérol (Silva-Illanes *et al.*, 2017).

Enfin, notons que le débit de production d'acétate et de consommation du lactate ne sont pas représentés de manière satisfaisante selon les dimensions choisies pour l'ACP (faible distance par rapport au centre), ce qui signifierait que ces variables ne semblent pas corrélées aux paramètres d'alimentation du BRM et n'ont pas d'effet significatif sur les performances de la fermentation.

7. Positionnement par rapport à la littérature

Les performances de production d'H₂ de cette étude sont présentées dans le tableau 52 et comparées à celles de la littérature relative à la bioproduction d'H₂ en réacteur en mode continu à partir de biomasses lignocellulosiques ou contenant de l'amidon.

Parmi les études de la littérature, une seule utilise une source de carbone non prétraitée (de l'amidon) puisque cette biomasse est facilement fermentescible (Arooj *et al.*, 2008). Les autres études utilisent des substrats plus complexes (paille de graminées ou bagasse de végétaux) et mettent en œuvre des prétraitements pour hydrolyser la biomasse et favoriser la solubilisation des sucres. Trois types de prétraitements interviennent : l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse acide, les prétraitements hydrothermiques. Plusieurs prétraitements peuvent être combinés pour améliorer l'hydrolyse de la biomasse. Parmi les systèmes de fermentation continue mis en œuvre pour fermenter ces hydrolysats, le CSTR est le réacteur le plus utilisé ; viennent ensuite les réacteurs à flux ascendant (lit de boues et BRM L/G (notre réacteur)) et les réacteurs à lit fixe et à flux descendant (réacteurs à ruissellement). Le TSH est le paramètre d'alimentation qui a été le plus étudié pour l'optimisation de la production d'H₂, celui-ci variant de 72 h, selon les travaux. On remarque que les différents TSH et les charges en substrat testés ne sont pas spécifiques à un type de réacteur en particulier.

Tableau 52 : Production d'hydrogène en continu à partir de biomasse hydrolysée.

Substrat	Péactour	Daramàtros	DAS	Productivité	Rendement	Báfáranca	
Substrat	Reacteur	Taraffectes	(g _{DCO} /L/h)	(L _{H2} /L/j)	(mol _{H2} /mol _{sucres ajoutées})	Reference	
Sans prétraitement							
Amidon	CSTR	4 - 18 h	1,0 - 5,0	1,5 - 5,6	0,20 - 0,92	Arooj <i>et al</i> . (2008)	
Hydrolyse enzymatique	2						
Amidon	CSTR	2 - 12 h	2,5 - 5,0	18 - 36	1,5 - 2,3	Chen <i>et al</i> . (2008)	
Bagasse d'agave	CSTR Bioréacteur à lit fixe et flux descendant	6 h 4 - 6 h	1,6 2,2	2,0 2,5 - 3, 5	1,35 0,80 - 1,53	Contreras-Dávila <i>et</i> al. (2017)	
Paille de blé	Réacteur continu à alimentation séquentielle	6 -24 h	0,5 - 2,0	2,3 - 5,5	1,5 - 1,9	Zhao <i>et al</i> . (2014)	
Paille de maïs	CSTR	42 h - 62 h	N.D.	3,9 - 4,8	1,6 - 1,9	Zhao <i>et al</i> . (2013)	
Hydrolyse acide							
Paille d'avoine	Bioréacteur à lit fixe et flux descendant	6 - 24 h 1,2 - 35 g _{DCO} /L	0,05 - 5,9	0,6 - 2,0	0,4 - 2,9 mol _{H2} /mol _{sucres consommées}	Arriaga <i>et al</i> . (2011)	
Paille de riz	CSTR à recirculation	4 - 8 h	2,5 - 5	5,5 - 16,3	0,72 - 1,02	Liu <i>et al</i> . (2014)	
Paille de riz	Réacteur à lit de boue	4 - 20 h	1,25	0,4 - 3,6	0,03 - 2,1 mmol _{H2} /g _{DCO consommé}	Tawfik et Salem (2014)	
Prétraitements hydroth	nermiques						
Paille de blé	CSTR Réacteur à lit de boue Réacteur à filtre	72 h 24 h 24 h	0,05 0,15 0,15	0,21 0,82 0,59	1,41 1,59 0,95	Kongjan <i>et al</i> . (2010)	
Ensilage de maïs	BRM (L/G)	2 - 6 h 17 - 42 g _{DCO} /L	2,9 - 12,0	3,5 - 8,7	0,12 - 1,33 2,6 - 0,3 mmolн2/g _{DCO}	Cette étude	
Prétraitement combiné (hydrolyse acide + enzymatique)							
Sorgho doux	CSTR	32 h Nutriments	N.D.	0,9 -2,6	1,42 - 2,02	Boonsayompoo et Reungsang (2013)	
Paille d'avoine	Bioréacteur à lit fixe et flux descendant	5 h	0,4	0,6	2,3	Arreola-Vargas <i>et al.</i> (2015)	
Paille de blé	CSTR	6,7 h	3,0	5,2	2,08	Pawar <i>et al</i> . (2013)	

N. D. : non déterminé

L'hydrolyse enzymatique est un prétraitement qui permet d'obtenir des substrats de bonne qualité car fermentés avec des rendements élevés en hydrogène (0,8 à 2,3 mol_{H2}/mol_{sucres ajoutées}). Nonobstant ce métabolisme favorable à la production d'H₂, les productivités en H₂ sont assez faibles car limitées par des DAS faibles, à l'exception de celles relevées par Chen *et al.* (2008) qui s'échelonnent de 18 à 36 L_{H2}/L/j avec une souche pure de *Clostridium butyricum*. Cette étude est remarquable car des productivités en H₂ très importantes sont obtenues à faibles TSH et ce malgré le lessivage potentiel des bactéries. Les performances et le substrat de cette étude sont proches des conditions de fermentation en substrat modèle présentées au chapitre V (Anburajan *et al.*, 2017 ; Park *et al.*, 2018b ; Pugazhendhi *et al.*, 2017). Les fermentations qui utilisent des substrats obtenus par hydrolyse acide présentent des rendements assez variables. L'optimisation du TSH permet d'atteindre des valeurs de rendement élevées 2,9 mol_{H2}/mol_{sucres consommées} pour Arriaga *et al.* (2011) qui hydrolysent de la paille d'avoine avec du HCI (2 %) à chaud (90°C). A titre indicatif, le rendement maximal de conversion des sucres consommés en H₂ s'élève à 2,05 mol_{H2}/mol_{sucres consommées}

(6 h / 100 g/L), dans notre étude. Une hydrolyse en condition acide concentré (6,67 et 55 % d'H₂SO₄ volume/volume) à basse température (40°C) permet à Liu *et al.* (2014) d'obtenir des productivités en H₂ très élevées montrant l'efficacité de leur dispositif de fermentation à DAS élevé. A notre connaissance, une seule étude a utilisé une biomasse lignocellulosique hydrolysée par prétraitement hydrothermal. Notre étude obtient des rendements en H₂ assez proches et des productivités en H₂ supérieures à ceux de Kongjan *et al.* (2010). Toujours dans la littérature, notons que les prétraitements combinés permettent d'obtenir de bons rendements grâce à la mise en œuvre d'un prétraitement d'hydrolyse enzymatique. Parmi ces travaux, seule l'étude de Pawar *et al.* (2013) présente une productivité en H₂ comparable à la nôtre par fermentation de l'hydrolysat de paille de blé par une culture pure de *Clostridium saccharolyticus* en chémostat.

Cette revue de la littérature montre l'importance d'un prétraitement efficace pour favoriser l'accès des bactéries à un substrat métabolisable et obtenir des rendements en H₂ associés à des productivités élevées. Pour ce faire, le prétraitement d'hydrolyse enzymatique semble le plus favorable malgré le coût des enzymes et la mise en place de conditions favorables à l'activité des enzymes (utilisation de tampons, pH et températures spécifiques). Notre étude a permis d'obtenir des rendements en H₂ tout à fait comparables aux substrats préparés par hydrolyse acide ou hydrothermale avec des productivités qui sont parmi les plus importantes de la littérature présentée (Tableau 52). Le point fort de notre technologie (BRM L/G) se situe au niveau de la quantité importante de charge organique traitée (jusqu'à 12 g_{DCO}/L/h), permettant d'obtenir des productivités en H₂ élevée au regard des autres études. En effet, seule notre étude propose une fermentation avec un taux de charge en biomasse supérieure à 10 g_{DCO}/L/h, les autres études proposent des taux de charge inférieurs.

Plus spécifiquement sur les BRM, peu d'études ont mis en œuvre des biomasses réelles pour la production d'H₂ en continu. Les performances de ces études sont présentées dans le tableau 53.

Configuration	Membranes	Biomasse	TSH (h)	DAS (kg _{sucres} /m³/h)	Productivité (L _{H2} /kg _{sucres} /j)	Référence
<i>Ex situ</i> L/L	Fibres creuses	Okara (pulpe de soja) hydrolysée	4	4,6	45	Kim <i>et al.,</i> 2011
<i>Ex situ</i> L/L	Module plat, PE	Déchets alimentaires	10,5	1,7	25	Lee <i>et al.,</i> 2014
Ex situ L/L	Fibres creuses de microfiltration en PVDF	Paille de blé	Fed bat (20 g/L)	ch)	8 - 10	Trad <i>et al.,</i> 2015
<i>In situ</i> L/G	Fibres creuses PTFE	Effluents viticoles	8	1,4	17	Données du laboratoire
<i>In situ</i> L/G	Fibres creuses PTFE	Ensilage de maïs hydrolysé	4 - 6	1,1 - 8,3	13 - 27	Cette étude

Tableau 53 : Production d'hydrogène continue à partir de biomasses réelles en BRM

La plupart des études en BRM privilégient la configuration de séparation liquide/liquide *ex situ*. Le système utilisé est un CSTR relié à un module de filtration situé sur une boucle externe. Dans la littérature, notre laboratoire est le seul à utiliser la configuration de séparation liquide / gaz pour une production d'H₂ en continu. Ce dispositif présente la particularité de ne pas comporter de système d'agitation du milieu réactionnel autre que la circulation de l'alimentation et la recirculation du fermentât, et de travailler sans ré ensemencement du bioréacteur.

Les productivités en H₂ obtenues avec le BRM en configuration séparation liquide/gaz sont du même ordre de grandeur que celles des autres biomasses ou que d'autres configurations. L'optimisation de l'hydrolyse de la biomasse et des paramètres d'alimentation ont permis d'égaler les performances de production d'H₂ obtenues au laboratoire avec un substrat riche en sucres provenant de la filière vitivinicole (Clion, 2016a; Renaudie, 2019) ou à partir de déchets alimentaires (Lee *et al.*, 2014). L'étude de Kim *et al.* (2011) présente des productivités en H₂ près de deux fois supérieures aux autres études, ce qui peut être expliqué par les gains de rendement observés lors de la fermentation en conditions thermophiles (60°C). En termes de charge de biomasse traitée (*i.e.* de DAS), notre étude se situe également dans la fourchette haute. Notons que notre TSH optimal (3 h) est proche de l'optimum déterminé par Kim *et al.* (2011). Les auteurs de cette étude notaient également une inhibition significative de la productivité en H₂ à TSH = 2 h, ce qui souligne le défi d'alimenter des BRM à TSH très faibles à partir de biomasses réelles par rapport à un substrat modèle.

Pour ce faire, le couplage d'un BRM à séparation liquide/gaz avec un bioréacteur à séparation liquide/liquide pourrait permettre de réduire à nouveau le TSH en augmentant la concentration en biomasse dans le milieu. Pour améliorer la rétention des bactéries, la solution la plus simple serait d'utiliser le réacteur à surface de membrane doublée présenté au chapitre 5. L'augmentation de la surface permet à la fois d'accroître la surface de développement des bactéries et l'extraction des gaz du milieu réactionnel.

Ainsi, ce travail contribue à la mise en place et à l'optimisation d'un système pour la production d'hydrogène continue à productivité élevée, à fort taux de rétention de bactéries et capable de fonctionner avec des débits élevés de charges organiques. A l'échelle industrielle et dans le cadre de l'intégration de la fermentation obscure dans la filière valorisation énergétique de l'ensilage de maïs, un tel dispositif pourrait être d'une grande valeur en raison de sa capacité à traiter rapidement des charges organiques élevées à faible TSH.

8. Analyse technico-économique de la valorisation énergétique de l'ensilage de maïs par voie fermentaire

Dans la perspective de l'intégration de la fermentation dans une filière de valorisation énergétique ou dans un système de bioraffinerie, il est nécessaire de s'intéresser à la valorisation des co-produits de la fermentation obscure pour améliorer la rentabilité énergétique et économique du procédé. Dans cette partie, le potentiel de production d'H₂ des résidus de filtration des hydrolysats d'ensilage de maïs sera testé en réacteur semi batch. Nous tenterons ensuite d'estimer le potentiel méthane des fermentâts du BRM pour calculer le potentiel énergétique global de la fermentation obscure en BRM couplée à la digestion anaérobie. Enfin, nous comparerons les différentes filières de valorisation des co-produits de la fermentation obscure pour déterminer la voie la plus rentable pour une application industrielle.

8.1. Valorisation des résidus solides issus de la préparation des solutions d'alimentation du BRM

Le potentiel de production d'H₂ des résidus obtenus lors de la préparation de solutions d'alimentation pour le BRM sont testés en réacteur semi batch (71,6 g_{résidu}/L) avec *l'inoculum* bactérien présenté au chapitre VII.

La figure 89 présente le comparatif des productions cumulées d'H₂ et des métabolites produits en réacteur semi batch à partir des résidus récupérés lors de la filtration de la solution d'alimentation aux 3 concentrations ($100 - 200 - 300 \text{ g}_{biomasse}/L$) pour le BRM. Les paramètres de performance de production et les paramètres de l'équation de Gompertz sont dans le tableau 54.



<u>Figure 89</u> : Production cumulée d'H₂ (a) et de métabolites (b) lors de la fermentation des résidus solides de l'hydrolyse de l'ensilage de maïs en réacteur en mode semi-batch. Les barres d'erreur rendent compte de la variabilité (n = 2).

<u>Tableau 54</u> : Performances de la production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure des solutions d'alimentation du BRM testées en réacteur semi-batch.

Résidu	Matières sèches	Rendement	Production	Productivité max	Rapport
d'nydrolysat	%	L _{H2} /kg _{MS résidu}	$mL_{H2}/L_{bioréacteur}$	mL _{H2} /L/h	H ₂ /CO ₂
100 g/L	23,0 ± 0,1 %	43	706	81,1	0,92
200 g/L	23,4 ± 0,1 %	50 ± 1	849 ± 2	98 ± 6	0,88 ± 0,02
300 g/L	23,8 ± 0,1 %	50	838	104	0,93

Tout d'abord, notons que le taux de matières sèches des résidus présente un faible écart-type, ce qui montre une reproductibilité certaine de l'étape d'essorage manuel du résidu au cours de la préparation des solutions d'alimentation (chapitre II). Par rapport à la biomasse initiale, on note une perte de matières sèches d'environ 8 % (31,4 % de matières sèches présentes dans l'ensilage de maïs du lot 2).

Les potentiels de production des résidus des hydrolysats à 200 g/L et 300 g/L sont bien répétables en termes de rendement de production (50 L_{H2}/kg_{MS}), ce qui représente environ 48 % du potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de maïs broyé et congelé par fermentation endogène. Les productivités maximales en H₂ obtenues sont 3 fois inférieures à celle de la biomasse broyée et congelée mais restent intéressantes tout comme le rapport molaire H₂/CO₂ qui est proche de 1.

Les tests de fermentation présentent des métabolismes fermentaires assez similaires en termes de métabolites produits. On note une consommation d'acide lactique lors de la fermentation du résidu d'hydrolysat à 300 g/L, signifiant que la totalité du lactate n'a pas été extraite lors du trempage précédant la filtration de l'hydrolysat.

Ainsi, les résidus solides issus de la préparation de la solution d'alimentation du BRM sont valorisables énergétiquement au regard des productions d'H₂ substantielles (50 L_{H2}/kg_{MS de résidu}) obtenues à l'issue de la fermentation obscure.

Dans la perspective d'intégration de la fermentation dans un système d'économie circulaire, il serait intéressant d'évaluer des voies de valorisation alternative à la valorisation énergétique par méthanisation pour le résidu d'hydrolyse. Des tests de caractérisation des fractions biochimiques du résidu pourraient être effectués de manière à déterminer si celui-ci présente un intérêt pour l'alimentation animale : amélioration de la digestibilité tout en conservant l'appétence de la matière végétale pour les animaux. Une autre voie de valorisation serait l'utilisation du résidu d'hydrolysat dans le domaine des matériaux composites agrosourcés.

8.2. Valorisation énergétique du digestat

8.2.1. Estimation du potentiel méthane du digestat

A partir des données de production de métabolites présentées au cours des parties précédentes (paragraphes 3 et 4) et de leur composition en atomes de carbone (32 g_{DCO} /mol), hydrogène (8 g_{DCO} /mol), azote (-24 g_{DCO} /mol), oxygène (-16 g_{DCO} /mol), phosphore (48 g_{DCO} /mol) et souffre (48 g_{DCO} /mol), les débits de DCO théorique générés par les fermentâts sont calculés. Ces valeurs sont utilisées pour estimer le potentiel méthanogène théorique des fermentâts avec une marge de 10 % (PM₉₀) (équation 8.4) (Escudie et Cresson, 2017).

$$PM_{90} = 0.9 \times 0.35 L_{CH4}/g_{DCO}$$
 (Eq. 8.4)



La figure 90 présente le débit de DCO calculé des fermentâts et le PM₉₀ associé.

<u>Figure 90</u> : Débit de DCO calculé sortant du BRM lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs hydrolysé et potentiel méthane théorique (PM₉₀) associé.

D'après l'analyse du bilan massique de la DCO (données non présentées), les co-produits de la fermentation représentent entre 48 % et 88 % de la DCO de la solution d'alimentation (17,1 - 23,9 - 41,7 g_{DCO}/L), en fonction des conditions d'alimentation dans le BRM (100 - 200 - 300 $g_{biomasse}/L$). Ce constat est également effectué par Silva-Illanes *et al.* (2017) dont les métabolites représentent entre 55 % et 85 % de la DCO de la solution d'alimentation (12 g_{DCO}/L), ce qui signifie qu'une partie des métabolites n'a pas été détectée lors de l'analyse. Par exemple, pour les tests de fermentation avec une solution d'alimentation à 100 g/L, l'écart de DCO s'explique en partie par une différence importante entre la DCO calculée et la DCO mesurée expérimentalement du substrat : 10 g_{DCO}/L et 17,1 g_{DCO}/L , respectivement.

D'après la Figure 90, on observe que le débit de la DCO augmente avec la réduction du TSH et est maximal pour le test 2 h /200 g/L qui génère un potentiel méthane théorique de 2,7 $L_{CH4}/L_{fermentât}/h$ soit 5,4 $L_{CH4}/L_{fermentât}$.

8.2.2. Optimisation du BRM en fonction du potentiel énergétique

Avec les données calculées dans la partie précédente, nous pouvons estimer la production d'énergie de la solution d'alimentation par fermentation obscure et du fermentât par digestion anaérobie. Cette production d'énergie peut être optimisée à la fois sur des critères de rendement ou de productivité en énergie et permet de répondre aux questions suivantes :

à partir d'une tonne de matières sèches, quelles conditions d'alimentation permettent de maximiser
la production d'énergie globale ?

 en une journée et avec un réacteur d'1 m³, quelles conditions d'alimentation permettent de maximiser la production d'énergie globale ?

Le tableau 55 présente les paramètres optimaux d'alimentation en rendement et productivité en hydrogène pour la production énergétique calculée à partir du pouvoir calorifique de H₂ et CH₄.

<u>Tableau 55</u> : Paramètres d'alimentation permettant d'optimiser la production énergétique du filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs

Paramètre	Production $d'H_2$	Production de CH ₄	Energie
6 h / 200 g/L	19 m ³ _{H2} /t _{MS}	107 m ³ _{CH4} /t _{MS}	1,25 kWh/t _{MS}
2 h / 200 g/L	4 m ³ _{H2} /m ³ /j	65 m³ _{CH4} /m³/j	0,72 kWh/m³/j

On remarque que les conditions optimales sont obtenues avec la solution d'alimentation à 200 g/L. Cette solution d'alimentation permet d'atteindre des productivités élevées en H₂ avec un rendement énergétique correct (paragraphe 3.1). Un TSH de 6 h est favorable à l'optimisation du rendement en H₂ et un TSH court (2 h), dont la conversion des sucres au cours de la fermentation est limitée en BRM, permet de générer de grands volumes d'effluents avec un bon potentiel méthanogène théorique, ce qui maximise la productivité énergétique journalière. Ainsi, dans notre étude, la capacité de production d'énergie estimée de l'ensilage de maïs est de 1,25 kWh/t_{MS} et la productivité maximale s'élève à 0,72 kWh/m³/j.

Des travaux similaires ont été effectués par Vo *et al.* (2019) qui testent l'effet du TSH sur une fermentation en deux étapes avec un réacteur unique (compartiment de production d'H₂ et de production de méthane) à partir de déchets alimentaires. Ils trouvent que le TSH est crucial pour le processus fermentaire : l'augmentation de la charge organique par réduction du TSH à 2 h permet de stimuler l'activité des bactéries productrices d'H₂, ce qui se traduit par un enrichissement du *consortium* fermentaire en *Firmicutes*. De manière intéressante, l'analyse des productions de gaz globales montre que la production d'H₂ par unité de volume de réacteur est 3 fois supérieure à la production de méthane. La production de méthane journalière est toutefois plus importante que celle d'H₂ en raison du plus grand volume dédié à la méthanisation (47/3). Ces travaux attestent des perspectives intéressantes pour le couplage entre production d'H₂ et de CH₄.

8.2.3. Valorisation de l'ensilage de maïs par procédés discontinus et comparaison avec la littérature

Deux expériences de test du potentiel biométhane (BMP) ont permis de déterminer le potentiel méthane de la biomasse brute d'ensilage de maïs et du fermentât après fermentation endogène en mode semi-batch. Les résultats obtenus pour la biomasse brute sont de 380,6 NL_{CH4}/kg_{MS} et pour le fermentât de la biomasse entière de 330,6 NL_{CH4}/kg_{MS}. Ces résultats sont très supérieurs aux estimations de la performance de production du filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs pour une charge initiale de 200 g_{biomasse}/L en réacteur semi batch (76 NL_{CH4}/kg_{MS}) et en BRM (107 NL_{CH4}/ kg_{MS}). étant donné que la biomasse a été fractionnée en
une phase liquide, contenant avant fermentation les solubles et en phase solide correspondant au résidu dont le potentiel de production d'hydrogène a été établi à 50 $L_{H2}/k_{MS de résidu}$) au paragraphe 8.1 et qui présenterait un potentiel méthanogène estimé à 294,91 $L_{H2}/k_{MS de résidu}$ (valeur du solide issu du trempage de la biomasse broyée non autoclavée) mais non évalué expérimentalement dans cette étude.

Une analyse de la littérature est effectuée pour situer les voies de valorisation testées d'un point de vue énergétique et financier. Les calculs sont effectués sur la base de 10 €/kg pour l'hydrogène et 2 €/kg pour le méthane.

Le tableau 56 présente les bilans énergétiques et financiers des études mettant en œuvre une fermentation en deux étapes (fermentation obscure et méthanisation) pour la valorisation énergétique de biomasse réelles.

Biomasse	Production	Production	Energie	Recette	Référence
	(m ³ _{H2} /t _{MS})	(m ³ _{CH4} /t _{MS})	(GJ/t _{MS})	(€/t _{MS})	
Fraction fermentescible	63	576	23,6	836,1	Kvesitadze et al. (2011)
des ordures ménagères					
Fraction fermentescible	38,2*	86,5*	3,9*	150,0	Paillet (2017)
des ordures ménagères					
Chair de dattes	292*	212*	11,6*	536,7	Ben Yahmed et al. (2020)
Pommes de terre	200,4	130	7,3	347,3	Xie <i>et al</i> . (2008)
Sorgho doux	10,4	107	4,4	154,2	Antonopoulou <i>et al</i> . (2008)
Ensilage d'herbe	5,6	467	18,6	639,0	Pakarinen <i>et al</i> . (2009)
Ensilage de maïs	56	309	12,9	467,3	Nkemka <i>et al</i> . (2015)
Ensilage de maïs	12	112	4,6	162,3	Sträuber <i>et al</i> . (2016)
Ensilage de maïs	33	128	5,4	201,9	Benito Martin <i>et al.</i> (2017)
Ensilage de maïs	108	426	18,1	670,5	Rechtebach et Stegmann (2009)
					d'après Monlau <i>et al</i> . (2013)
Ensilage de maïs	-	380	15,1	516,4	Cette étude
Entier, semi-batch	80	330	14,0	516,3	
Hydrolysat, semi-batch	82	76	3,9	173,3	
Filtrat d'hydrolysat, BRM	19	107	4,5	161,5	

<u>Tableau 56</u> : Valorisation énergétique de biomasse par la production d'hydrogène et de méthane par voie fermentaire.

*valeurs par tonne de solides volatils.

Le bilan de la valorisation énergétique de la matière organique a été effectué dans la littérature sur plusieurs types de biomasse : des déchets ménagers (contenant une fraction lignocellulosique), des biomasses riches en sucres provenant de l'alimentation humaine (dattes, pommes de terre) et des biomasses lignocellulosiques (sorgho, ensilages).

L'utilisation des déchets alimentaires prétraités par explosion à « froid » permet d'obtenir le meilleur rendement en énergie (23,6 GJ/t_{MS}) (Kvesitadze *et al.*, 2011). En réacteur à l'échelle pilote de 40 L et sans prétraitement, Paillet (2017) obtient un rendement nettement plus faible, en partie lié au changement

d'échelle mais aussi à la nature de la biomasse. Les biomasses riches en sucres facilement fermentescibles (dattes et pommes de terre) se distinguent des autres études par le rendement important de la fermentation obscure en H₂, supérieur au rendement de la digestion anaérobie en CH₄ par tonne de matières sèches.

Parmi les biomasses ensilées, Pakarinen *et al.* (2009) et Rechtebach et Stegmann (2009) obtiennent les meilleurs rendements énergétiques avec respectivement de l'ensilage d'herbe (18,6 GJ/t_{MS}) et de maïs (18,1 GJ/t_{MS}) en réacteur batch. Notons que dans notre cas - fermentation endogène de l'ensilage de maïs sans aucun traitement ni intrant chimique - le rendement énergétique est légèrement inférieur mais proche (14,0 GJ/t_{MS}). Notons également que le potentiel méthane initial de l'ensilage d'herbe de Pakarinen *et al.* (2009) est supérieur au potentiel méthane de notre ensilage de maïs (18,6 et 15,1 GJ/t_{MS}). Les autres études mettant en œuvre l'ensilage de maïs en procédés mésophiles continus ou semi-continus obtiennent des rendements énergétiques plus faibles (Benito Martin *et al.*, 2017 ; Nkemka *et al.*, 2015 ; Sträuber *et al.*, 2016).

Avec notre ensilage de maïs, le rendement énergétique maximal est obtenu par digestion anaérobie (15,1 GJ/t_{MS}), cette valeur est assez élevée par rapport aux autres études et surtout très proche du bilan énergétique par production d'hydrogène puis de méthane (à partir du fermentât). Le couplage fermentation obscure et digestion anaérobie est rentable d'un point de vue financier par rapport à la digestion anaérobie seule. Le rendement énergétique estimé de l'hydrolysat seul représente entre 26 et 30 % du rendement total énergétique de la biomasse, ce qui signifie sans doute que le résidu d'hydrolyse (non testé et qui contient 70 % de la MS) permettra d'obtenir potentiellement une production de méthane importante.

Enfin, notons que Kvesitadze *et al.* (2011) et Pakarinen *et al.* (2009) observent une augmentation du potentiel biométhane après fermentation obscure, ce qui n'est pas le cas dans notre étude où la digestion anaérobie seule présente un rendement énergétique légèrement plus élevé qu'avec un procédé en deux étapes. Par rapport à notre étude où la biomasse est fermentée de manière endogène et en condition mésophile, Kvesitadze *et al.* (2011) et Pakarinen *et al.* (2009) effectuent leurs essais en fermentation obscure en conditions thermophiles, avec un coût énergétique supplémentaire. De plus, Kvesitadze *et al.* (2011) sélectionnent un *consortium* de bactéries cellulolytiques et saccharolytiques. Dans ces conditions, la fermentation obscure est à la fois une étape de production d'énergie et une étape de prétraitement de la biomasse avant la digestion anaérobie, ce qui permettrait d'expliquer les gains de rendement en CH_4 consécutifs à la fermentation obscure.

Ainsi, au terme de cette partie, il apparaît que le couplage de la fermentation obscure à la digestion anaérobie soit une bonne option pour co-produire de l'hydrogène et du méthane ; les conditions thermophiles permettraient encore d'améliorer le rendement énergétique de l'ensilage de maïs. On pourra noter que si l'on cumule la production d'hydrogène de l'hydrolysat et du résidu (fermentation en réacteur semi-batch), soit au total : 51,3 m³_{H2}/t_{MS de biomasse initiale}, le rendement énergétique peut atteindre 4 GJ/t_{MS} sans tenir compte du fermentât du résidu, qui a sans doute un potentiel énergétique élevé.

8.3. Valorisation des acides : estimation de la valeur du fermentât

Une autre voie possible pour la valorisation du digestat est le fractionnement et la purification des acides organiques volatils. Connaissant les compositions des fermentâts et les prix d'achat en gros (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015) (tableau 57), nous pouvons calculer la valeur du fermentât du BRM. Le tableau 57 expose le prix de vente des principales molécules produites lors de la fermentation obscure en BRM.

<u>Tableau 57</u> : Prix de vente en gros (€/t) des principales molécules produites au cours de la fermentation obscure, d'après Bastidas-Oyanedel *et al.* (2015). Taux de conversion : 1 € = 0,89 \$. Le CO₂ n'a pas été pris en compte dans cette étude.

_

€/tonne	Limite basse	Limite haute
Propionate	1335	1513
Formiate	845,5	1068
Lactate	890	1869
Ethanol	712	1780
Butyrate	1780	2225
Acétate	356	712
H ₂	10 000	

L'H₂ est la molécule la plus rentable par unité de masse avec un prix de 10 000 €/t. Concernant les acides organiques, le butyrate a le prix de vente le plus élevé et est un produit majoritaire de la fermentation obscure. En effet, tout au long de ce travail, nous avons montré que le métabolisme fermentaire est basé sur la production d'H₂ par la voie du butyrate. Le propionate a un prix de vente intéressant mais est peu produit lors de la fermentation obscure. Notons que l'éthanol et le lactate ont des prix très fluctuants selon les sources consultées par Bastidas-Oyanedel *et al.* (2015).

Le tableau 58 présente la composition en métabolites des fermentâts permettant de générer le plus de métabolites en terme de rendement (par tonne de matières sèches d'ensilage de maïs) et de productivité journalière ainsi que les paramètres d'alimentation du BRM associés.

Molécule	6h / 200 gL	4h / 300gL
	(kg _{AGV} /t _{MS})	(kg _{AGV} /m³/j)
Propionate	14,7	2,2
Formiate	15,2	8,3
Lactate	41,6	30,4
Ethanol	8,1	3,0
Butyrate	74,3	26,0
Acétate	53,7	13,6
Revenu total	241 - 349 €/t _{MS}	97 - 149 €/m³/j
(dont H ₂)	(17,5 €/t _{Ms})	(8,2 €/m³/j)

Tableau 58 : Composition des fermentâts et revenus estimés de la valorisation des métabolites générés.

Une fois de plus, la fermentation en BRM de la solution d'alimentation à 200 g/L à un TSH de 6 h permet de maximiser la production de métabolites et le prix de revient associé. En termes de productivité, le test de fermentation 4 h / 300 g/L est le plus intéressant avec un revenu estimé entre 97 à 149 €/m³/j (tableau 58).

La comparaison avec le tableau 56 montre que le fractionnement des acides serait théoriquement plus intéressant d'un point de vue économique que la méthanisation du fermentât, en supposant que les coûts d'exploitation (CAPEX et OPEX) soient équivalents.

La récupération et le fractionnement des acides est une voie intéressante pour la valorisation du fermentâts car, d'après nos estimations, elle serait plus lucrative que la voie de valorisation énergétique. De plus, la revue de la littérature de Bastidas-Oyanedel *et al.* (2015) montre qu'une réelle demande en acides gras volatils *et al*cools existe et que le marché mondial de certaines de ces molécules (éthanol, acétate, propionate, lactate) représente plus de 100 000 t/an. De plus, la production d'acides organiques et leur fractionnement semblent être une technologie en cours d'industrialisation par la société AFYREN, qui produit des acides gras volatils par voie fermentaire à partir de biomasse non alimentaire (AFYREN, 2021). En plus de générer potentiellement une source de revenus supplémentaires, le fractionnement des acides permet de substituer les molécules issues de la chimie conventionnelle par des molécules biosourcées et justifie pleinement l'association fermentation obscure et bio raffinage.

9. Conclusion

Grâce au travail entrepris au chapitre VII, nous avons identifié une méthode de préparation d'une solution d'alimentation pour le BRM. Celle-ci est préparée à partir d'ensilage de maïs prétraité par autoclave et mis en solution dans de l'eau. L'objectif de ce chapitre a été d'optimiser le fonctionnement du BRM alimenté à partir de cette solution d'alimentation en jouant sur les paramètres d'alimentation (TSH et concentration en biomasse dans la solution d'alimentation).

Le premier résultat montre que la production d'H₂ à partir de filtrat d'hydrolysat d'ensilage de maïs est réalisable à la fois en réacteur semi batch et en BRM en mode de fonctionnement continu. Le métabolisme des *consortia* bactériens au cours de ces fermentations est caractéristique de ce qui a été observé tout au long de ce travail de recherche avec l'ensilage de maïs : une production d'H₂ majoritairement issue de la voie du butyrate et une consommation importante mais partielle des sucres et du lactate présents dans la solution d'alimentation. Dans le milieu réactionnel, une majorité de bactéries productrices appartenant au genre *Clostridium (C. butyricum* et C. *acetobutylicum)* ont été identifiées ainsi que des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et *Lactococcus*. Ces populations sont relativement différentes de celles identifiées lors de la fermentation du substrat modèle (*Clostridium butyricum* et *Ethanoligenens sp.*) et indiquent que dans les conditions testées *i.e.* sans réensemencement, la nature du substrat impacte étroitement la flore bactérienne du BRM.

Les tests d'optimisation des paramètres d'alimentation ont mis en évidence un TSH optimal compris entre 3 et 4 h pour la productivité en H₂ du réacteur. A TSH plus long, la productivité est limitée par l'apport en sucres et, à faible TSH, la productivité est limitée par le lessivage des bactéries, révélé par les données microbiologiques. L'augmentation de la concentration en biomasse permet aussi d'améliorer la production $d'H_2$ avec un effet plus marqué que celui du TSH. Notons que nous n'avons pas atteint la teneur en biomasse dans l'alimentation qui inhiberait la production d'H₂. L'optimisation de ces deux paramètres a permis d'atteindre des taux de production d'H₂ élevés (8,7 L_{H2}/L/j pour une teneur en biomasse de 300 g_{biomasse}/L dans la solution d'alimentation).

Par ailleurs, à TSH non lessivant (*i.e.* supérieurs à 2 h), le DAS est le paramètre clé pour la production d'H₂. De manière remarquable, l'augmentation du DAS a un triple sur la fermentation :

- augmentation de la productivité en H₂
- amélioration du métabolisme fermentaire (production de butyrate plus importante et réduction de l'activité des voies non productrices d'H₂)
- augmentation de la quantité de bactéries productrices d'H₂ à la fois d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

L'analyse des corrélations a aussi révélé que le DAS et le rendement de production d'hydrogène sont corrélés négativement avec le rendement de conversion des sucres en H₂. Ainsi, l'ajustement du DAS *via* les paramètres d'alimentation du BRM permettra de produire de l'H₂ en fonction des objectifs et des contraintes opérationnelles (optimisation du rendement ou de la productivité en H₂).

Le plan d'expériences a montré que le BRM est capable de fermenter des quantités importantes de biomasse lignocellulosique hydrolysée avec des temps de séjours faibles (jusqu'à 240 kg_{DCO}/m³/j). De plus, la consommation partielle des sucres des solutions d'alimentation et la production d'acides (acétate et butyrate) rendent le fermentât du BRM tout à fait approprié pour une valorisation énergétique ultérieure telle que la production de méthane ou l'intégration dans un système d'économie circulaire basé sur la biomasse.

Ce travail a donné quelques éléments pour la valorisation du fermentât par différentes voies. Dans la perspective de l'intégration de la production d'hydrogène dans un procédé de valorisation énergétique, il serait intéressant de mesurer le potentiel de chaque fermentât pour d'autres procédés de valorisation possibles en aval (photofermentation, méthanisation, électrofermentation) afin de déterminer les paramètres d'alimentation du BRM qui maximiseraient le rendement global de la filière de valorisation énergétique de l'ensilage de maïs.

Chapitre 8

Conclusion et perspectives

La première partie de ce travail a montré **la possibilité de produire de l'H₂ par voie fermentaire endogène** à partir de deux biomasses ensilées, **l'ensilage de maïs et l'ensilage de seigle**, soulignant l'émergence de bactéries productrices d'H₂ présentes dans la flore des ensilages riches en bactéries lactiques. L'étude de l'ensilage de maïs a mis en évidence **la présence de plusieurs substrats dans la biomasse** (monosaccharides, sucres hydrolysés, lactate), qui sont successivement métabolisés et **d'une hydrolyse qui se produit** *in situ* dans le bioréacteur fermentaire. La consommation de ces différents substrats impacte le métabolisme global de la fermentation obscure et les *consortia* bactériens producteurs d'H₂. L'étude sur l'ajout de lactate au milieu réactionnel confirme ce constat. En effet, selon la teneur ajoutée en lactate dans le milieu réactionnel, des variations du métabolisme et des *consortia* sont observées avec notamment une augmentation de la production de butyrate et de l'abondance en *Clostridia*. Nous avons montré que **la conversion hydrogénogène du lactate en butyrate** fait également intervenir l'acétate comme co-substrat, ce qui est en accord avec les données de la littérature.

La deuxième partie de ce manuscrit a évalué **l'impact de l'exposition à l'air sur le potentiel de production d'H**₂ **de la biomasse**. Ces phénomènes d'aération interviennent lors du stockage de la biomasse (dégradation aérobie de la biomasse) ou lors de la mise en œuvre de la biomasse en bioréacteur (aération forcée).

La dégradation aérobie de l'ensilage de maïs lors de son stockage a été reproduite en laboratoire. La production d'H₂ de la biomasse par fermentation endogène a été augmentée de 94 % pendant les 140 premiers jours de stockage (de 22,5 L_{H2}/kg_{MS} à 43,7 L_{H2}/kg_{MS}). Malgré une flore avant fermentation fortement dominée par des bactéries lactiques, **les travaux ont montré à nouveau l'émergence d'une flore bactérienne productrice d'H₂ dominée par les bactéries du genre** *Clostridium***. Il a également été mis en évidence qu'au-delà de 140 jours, les productions étaient plus faibles en raison de la prolifération de levures, champignons et autres microorganismes hydrolytiques. Par ailleurs, les effets de l'aération forcée, qui a permis d'améliorer la production d'H₂ de 40 % soit de 29,1 L_{H2}/kg_{MS} à 40,6 L_{H2}/kg_{MS} grâce à un meilleur métabolisme avec un** *consortium* **fermentaire riche en bactéries productrices d'H₂ (***Clostridium, Enterococcus, Enterobacteriaceae* **et absence de la bactérie hydrogénotrophe** *Clostridium ljungdahlii***). Ainsi, en moins de 24 h d'aération forcée, nous obtenons une biomasse avec des caractéristiques de production d'hydrogène proches de celle stockée à 140 jours.**

D'un point de vue applicatif, la fermentation obscure pourrait être une voie de valorisation de biomasses ensilées qui auraient subi une dégradation aérobie involontaire. L'exposition à l'air de la biomasse et de sa flore endogène améliore en effet le métabolisme de fermentation obscure et augmente la quantité d'hydrogène produit. Une autre stratégie pour augmenter la production d'H₂ de la biomasse a été explorée : l'utilisation de prétraitements visant à améliorer la quantité d'éléments fermentescibles dans la biomasse. Ces essais comportaient un double objectif : caractériser les variations du métabolisme fermentaire consécutives aux prétraitements et obtenir une solution de substrat liquide pour alimenter le bioréacteur membranaire.

Le broyage de la biomasse d'ensilage a permis la conservation de la flore endogène et s'est avéré pertinent pour améliorer la production d'H₂ à partir d'ensilage de maïs. A l'issue de la fermentation, un *consortium* riche en bactéries productrices d'H₂ (majoritairement *Clostridium butyricum* et *Clostridium intestinale*), associé à un métabolisme favorable à la production d'H₂ (production d'H₂ par la voie du butyrate, faible production d'acétate par la voie de l'homoacétogenèse) a été obtenu, **montrant une amélioration globale de la fermentation consécutivement au broyage avec une augmentation de la production d'hydrogène** de 88 % (de 27 L_{H2}/kg_{MS} à 55 L_{H2}/kg_{MS}) à 167 % (de 38 L_{H2}/kg_{MS} à 104 L_{H2}/kg_{MS}) selon la modalité de stockage de la biomasse (congélation ou stockage à 4°C). Les résultats établis sur l'ensilage de seigle ont permis de montrer un impact limité du broyage testé (de 28 L_{H2}/kg_{MS} à 32 L_{H2}/kg_{MS}), mettant en évidence la non nécessité de ce type de traitement pour cette biomasse. Par ailleurs, **le broyage a intensifié l'extraction des sucres par trempage sur la biomasse d'ensilage de maïs**, ce qui a permis **l'obtention d'une solution contenant une partie importante (85 %) du potentiel H₂ de la biomasse totale**. La mise en œuvre de ces solutions en BRM a donné lieu à des productivités maximales en H₂ de l'ordre de 1,2 L_{H2}/L/j améliorables, ce qui a motivé l'utilisation de prétraitements d'hydrolyse plus sévères.

Les prétraitements d'explosion à la vapeur et d'autoclavage ont été explorés avec une démarche de plan d'expériences avec l'ensilage de maïs en fermentation exogène (ensemencement avec un inoculum issu d'un fermentât de la biomasse); la flore endogène ayant été inhibée par le prétraitement. Les meilleures conditions d'hydrolyse de la biomasse (140°C autoclave, 60 min, H₂SO₄ et 170°C explosion à vapeur, 10 min, H₂SO₄) ont donné lieu à des augmentations significatives de la production d'H₂ : +31 % pour l'explosion à la vapeur (de 90 L_{H2}/kg_{MS} à 119 L_{H2}/kg_{MS}) et +61 % pour l'autoclavage (140°C, 60 min) de 90 L_{H2}/kg_{MS} à 147 L_{H2}/kg_{MS} soit 154 L_{H2}/kg_{MV}. Ces tests de fermentation ont mis en évidence des variations de métabolisme par rapport aux tests de référence ainsi que d'abondance des microorganismes fermentaires (abondance de *Clostridium butyricum* doublée pendant la fermentation de la biomasse prétraitée) en réponse à l'hydrolyse des polysaccharides, à la dégradation des sucres monomériques et à la libération des composés de la lignine dans le milieu réactionnel. Expérimentalement, la libération des sucres lors du prétraitement se traduit par une augmentation de la productivité maximale en H₂ (jusqu'à 463 mL_{H2}/L/h) par rapport aux tests avec la biomasse non prétraitée (278 mL_{H2}/L/h). Par rapport aux tests de fermentation par voie endogène, les productions en H₂ obtenues avec la biomasse non prétraitée et inoculée sont légèrement plus faibles (99 contre 91 L_{H2}/kg_{MS}) malgré un rapport molaire B/A identique (1,15). Dans les conditions optimales d'explosion à la vapeur, le prétraitement permet un gain de production et de productivité maximale en H₂ de 20 % par rapport à l'ensilage de maïs fermenté par voie endogène.

Les solutions liquides (filtrats) obtenues à partir de ces prétraitements ont été également testées par voie exogène pour les productions d'H₂. Celles-ci contenaient des teneurs en sucres variables en fonction des températures d'hydrolyse et, **dans les conditions d'hydrolyse optimale**, le potentiel hydrogène de la phase liquide était quasi équivalent à celui de la biomasse totale. Des rendements de conversion de sucres en H₂ remarquables (jusqu'à 2,9 mol_{H2}/mol_{sucres}) ont été obtenus lors de la fermentation de ces solutions comparativement à ceux du substrat modèle (glucose, 1,6 mol_{H2}/mol_{sucres}).

Ainsi, au terme de cette étude, nous avons pu montrer que les *consortia* fermentaires qui émergent au cours de la fermentation de biomasses ensilées peuvent servir de source de bactéries productrices d'H₂ pour inoculer une biomasse hydrolysée à haute température (ensemencement). Dans les conditions testées, l'explosion à la vapeur s'est avérée très efficace pour solubiliser les sucres dans la phase liquide, ce qui s'illustre par des rendements de conversion des sucres en H₂ élevés qui soulignent la fermentescibilité de la biomasse prétraitée et le métabolisme efficace des bactéries. Lors de la fermentation de la biomasse entière (filtrat + résidu), le prétraitement d'autoclavage à 140°C pendant 60 min (acide) a permis des gains de production en H₂ plus élevés que le prétraitement d'explosion à la vapeur. **Ainsi, pour alimenter le BRM, le prétraitement d'hydrolyse en autoclave a été sélectionné.**

En préambule des tests avec l'hydrolysat d'ensilage de maïs, une étude a été conduite pour améliorer le fonctionnement du BRM alimenté avec du substrat modèle. L'augmentation du débit d'alimentation en substrat (1,4 - 4,7 g_{glucose}/L/h) par réduction du temps de séjour (de 10 h à 3 h) a stimulé la productivité en H₂ du BRM (12,9 L_{H2}/L/j). Lors du fonctionnement à DAS important (> 2,3 g_{glucose}/L/h), nous avons observé qu'une partie des gaz était évacuée par la sortie des liquides. Pour récupérer ces gaz, un extracteur liquide/gaz a été mise en place *ex situ* et **un BRM à surface de fibres doublée (0,49 m²) a été testé pour améliorer l'extraction des gaz** *in situ* **(+42 %). Ces deux stratégies mises en œuvre simultanément ont augmenté la productivité en H**₂ **de 97 % (16,2 L**_{H2}/L/j) et le rendement de conversion des sucres en H₂ de 121 % (1,22 mol_{H2}/mol_{substrat ajouté}). Enfin, le test avec une solution modèle de substrat ensilé, composé uniquement de glucose et de lactate, a montré l'effet positif de la présence du lactate dans la solution d'alimentation sur la productivité du BRM. L'ensemble de ces résultats préliminaires ont été déterminants dans la perspective d'alimenter le BRM avec des biomasses ensilées.

Enfin, le plan d'expériences conduit sur le bioréacteur membranaire a montré la potentialité de l'hydrolysat d'ensilage de maïs issu du traitement d'autoclavage comme substrat pour une fermentation en mode continu dans un BRM avec **une productivité en H₂ optimale à TSH = 4 h (8,6 L_{H2}/L/j)**. **La concentration de biomasse dans l'hydrolysat a été identifiée comme un paramètre clé pour augmenter la productivité d'H₂.** De manière cohérente avec le test glucose/lactate, l'analyse des métabolites révèle une conversion du lactate pendant la fermentation (jusqu'à 70 %). La consommation incomplète des sucres solubles (de 50 à 87 %) dans le processus et la production d'acides (acétate et butyrate) rendent **l'effluent du BRM intéressant pour une** valorisation énergétique par couplage avec un autre bioprocédé (méthanisation par exemple). Enfin, d'autres prétraitements d'hydrolyse de la biomasse pourraient être testés pour améliorer la digestibilité de l'effluent.

A l'issue de ce travail, des perspectives ont été identifiées pour potentiellement approfondir la production d'H₂ à partir de biomasses ensilées.

1. Effet du processus d'ensilage sur la fermentation obscure par voie endogène

Une étude plus approfondie pourrait être menée afin d'examiner l'effet du temps d'ensilage sur le potentiel de production d'hydrogène de la biomasse. Dans un premier temps, des tests de fermentation de maïs non ensilé pourraient être conduits afin d'évaluer l'impact du processus d'ensilage sur le potentiel de production H₂ de la biomasse. Ces expériences, effectuées avec une biomasse dépourvue d'acide lactique, permettront de comparer les voies métaboliques par lesquelles la plante de maïs brute et l'ensilage sont fermentés, afin de faire le lien avec les expériences sur l'ajout de lactate. En outre, des analyses biochimiques sur la biomasse permettront de déterminer si :

- (i) la conversion préalable du sucre en acide lactique améliore le potentiel de production H₂?
- (ii) la biomasse est dégradée par des phénomènes d'hydrolyse au cours du processus d'ensilage ?

D'un point de vue microbiologique, le séquençage des consortia permettra d'examiner si :

- (iii) la flore épiphyte de la plante de maïs est plus favorable à la production d'H₂
- (iv) la prolifération de bactéries lactiques permet d'inhiber des bactéries non productrices d'H₂.

Par ailleurs, comme l'utilisation de bactéries lactiques a été bien documentée dans la littérature sur l'ensilage, il serait intéressant de déterminer si l'intensification de la fermentation lactique, bénéfique à la stabilité du silo, impacte positivement le potentiel de production d'H₂ de la biomasse. L'effet sur la fermentation obscure d'autres additifs pour l'ensilage, déjà utilisés dans le monde agricole, pourrait être testé : acides organiques (acide propionique, formique), produits azotés (ammoniac ou urée) et/ou enzymes hydrolytiques.

2. Le couple inoculum/substrat : moteur de la fermentation par voie exogène ?

D'un point de vue microbiologique, le doublement du rendement en H₂ avec la biomasse hydrolysée que nous avons montré par rapport au substrat modèle, pour une teneur en sucres équivalente, atteste de l'efficacité d'une biomasse alliant *inoculum* bactérien et substrat.

Un travail de recherche pourrait être effectué pour approfondir les liens entre l'*inoculum* bactérien, la nature de la biomasse et ses caractéristiques en termes de biodisponibilité du substrat. Cette étude impliquerait un travail de criblage d'*inocula* bactériens de provenances variées sur différentes catégories de biomasse (riches

en protéines, ensilées, lignocellulosiques, riches en sucres) et le développement de méthodes de transplantation de microbiotes, c'est-à-dire de stérilisation de la biomasse sans altérer sa structure (Wang *et al.*, 2020) et de réensemencement.

Une autre stratégie consisterait à étudier si le métabolisme lors du prélèvement de *l'inoculum* bactérien (production d'H₂, consommation de lactate, solvantogenèse et acétogenèse en fin de fermentation) impacte la production d'H₂ ou le métabolisme fermentaire.

3. Analyse du cycle de vie et des coûts des prétraitements de la biomasse

Les prétraitements ouvrent des perspectives intéressantes en termes de gains de production d'H₂. L'intensification des prétraitements pourrait s'effectuer *via* l'optimisation de la granulométrie de la biomasse ou par un couplage avec un traitement enzymatique en simultanée avec la fermentation. L'effet du prétraitement sur la production d'H₂ pourrait être évalué en parallèle de son coût énergétique et de son impact environnemental, mesuré par une analyse de cycle de vie ; ces données étant essentielles dans l'équation de l'industrialisation du procédé de bioproduction d'H₂.

4. L'avenir du BRM : effet de la surface des fibres, modélisation et montée en échelle / passage à l'échelle pilote

Les travaux menés sur le BRM ont permis des gains importants de productivité en H₂. Le module à surface de fibres doublée est très prometteur et son domaine de fonctionnement nécessite d'être déterminé notamment à charge organique élevée et à TSH faible par une stratégie de plan d'expériences.

En parallèle, des travaux de modélisation de la dynamique des fluides seraient nécessaires pour étudier l'effet du TSH sur le fonctionnement du BRM et pour déterminer l'impact du taux de recirculation des liquides qui maximiserait l'utilisation du substrat. Un mode de fonctionnement à fort taux de recirculation des liquides, comme les réacteurs à lit de boues expansées, serait à envisager dans la perspective d'augmenter la charge de biomasse traitée par le BRM et d'homogénéiser le milieu réactionnel. Les données acquises au cours du plan d'expériences pourraient servir de base à un travail de modélisation du métabolisme microbien dans le BRM.

Pris ensemble, ces deux modèles permettraient de décrire les effets des paramètres d'alimentation sur le fonctionnement du BRM tant d'un point de vue métabolique qu'hydrodynamique. Ces connaissances pourraient contribuer à optimiser le pilotage du réacteur et apporter des éléments scientifiques cruciaux pour le dimensionnement d'un démonstrateur de la technologie BRM. Cette montée en échelle permettrait d'augmenter le volume de la quantité journalière de biomasse traitée par le réacteur et d'envisager un couplage à des installations de méthanisation.

5. Intégration de la bioproduction d'hydrogène dans l'économie circulaire

La fermentation aboutit à plusieurs co-produits biosourcés trouvant des applications dans de nombreux domaines : production de carburants, plasturgie, industrie de la chimie ou pouvant être valorisés

énergétiquement. Ce travail a donné des éléments pour la valorisation des co-produits de la fermentation obscure (fermentât du BRM et résidu d'hydrolyse).

(i) Quelles pistes pour la valorisation du fermentât ?

Dans la perspective de l'intégration de la production d'hydrogène dans un procédé de valorisation énergétique, il serait intéressant de mesurer le potentiel de chaque fermentât pour les procédés de valorisation en aval (photofermentation, électrofermentation, méthanisation) afin de déterminer les paramètres d'alimentation du BRM et de prétraitement de la biomasse, qui maximisent le rendement global de la filière de valorisation énergétique de l'ensilage de maïs. Le couplage avec la photofermentation ou l'électrofermentation permettrait d'augmenter le rendement maximal *in vivo* de conversion de la matière organique en H₂, de 4 à 12 mol_{H2}/mol_{sucres}. Enfin, l'utilisation de réacteurs à faibles volumes mais à taux de charge important pour la fermentation obscure tel que nous le développons permettrait de réduire les coûts d'installation de cette technologie et de favoriser le couplage avec la méthanisation.

(ii) Quelles pistes pour la valorisation du résidu ?

Une étude spécifique pourrait être également consacrée à la valorisation du résidu solide d'hydrolyse par méthanisation. Notons que l'utilisation de l'ensilage de maïs traité par explosion à la vapeur pour l'alimentation animale a été envisagée d'après Williams *et al.* (1995), ce qui pourrait également constituer une piste de valorisation du résidu d'hydrolyse de par sa bonne digestibilité (Zhao *et al.*, 2018). Parmi les autres pistes de valorisation du solide, une seconde explosion à la vapeur pourrait être envisagée à une température supérieure à 220°C, comme le proposent Söderström *et al.* (2002) avec du bois tendre, pour dégrader la cellulose et améliorer sa digestibilité par les bactéries productrices d'H₂. Un couplage entre l'explosion à la vapeur et une hydrolyse enzymatique du résidu pourrait être entrepris pour obtenir une production d'hydrogène, qui peut multiplier par deux le rendement global en H₂ de la biomasse après valorisation du potentiel de production H₂ du résidu tel qu'observé par Datar *et al.* (2007) et Pan *et al.* (2011). Le résidu solide mis en œuvre en photofermentation est également une possibilité permettant un rendement global amélioré tout comme Yang *et al.* (2010) l'ont montré avec des rafles de maïs avec 738 L/kg_{MV} équivalent à un rendement global de 6,6 mol_{H2}/mol_{glucose}.

Ces perspectives concernent de nombreux aspects du procédé : le stockage de la biomasse, son prétraitement, sa fermentation par un *consortium* bactérien, la valorisation des co-produits fermentaires et le design des bioréacteurs, pour lesquels nous avons déjà dans cette thèse pu poser des jalons solides. Elles montrent encore l'ampleur des connaissances à acquérir sur le procédé de fermentation obscure pour une montée en échelle permettant d'accéder à une phase d'industrialisation à moyen terme.

282

Bibliographie

Abd-Alla, M.H., Gabra, F.A., Danial, A.W., and Abdel-Wahab, A.M. (2019). Enhancement of biohydrogen production from sustainable orange peel wastes using *Enterobacter* species isolated from domestic wastewater. International Journal of Energy Research 43, 391–404.

Abdeshahian, P., Al-Shorgani, N.K.N., Salih, N.K.M., Shukor, H., Kadier, A., Hamid, A.A., and Kalil, M.S. (2014). The production of biohydrogen by a novel strain Clostridium sp. YM1 in dark fermentation process. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 12524–12531.

Aceves-Lara, C.A., Latrille, E., Buffiere, P., Bernet, N., and Steyer, J.-P. (2008). Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 47, 1968–1975.

ADEME (2021). Le vecteur hydrogène, https://expertises.ademe.fr/energies/energies-renouvelables-enr-production-reseaux-stockage/passer-alaction/vecteur-hydrogene.

AFYREN (2021). AFYREN, nos produits. https://afyren.com/solutions/

Air Liquide (2017). Cryocap[™]: solution cryogénique de captage de CO₂ unique au monde, https://www.airliquide.com/fr/histoires/industry/cryocaptm-au-coeur-du-site-de-port-jerome.

Akobi, C., Hafez, H., and Nakhla, G. (2016). The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. Bioresource Technology 221, 598–606.

Akroum-Amrouche, D., Lounici, H., Abdi, N., and Mameri, N. (2014). Dark fermentative hydrogen production rate from glucose using facultative anaerobe bacteria E coli. International Conference on Control, Engineering & Information Technology (CEIT'14) Proceedings Engineering & Technology - 117–119.

Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I.M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. Applied and Environmental Microbiology *66*, 2001–2005.

Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., and Lyberatos, G. (2018). A novel approach of modeling continuous dark hydrogen fermentation. Bioresource Technology 250, 784–792.

Almarsdottir, A.R., Tarazewicz, A., Gunnarsson, I., and Orlygsson, J. Hydrogen production from sugars and complex biomass by Clostridium species, AK14, isolated from Icelandic hot spring. 11.

de Almeida Antunes Ferraz, J.L., Souza, L.O., Soares, G.A., Coutinho, J.P., de Oliveira, J.R., Aguiar-Oliveira, E., and Franco, M. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by Penicillium roqueforti ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. Bioresource Technology 248, 214–220.

Álvarez, S., Méndez, P., and Martínez-Fernández, A. (2015). Fermentative and nutritive quality of banana by-product silage for goats. Journal of Applied Animal Research 43, 396–401.

Amador-Noguez, D., Brasg, I.A., Feng, X.-J., Roquet, N., and Rabinowitz, J.D. (2011). Metabolome Remodeling during the Acidogenic-Solventogenic Transition in Clostridium acetobutylicum. Applied and Environmental Microbiology 77, 7984–7997.

Amin, F.R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S. u, Zhang, R., Liu, G., and Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. AMB Express 7:72, 1–12.

de Amorim, E.L.C., Sader, L.T., and Silva, E.L. (2012). Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology *166*, 1248–1263.

Anburajan, P., Park, J.-H., Sivagurunathan, P., Pugazhendhi, A., Kumar, G., Choi, C.-S., and Kim, S.-H. (2017). Mixed-culture H2 fermentation performance and the relation between microbial community composition and hydraulic retention times for a fixed bed reactor fed with galactose/glucose mixtures. Journal of Bioscience and Bioengineering *124*, 339–345.

Anburajan, P., Pugazhendhi, A., Park, J.-H., Sivagurunathan, P., Kumar, G., and Kim, S.-H. (2018). Effect of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) on highrate continuous biohydrogen production from galactose. Bioresource Technology 247, 1197–1200.

Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K., and Lyberatos, G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. Bioresource Technology *99*, 110–119.

APHA (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Arasu, M.V., Jung, M.-W., Kim, D.H., Ilavenil, S., Jane, M., Park, H.S., Al-Dhabi, N.A., Jeon, B.T., and Choi, K.C. (2014). Enhancing Nutritional Quality of Silage by Fermentation with Lactobacillus plantarum. Indian Journal of Microbiology 54, 396–402.

Arellano-García, L., Velázquez-Fernández, J.B., Macías-Muro, M., and Marino-Marmolejo, E.N. (2021). Continuous hydrogen production and microbial community profile in the dark fermentation of tequila vinasse: Response to increasing loading rates and immobilization of biomass. Biochemical Engineering Journal *172*, 108049.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I., and Oztekin, R. (2008). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. International Journal of Hydrogen Energy *33*, 1813–1819.

Arooj, M., Han, S., Kim, S., Kim, D., and Shin, H. (2008). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. International Journal of Hydrogen Energy 33, 3289–3294.

Arreola-Vargas, J., Alatriste-Mondragón, F., Celis, L.B., Razo-Flores, E., López-López, A., and Méndez-Acosta, H.O. (2015). Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: effect of simple and complex substrates. Journal of Chemical Technology & Biotechnology *90*, 1062–1069.

Arriaga, S., Rosas, I., Alatriste-Mondragón, F., and Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 3442–3449.

Arvalis-infos.fr. (2015). Maïs ensilage : la hauteur de coupe influence la qualité du fourrage. https://www.arvalis-infos.fr/la-hauteur-de-coupe-influence-la-qualite-du-fourrage-@/view-19612-arvarticle.html

Asunis, F., De Gioannis, G., Isipato, M., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., and Spiga, D. (2019). Control of fermentation duration and ph to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. Bioresource Technology 121722.

Ausiello, A., Micoli, L., Turco, M., Toscano, G., Florio, C., and Pirozzi, D. (2017). Biohydrogen production by dark fermentation of Arundo donax using a new methodology for selection of H2-producing bacteria. International Journal of Hydrogen Energy *42*, 30599–30612.

Ávila, C.L.S., and Carvalho, B.F. (2020). Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. Journal of Applied Microbiology 128, 966–984.

Ávila, C.L.S., Carvalho, B.F., Pinto, J.C., Duarte, W.F., and Schwan, R.F. (2014). The use of Lactobacillus species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. Journal of Dairy Science 97, 940–951.

Badiei, M., Asim, N., Jahim, J.M., and Sopian, K. (2014). Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. APCBEE Procedia 9, 170–174.

Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., and Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy *34*, 2573–2579.

Baima Ferreira Freitas, I., Aparecida de Menezes, C., and Luiz Silva, E. (2020). An alternative for value aggregation to the sugarcane chain: Biohydrogen and volatile fatty acids production from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed reactors. Fuel 260, 116419.

Bakonyi, P., Nemestóthy, N., and Bélafi-Bakó, K. (2012). Comparative Study of Various *E. coli* Strains for Biohydrogen Production Applying Response Surface Methodology. The Scientific World Journal 2012, 1–7.

Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., and Bélafi-Bakó, K. (2014). Fermentative hydrogen production in anaerobic membrane bioreactors: A review. Bioresource Technology 156, 357–363.

Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Lankó, J., Rivera, I., Buitrón, G., and Bélafi-Bakó, K. (2015). Simultaneous biohydrogen production and purification in a double-membrane bioreactor system. International Journal of Hydrogen Energy 40, 1690–1697.

Bakonyi, P., Buitrón, G., Valdez-Vazquez, I., Nemestóthy, N., and Bélafi-Bakó, K. (2017). A novel gas separation integrated membrane bioreactor to evaluate the impact of self-generated biogas recycling on continuous hydrogen fermentation. Applied Energy *190*, 813–823.

Bakonyi, P., Kumar, G., Koók, L., Tóth, G., Rózsenberszki, T., Bélafi-Bakó, K., and Nemestóthy, N. (2018). Microbial electrohydrogenesis linked to dark fermentation as integrated application for enhanced biohydrogen production: A review on process characteristics, experiences and lessons. Bioresource Technology *251*, 381–389.

Ballongue, J., Masion, E., Amine, J., Petitdemange, H., and Gay, R. (1987). Inhibitor effect of products of metabolism on growth of Clostridium acetobutylicum. Applied Microbiology and Biotechnology 26, 568–573.

Bao, H., Chen, C., Jiang, L., Liu, Y., Shen, M., Liu, W., and Wang, A. (2016). Optimization of key factors affecting biohydrogen production from microcrystalline cellulose by the co-culture of Clostridium acetobutylicum X 9 + Ethanoigenens harbinense B 2. RSC Advances *6*, 3421–3427.

Bao, M.D., Su, H.J., and Tan, T.W. (2013). Dark fermentative bio-hydrogen production: Effects of substrate pre-treatment and addition of metal ions or L-cysteine. Fuel *112*, 38–44.

Baral, N.R., and Shah, A. (2017). Comparative techno-economic analysis of steam explosion, dilute sulfuric acid, ammonia fiber explosion and biological pretreatments of corn stover. Bioresource Technology 232, 331–343.

Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-Orticoni, M.-T., and Ferrasse, J.-H. (2015). Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. Bioresource Technology 185, 386–398.

Basak, B., Jeon, B.-H., Kim, T.H., Lee, J.-C., Chatterjee, P.K., and Lim, H. (2020). Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies. Renewable and Sustainable Energy Reviews *133*, 110338.

Bastidas-Oyanedel, J.-R., Mohd-Zaki, Z., Zeng, R.J., Bernet, N., Pratt, S., Steyer, J.-P., and Batstone, D.J. (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. Bioresource Technology *110*, 503–509.

Bastidas-Oyanedel, J.-R., Bonk, F., Thomsen, M.H., and Schmidt, J.E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 14, 473–498.

Batista, A.P., Gouveia, L., and Marques, P.A.S.S. (2018). Fermentative hydrogen production from microalgal biomass by a single strain of bacterium Enterobacter aerogenes – Effect of operational conditions and fermentation kinetics. Renewable Energy *119*, 203–209.

Batstone, D.J., Hernandez, J.L.A., and Schmidt, J.E. (2005). Hydraulics of laboratory and full-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Biotechnol Bioeng *91*, 387–391.

Beckers, L., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Masset, J., and Thonart, P. (2010). Fermentative hydrogen production by Clostridium butyricum CWBI1009 and Citrobacter freundii CWBI952 in pure and mixed cultures. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 8.

Beckers, L., Hiligsman, S., Masset, J., Hamilton, C., and Thonart, P. (2012). Effects of Hydrogen Partial Pressure on Fermentative Biohydrogen Production by a Chemotropic Clostridium Bacterium in a New Horizontal Rotating Cylinder Reactor. Energy Proceedia 29, 34–41.

Ben Yahmed, N., Dauptain, K., Lajnef, I., Carrere, H., Trably, E., and Smaali, I. (2020). New sustainable bioconversion concept of date by-products (Phoenix dactylifera L.) to biohydrogen, biogas and date-syrup. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 297–305.

Benito Martin, P.C., Schlienz, M., and Greger, M. (2017). Production of bio-hydrogen and methane during semi-continuous digestion of maize silage in a two-stage system. International Journal of Hydrogen Energy *42*, 5768–5779.

Bento-Silva, A., Vaz Patto, M.C., and do Rosário Bronze, M. (2018). Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. Food Chemistry 246, 360–378.

Bernal, A.P., de Menezes, C.A., and Silva, E.L. (2021). A new side-looking at the dark fermentation of sugarcane vinasse: Improving the carboxylates production in mesophilic EGSB by selection of the hydraulic retention time and substrate concentration. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 12758–12770.

Bernardes, T.F., Daniel, J.L.P., Adesogan, A.T., McAllister, T.A., Drouin, P., Nussio, L.G., Huhtanen, P., Tremblay, G.F., Bélanger, G., and Cai, Y. (2018). Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. Journal of Dairy Science 101, 4001–4019.

Bhatia, P., Fujiwara, M., Ban, S., and Toda, T. (2020). Effect of steam explosion pre-treatment on methane generation from Ludwigia grandiflora. Biomass and Bioenergy 142, 105771.

Bhatia, S.K., Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., Bhatia, R.K., Rajendran, K., Pugazhendhi, A., Rao, C.V., Atabani, A.E., Kumar, G., and Yang, Y.-H. (2021). Renewable biohydrogen production from lignocellulosic biomass using fermentation and integration of systems with other energy generation technologies. Science of The Total Environment *765*, 144429.

Biernacki, P., Steinigeweg, S., Borchert, A., and Uhlenhut, F. (2013). Application of Anaerobic Digestion Model No. 1 for describing anaerobic digestion of grass, maize, green weed silage, and industrial glycerine. Bioresource Technology 127, 188–194.

Blanco, V.M.C., Oliveira, G.H.D., and Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. Renewable Energy 139, 1310–1319.

Boessinger, L., Hug, M., and Wyss, U. (2005). Les drêches de brasserie, un aliment protéique intéressant.

Boonsayompoo, O., and Reungsang, A. (2013). Thermophilic biohydrogen production from the enzymatic hydrolysate of cellulose fraction of sweet sorghum bagasse by Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KKU19: Optimization of media composition. International Journal of Hydrogen Energy *38*, 15777–15786.

Borreani, G., Dolci, P., Tabacco, E., and Cocolin, L. (2013). Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming Paenibacillus in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films. Journal of Dairy Science *96*, 5206–5216.

Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., and Muck, R.E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. Journal of Dairy Science 101, 3952–3979.

Brémond, U., de Buyer, R., Steyer, J.-P., Bernet, N., and Carrere, H. (2018). Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. Renewable and Sustainable Energy Reviews 90, 583–604.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Garrity, G.M., and Staley, J.T. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume two. (Springer New York).

Brethauer, S., and Wyman, C.E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. Bioresource Technology 101, 4862–4874.

Bundhoo, M.A.Z., and Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy *41*, 6713–6733.

Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., and Hassan, M.A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. Journal of Environmental Management 157, 20–48.

Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.-P., Ruiz-Filippi, G., and Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. FEMS Microbiology Reviews 41, 158–181.

Cai, J., Zhao, Y., Fan, J., Li, F., Feng, C., Guan, Y., Wang, R., and Tang, N. (2019). Photosynthetic bacteria improved hydrogen yield of combined darkand photo-fermentation. Journal of Biotechnology 302, 18–25.

Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D.-J., Guo, W., Liu, B., Feng, Y., and Zhao, Q. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16. International Journal of Hydrogen Energy *34*, 7182–7188.

Cao, G.-L., Guo, W.-Q., Wang, A.-J., Zhao, L., Xu, C.-J., Zhao, Q., and Ren, N.-Q. (2012). Enhanced cellulosic hydrogen production from lime-treated cornstalk wastes using thermophilic anaerobic microflora. International Journal of Hydrogen Energy 37, 13161–13166.

Caputo, L., Quintieri, L., Baruzzi, F., Borcakli, M., and Morea, M. (2012). Molecular and phenotypic characterization of Pichia fermentans strains found among Boza yeasts. Food Research International 48, 755–762.

Carolin Christopher, F., Kumar, P.S., Vo, D.-V.N., and Joshiba, G.J. (2020). A review on critical assessment of advanced bioreactor options for sustainable hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy \$0360319920344955.

Carpentier, B., and Cabon, G. (2011). "Le maïs fourrage : élaboration du rendement et de la qualité, récolte et conservation, Fourrages, 205, 11-23.

Carpentier, B., and Ferard, A. (2017). Maïs fourrage 2017 : un très bon cru en quantité comme en qualité. Dossier de presse. https://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/file/galleryelement/pj/2b/8f/d9/e1/doss_press_bilan_campagne_2017_mais_fourrage4153003291980978 160.pdf

Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., *et al.* (2019). A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. International Journal of Hydrogen Energy *44*, 26237–26247.

Castillo-Moreno, P., Serrato, J.C., Willison, J.C., and Magnin, J.-P. (2018). Photohydrogen production from lactose and lactate by recombinant strains of Rhodobacter capsulatus: Modeling and optimization. International Journal of Hydrogen Energy 43, 21231–21245.

Cavalcante de Amorim, E.L., Barros, A.R., Rissato Zamariolli Damianovic, M.H., and Silva, E.L. (2009). Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. International Journal of Hydrogen Energy *34*, 783–790.

Chalmers, N.I., Palmer, R.J., Cisar, J.O., and Kolenbrander, P.E. (2008). Characterization of a Streptococcus sp.-Veillonella sp. Community Micromanipulated from Dental Plaque. Journal of Bacteriology 190, 8145–8154.

Chang, J., Wu, J., Wen, F., Hung, K., Chen, Y., Hsiao, C., Lin, C., and Huang, C. (2008a). Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogenproducing system with different hydraulic retention time. International Journal of Hydrogen Energy 33, 1579–1585.

Chang, J.-J., Chou, C.-H., Ho, C.-Y., Chen, W.-E., Lay, J.-J., and Huang, C.-C. (2008b). Syntrophic co-culture of aerobic Bacillus and anaerobic Clostridium for bio-fuels and bio-hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 33, 5137–5146.

Chang, J.-S., Lee, K.-S., and Lin, P.-J. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. International Journal of Hydrogen Energy 1167 – 1174.

Chang, S., Li, J.-Z., and Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. Renewable Energy 36, 1517–1522.

Chatellard, L. (2016). Production de bio-hydrogène par fermentation sombre de résidus lignocellulosiques: Liens entre structure du substrat et communautés bactériennes fermentaires. *Thèse de doctrorat, Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier,* 229.

Chatellard, L., Trably, E., and Carrère, H. (2016). The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. Bioresource Technology 221, 541–549.

Chen, H. (2014). Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice (Springer).

Chen, C.-C., Chuang, Y.-S., Lin, C.-Y., Lay, C.-H., and Sen, B. (2012). Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 15540–15546.

Chen, S., Lee, K., Lo, Y., Chen, W., Wu, J., Lin, C., and Chang, J. (2008). Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by Clostridium species. International Journal of Hydrogen Energy 33, 1803–1812.

Chen, S., A. Arnold, W., and J. Novak, P. (2021). Encapsulation technology to improve biological resource recovery: recent advancements and research opportunities. Environmental Science: Water Research & Technology 7, 16–23.

Chen, Y., Yin, Y., and Wang, J. (2020). Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy \$0360319920343020.

Cheng, X.-Y., and Liu, C.-Z. (2011). Hydrogen Production via Thermophilic Fermentation of Cornstalk by Clostridium thermocellum. Energy & Fuels 25, 1714–1720.

Cheng, X.-Y., Li, Q., and Liu, C.-Z. (2012). Coproduction of hydrogen and methane via anaerobic fermentation of cornstalk waste in continuous stirred tank reactor integrated with up-flow anaerobic sludge bed. Bioresource Technology *114*, 327–333.

Cheong, D.-Y., and Hansen, C.L. (2006). Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. Applied Microbiology and Biotechnology 72, 635–643.

Chezeau, B., Fontaine, J.P., and Vial, C. (2019). Analysis of liquid-to-gas mass transfer, mixing and hydrogen production in dark fermentation process. Chemical Engineering Journal *372*, 715–727.

Cho, S.-K., Jeong, M.-W., Choi, Y.-K., Shin, J., and Shin, S.G. (2018). Effects of low-strength ultrasonication on dark fermentative hydrogen production: Start-up performance and microbial community analysis. Applied Energy 219, 34–41.

Choi, D.H., Chun, S.M., Ma, S.H., and Hong, Y.C. (2016). Production of hydrogen-rich syngas from methane reforming by steam microwave plasma. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 34, 286–291.

Chojnacka, A., Błaszczyk, M.K., Szczęsny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Żak, K., Zielenkiewicz, U., and Sikora, A. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. Bioresource Technology *102*, 10057–10064.

Chornet, E., and Overend, R.P. (2017). How the Severity Factor in Biomass Hydrolysis Came About. In Hydrothermal Processing in Biorefineries, H.A. Ruiz, M. Hedegaard Thomsen, and H.L. Trajano, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–3.

Chou, C., Wang, C., Huang, C., and Lay, J. (2008). Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy 33, 1550–1558.

Chou, C.-H., Han, C.-L., Chang, J.-J., and Lay, J.-J. (2011). Co-culture of Clostridium beijerinckii L9, Clostridium butyricum M1 and Bacillus thermoamylovorans B5 for converting yeast waste into hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 13972–13983.

Cibis, K.G., Gneipel, A., and König, H. (2016). Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. Journal of Biotechnology 220, 51–63.

Cieciura-Włoch, W., and Borowski, S. (2019). Biohydrogen production from wastes of plant and animal origin via dark fermentation. Journal of Environmental Engineering and Landscape Management 27, 101–113.

Ciolacu, D.E. (2018). Biochemical Modification of Lignocellulosic Biomass. In Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value, (Elsevier), pp. 315–350.

Ciranna, A., Ferrari, R., Santala, V., and Karp, M. (2014). Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile Caloramator celer: Kinetic, metabolic and transcription analyses. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 6391–6401.

Clark, I.C., Zhang, R.H., and Upadhyaya, S.K. (2012). The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production via anaerobic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 37, 11504–11513.

Clion, V. (2016a). Production d'hydrogène par fermentation obscure : intensification du procédé par extraction des gaz et développement d'un bioréacteur à membrane. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.

Clion, V., Dumas, C., Collin, S., and Ernst, B. (2015). Key factors for biohydrogen production by dark fermentation. The Canadian Journal of Chemical Engineering *93*, 309–316.

Çokay, E. (2018). Hydrogen gas production from food wastes by electrohydrolysis using a statical design approach. International Journal of Hydrogen Energy 43, 10555–10561.

Combes, D., and Monsan, P. (2016). Biocatalyse ou catalyse enzymatique. Technique de l'Ingénieur 23.

Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Streicher, C., Patel, B.K., Dwivedi, P.P., Pot, B., Prensier, G., and Garcia, J.L. (1995). Bacillus thermoamylovorans sp. nov., a Moderately Thermophilic and Amylolytic Bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 9–16.

Compton, R.G., Perkin, S.J., Gamblin, D.P., Davis, J., Marken, F., Nikki Padden, A., and John, P. (2000). Clostridium isatidis colonised carbon electrodes: voltammetric evidence for direct solid state redox processes. New Journal of Chemistry 24, 179–181.

Constant, P., and Hallenbeck, P.C. (2019). Hydrogenase. In Biohydrogen, (Elsevier), pp. 49–78.

Contreras-Dávila, C.A., Méndez-Acosta, H.O., Arellano-García, L., Alatriste-Mondragón, F., and Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. Chemical Engineering Journal *313*, 671–679.

Crespo, C.F., Badshah, M., Alvarez, M.T., and Mattiasson, B. (2012). Ethanol production by continuous fermentation of d-(+)-cellobiose, d-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe Caloramator boliviensis. Bioresource Technology *103*, 186–191.

Cui, S., and Brummer, Y. (2005). Understanding Carbohydrate Analysis. In Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications, S. Cui, ed. (CRC Press), pp. 69–104.

Dahiya, S., Chatterjee, S., Sarkar, O., and Venkata Mohan, S. (2020). Renewable Hydrogen Production by Dark-Fermentation: Current Status, Challenges and Perspectives. Bioresource Technology 124354.

Dai, N.H., Vo, T.T., Le, L.P.M., Van Tran, M., and Nguyen, T.A.D. (2021). Hydrogen production from acidic, alkaline, and steam-exploded Bambusa stenostachya hydrolysates in dark fermentation process. Biomass Conversion and Biorefinery.

Dai, X., Li, X., Zhang, D., Chen, Y., and Dai, L. (2016). Simultaneous enhancement of methane production and methane content in biogas from waste activated sludge and perennial ryegrass anaerobic co-digestion: The effects of pH and C/N ratio. Bioresource Technology *216*, 323–330.

Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., and Braun, R. (2003). Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. Applied and Environmental Microbiology 69, 562–567.

Darmawan, A., Aziz, M., Ajiwibowo, M.W., Biddinika, M.K., Tokimatsu, K., and Lokahita, B. (2022). Chapter 5 - Integrated ammonia production from the empty fruit bunch. In Innovative Energy Conversion from Biomass Waste, A. Darmawan, and M. Aziz, eds. (Elsevier), pp. 149–185.

Datar, R., Huang, J., Maness, P., Mohagheghi, A., Czernik, S., and Chornet, E. (2007). Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. International Journal of Hydrogen Energy *32*, 932–939.

Dauptain, K., Trably, E., Santa-Catalina, G., Bernet, N., and Carrere, H. (2020). Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. Bioresource Technology *313*, 123665.

Dauptain, K., Schneider, A., Noguer, M., Fontanille, P., Escudie, R., Carrere, H., and Trably, E. (2021). Impact of microbial inoculum storage on dark fermentative H2 production. Bioresource Technology *319*, 124234.

Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., and Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. International Journal of Hydrogen Energy 34, 4296–4304.

De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K., and Whitman, W. (2009). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume three, The firmicutes (New York: Springer).

Debacq, M. (2009). Génie de la Réaction Chimique: réacteurs homogènes. Génie de la Réaction Chimique : réacteurs homogènes. École d'ingénieur. CGP215 : Génie de la réaction chimique & Évaluation économique des procédés,Conservatoire national des arts et métiers. 94.

Demarquilly, C. (1994). Facteurs de variation de la valeur nutritive du maïs ensilage. 177-189.

Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., Błaszczyk, M.K., and Sikora, A. (2019). Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: Clostridium butyricum and microbial communities from dark fermentation bioreactors. Microbial Cell Factories *18*.

Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Wiktorowska-Sowa, E., Piotrowski, J., Salamon, A., Kaźmierczak, W., Błaszczyk, M.K., Barberan, A., Chen, Y., *et al.* (2021). Dynamics and Complexity of Dark Fermentation Microbial Communities Producing Hydrogen From Sugar Beet Molasses in Continuously Operating Packed Bed Reactors. Frontiers in Microbiology *11*.

Dicko, M., Darkrim-Lamari, F., and Malbrunot, P. (2013). Combustible hydrogène - Production. Technique de l'Ingénieur, Procédés chimie-bio-agro, BE8566 V2.

Diez-Gonzalez, F., Russell, J.B., and Hunter, J.B. (1995). The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by Clostridium acetobutylicum strain P262. Arch Microbiol 36–42.

Ding, C., Yang, K.-L., and He, J. (2016). Biological and fermentative production of hydrogen. In Handbook of Biofuels Production, (Elsevier), pp. 303–333.

Ding, J., Wang, X., Zhou, X.-F., Ren, N.-Q., and Guo, W.-Q. (2010). CFD optimization of continuous stirred-tank (CSTR) reactor for biohydrogen production. Bioresource Technology 101, 7005–7013.

Dolci, P., Tabacco, E., Cocolin, L., and Borreani, G. (2011). Microbial Dynamics during Aerobic Exposure of Corn Silage Stored under Oxygen Barrier or Polyethylene Films. Applied and Environmental Microbiology 77, 7499–7507.

Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., and Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. International Journal of Hydrogen Energy *34*, 812–820.

Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., and Longlong, M. (2010). Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). International Journal of Hydrogen Energy 35, 8234–8240.

Dounavis, A.S., Ntaikou, I., and Lyberatos, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. Bioresource Technology 198, 701–708.

Dreschke, G., Papirio, S., d'Ippolito, G., Panico, A., Lens, P.N.L., Esposito, G., and Fontana, A. (2019a). H2-rich biogas recirculation prevents hydrogen supersaturation and enhances hydrogen production by Thermotoga neapolitana cf. capnolactica. International Journal of Hydrogen Energy 44, 19698–19708.

Dreschke, G., Papirio, S., Lens, P.N.L., and Esposito, G. (2019b). Influence of liquid-phase hydrogen on dark fermentation by Thermotoga neapolitana. Renewable Energy *140*, 354–360.

Dreywood, R. (1946). Qualitative Test for Carbohydrate Material. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition 18, 499–499.

Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. Agricultural and Food Science 22, 16–34.

Drouin, P., J. Mari, L., and J. Schmidt, R. (2019). Lactic Acid Bacteria as Microbial Silage Additives: Current Status and Future Outlook. In New Advances on Fermentation Processes, (IntechOpen), pp. 1–24.

Drouin, P., Tremblay, J., Renaud, J., and Apper, E. (2021). Microbiota succession during aerobic stability of maize silage inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788 and *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM-I-4785. MicrobiologyOpen *10*, 19.

Dumas, C., Silva Ghizzi Damasceno, G., Barakat, A., Carrère, H., Steyer, J.-P., and Rouau, X. (2015). Effects of grinding processes on anaerobic digestion of wheat straw. Industrial Crops and Products 74, 450–456.

Duncan, S.H., Louis, P., and Flint, H.J. (2004). Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. Applied and Environmental Microbiology 70, 5810–5817.

Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., and Ballesteros, M. (2016). Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment. In Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery, (Elsevier), pp. 349–368.

Durot, M.-P. (2021). L'hydrogène vert : un levier pour décarboner l'industrie ?

Dzul Rashidi, N.F., Jamali, N.S., Mahamad, S.S., Ibrahim, M.F., Abdullah, N., Ismail, S.F., and Siajam, S.I. (2020). Effects of Alginate and Chitosan on Activated Carbon as Immobilisation Beads in Biohydrogen Production. Processes *8*, 1254.

Elbeshbishy, E., Hafez, H., and Nakhla, G. (2011). Hydrogen production using sono-biohydrogenator. International Journal of Hydrogen Energy 36, 1456–1465.

Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., and Lee, H.-S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. Renewable and Sustainable Energy Reviews 79, 656–668.

Elreedy, A., Fujii, M., Koyama, M., Nakasaki, K., and Tawfik, A. (2019). Enhanced fermentative hydrogen production from industrial wastewater using mixed culture bacteria incorporated with iron, nickel, and zinc-based nanoparticles. Water Research 151, 349–361.

Environnement et Changement climatique Canada (2021). Indicateurs canadiens de durabilité de l'environnement : Émissions de gaz à effet de serre à l'échelle mondiale. https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/indicateurs-environnementaux/emissions-gaz-effet-serre.html

Ernst, B., Clion, V., and Dumas, C. (2016). Dépôt de brevet d'invention BNT219799FR00 du 25/09/15. Dépôt international PCT/FR2016/052424 du 23/09/16 : Dispositif de production d'hydrogène. Déposants : Université de Strasbourg, CNRS.

Escudie, R., and Cresson, R. (2017). Méthanisation de la biomasse. Techniques de l'Ingénieur BIO 5 100 v2, 26.

Esteghlalian, A., Hashimoto, A.G., Fenske, J.J., and Penner, M.H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. Bioresource Technology 59, 129–136.

Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V.M., Carrillo-Reyes, J., Cisneros-Pérez, C., *et al.* (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. Applied Microbiology and Biotechnology *100*, 3371–3384.

ETIP Bioenergy (2021). Cellulosic Ethanol (CE). https://www.etipbioenergy.eu/value-chains/conversion-technologies/advanced-technologies/sugarto-alcohols/ec-funded-r-d-on-cellulosic-ethanol

Fan, Y., Xing, Y., Ma, H., Pan, C., and Hou, H. (2008). Enhanced cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. International Journal of Hydrogen Energy 33, 6058–6065.

Fermon, V. (2021). La méthanisation, nouveau levier de développement du seigle hydride. https://www.action-agricole-picarde.com/la-methanisation-nouveau-levier-de-developpement-du-seigle-hydride

Ferreira, T.B., Rego, G.C., Ramos, L.R., de Menezes, C.A., and Silva, E.L. (2020). Improved dark fermentation of cane molasses in mesophilic and thermophilic anaerobic fluidized bed reactors by selecting operational conditions. International Journal of Energy Research 44, 10442–10452.

Fessard, A. (2017). Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante. Sciences agricoles. Université de La Réunion.

Fontes Lima, D.M., and Zaiat, M. (2012). The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 9630–9635.

Forsythe, S. (2018). Microbial Source Tracking of Cronobacter spp. In Advances in Applied Microbiology, S. Sariaslani, and G.M. Gadd, eds. (Elsevier), pp. 49–101.

Fourmond, V., Baffert, C., Sybirna, K., Dementin, S., Abou-Hamdan, A., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., Bottin, H., and Léger, C. (2013). The mechanism of inhibition by H2 of H2-evolution by hydrogenases. Chem. Commun. 49, 6840–6842.

France Hydrogène (2021a). Cartographie des projets et stations, https://www.h2-mobile.fr/stations-hydrogene/.

France Hydrogène (2021b). Faire de la France un leader de l'hydrogène renouvelable ou bas carbone, Livre blanc pour l'élection présidentielle 2022, https://www.france-hydrogene.org/presidentielle-2022-accelerer-pour-faire-de-la-france-un-pays-leader-de-lhydrogene/. 58.

Franco, C.M.M. (2015). *Microbispora*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh, eds. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–11.

François, E. (2016). Production de biohydrogène par fermentation obscure : potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.

François, E., Dumas, C., Gougeon, R.D., Alexandre, H., Vuilleumier, S., and Ernst, B. (2021). Unexpected high production of biohydrogen from the endogenous fermentation of grape must deposits. Bioresource Technology *320*, 124334.

Fuess, L.T., Ferraz, A.D.N., Machado, C.B., and 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. Bioresource Technology 247, 426–433.

García-Depraect, O., and León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. Fuel 234, 151–160.

García-Depraect, O., Rene, E.R., Gómez-Romero, J., López-López, A., and León-Becerril, E. (2019). Enhanced biohydrogen production from the dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Novel insights into ecological regulation by pH. Fuel 253, 159–166.

García-Depraect, O., Diaz-Cruces, V.F., Rene, E.R., and León-Becerril, E. (2020). Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing reactor subjected to substrate- and pH-induced perturbations. Bioresource Technology 295, 122182.

Garfinkel, L., and Garfinkel, D. (1985). Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved. Magnesium 4, 60–72.

Gauvry, E., Mathot, A.-G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., and Coroller, L. (2017). Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. Research in Microbiology *168*, 369–378.

Gharechahi, J., Kharazian, Z.A., Sarikhan, S., Jouzani, G.S., Aghdasi, M., and Hosseini Salekdeh, G. (2017). The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage. Microbial Biotechnology 10, 1663–1676.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., and Esposito, G. (2015a). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. Applied Energy 144, 73–95.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pontoni, L., d'Antonio, G., Lens, P.N.L., Esposito, G., and Pirozzi, F. (2015b). Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. Journal of Environmental Management 152, 43–48.

Ghimire, A., Luongo, V., Frunzo, L., Pirozzi, F., Lens, P.N.L., and Esposito, G. (2017). Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent. International Journal of Hydrogen Energy 42, 4861–4869.

Giordano, A., Sarli, V., Lavagnolo, M.C., and Spagni, A. (2014). Evaluation of aeration pretreatment to prepare an inoculum for the two-stage hydrogen and methane production process. Bioresource Technology *166*, 211–218.

Gokfiliz, P., and Karapinar, I. (2017). The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 42, 2553–2561.

Gollakota, A.R.K., Kishore, N., and Gu, S. (2018). A review on hydrothermal liquefaction of biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews 81, 1378–1392.

Gómez-Camacho, C.E., Pellicer Alborch, K., Bockisch, A., Neubauer, P., Junne, S., and Ruggeri, B. (2021). Monitoring the Physiological State in the Dark Fermentation of Maize/Grass Silage Using Flow Cytometry and Electrooptic Polarizability Measurements. BioEnergy Research 14, 910–923.

Gopalakrishnan, B., Khanna, N., and Das, D. (2019). Dark-Fermentative Biohydrogen Production. In Biohydrogen, (Elsevier), pp. 79–122.

Goud, R.K., Sarkar, O., Chiranjeevi, P., and Venkata Mohan, S. (2014). Bioaugmentation of potent acidogenic isolates: a strategy for enhancing biohydrogen production at elevated organic load. Bioresour Technol 165, 223–232.

Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., and Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review. Microbial Cell Factories 15, 18.

Grause, G., Igarashi, M., Kameda, T., and Yoshioka, T. (2012). Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 37, 16967–16973.

van Groenestijn, J. (2002). Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1141–1147.

Guan, H., Yan, Y., Li, X., Li, X., Shuai, Y., Feng, G., Ran, Q., Cai, Y., Li, Y., and Zhang, X. (2018). Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. Bioresource Technology 265, 282–290.

Güngörmüşler, M., Tamayol, A., and Levin, D.B. (2021). Hydrogen Production by Immobilized Cells of Clostridium intestinale Strain URNW Using Alginate Beads. Applied Biochemistry and Biotechnology 193, 1558–1573.

Gunsalus, R.P., and Wolfe, R.S. (1978). ATP Activation and Properties of the Methyl Coenzyme M Reductase System in Methanobacterium thernoautotrophicum. J. BACTERIOL. 135, 7.

Guo, W.-Q., Ren, N.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Meng, Z.-H., Ding, J., Qu, Y.-Y., and Zhang, L.-S. (2008). Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. International Journal of Hydrogen Energy 33, 4981–4988.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., and Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal of Hydrogen Energy *35*, 10660–10673.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., and Steyer, J.-P. (2014). Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 7476–7485.

Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggar, M.H., Elbeshbishy, E., and Baghchehsaraee, B. (2010). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy *35*, 81–92.

Han, W., Hu, Y., Li, S., Huang, J., Nie, Q., Zhao, H., and Tang, J. (2017). Simultaneous dark fermentative hydrogen and ethanol production from waste bread in a mixed packed tank reactor. Journal of Cleaner Production 141, 608–611.

Harrigan, W.F. (1966). The nutritional requirements and biochemical reactions of Corynebacterium bovis. J Appl Bacteriol 29, 380–394.

Hashsham, S.A., Fernandez, A.S., Dollhopf, S.L., Dazzo, F.B., Hickey, R.F., Tiedje, J.M., and Criddle, C.S. (2000). Parallel Processing of Substrate Correlates with Greater Functional Stability in Methanogenic Bioreactor Communities Perturbed by Glucose. Applied and Environmental Microbiology *66*, 4050–4057.

Hawkes, F. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1339–1347.

Hawkes, F., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., and Hawkes, D. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. International Journal of Hydrogen Energy 32, 172–184.

Hay, J.X.W., Wu, T.Y., Juan, J.C., and Md. Jahim, J. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 7, 334–352.

Hendriks, A.T.W.M., and Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 100, 10–18.

Herrmann, C., Heiermann, M., and Idler, C. (2011). Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. Bioresource Technology *102*, 5153–5161.

Herrmann, C., Idler, C., and Heiermann, M. (2015). Improving aerobic stability and biogas production of maize silage using silage additives. Bioresource Technology *197*, 393–403.

Heuzé, V., Tran, G., and Rouillé, B. (2017). Fiche co-produit - Drêches de brasserie. 10.

Hillion, M.-L., Moscoviz, R., Trably, E., Leblanc, Y., Bernet, N., Torrijos, M., and Escudié, R. (2018). Co-ensiling as a new technique for long-term storage of agro-industrial waste with low sugar content prior to anaerobic digestion. Waste Management 71, 147–155.

Hognon, C. (2012). Production d'hydrogène par l'oxydation partielle catalytique du propane. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

Houtsma, P.C., de WIT, J.C., and Rombouts, F.M. (1996). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Sodium Lactate and Sodium Chloride for Spoilage Organisms and Pathogens at Different pH Values and Temperatures. Journal of Food Protection *59*, 1300–1304.

Hu, C.C., Giannis, A., Chen, C.-L., Qi, W., and Wang, J.-Y. (2013). Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria. International Journal of Hydrogen Energy *38*, 15686–15692.

Hu, Z., Chang, J., Yu, J., Li, S., and Niu, H. (2018). Diversity of bacterial community during ensiling and subsequent exposure to air in whole-plant maize silage. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 31, 1464–1473.

Hung, C.-H., Chang, Y.-T., and Chang, Y.-J. (2011a). Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. Bioresource Technology *102*, 8437–8444.

Hung, C.-H., Cheng, C.-H., Guan, D.-W., Wang, S.-T., Hsu, S.-C., Liang, C.-M., and Lin, C.-Y. (2011b). Interactions between Clostridium sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 8704–8711.

d'Ippolito, G., Dipasquale, L., Vella, F.M., Romano, I., Gambacorta, A., Cutignano, A., and Fontana, A. (2010). Hydrogen metabolism in the extreme thermophile Thermotoga neapolitana. International Journal of Hydrogen Energy 35, 2290–2295.

Ivanova, G., Rákhely, G., and Kovács, K.L. (2009). Thermophilic biohydrogen production from energy plants by Caldicellulosiruptor saccharolyticus and comparison with related studies. International Journal of Hydrogen Energy 34, 3659–3670.

Jacquet, N., Vanderghem, C., Blecker, C., and Paquot, M. (2010). La steam explosion : application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique. BASE 14, 561–566.

Jamali, N.S., Md Jahim, J., and Wan Isahak, W.N.R. (2016). Biofilm formation on granular activated carbon in xylose and glucose mixture for thermophilic biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 41, 21617–21627.

Jamali, N.S., Md Jahim, J., Mumtaz, T., and Abdul, P.M. (2021). Dark fermentation of palm oil mill effluent by Caldicellulosiruptor saccharolyticus immobilized on activated carbon for thermophilic biohydrogen production. Environmental Technology & Innovation 22, 101477.

Janssen, H., Döring, C., Ehrenreich, A., Voigt, B., Hecker, M., Bahl, H., and Fischer, R.-J. (2010). A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of Clostridium acetobutylicum in a chemostat culture. Applied Microbiology and Biotechnology *87*, 2209–2226.

Jeong, J.S., Lee, J.H., Simizu, Y., Tazaki, H., Itabashi, H., and Kimura, N. (2010). Effects of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on in vitro rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology *162*, 144–148.

Ji, M., and Wang, J. (2021). Review and comparison of various hydrogen production methods based on costs and life cycle impact assessment indicators. International Journal of Hydrogen Energy.

Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., Choe, W.-S., and Park, J.M. (2008). Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by Enterobacter aerogenes using statistical methods. Bioresource Technology *99*, 2061–2066.

Jönsson, L.J., and Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. Bioresource Technology 199, 103–112.

Juang, C.-P., Whang, L.-M., and Cheng, H.-H. (2011). Evaluation of bioenergy recovery processes treating organic residues from ethanol fermentation process. Bioresource Technology *102*, 5394–5399.

Jung, K., Kim, D., Kim, S.-H., and Shin, H. (2011). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. Bioresource Technology *102*, 8612–8620.

Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., and Decker, K. (1973). Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *305*, 268–280.

Kadier, A., Kalil, M.S., Chandrasekhar, K., Mohanakrishna, G., Saratale, G.D., Saratale, R.G., Kumar, G., Pugazhendhi, A., and Sivagurunathan, P. (2018). Surpassing the current limitations of high purity H2 production in microbial electrolysis cell (MECs): Strategies for inhibiting growth of methanogens. Bioelectrochemistry *119*, 211–219.

Kalinoski, R.M., Li, W., Mobley, J.K., Asare, S.O., Dorrani, M., Lynn, B.C., Chen, X., and Shi, J. (2020). Antimicrobial Properties of Corn Stover Lignin Fractions Derived from Catalytic Transfer Hydrogenolysis in Supercritical Ethanol with a Ru/C Catalyst. ACS Sustainable Chemistry & Engineering *8*, 18455–18467.

Kao, C.T., and Frazier, W.C. (1966). Effect of Lactic Acid Bacteria on Growth of Staphylococcus aureus. APPL. MICROBIOL. 14, 5.

Karaosmanoglu Gorgec, F., and Karapinar, I. (2019). Biohydrogen production from hydrolyzed waste wheat by dark fermentation in a continuously operated packed bed reactor: The effect of hydraulic retention time. International Journal of Hydrogen Energy 44, 136–143.

Karaosmanoglu Gorgeç, F., and Karapinar, I. (2019). Production of biohydrogen from waste wheat in continuously operated UPBR: The effect of influent substrate concentration. International Journal of Hydrogen Energy 44, 17323–17333.

Karlsson, A. (2008). Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. International Journal of Hydrogen Energy 33, 953–962.

Kataoka, N., Miya, A., and Kiriyama, K. (1997). Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. Water Science and Technology *36*, 41–47.

Keskin, T., Aksöyek, E., and Azbar, N. (2011). Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed materials of ceramic ring and pumice stone. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 15160–15167.

Khamtib, S., Sittijunda, S., Imai, T., and Reungsang, A. (2021). Co-digestion of Oil Palm Trunk Hydrolysate and Slaughterhouse Wastewater for Biohydrogen Production in a Fixed Bed Reactor by Immobilized Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KKU19 on Expanded Clay. Frontiers in Energy Research *9*, 198.

Khanna, N., and Das, D. (2013). Biohydrogen production by dark fermentation: Biohydrogen production by dark fermentation. Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment 2, 401–421.

Kim, D., Han, S., Kim, S., and Shin, H. (2006a). Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 31, 2158–2169.

Kim, D.-H., Jang, S., Yun, Y.-M., Lee, M.-K., Moon, C., Kang, W.-S., Kwak, S.-S., and Kim, M.-S. (2014). Effect of acid-pretreatment on hydrogen fermentation of food waste: Microbial community analysis by next generation sequencing. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 16302–16309.

Kim, M.-S., Oh, Y.-K., Yun, Y.-S., and Lee, D.-Y. (2006b). Fermentative hydrogen production from anaerobic bacteria using a membrane bioreactor. World Hydrogen Energy Conference (Lyon, France).

Kim, M.-S., Lee, D.-Y., and Kim, D.-H. (2011). Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 8712–8718.

Kim, T.-H., Lee, Y., Chang, K.-H., and Hwang, S.-J. (2012). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. Bioresource Technology 103, 136–141.

Kirli, B., and Kapdan, I.K. (2016). Selection of microorganism immobilization particle for dark fermentative biohydrogen production by repeated batch operation. Renewable Energy *87*, 697–702.

Kisielewska, M., Dębowski, M., and Zieliński, M. (2015). Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering 38, 1925–1933.

Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B., and Angelidaki, I. (2010). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. Biotechnology and Bioengineering 899–908.

Kongjan, P., Inchan, S., Chanthong, S., Jariyaboon, R., Reungsang, A., and O-Thong, S. (2019). Hydrogen production from xylose by moderate thermophilic mixed cultures using granules and biofilm up-flow anaerobic reactors. International Journal of Hydrogen Energy 44, 3317–3324.

Kopke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., and Durre, P. (2010). Clostridium ljungdahlii represents a microbial production platform based on syngas. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 13087–13092.

Kopp-Holtwiesche, B., and Rehm, H.J. (1990). Antimicrobial action of roquefortine. J Environ Pathol Toxicol Oncol 10, 41–44.

Kraemer, J., and Bagley, D. (2008). Optimisation and design of nitrogen-sparged fermentative hydrogen production bioreactors. International Journal of Hydrogen Energy *33*, 6558–6565.

Kraemer, J.T., and Bagley, D.M. (2006). Supersaturation of Dissolved H2 and CO2 During Fermentative Hydrogen Production with N2 Sparging. Biotechnology Letters 28, 1485–1491.

Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., and Nemec, A. (2015). Acinetobacter albensis sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *65*, 3905–3912.

Kumar, A., and Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. Heliyon 6, e03170.

Kumar, A.K., and Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. Bioresources and Bioprocessing 4.

Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., and Mahajan, S. (2018). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of Penicillium. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, (Elsevier), pp. 47–68.

Kumar, G., Park, J.-H., Kim, M.-S., Kim, D.-H., and Kim, S.-H. (2014). Hydrogen fermentation of different galactose–glucose compositions during various hydraulic retention times (HRTs). International Journal of Hydrogen Energy *39*, 20625–20631.

Kumar, G., Mudhoo, A., Sivagurunathan, P., Nagarajan, D., Ghimire, A., Lay, C.-H., Lin, C.-Y., Lee, D.-J., and Chang, J.-S. (2016). Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. Bioresource Technology 219, 725–737.

Kumar, G., Sivagurunathan, P., Sen, B., Mudhoo, A., Davila-Vazquez, G., Wang, G., and Kim, S.-H. (2017). Research and development perspectives of lignocellulose-based biohydrogen production. International Biodeterioration & Biodegradation *119*, 225–238.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., and Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Industrial & Engineering Chemistry Research 48, 3713–3729.

Kumar, R., Kumar, A., and Pal, A. (2020). An overview of conventional and non-conventional hydrogen production methods. Materials Today: Proceedings.

Kung, L., Robinson, J.R., Ranjit, N.K., Chen, J.H., Golt, C.M., and Pesek, J.D. (2000). Microbial Populations, Fermentation End-Products, and Aerobic Stability of Corn Silage Treated with Ammonia or a Propionic Acid-Based Preservative. Journal of Dairy Science 83, 1479–1486.

Kvesitadze, G., Sadunishvili, T., Dudauri, T., Zakariashvili, N., Partskhaladze, G., Ugrekhelidze, V., Tsiklauri, G., Metreveli, B., and Jobava, M. (2011). Two-stage anaerobic process for bio-hydrogen and bio-methane combined production from biodegradable solid wastes. Energy 94–102.

Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Guwy, A.J., Premier, G.C., and Donnison, I.S. (2008). Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora. Bioresource Technology *99*, 8833–8839.

Ladisch, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., and Tsao, G.T. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. Enzyme and Microbial Technology 5, 82–102.

Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P.-C., and Logan, B.E. (2009). Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. International Journal of Hydrogen Energy 34, 6201–6210.

Lamed, R.J., Lobos, J.H., and Su, T.M. (1988). Effects of Stirring and Hydrogen on Fermentation Products of *Clostridium thermocellum*. Applied and Environmental Microbiology *54*, 1216–1221.

Lay, J.-J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. Biotechnology and Bioengineering 68, 269–278.

Lazaro, C.Z., and Hallenbeck, P.C. (2019). Fundamentals of Biohydrogen Production. In Biohydrogen, (Elsevier), pp. 25–48.

Lee, B., Lee, H., Lim, D., Brigljević, B., Cho, W., Cho, H.-S., Kim, C.-H., and Lim, H. (2020). Renewable methanol synthesis from renewable H2 and captured CO2: How can power-to-liquid technology be economically feasible? Applied Energy 279, 115827.

Lee, D.-Y., Li, Y.-Y., and Noike, T. (2010). Influence of solids retention time on continuous H2 production using membrane bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy 35, 52–60.

Lee, D.-Y., Xu, K.-Q., Kobayashi, T., Li, Y.-Y., and Inamori, Y. (2014). Effect of organic loading rate on continuous hydrogen production from food waste in submerged anaerobic membrane bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 16863–16871.

Lee, K., Lin, P., and Chang, J. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. International Journal of Hydrogen Energy 31, 465–472.

Lee, M.-J., Kim, T.-H., Min, B., and Hwang, S.-J. (2012). Sodium (Na+) concentration effects on metabolic pathway and estimation of ATP use in dark fermentation hydrogen production through stoichiometric analysis. Journal of Environmental Management 108, 22–26.

Lee, Z.-K., Li, S.-L., Lin, J.-S., Wang, Y.-H., Kuo, P.-C., and Cheng, S.-S. (2008). Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. International Journal of Hydrogen Energy *33*, 5234–5241.

Légifrance.fr (2021). Ordonnance n° 2021-167 du 17 février 2021 relative à l'hydrogène. NOR : TRER2018536R 10.

Lepage, T. (2021). Biomass-to-hydrogen: A review of main routes production, processes evaluation and techno-economical assessment. Biomass and Bioenergy 16.

Levin, D. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. International Journal of Hydrogen Energy 29, 173–185.

Levin, D., Islam, R., Cicek, N., and Sparling, R. (2006). Hydrogen production by Clostridium thermocellum 27405 from cellulosic biomass substrates. International Journal of Hydrogen Energy *31*, 1496–1503.

Li, C., and Fang, H.H.P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 37, 1–39.

Li, D., and Chen, H. (2007). Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 32, 1742–1748.

Li, Q., and Liu, C.-Z. (2012). Co-culture of Clostridium thermocellum and Clostridium thermosaccharolyticum for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 10648–10654.

Li, Y., and Nishino, N. (2011). Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum and Lactobacillus buchneri: Bacteria in inoculated bunker-made maize silage. Journal of Applied Microbiology *110*, 1561–1570.

Li, C., Zhang, T., and Fang, H.H.P. (2006). Fermentative hydrogen production in packed-bed and packing-free upflow reactors. Water Science and Technology 54, 95–103.

Li, L., Wang, Y., and Li, Y. (2019). Effects of substrate concentration, hydraulic retention time and headspace pressure on acid production of protein by anaerobic fermentation. Bioresource Technology 283, 106–111.

Li, M., Wang, T., Zhao, M., and Wang, Y. (2021a). Research on hydrogen production and degradation of corn straw by circular electrolysis with polyoxometalate (POM) catalyst. International Journal of Hydrogen Energy.

Li, Q., Guo, C., and Liu, C.-Z. (2014). Dynamic microwave-assisted alkali pretreatment of cornstalk to enhance hydrogen production via co-culture fermentation of Clostridium thermocellum and Clostridium thermosaccharolyticum. Biomass and Bioenergy 64, 220–229.

Li, Q., An, D., Feng, J., Hu, J., Cao, W., and Guo, L. (2021b). Response surface methodology to optimize the conditions for Enterococcus faecium YA002 producing H2 from xylose. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 6310–6320.

Li, W., Zhang, D., Huang, X., and Qin, W. (2014). Acinetobacter harbinensis sp. nov., isolated from river water. Int J Syst Evol Microbiol 64, 1507–1513.

Li, X.-H., Liang, D.-W., Bai, Y.-X., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2014). Enhanced H2 production from corn stalk by integrating dark fermentation and single chamber microbial electrolysis cells with double anode arrangement. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 8977–8982.

Li, Y., Zhang, Z., Zhu, S., Zhang, H., Zhang, Y., Zhang, T., and Zhang, Q. (2018). Comparison of bio-hydrogen production yield capacity between asynchronous and simultaneous saccharification and fermentation processes from agricultural residue by mixed anaerobic cultures. Bioresource Technology 247, 1210–1214.

Li, Y.-C., Nissilä, M.E., Wu, S.-Y., Lin, C.-Y., and Puhakka, J.A. (2012). Silage as source of bacteria and electrons for dark fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 15518–15524.

Liang, T.-M., Cheng, S.-S., and Wu, K.-L. (2002). Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1157–1165.

Lin, C. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. International Journal of Hydrogen Energy 29, 41–45.

Lin, C., and Lay, C. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. International Journal of Hydrogen Energy *30*, 285–292.

Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., Hart, R.A., Dickerson, J.T., Feyerherm, A.M., and Aimutis, W.R. (1992). Epiphytic Microflora on Alfalfa and Whole-Plant Corn. Journal of Dairy Science 75, 2484–2493.

Lin, P.-Y., Whang, L.-M., Wu, Y.-R., Ren, W.-J., Hsiao, C.-J., Li, S.-L., and Chang, J.-S. (2007). Biological hydrogen production of the genus Clostridium: Metabolic study and mathematical model simulation. International Journal of Hydrogen Energy *32*, 1728–1735.

Liu, C., and Cheng, X. (2010). Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. International Journal of Hydrogen Energy 35, 8945–8952.

Liu, G., and Shen, J. (2004). Effects of Culture and Medium Conditions on Hydrogen Production from Starch Using Anaerobic Bacteria. Journal Of Bioscience And Bioengineering 98, 6.

Liu, Y., and Wang, Y. (2017). Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. International Journal of Hydrogen Energy 42, 4095–4101.

Liu, B., Yang, Z., Huan, H., Gu, H., Xu, N., and Ding, C. (2020). Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. Scientific Reports 10.

Liu, C.-M., Wu, S.-Y., Chu, C.-Y., and Chou, Y.-P. (2014). Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy 39, 19317–19322.

Liu, H., Wang, G., Zhu, D., and Pan, G. (2009). Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. International Journal of Hydrogen Energy 34, 9696–9701.

Liu, J., Zhou, W., Fan, S., Qiu, B., Wang, Y., Xiao, Z., Tang, X., Wang, W., Jian, S., and Qin, Y. (2019). Cell degeneration and performance decline of immobilized Clostridium acetobutylicum on bagasse during hydrogen and butanol production by repeated cycle fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 44, 26204–26212.

Liu, S., Xu, F., Ge, X., and Li, Y. (2016). Comparison between ensilage and fungal pretreatment for storage of giant reed and subsequent methane production. Bioresource Technology 209, 246–253.

Liu, Y., Yu, P., Song, X., and Qu, Y. (2008). Hydrogen production from cellulose by co-culture of Clostridium thermocellum JN4 and Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum GD17. International Journal of Hydrogen Energy *33*, 2927–2933.

Liu, Z., Zhang, C., Wang, L., He, J., Li, B., Zhang, Y., and Xing, X.-H. (2015). Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steamexploded cornstalk and its microbial community. Bioresource Technology 175, 152–159.

Lo, Y.-C., Lu, W.-C., Chen, C.-Y., and Chang, J.-S. (2010). Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by Clostridium butyricum CGS5. Bioresource Technology 101, 5885–5891.

Lobo, F.C.M., Franco, A.R., Fernandes, E.M., and Reis, R.L. (2021). An Overview of the Antimicrobial Properties of Lignocellulosic Materials. Molecules 26, 1749.

Logan, B.E., Oh, S.-E., Kim, I.S., and Van Ginkel, S. (2002). Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. Environmental Science & Technology *36*, 2530–2535.

Lu, Y., Lai, Q., Zhang, C., Zhao, H., Ma, K., Zhao, X., Chen, H., Liu, D., and Xing, X.-H. (2009). Characteristics of hydrogen and methane production from cornstalks by an augmented two- or three-stage anaerobic fermentation process. Bioresource Technology *100*, 2889–2895.

Lui, J., Chen, W.-H., Tsang, D.C.W., and You, S. (2020). A critical review on the principles, applications, and challenges of waste-to-hydrogen technologies. Renewable and Sustainable Energy Reviews 134, 110365.

Lynd, L.R., Liang, X., Biddy, M.J., Allee, A., Cai, H., Foust, T., Himmel, M.E., Laser, M.S., Wang, M., and Wyman, C.E. (2017). Cellulosic ethanol: status and innovation. Current Opinion in Biotechnology 45, 202–211.

Ma, S., Wang, H., Wang, Y., Bu, H., and Bai, J. (2011). Bio-hydrogen production from cornstalk wastes by orthogonal design method. Renewable Energy 36, 709–713.

Mähnert, P., and Linke, B. (2009). Kinetic study of biogas production from energy crops and animal waste slurry: Effect of organic loading rate and reactor size. Environmental Technology 30, 93–99.

Mainardis, M., Buttazzoni, M., and Goi, D. (2020). Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Technology for Energy Recovery: A Review on State-of-the-Art and Recent Technological Advances. Bioengineering 7, 43.

Malfliet, S., Justé, A., Crauwels, S., Willems, K., De Cooman, L., Lievens, B., and Aerts, G. (2013). Assessing the xylanolytic bacterial diversity during the malting process. Food Microbiology 36, 406–415.

Mandal, B., Nath, K., and Das, D. (2006). Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H2 by Enterobacter cloacae. Biotechnology Letters 28, 831–835.

Maness, P., and Weaver, P.F. (2002). Hydrogen production from a carbon-monoxide oxidation pathway in Rubrivivax gelatinosus. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1407–1411.

Mannetje, L., Batello, C., Food, and Nations, A.O. of the U. (2000). Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Smallholders: Proceedings of the FAO Electronic Conference on Tropical Silage, 1 September -15 December 1999 (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Manzini, E., Scaglia, B., Schievano, A., and Adani, F. (2015). Dark fermentation effectiveness as a key step for waste biomass refineries: influence of organic matter macromolecular composition and bioavailability: How organic matter quality influences dark fermentation effectiveness. International Journal of Energy Research *39*, 1519–1527.

Mariakakis, I., Meyer, C., and Steinmetz, H. (2012). Fermentative Hydrogen Production by Molasses; Effect of Hydraulic Retention Time, Organic Loading Rate and Microbial Dynamics. In Hydrogen Energy - Challenges and Perspectives, D. Minic, ed. (InTech), pp. 121–148.

Marques, S., Moreno, A.D., Ballesteros, M., and Gírio, F. (2018). Starch Biomass for Biofuels, Biomaterials, and Chemicals. In Biomass and Green Chemistry, S. Vaz, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 69–94.

Martinezperez, N., Cherryman, S., Premier, G., Dinsdale, R., Hawkes, D., Hawkes, F., Kyazze, G., and Guwy, A. (2007). The potential for hydrogenenriched biogas production from crops: Scenarios in the UK. Biomass and Bioenergy *31*, 95–104.

Mashima, I., and Nakazawa, F. (2015). Interaction between Streptococcus spp. and Veillonella tobetsuensis in the Early Stages of Oral Biofilm Formation. Journal of Bacteriology 197, 2104–2111.

Matsumoto, M., and Nishimura, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. Journal of Bioscience and Bioengineering 103, 236–241.

Mazareli, R.C. da S., Villa-Montoya, A.C., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Maia de Oliveira, V., Silva, E.L., and Amâncio Varesche, M.B. (2020). Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: Screening design of factors that affect hydrogen production. Biomass and Bioenergy *138*, 105573.

McDonald, P. (1982). Silage fermentation. Trends in Biochemical Sciences 7.

McEniry, J., O'Kiely, P., Clipson, N.J.W., Forristal, P.D., and Doyle, E.M. (2006). The microbiological and chemical composition of baled and precisionchop silages on a sample of farms in County Meath. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions, 73–83.

McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresource Technology 83, 37–46.

Megret, O., Hubert, L., Calbry, M., Trably, E., Carrere, H., Garcia-Bernet, D., and Bernet, N. (2015). Production d'hydrogène à partir de déchets. Etat de l'art et potentiel d'émergence. RECORD 13-0239/1A p 227.

Ministère de la Transition écologique (2021). Stratégie Nationale Bas-Carbone (SNBC). https://www.ecologie.gouv.fr/strategie-nationale-bas-carbone-snbc.

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (2021). Bilan conjoncturel 2021. Agreste. La Statistique, l'évaluation et Prospective Du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Synthèses Conjoncturelles, 383 80.

Miyadoh, S., Amano, S., Tohyama, H., and Shomura, T. (1990). A taxonomic review of the genus Microbispora and a proposal to transfer two species to the genus Actinomadura and to combine ten species into Microbispora rosea. Journal of General Microbiology 136, 1905–1913.

Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., and Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. Bioresource Technology 73, 59–65.

Mohammadi, P., Ibrahim, S., Mohamad Annuar, M.S., and Law, S. (2011). Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. Journal of Cleaner Production 19, 1654–1658.

Mohammadi, P., Ibrahim, S., Annuar, M.S.M., Ghafari, S., Vikineswary, S., and Zinatizadeh, A.A. (2012a). Influences of Environmental and Operational Factors on Dark Fermentative Hydrogen Production: A Review. CLEAN - Soil, Air, Water 40, 1297–1305.

Mohammadi, P., Ibrahim, S., and Annuar, M.S.M. (2012b). Comparative study on the effect of various pretreatment methods on the enrichment of hydrogen producing bacteria in anaerobic granulated sludge from brewery wastewater. Korean Journal of Chemical Engineering *29*, 1347–1351.

Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., and Carrère, H. (2013). Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 43, 260–322.

Montgomery, L.F.R., and Bochmann, G. (2014). Pretreatment of feedstock for enhanced biogas production. IEA Bioenergy, 1–24.

Moreno Dávila, I.M.M., Tamayo Ordoñez, M.C., Morales Martínez, T.K., Soria Ortiz, A.I., Gutiérrez Rodríguez, B., Rodríguez de la Garza, J.A., and Ríos González, L.J. (2020). Effect of fermentation time/hydraulic retention time in a UASB reactor for hydrogen production using surface response methodology. International Journal of Hydrogen Energy.

Moscoviz, R., Trably, E., and Bernet, N. (2016). Consistent 1,3-propanediol production from glycerol in mixed culture fermentation over a wide range of pH. Biotechnology for Biofuels 9.

Mosier, N. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 96, 673-686.

Mudhoo, A. (2012). Biogas Production: Pretreatment Methods in Anaerobic Digestion (John Wiley & Sons).

Muñoz-Páez, K.M., Alvarado-Michi, E.L., Buitrón, G., and Valdez-Vazquez, I. (2019). Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. International Journal of Hydrogen Energy *44*, 2289–2297.

Muri, P., Marinšek-Logar, R., Djinović, P., and Pintar, A. (2018). Influence of support materials on continuous hydrogen production in anaerobic packedbed reactor with immobilized hydrogen producing bacteria at acidic conditions. Enzyme and Microbial Technology *111*, 87–96.

Murugan, R.S., Dinesh, G.H., Raja, R.K., James Obeth, E.S., Bora, A., Samsudeen, N.M., Pugazhendhi, A., and Arun, A. (2021). Dark fermentative biohydrogen production by Acinetobacter junii-AH4 utilizing various industry wastewaters. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 11297–11304.

Naraian, R., and Gautam, R.L. (2018). Penicillium Enzymes for the Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, (Elsevier), pp. 121–136.

Nasr, N., Gupta, M., Elbeshbishy, E., Hafez, H., El Naggar, M.H., and Nakhla, G. (2014). Biohydrogen production from pretreated corn cobs. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 19921–19927.

Nath, K., Kumar, A., and Das, D. (2006). Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. Canadian Journal of Microbiology *52*, 525–532.

Nemec, A., Radolfová-Křížová, L., Maixnerová, M., Nemec, M., Španělová, P., Šafránková, R., Šedo, O., Lopes, B.S., and Higgins, P.G. (2021). Delineation of a novel environmental phylogroup of the genus Acinetobacter encompassing Acinetobacter terrae sp. nov., Acinetobacter terrestris sp. nov. and three other tentative species. Systematic and Applied Microbiology *44*, 126217.

Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., and Bakonyi, P. (2020). Enhancement of dark fermentative H2 production by gas separation membranes: A review. Bioresource Technology 122828.

Newsome, D.S. (1980). The Water-Gas Shift Reaction. Catalysis Reviews 21, 275–318.

Ng, S.K.C., and Hamilton, I.R. (1971). Lactate Metabolism by Veillonella parvula. Journal of Bacteriology 105, 999–1005.

Nguyen, T.-A.D., Han, S.J., Kim, J.P., Kim, M.S., and Sim, S.J. (2010). Hydrogen production of the hyperthermophilic eubacterium, Thermotoga neapolitana under N2 sparging condition. Bioresource Technology *101*, S38–S41.

van Niel, E.W.J., Budde, M.A.W., de Haas, G.G., van der Wal, F.J., Claassen, P.A.M., and Stams, A.J.M. (2002). Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, Caldicellulosiruptor saccharolyticus and Thermotoga el i. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1391–1398.

Nikolaidis, P., and Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. Renewable and Sustainable Energy Reviews 67, 597–611.

Nikolajeva, V., Neibergs, M., Valucka, S., Dimanta, I., and Kleperis, J. (2015). Application of Pretreatment, Bioaugmentation and Biostimulation for Fermentative Hydrogen Production from Maize Silage. The Open Biotechnology Journal *9*, 39–48.

Niño-Navarro, C., Chairez, I., Torres-Bustillos, L., Ramírez-Muñoz, J., Salgado-Manjarrez, E., and Garcia-Peña, E.I. (2016). Effects of fluid dynamics on enhanced biohydrogen production in a pilot stirred tank reactor: CFD simulation and experimental studies. International Journal of Hydrogen Energy *41*, 14630–14640.

Nkemka, V.N., Gilroyed, B., Yanke, J., Gruninger, R., Vedres, D., McAllister, T., and Hao, X. (2015). Bioaugmentation with an anaerobic fungus in a twostage process for biohydrogen and biogas production using corn silage and cattail. Bioresource Technology 185, 79–88.

Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., Santa-Catalina, G., Trably, E., and Fontanille, P. (2017). High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy 42, 24656–24666.

Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., and Fontanille, P. (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. Bioresource Technology 247, 864–870.

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., and Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1367–1371.

Nordmann, V. (2013). Caractérisation et impact des différentes fractions d'une biomasse lignocellulosique pour améliorer les prétraitements favorisant sa méthanisation, Thèse Chimie Organique, Université de Bordeaux.

Nualsri, C., Kongjan, P., and Reungsang, A. (2016). Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. International Journal of Hydrogen Energy 41, 17884–17895.

Nualsri, C., Kongjan, P., Reungsang, A., and Imai, T. (2017). Effect of biogas sparging on the performance of bio-hydrogen reactor over a long-term operation. PLOS ONE 12, e0171248.

Obanda, D.N., Husseneder, C., Raggio, A.M., Page, R., Marx, B., Stout, R.W., Guice, J., Coulon, D., and Keenan, M.J. (2020). Abundance of the species Clostridium butyricum in the gut microbiota contributes to differences in obesity phenotype in outbred Sprague-Dawley CD rats. Nutrition 78, 110893.

Offer, N.W., Marsden, M., and Phipps, R.H. (2001). Effect of oil supplementation of a diet containing a high concentration of starch on levels of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in bovine milk. Animal Science *73*, 533–540.

Oh, S.-E., Iyer, P., Bruns, M.A., and Logan, B.E. (2004). Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 87, 119–127.

Oh, S.-E., Zuo, Y., Zhang, H., Guiltinan, M.J., Logan, B.E., and Regan, J.M. (2009). Hydrogen production by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. International Journal of Hydrogen Energy *34*, 9347–9353.

Ohnishi, A., Hasegawa, Y., Abe, S., Bando, Y., Fujimoto, N., and Suzuki, M. (2012). Hydrogen fermentation using lactate as the sole carbon source: Solution for 'blind spots' in biofuel production. RSC Advances 2, 8332.

Oliveira, C.A., Fuess, L.T., Soares, L.A., and Damianovic, M.H.R.Z. (2020). Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. International Journal of Hydrogen Energy.

O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasungkha, N., Dhamwichukorn, S., and Birkeland, N.-Kå. (2008). Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. International Journal of Hydrogen Energy 33, 1221–1231.

O-Thong, S., Prasertsan, P., and Birkeland, N.-K. (2009). Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. Bioresource Technology 100, 909–918.

Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O., and Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of Ensiling. In Agronomy Monographs, D.R. Buxton, R.E. Muck, and J.H. Harrison, eds. (Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America), pp. 31–93.

Paillet, F. (2017). Optimisation d'un procédé à deux étapes pour la production d'un mélange hydrogène/méthane (biohythane) à partir de la fraction fermentescible des ordures ménagères. Thèse de doctorat, Montpellier Supagro.

Paillet, F., Barrau, C., Escudié, R., and Trably, E. (2020). Inhibition by the ionic strength of hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. International Journal of Hydrogen Energy 45, 5854–5863.

Pakarinen, O., Kaparaju, P., and Rintala, J. (2011). The effect of organic loading rate and retention time on hydrogen production from a methanogenic CSTR. Bioresource Technology *102*, 8952–8957.

Pakarinen, O.M., Tähti, H.P., and Rintala, J.A. (2009). One-stage H2 and CH4 and two-stage H2+CH4 production from grass silage and from solid and liquid fractions of NaOH pre-treated grass silage. Biomass and Bioenergy *33*, 1419–1427.

Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology 74, 25–33.

Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., and Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. Applied Energy 198, 77–87.

Palomo-Briones, R., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Trably, E., and Razo-Flores, E. (2019). Enhancement of mass transfer conditions to increase the productivity and efficiency of dark fermentation in continuous reactors. Fuel 254, 115648.

Palomo-Briones, R., Montoya-Rosales, J. de J., and Razo-Flores, E. (2021). Advances towards the understanding of microbial communities in dark fermentation of enzymatic hydrolysates: Diversity, structure and hydrogen production performance. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 27459–27472.

Pan, C., Zhang, S., Fan, Y., and Hou, H. (2010). Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora. International Journal of Hydrogen Energy 35, 2663–2669.

Pan, C.-M., Ma, H.-C., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2011). Bioaugmented cellulosic hydrogen production from cornstalk by integrating dilute acidenzyme hydrolysis and dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 36, 4852–4862.

Pan, J., Zhang, R., Elmashad, H., Sun, H., and Ying, Y. (2008). Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 33, 6968–6975.

Panagiotopoulos, I., Bakker, R., De Vrije, T., Van Niel, E., Koukios, E., and Claassen, P. (2011). Exploring Critical Factors for Fermentative Hydrogen Production from Various Types of Lignocellulosic Biomass. Journal of the Japan Institute of Energy *90*, 363–368.

Panagiotopoulos, I.A., Bakker, R.R., Budde, M.A.W., de Vrije, T., Claassen, P.A.M., and Koukios, E.G. (2009). Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: A comparative study. Bioresource Technology *100*, 6331–6338.

Paragon, B.M., Andrieu, J.-P., Brunschwig, P., Gaillard, F., GRIESS, D., Heuchel, V., Piriou, B., Weiss, P., and Valentin, S. (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maitrise des risques sanitaires.

Park, J., Sim, Y., Kim, J.S., and Kim, S. (2020). Effects of alginate immobilization on dynamic membrane formation and H2 fermentation from galactose. International Journal of Hydrogen Energy 45, 5874–5880.

Park, J.-H., Cheon, H.-C., Yoon, J.-J., Park, H.-D., and Kim, S.-H. (2013). Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. International Journal of Hydrogen Energy 38, 6130–6136.

Park, J.-H., Lee, S.-H., Yoon, J.-J., Kim, S.-H., and Park, H.-D. (2014). Predominance of cluster I Clostridium in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges. Bioresource Technology 157, 98–106.

Park, J.-H., Sim, Y.-B., Kumar, G., Anburajan, P., Park, J.-H., Park, H.-D., and Kim, S.-H. (2018a). Kinetic modeling and microbial community analysis for high-rate biohydrogen production using a dynamic membrane. Bioresource Technology 262, 59–64.

Park, J.-H., Kim, D.-H., Kim, S.-H., Yoon, J.-J., and Park, H.-D. (2018b). Effect of substrate concentration on the competition between Clostridium and Lactobacillus during biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 43, 11460–11469.

Park, J.-H., Park, J.-H., Sim, Y.-B., Kim, S.-H., and Park, H.-D. (2019). Formation of a dynamic membrane altered the microbial community and metabolic flux in fermentative hydrogen production. Bioresource Technology 282, 63–68.

Park, J.-H., Kim, D.-H., Baik, J.-H., Park, J.-H., Yoon, J.-J., Lee, C.-Y., and Kim, S.-H. (2021). Improvement in H2 production from Clostridium butyricum by co-culture with Sporolactobacillus vineae. Fuel 285, 119051.

Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., and Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. Biotechnol Biofuels 3, 10.

Parthasarathy, P., and Narayanan, K.S. (2014). Hydrogen production from steam gasification of biomass: Influence of process parameters on hydrogen yield – A review. Renewable Energy *66*, 570–579.

Pasteris, S.E., Guidoli, M.G., Otero, M.C., Bühler, M.I., and Nader-Macías, M.E. (2011). In vitro inhibition of Citrobacter freundii, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous Lactococcus lactis CRL 1584. Veterinary Microbiology 151, 336–344.

Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., and Reungsang, A. (2008). Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium butyricum. International Journal of Hydrogen Energy 33, 5256–5265.

Paul De Vos ... [and others], editors (2009). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume three, The firmicutes (Second edition. Dordrecht ; New York : Springer, [2009] ©2009).

Pawar, S.S., Nkemka, V.N., Zeidan, A.A., Murto, M., and van Niel, E.W.J. (2013). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using Caldicellulosiruptor saccharolyticus followed by biogas production in a two-step uncoupled process. International Journal of Hydrogen Energy *38*, 9121–9130.

Peet, R.K. (1974). The Measurement of Species Diversity. Annual Review of Ecology and Systematics 5, 285–307.

Pekguzel, E.A., Gundogdu, T.K., and Azbar, N. (2015). Enhancement of Biohydrogen Production via Thermophilic Cell Culture Immobilized on Glass Beads and Raschig Rings of Different Sizes in a Packed Bed Reactor. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 29, 541–547.

Peters, V., and Conrad, R. (1995). Methanogenic and Other Strictly Anaerobic Bacteria in Desert Soil and Other Oxic Soils. Applied and Environmental Microbiology *61*, 1673–1676.

Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., Purohit, H.J., Sharma, R., Singh Patel, S.K., and Kalia, V.C. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. Bioresource Technology *99*, 5444–5451.

Postgate, J.R., and Hunter, J.R. (1961). On the Survival of Frozen Bacteria. Journal of General Microbiology 26, 367–378.

Prabhu, A.A., Bosakornranut, E., Amraoui, Y., Agrawal, D., Coulon, F., Vivekanand, V., Thakur, V.K., and Kumar, V. (2020). Enhanced xylitol production using non-detoxified xylose rich pre-hydrolysate from sugarcane bagasse by newly isolated Pichia fermentans. Biotechnology for Biofuels *13*, 15.

Pugazhendhi, A., Anburajan, P., Park, J.-H., Kumar, G., Sivagurunathan, P., and Kim, S.-H. (2017). Process performance of biohydrogen production using glucose at various HRTs and assessment of microbial dynamics variation via q-PCR. International Journal of Hydrogen Energy 42, 27550–27557.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.-P., Carrère, H., and Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 3150–3159.

Rajhi, H., Puyol, D., Martínez, M.C., Díaz, E.E., and Sanz, J.L. (2016). Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. Frontiers of Environmental Science & Engineering 10, 513–521.

Ramachandran, U., Wrana, N., Cicek, N., Sparling, R., and Levin, D.B. (2011). Isolation and characterization of a hydrogen- and ethanol-producing Clostridium sp. strain URNW. Canadian Journal of Microbiology *57*, 236–243.

Ramírez-Morales, J.E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., and Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. Water Science and Technology 71, 1271–1285.

Ranjit, N.K., and Kung, L. (2000). The Effect of Lactobacillus buchneri, Lactobacillus plantarum, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. Journal of Dairy Science 83, 526–535.

Rego, G.C., Ferreira, T.B., Ramos, L.R., de Menezes, C.A., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., and Silva, E.L. (2020). Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen: new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. Biomass Conversion and Biorefinery p.15.

dos Reis, C.M., and Silva, E.L. (2011). Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. Chemical Engineering Journal *172*, 28–36.

dos Reis, C.M., and Silva, E.L. (2014). Simultaneous Coproduction of Hydrogen and Ethanol in Anaerobic Packed-Bed Reactors. BioMed Research International 2014, 1–10.

Ren, N., Xing, D., Rittmann, B.E., Zhao, L., Xie, T., and Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. Environmental Microbiology 9, 1112–1125.

Ren, N., Guo, W., Wang, X., Xiang, W., Liu, B., Wang, X., Ding, J., and Chen, Z. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 33, 4318–4324.

Ren, N., Xie, T., and Xing, D. (2009). Composition of extracellular polymeric substances influences the autoaggregation capability of hydrogenproducing bacterium Ethanoligenens harbinense. Bioresource Technology 100, 5109–5113.

Ren, N.-Q., Cao, G.-L., Guo, W.-Q., Wang, A.-J., Zhu, Y.-H., Liu, B., and Xu, J.-F. (2010). Biological hydrogen production from corn stover by moderately thermophile Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16. International Journal of Hydrogen Energy *35*, 2708–2712.

Renaudie, M. (2019). Intensification d'un procédé de production d'hydrogène par extraction sélective en bioréacteur membranaire, appliquée à des effluents complexes. Université de Strasbourg.

Renaudie, M., Dumas, C., Vuilleumier, S., and Ernst, B. (2021a). Biohydrogen production in a continuous liquid/gas hollow fiber membrane bioreactor: Efficient retention of hydrogen producing bacteria via granule and biofilm formation. Bioresource Technology *319*, *124203*.

Renaudie, M., Clion, V., Dumas, C., Vuilleumier, S., and Ernst, B. (2021b). Intensification and optimization of continuous hydrogen production by dark fermentation in a new design liquid/gas hollow fiber membrane bioreactor. Chemical Engineering Journal *416*, 129068.

Renaudie, M., Dumas, C., Vuilleumier, S., and Ernst, B. (2022). New way of valorization of raw coffee silverskin: Biohydrogen and acetate production by dark fermentation without exogenous inoculum. Bioresource Technology Reports *17*, 100918.

Richer, E. (2013). Cereal Rye – A Cover Crop with Feed Value? | Ohio BEEF Cattle Letter.

Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., and De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. Frontiers in Microbiology 7, 1–21.

Robert, C., and Bernalier-Donadille, A. (2003). The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. FEMS Microbiology Ecology 46, 81–89.

Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Rivas-García, P., Magnin, J.-P., Alcalá-Rodríguez, M., and García-Reyes, R.B. (2020a). Biorefinery concept comprising acid hydrolysis, dark fermentation, and anaerobic digestion for co-processing of fruit and vegetable wastes and corn stover. Environmental Science and Pollution Research *27*, 28585–28596.

Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Magnin, J.-P., Rivas-García, P., Valdez-Vazquez, I., and Ríos-Leal, E. (2020b). Batch biohydrogen production from dilute acid hydrolyzates of fruits-and-vegetables wastes and corn stover as co-substrates. Biomass and Bioenergy 140, 105666.

Rossi, D.M., Berne da Costa, J., Aquino de Souza, E., Peralba, M. do C.R., Samios, D., and Záchia Ayub, M.A. (2011). Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 4814–4819.

Rouches, E., Herpoël-Gimbert, I., Steyer, J.P., and Carrere, H. (2016). Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 59, 179–198.

Ruggeri, B., Tommasi, T., and Sanfilippo, S. (2015a). Ecological Mechanisms of Dark H2 Production by a Mixed Microbial Community. In BioH2 & BioCH4 Through Anaerobic Digestion: From Research to Full-Scale Applications, B. Ruggeri, T. Tommasi, and S. Sanfilippo, eds. (London: Springer), pp. 1–24.

Ruggeri, B., Tommasi, T., and Sanfilippo, S. (2015b). Pretreatment to Increase Hydrogen Producing Bacteria (HPB). In BioH2 & BioCH4 Through Anaerobic Digestion: From Research to Full-Scale Applications, B. Ruggeri, T. Tommasi, and S. Sanfilippo, eds. (London: Springer), pp. 25–36.

Saady, N.M.C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. International Journal of Hydrogen Energy *38*, 13172–13191.

Sağır, E., and Hallenbeck, P.C. (2019). Photofermentative Hydrogen Production. In Biohydrogen, (Elsevier), pp. 141–157.

Saleem, M., Lavagnolo, M.C., and Spagni, A. (2018). Biological hydrogen production via dark fermentation by using a side-stream dynamic membrane bioreactor: Effect of substrate concentration. Chemical Engineering Journal *349*, 719–727.

Salem, A.H., Brunstermann, R., Mietzel, T., and Widmann, R. (2018). Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. International Journal of Hydrogen Energy 43, 4856–4865.

Samer, M., Helmy, K., Morsy, S., Assal, T., Amin, Y., Mohamed, S., Maihoob, M., Khalil, M., Fouda, I., and Abdou, A. (2019). Cellphone application for computing biogas, methane and electrical energy production from different agricultural wastes. Computers and Electronics in Agriculture *163*, 104873.

Santiago, S.G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G., and Moreno-Andrade, I. (2019). The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter, Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. Letters in Applied Microbiology 10.

Santos, M.C., Golt, C., Joerger, R.D., Mechor, G.D., Mourão, G.B., and Kung, L. (2017). Identification of the major yeasts isolated from high moisture corn and corn silages in the United States using genetic and biochemical methods. Journal of Dairy Science 100, 1151–1160.

Saratale, G.D., Saratale, R.G., Banu, J.R., and Chang, J.-S. (2019). Biohydrogen Production From Renewable Biomass Resources. In Biohydrogen, (Elsevier), pp. 247–277.

Sarkar, O., Butti, S.K., and Venkata Mohan, S. (2017). Acidogenesis driven by hydrogen partial pressure towards bioethanol production through fatty acids reduction. Energy 118, 425–434.

Schelegueda, L.I., Gliemmo, M.F., and Campos, C.A. (2012). Antimicrobial Synergic Effect of Chitosan with Sodium Lactate, Nisin or Potassium Sorbate against the Bacterial Flora of Fish. Journal of Food Research 1, 272–281.

Schimpf, U., Hanreich, A., Mähnert, P., Unmack, T., Junne, S., Renpenning, J., and Lopez-Ulibarri, R. (2013). Improving the Efficiency of Large-Scale Biogas Processes: Pectinolytic Enzymes Accelerate the Lignocellulose Degradation. 8.

Schmidt, T., Ziganshin, A.M., Nikolausz, M., Scholwin, F., Nelles, M., Kleinsteuber, S., and Pröter, J. (2014). Effects of the reduction of the hydraulic retention time to 1.5 days at constant organic loading in CSTR, ASBR, and fixed-bed reactors – Performance and methanogenic community composition. Biomass and Bioenergy *69*, 241–248.

Schwoerer, P. (2021). Comment Airbus prépare le décollage de l'avion à hydrogène. https://www.h2-mobile.fr/actus/comment-airbus-prepare-decollage-avion-hydrogene/

Scohy, D. (2019). [Maïs ensilage] 11,7 t MS/ha de rendement moyen : y aura-t-il assez de fourrage pour l'année ? *Web-agri*. https://www.web-agri.fr/ensilage/article/163304/sondage-rendements-de-mais-ensilage-2019-stock-de-fourrage

Sekoai, P.T., Yoro, K.O., and Daramola, M.O. (2018). Effect of nitrogen gas sparging on dark fermentative biohydrogen production using suspended and immobilized cells of anaerobic mixed bacteria from potato waste. Biofuels *9*, 595–604.

Sénat.fr (2005). Définition et implications du concept de voiture propre Rapport n° 125 (2005-2006). https://www.senat.fr/rap/r05-125/r05-125_mono.html

Shahbazi, A., and Zhang, B. (2010). Dilute and concentrated acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. In Bioalcohol Production, (Elsevier), pp. 143–158.

Shanmugam, S.R., Chaganti, S.R., Lalman, J.A., and Heath, D. (2014). Using a statistical approach to model hydrogen production from a steam exploded corn stalk hydrolysate fed to mixed anaerobic cultures in an ASBR. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 10003–10015.

Sharma, P., and Melkania, U. (2018). Synergic effect of various amino acids and ferric oxide on hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 43, 15843–15856.

Shell (2017). Shell hydrogène study, Energy of the future ? Sustainable Mobility through Fuel Cells en H2. Etude conduite par Jörg Adolph (Project lead), Dr. Christoph H. Balzer, Dr. Jurgen Louis et Dipl.-Ing Uwe Schabla.

Shen, L., Bagley, D.M., and Liss, S.N. (2009). Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. International Journal of Hydrogen Energy 34, 3689–3696.

Shen, L., Zhou, Y., Mahendran, B., Bagley, D.M., and Liss, S.N. (2010). Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. Journal of Membrane Science 360, 226–233.

Shi, P., Tian, J., Yuan, T., Liu, X., Huang, H., Bai, Y., Yang, P., Chen, X., Wu, N., and Yao, B. (2010). Paenibacillus sp. Strain E18 Bifunctional Xylanase-Glucanase with a Single Catalytic Domain. Applied and Environmental Microbiology *76*, 3620–3624.

Shiva Kumar, S., and Himabindu, V. (2019). Hydrogen production by PEM water electrolysis – A review. Materials Science for Energy Technologies 2, 442–454.

Shiyan, S.P., and Krishnaveni, M. (2013). Hydrogen production by Pseudomonas stutzeri JX442762 isolated from thermal soil at Mettur power station, Salem district, Tamil Nadu, India. Journal of Pharmacy Research *6*, 112–116.

Show, K.-Y., Lee, D.-J., and Chang, J.-S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. Bioresource Technology 102, 8524–8533.

Si, B., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., Xing, X.-H., Li, B., Duan, N., and Lu, H. (2015a). Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity. International Journal of Hydrogen Energy 40, 3191–3200.

Si, B., Li, J., Li, B., Zhu, Z., Shen, R., Zhang, Y., and Liu, Z. (2015b). The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). International Journal of Hydrogen Energy *40*, 11414–11421.

Sikora, A., Baszczyk, M., Jurkowski, M., and Zielenkiewicz, U. (2013). Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? In Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, J.M. Kongo, ed. (InTech), pp. 487–514.

Siles, J.A., Brekelmans, J., Martín, M.A., Chica, A.F., and Martín, A. (2010). Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion. Bioresource Technology *101*, 9040–9048.

da Silva, É.B., Savage, R.M., Biddle, A.S., Polukis, S.A., Smith, M.L., and Kung, L. (2020). Effects of a chemical additive on the fermentation, microbial communities, and aerobic stability of corn silage with or without air stress during storage. Journal of Animal Science *98*, skaa246.

Silva-Illanes, F., Tapia-Venegas, E., Schiappacasse, M.C., Trably, E., and Ruiz-Filippi, G. (2017). Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. Energy *141*, 358–367.

Simpson, E.H. (1949). Measurement of Diversity. Nature 163, 688-688.

Singer, S., Magnusson, L., Hou, D., Lo, J., Maness, P.-C., and Ren, Z.J. (2018). Anaerobic membrane gas extraction facilitates thermophilic hydrogen production from *Clostridium thermocellum*. Environmental Science: Water Research & Technology *4*, 1771–1782.

Sinha, P., and Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 36, 7460–7478.

Sinharoy, A., Kumar, M., and Pakshirajan, K. (2020). Chapter 14 - An overview of bioreactor configurations and operational strategies for dark fermentative biohydrogen production. In Bioreactors, L. Singh, A. Yousuf, and D.M. Mahapatra, eds. (Elsevier), pp. 249–288.

Sivagurunathan, P., Sen, B., and Lin, C.-Y. (2014). Batch fermentative hydrogen production by enriched mixed culture: Combination strategy and their microbial composition. Journal of Bioscience and Bioengineering *117*, 222–228.

Sivagurunathan, P., Kumar, G., Mudhoo, A., Rene, E.R., Saratale, G.D., Kobayashi, T., Xu, K., Kim, S.-H., and Kim, D.-H. (2017). Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. Renewable and Sustainable Energy Reviews 77, 28–42.

Soares, J.F., Confortin, T.C., Todero, I., Mayer, F.D., and Mazutti, M.A. (2020). Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. Renewable and Sustainable Energy Reviews *117*, 109484.

Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., and Zacchi, G. (2002). Two-step steam pretreatment of softwood with SO2 impregnation for ethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology *98–100*, 5–21.

Song, W., Ding, L., Liu, M., Cheng, J., Zhou, J., and Li, Y.-Y. (2020). Improving biohydrogen production through dark fermentation of steam-heated acid pretreated Alternanthera philoxeroides by mutant Enterobacter aerogenes ZJU1. Science of The Total Environment *716*, 134695.

Song, Z.-X., Wang, Z.-Y., Wu, L.-Y., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2012a). Effect of microwave irradiation pretreatment of cow dung compost on biohydrogen process from corn stalk by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 6554–6561.

Song, Z.-X., Dai, Y., Fan, Q.-L., Li, X.-H., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2012b). Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 5631–5636.

Song, Z.-X., Li, X.-H., Li, W.-W., Bai, Y.-X., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2014). Direct bioconversion of raw corn stalk to hydrogen by a new strain Clostridium sp. FS3. Bioresource Technology 157, 91–97.

Sonnleitner, A., Peintner, C., Wukovits, W., Friedl, A., and Schnitzhofer, W. (2012). Process investigations of extreme thermophilic fermentations for hydrogen production: Effect of bubble induction and reduced pressure. Bioresource Technology *118*, 170–176.

Sparling, R. (1997). Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. International Journal of Hydrogen Energy 22, 563–566.

Speck, M.L., and Ray, B. (1977). Effects of Freezing and Storage on Microorganisms in Frozen Foods: A Review. Journal of Food Protection 40, 333–336.

Steinberger-Wilckens, R., Radcliffe, J., Al-Mufachi, N., Abad, A.V., Jones, O., and Kurban, Z. (2017). The role of hydrogen and fuel cells in delivering energy security for the UK. H2FC Supergen, London, UK 22.

Sträuber, H., Lucas, R., and Kleinsteuber, S. (2016). Metabolic and microbial community dynamics during the anaerobic digestion of maize silage in a two-phase process. Applied Microbiology and Biotechnology 100, 479–491.

Sui, H., Dong, J., Wu, M., Li, X., Zhang, R., and Wu, G. (2017). Continuous hydrogen production by dark fermentation in a foam SiC ceramic packed upflow anaerobic sludge blanket reactor. The Canadian Journal of Chemical Engineering 95, 62–68.

Suksong, W., Kongjan, P., Prasertsan, P., and O-Thong, S. (2019). Thermotolerant cellulolytic Clostridiaceae and Lachnospiraceae rich consortium enhanced biogas production from oil palm empty fruit bunches by solid-state anaerobic digestion. Bioresource Technology 291, 121851.

Sun, Y., and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review q. Bioresource Technology 11.

Sun, Y., and Cheng, J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Bioresource Technology 96, 1599–1606.

Surla, K. (2019). Hydrogène. Techniques de l'Ingénieur – Procédés Chimie - Bio - Agro | Opérations Unitaires. Génie de La Réaction Chimique J 6 368 V2 1–29.

Ta, D.T., Lin, C.-Y., Ta, T.M.N., and Chu, C.-Y. (2020). Biohythane production via single-stage anaerobic fermentation using entrapped hydrogenic and methanogenic bacteria. Bioresource Technology *300*, 122702.

Tang, J., Yuan, Y., Guo, W.-Q., and Ren, N.-Q. (2012). Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of Ethanoligenens harbinese B49. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 741–747.

Tang, X., Ren, N., and Xu, J. (2013). Evaluation of hydrogen production from corn cob with the mesophilic bacterium Clostridium hydrogeniproducens HR-1. International Journal of Hydrogen Energy *38*, 9104–9110.

Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., and Zhou, Z. (2007). High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. International Journal of Hydrogen Energy *32*, 200–206.

Tashyrev, O., Govorukha, V., and Havryliuk, O. (2017). The effect of mixing modes on biohydrogen yield and spatial pH gradient at dark fermentation of solid food waste. Ecological Engineering and Environment Protection 53–62.

Tawfik, A., and Salem, A.H. (2014). Optimization of hydrogen production from pretreated rice straw waste in a mesophilic up-flow anaerobic staged reactor: Hydrogen energy. International Journal of Energy Research 38, 1155–1161.

Teixeira Franco, R., Buffière, P., and Bayard, R. (2016). Ensiling for biogas production: Critical parameters. A review. Biomass and Bioenergy 94, 94– 104.

Tenca, A., Schievano, A., Lonati, S., Malagutti, L., Oberti, R., and Adani, F. (2011). Looking for practical tools to achieve next-future applicability of dark fermentation to produce bio-hydrogen from organic materials in Continuously Stirred Tank Reactors. Bioresource Technology *102*, 7910–7916.

Teng, Y., Xu, Y., Wang, X., and Christie, P. (2019). Function of Biohydrogen Metabolism and Related Microbial Communities in Environmental Bioremediation. Frontiers in Microbiology 10.

Teugjas, H., and Väljamäe, P. (2013). Product inhibition of cellulases studied with 14C-labeled cellulose substrates. Biotechnology for Biofuels 6, 104.

Thomsen, M.H., Holm-Nielsen, J.B., Oleskowicz-Popiel, P., and Thomsen, A.B. (2008). Pretreatment of Whole-Crop Harvested, Ensiled Maize for Ethanol Production. Applied Biochemistry and Biotechnology 148, 23–33.

Thylin, I., Schuisky, P., Lindgren, S., and Gottschal, J.C. (1995). Influence of pH and lactic acid concentration on *Clostridium tyrobutyricum* during continuous growth in a pH-auxostat. Journal of Applied Bacteriology *79*, 663–670.

Tohno, M., Sakamoto, M., Ohkuma, M., and Tajima, K. (2016). Paenibacillus silagei sp. nov. isolated from corn silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *66*, 3873–3877.

Toledo-Alarcón, J., Fuentes, L., Etchebehere, C., Bernet, N., and Trably, E. (2021). Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 1694–1704.

Tomczak, W., Ferrasse, J.-H., Giudici-Orticoni, M.-T., and Soric, A. (2018). Effect of hydraulic retention time on a continuous biohydrogen production in a packed bed biofilm reactor with recirculation flow of the liquid phase. International Journal of Hydrogen Energy *43*, 18883–18895.

Toscano, G., Zuccaro, G., Ausiello, A., Micoli, L., Turco, M., and Pirozzi, D. (2014). Production of hydrogen from giant reed by dark fermentation. Chemical Engineering Transactions *37*, 331–336.

Trably, E., Christophe, G., Latrille, E., and Larroche, C. (2018). Production de biohydrogène - Voie fermentaire sombre. Technique de l'ingénieur BIO3351 V2, 1–35.

Trad, Z., Fontaine, J.-P., Larroche, C., and Vial, C. (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. Renewable Energy *98*, 264–282.

Tucker, M.P., Kim, K.H., Newman, M.M., and Nguyen, Q.A. (2003). Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology *105*, 1–13.

Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., and Morimoto, M. (1995). Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. Journal of Fermentation and Bioengineering 79, 395–397.

Urness, J. (2013). Harvesting fall-seeded rye as silage | Vita Plus.

Utama, G.L., Lestari, W.D., Kayaputri, I.L., and Balia, R.L. (2019). Indigenous yeast with cellulose-degrading activity in napa cabbage (Brassica pekinensis L.) waste: Characterisation and species identification. Foods and Raw Materials 7, 321–328.

Valdez-Vazquez, I., and Poggi-Varaldo, H.M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. Renewable and Sustainable Energy Reviews 13, 1000–1013.

Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., and Amaya-Delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of Enterococcus and Clostridium. Fuel 159, 214–222.

Van Ginkel, S., and Logan, B.E. (2005). Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. Environmental Science & Technology 39, 9351–9356.

Veeravalli, S.S., Chaganti, S.R., Lalman, J.A., and Heath, D.D. (2014). Fermentative H2 production using a switchgrass steam exploded liquor fed to mixed anaerobic cultures: Effect of hydraulic retention time, linoleic acid and nitrogen sparging. International Journal of Hydrogen Energy 39, 9994–10002.

Venkata Mohan, S., and Pandey, A. (2019). Sustainable Hydrogen Production. In Biohydrogen, (Elsevier), pp. 1–23.

Vicelma Cardoso, Betania B. Romao, Felipe Thalles M. Silva, Julia G. Santos, Fabiana Regina X. Batista, and Juliana S. Ferreira (2014). Hydrogen production by dark fermentation. Chemical Engineering Transactions *38*, 481–486.

Vigliotti, C. (2017). Étude de l'impact d'un changement de régime alimentaire sur le microbiome intestinal de Podarcis sicula. Thèse de doctorat, 280.

Villa Montoya, A.C., Cristina da Silva Mazareli, R., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Sakamoto, I.K., Maia de Oliveira, V., Silva, E.L., and Amâncio Varesche, M.B. (2019). Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. International Journal of Hydrogen Energy *44*, 21434–21450.

Villermaux, J. (1994). Réacteurs chimiques - Principes. Technique de l'Ingénieur J4010 V1, 1-51.

Vital, M., Karch, A., and Pieper, D.H. (2017). Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. MSystems 2, e00130-17.

Vo, T.-P., Lay, C.-H., and Lin, C.-Y. (2019). Effects of hydraulic retention time on biohythane production via single-stage anaerobic fermentation in a two-compartment bioreactor. Bioresource Technology 121869.

Voitic, G., Pichler, B., Basile, A., Iulianelli, A., Malli, K., Bock, S., and Hacker, V. (2018). Hydrogen Production. In Fuel Cells and Hydrogen, (Elsevier), pp. 215–241.

Waligórska, M. (2012). Fermentative Hydrogen Production - Process Design and Bioreactors. Chemical and Process Engineering 33, 585–594.

Walter, R.P., Morris, J.G., and Kell, D.B. (1987). The Roles of Osmotic Stress and Water Activity in the Inhibition of the Growth, Glycolysis and Glucose Phosphotransferase System of Clostridium pasteurianum. Microbiology 133, 259–266.

Wang, A. (2008). Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture—Clostridium acetobutylicum X9 and Ethanoigenens harbinense B49. International Journal of Hydrogen Energy *33*, 912–917.

Wang, J., and Wan, W. (2008a). Influence of Ni2+ concentration on biohydrogen production. Bioresource Technology 99, 8864–8868.

Wang, J., and Wan, W. (2008b). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. International Journal of Hydrogen Energy *33*, 2934–2941.

Wang, B., Wan, W., and Wang, J. (2008a). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 33, 7013–7019.

Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.-V., and Liao, C.S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by Clostridium bifermentans. Journal of Biotechnology *102*, 83–92.

Wang, H., Fang, M., Fang, Z., and Bu, H. (2010). Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. Bioresource Technology *101*, 8731–8735.

Wang, J.-Y., Stabnikova, O., Tay, S.T.-L., Ivanov, V., and Tay, J.-H. (2003). Intensive bioconversion of sewage sludge and food waste by. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19, 427–432.

Wang, R., Zong, W., Qian, C., Wei, Y., Yu, R., and Zhou, Z. (2011). Isolation of Clostridium perfringens strain W11 and optimization of its biohydrogen production by genetic modification. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 12159–12167.

Wang, S., Dong, Z., Li, J., Chen, L., and Shao, T. (2019). *Pediococcus acidilactici* strains as silage inoculants for improving the fermentation quality, nutritive value and *in vitro* ruminal digestibility in different forages. Journal of Applied Microbiology *126*, 424–434.

Wang, S., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Kaka, N.A., and Shao, T. (2020). Sequencing and microbiota transplantation to determine the role of microbiota on the fermentation type of oat silage. Bioresource Technology 309, 123371.

Wang, Y., Zhao, Q.-B., Mu, Y., Yu, H.-Q., Harada, H., and Li, Y.-Y. (2008). Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. International Journal of Hydrogen Energy 33, 1164–1171.

Wang, Y., Wang, H., Feng, X., Wang, X., and Huang, J. (2010). Biohydrogen production from cornstalk wastes by anaerobic fermentation with activated sludge. International Journal of Hydrogen Energy 35, 3092–3099.

Wang, Y.-B., Li, R.-J., Li, W.-W., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2012). Effects of pretreatment of natural bacterial source and raw material on fermentative biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy *37*, 831–836.

Weghoff, M.C., Bertsch, J., and Müller, V. (2015). A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria: A novel mode of lactate metabolism in anaerobes. Environmental Microbiology 17, 670–677.

Weinberg, Z.G., and Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. Biochemical Engineering Journal 13, 181–188.

Whittaker, R.H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. Ecological Monographs 30(3), 279–338.

Whittaker, R.H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. Taxon 21, 213-251.

Wilkinson, J.M., and Davies, D.R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. Grass and Forage Science 68, 1–19.

Williams, B.A., Van Der Poel, A.F.B., Boer, H., and Tamminga, S. (1995). The use of cumulative gas production to determine the effect of steam explosion on the fermentability of two substrates with different cell wall quality. Journal of the Science of Food and Agriculture *69*, 33–39.

de Wit, J.C., and Rombouts, F.M. (1990). Antimicrobial activity of sodium lactate. Food Microbiology 7, 113-120.

Wittkamp, F., Senger, M., Stripp, S.T., and Apfel, U.-P. (2018). [FeFe]-Hydrogenases: recent developments and future perspectives. Chemical Communications 54, 5934–5942.

Wong, H.-C., and Chen, Y.-L. (1988). Effects of Lactic Acid Bacteria and Organic Acids on Growth and Germination of Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology 54, 2179–2184.

Wong, Y.M., Wu, T.Y., and Juan, J.C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. Renewable and Sustainable Energy Reviews 34, 471–482.

Wongthanate, J., and Polprasert, C. (2015). Immobilized Biofilm in Thermophilic Biohydrogen Production using Synthetic versus Biological Materials. Braz. Arch. Biol. Technol. 58, 124–130.

Wu, C.-W., Whang, L.-M., Cheng, H.-H., and Chan, K.-C. (2012). Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. Bioresource Technology 113, 30–36.

Wu, K.-J., Chang, C.-F., and Chang, J.-S. (2007). Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. Process Biochemistry 42, 1165–1171.

Xia, M., Peng, M., Xue, D., Cheng, Y., Li, C., Wang, D., Lu, K., Zheng, Y., Xia, T., song, J., *et al.* (2020). Development of optimal steam explosion pretreatment and highly effective cell factory for bioconversion of grain vinegar residue to butanol. Biotechnology for Biofuels 13:111, 1–17.

Xiao, N., Chen, Y., Chen, A., and Feng, L. (2015). Enhanced Bio-hydrogen Production from Protein Wastewater by Altering Protein Structure and Amino Acids Acidification Type. Scientific Reports 4.

Xie, B., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., Liu, J., and Cen, K. (2008). Production of hydrogen and methane from potatoes by two-phase anaerobic fermentation. Bioresource Technology *99*, 5942–5946.

Xing, Y., Fan, S.-Q., Zhang, J.-N., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2011). Enhanced bio-hydrogen production from corn stalk by anaerobic fermentation using response surface methodology. International Journal of Hydrogen Energy *36*, 12770–12779.

Xu, J.-F., Ren, N., Su, D.-X., and Qiu, J. (2010). Bio-hydrogen production from acetic acid steam-exploded corn straws by simultaneous saccharification and fermentation with Ethanoligenens harbinense B49. International Journal of Energy Research *34*, 381–386.

Xu, Z., He, H., Zhang, S., and Kong, J. (2017). Effects of inoculants Lactobacillus brevis and Lactobacillus parafarraginis on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. Nature Scientific Reports 7.

Xu, Z., Zhang, S., Mu, Y., and Kong, J. (2018). Paenibacillus panacisoli enhances growth of Lactobacillus spp. by producing xylooligosaccharides in corn stover ensilages. Carbohydrate Polymers 184, 435–444.

Yan, B.H., Selvam, A., and Wong, J.W.C. (2017). Influence of acidogenic headspace pressure on methane production under schematic of diversion of acidogenic off-gas to methanogenic reactor. Bioresource Technology 245, 1000–1007.

Yan, Z., Song, Z., Li, D., Yuan, Y., Liu, X., and Zheng, T. (2015). The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw. Bioresource Technology *177*, 266–273.

Yang, G., and Wang, J. (2019). Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 44, 25542–25550.

Yang, Y., and Sha, M. (2019). A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, Fed- Batch, and Continuous Fermentation. Eppendorf *Application note*, 1–16.

Yang, H., Guo, L., and Liu, F. (2010). Enhanced bio-hydrogen production from corncob by a two-step process: Dark- and photo-fermentation. Bioresource Technology 101, 2049–2052.

Yang, H., Shi, B., Ma, H., and Guo, L. (2015). Enhanced hydrogen production from cornstalk by dark- and photo-fermentation with diluted alkalicellulase two-step hydrolysis. International Journal of Hydrogen Energy 40, 12193–12200.

Yerushalmi, L., Volesky, B., and Szczesny, T. (1985). Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by Clostridium acetobutylicum. Appl Microbiol Biotechnol 22, 103–107.

Yin, Y., and Wang, J. (2016). Characterization and hydrogen production performance of a novel strain Enterococcus faecium INET2 isolated from gamma irradiated sludge. International Journal of Hydrogen Energy 41, 22793–22801.

Yin, Y., and Wang, J. (2019a). Mechanisms of enhanced biohydrogen production from macroalgae by ferrous ion: insights into correlations of microbes and metabolites. Bioresource Technology 291, 121808.

Yin, Y., and Wang, J. (2019b). Optimization of fermentative hydrogen production by Enterococcus faecium INET2 using response surface methodology. International Journal of Hydrogen Energy 44, 1483–1491.

Yin, Y., Chen, Y., and Wang, J. (2021). Co-fermentation of sewage sludge and algae and Fe2+ addition for enhancing hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy *46*, 8950–8960.

Yoo, M. (2016). Analysis of metabolic mutants of Clostridium acetobutylicum by a global and quantitative systems biology approach. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse.

Zahan, Z., Othman, M.Z., and Muster, T.H. (2018). Anaerobic digestion/co-digestion kinetic potentials of different agro-industrial wastes: A comparative batch study for C/N optimisation. Waste Management 71, 663–674.

Zakzeski, J., Bruijnincx, P.C.A., Jongerius, A.L., and Weckhuysen, B.M. (2010). The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. Chem. Rev. 110, 3552–3599.

Zhang, H., and Logan, B.E. (2004). Biological hydrogen production from an unsaturated, packed-bed bioreactor. ACS National Meeting Book of Abstracts 228.

Zhang, J., and Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. Appl Microbiol Biotechnol 51, 407–421.

Zhang, F., Zhang, Y., Chen, M., and Zeng, R.J. (2012a). Hydrogen supersaturation in thermophilic mixed culture fermentation. International Journal of Hydrogen Energy 37, 17809–17816.

Zhang, J.-N., Li, Y.-H., Zheng, H.-Q., Fan, Y.-T., and Hou, H.-W. (2015). Direct degradation of cellulosic biomass to bio-hydrogen from a newly isolated strain Clostridium sartagoforme FZ11. Bioresource Technology 192, 60–67.

Zhang, K., Ren, N., Guo, C., Wang, A., and Cao, G. (2011a). Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. Journal of Environmental Sciences 23, 1929–1936.

Zhang, M.-L., Fan, Y.-T., Xing, Y., Pan, C.-M., Zhang, G.-S., and Lay, J.-J. (2007). Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. Biomass and Bioenergy *31*, 250–254.

Zhang, S., Kim, T.-H., Lee, Y., and Hwang, S.-J. (2012b). Effects of VFAs Concentration on Bio-hydrogen Production with Clostridium Bifermentans 3ATma. Energy Procedia 14, 518–523.

Zhang, S.-C., Lai, Q.-H., Lu, Y., Liu, Z.-D., Wang, T.-M., Zhang, C., and Xing, X.-H. (2016). Enhanced biohydrogen production from corn stover by the combination of Clostridium cellulolyticum and hydrogen fermentation bacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering *122*, 482–487.

Zhang, T., Jiang, D., Zhang, H., Jing, Y., Tahir, N., Zhang, Y., and Zhang, Q. (2019). Comparative study on bio-hydrogen production from corn stover: Photo-fermentation, dark-fermentation and dark-photo co-fermentation. International Journal of Hydrogen Energy.

Zhang, Z.-P., Show, K.-Y., Tay, J.-H., Liang, D.T., Lee, D.-J., and Jiang, W.-J. (2006). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. Process Biochemistry 41, 2118–2123.

Zhao, L., Cao, G.-L., Wang, A.-J., Ren, H.-Y., Dong, D., Liu, Z.-N., Guan, X.-Y., Xu, C.-J., and Ren, N.-Q. (2012). Fungal pretreatment of cornstalk with Phanerochaete chrysosporium for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. Bioresource Technology *114*, 365–369.

Zhao, L., Cao, G.-L., Wang, A.-J., Ren, H.-Y., and Ren, N.-Q. (2013). Evaluation of continuous biohydrogen production from enzymatically treated cornstalk hydrolysate. International Journal of Hydrogen Energy *38*, 15100–15104.

Zhao, L., Cao, G.-L., Wang, A.-J., Ren, H.-Y., and Ren, N.-Q. (2014). An anaerobic sequential batch reactor for enhanced continuous hydrogen production from fungal pretreated cornstalk hydrolysate. International Journal of Hydrogen Energy *39*, 19311–19316.

Zhao, S., Li, G., Zheng, N., Wang, J., and Yu, Z. (2018). Steam explosion enhances digestibility and fermentation of corn stover by facilitating ruminal microbial colonization. Bioresource Technology 253, 244–251.

Zheng, X.-J., and Yu, H.-Q. (2005). Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. Journal of Environmental Management 74, 65–70.

Zheng, H., O'Sullivan, C., Mereddy, R., Zeng, R.J., Duke, M., and Clarke, W.P. (2010). Experimental and theoretical investigation of diffusion processes in a membrane anaerobic reactor for bio-hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy *35*, 5301–5311.

Zheng, X.J., Zheng, Y.M., and Yu, H.Q. (2005). Influence of NaCl on Hydrogen Production from Glucose by Anaerobic Cultures. Environmental Technology 26, 1073–1080.

Zhu, H., and Beland, M. (2006). Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. International Journal of Hydrogen Energy *31*, 1980–1988. Zhu, H., Stadnyk, A., Béland, M., and Seto, P. (2008). Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. Bioresource Technology *99*, 5078–5084.

Ziara, R.M.M., Miller, D.N., Subbiah, J., and Dvorak, B.I. (2019). Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. International Journal of Hydrogen Energy 44, 661–673.

Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., and Brosse, N. (2021). Steam Explosion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Mini-Review of Theorical and Experimental Approaches. Frontiers in Chemistry 9.

Zinder, S.H., Anguish, T., and Cardwell, S.C. (1984). Selective Inhibition by 2-Bromoethanesulfonate of Methanogenesis from Acetate in a Thermophilic Anaerobic Digestor. Appl Environ Microbiol 47, 1343–1345.

Bibliographie

Annexes

Annexe 1 : Potentiel de production d'hydrogène en fermentation endogène des biomasses fraîches

Les tests de production d'H₂ sont effectués par fermentation en bioréacteur agité semi-batch à 37°C à partir de 50 g de biomasse fraîche (c'est-à-dire réceptionnée et stockée à 4°C) et sans *inoculum* (fermentation endogène).

Une première série d'expériences a été réalisée dans l'objectif d'évaluer le potentiel H₂ des biomasses sans prétraitement ni inoculation exogène.

1.1 Fermentation d'ensilage de maïs frais en réacteur semi-batch (lot 1)

La figure 91 représente l'évolution du débit de production d'H₂ ainsi que les concentrations en métabolites dans le milieu fermentaire au cours du temps.



<u>Figure 91</u> : Evolution du débit de production d'H₂ en mL/min (a) et de la concentration en métabolites dans le fermentât (b) au cours de la fermentation endogène d'ensilage de maïs (lot 1). Les barres d'erreurs représentent la variabilité de la teneur en métabolites pour les réplicats 1 et 2.

Pendant la fermentation, l'H₂ et le dioxyde de carbone sont les seuls gaz détectés en sortie du bioréacteur. Une production d'H₂ de 535 \pm 2 mL_{H2}/L_{bioréacteur} est obtenue (tableau 59).

Le profil de production obtenu est caractéristique : une phase d'environ 8 heures sans production d'H₂ correspondant à une phase de latence ; suivie d'un pic de production d'intensité variable selon les réplicats (maximum de 0,39 à 0,58 mL/min), atteint au bout d'une dizaine d'heures de fermentation ; puis, une phase avec un débit moyen (0,3 à 0,4 mL/min) pendant une dizaine d'heures suivie d'une baisse et d'une dernière phase de production à faible débit. La fin de la production est atteinte au bout de 48 heures (figure 91a).

De par l'hétérogénéité de l'ensilage de maïs et au vu du profil de débit de production d'H₂, la biomasse semble constituée de plusieurs substrats. Chaque phase pourrait correspondre à l'utilisation d'un substrat suivant des voies métaboliques qui sont propres à différentes bactéries, donnant des productions et productivités de gaz plus ou moins importantes. La première phase de production est caractérisée par une activité métabolique importante des *consortia* qui se traduit par l'augmentation du débit d'H₂; une fois le substrat épuisé, le débit de production d'H₂ diminue et il s'en suit une phase d'adaptation à un autre substrat. Afin de vérifier cette hypothèse, les sucres solubles dans le milieu ainsi que les populations bactériennes doivent être analysés au cours de la fermentation.

Malgré les différences de cinétique observées : premier pic et phases de productions suivantes d'intensités variables, le volume d'H₂ produit est reproductible (tableau 59).

En ce qui concerne les métabolites (figure 91b), pendant la phase de latence, une très légère augmentation des concentrations en lactate et en acétate est observée. Celle-ci peut être attribuée à une solubilisation des métabolites sous l'effet de l'agitation. Entre 8 h et 24 h de fermentation, la production d'H₂ s'accompagne de la consommation de la totalité du lactate présent initialement dans le milieu réactionn el, d'une production importante de butyrate (+11,5 mM) et dans une moindre mesure d'acétate (+5,9 mM), d'éthanol (+2,9 mM) et de traces de formiate, de succinate et de propionate. Entre 24 h et 48 h, les débits de production d'H₂ diminuent ainsi que la production de butyrate (+6,0 mM) au profit de celle de l'acétate (+34,5 mM) potentiellement issue de l'acétogénèse. Des produits de la solvantogénèse (éthanol) et des voies consommatrices d'H₂ (propionate) sont analysés.

La production d'acétate est très importante en comparaison de la production d'H₂, ce qui laisse penser que cette production d'acétate s'effectue sans coproduction majeure d'H₂, c'est-à-dire soit par des bactéries hydrogénotrophes *via* la voie de l'homoacétogénèse (Eq A.1), soit par la voie de l'acétogenèse homo-fermentaire (Eq A.2) consommant de la matière organique sans coproduction de gaz. Ainsi, il semblerait que ce soit la voie du butyrate (Eq A.3) qui contribue le plus à la production d'H₂.

$$4 H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3 COOH + 2 H_2 O$$
 (Eq A.1)

$$C_6 H_{12} O_6 \rightarrow 3 C H_3 \text{COOH} \tag{Eq A.2}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \to CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2 + 2CO_2$$
 (Eq A.3)

Les résultats des paramètres de performances de production et ceux de l'équation de Gompertz sont présentés dans le tableau 59 et montrent que les réplicats 1 et 2 présentent des données très similaires en termes de production et rendement en H_2 , et rapport molaire H_2/CO_2 .
Tableau 59 : Performances de la production d'H2 et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure c	зe
l'ensilage de maïs (lot 1) pour deux réplicats.	

Réplicat	Production (mL _{H2} /L _{bioréacteur})	Rendement (L _{H2} /kg _{MS})	Rendement (mol _{H2} /mol _{sucres})	Productivité max (mL _{H2} /L/h)	Latence (h)	Rapport H ₂ /CO ₂
1	534	23	0,21	50	7,5	0,46
2	536	23	0,21	31	9,4	0,46
Moyenne	535 ± 2	23 ± 1	0,21 ± 0,01	41 ± 13	8,4 ± 1,3	0,46 ± 0,01

Le rendement en H₂ est relativement faible (0,21 mol_{H2}/mol_{sucres totaux} en comparaison des valeurs obtenues généralement dans la littérature à partir d'un substrat modèle (glucose) en fermentation par des cultures pures telles que Clostridium beijeirincki (2,8 mol_{H2}/mol_{glucose}) (Lin et al., 2007) et Enterobacter cloacae (3,3 mol_{H2}/mol_{glucose}) (Nath et al., 2006). Dans les biomasses réelles, tous les sucres ne sont pas accessibles et disponibles pour les bactéries hydrogénogènes à la différence des expériences réalisées avec substrats modèles, facilement fermentescibles. L'étude de Martinez-Perez et al. (2007) estime le potentiel de l'ensilage de maïs à 1,9 mol_{H2}/mol_{glucose consommé}, un chiffre proche de celui obtenu par Ivanova et al. (2009) et Liu et al. (2008) : 1,8 mol_{H2}/mol_{glucose} lors de la fermentation exogène de feuille de maïs et de cellulose. Par fermentation en condition thermophile, Cheng et Liu (2011) produisent de l'H₂ avec un rendement de 1,7 mol_{H2}/mol_{glucose} à partir d'amidon. D'autres études ciblant des biomasses lignocellulosiques (très souvent prétraitées) obtiennent des rendements en H₂ compris entre 0,17 et 1,73 mol_{H2}/mol_{glucose} (Almarsdottir et al., 2010 ; Levin et al., 2006 ; Liu et Cheng, 2010 ; Liu et Shen, 2004 ; Lo et al., 2010 ; Pattra et al., 2008 ; Toscano et al., 2014). Ainsi, le rendement en H₂ de l'ensilage de maïs (lot 1) se situe dans la fourchette basse, un résultat logique puisque la biomasse est fermentée sans prétraitement, sans inoculum bactérien et sans additif nutritionnel. Ce résultat montre que cette biomasse est difficilement fermentescible sans prétraitement préalable.

Le rapport molaire H₂/CO₂ révèle que le métabolisme de la fermentation obscure s'avère peu favorable à la production d'H₂, ainsi une valeur de 0,46 (dans notre cas) signifie que seulement 30,5 % des gaz produits est de l'H₂, ce qui est comparable aux autres études menées sur la biomasse d'ensilage de maïs : Nikolajeva *et al.* (2015) détectent 15 à 21 % d'H₂ dans les gaz extraits du bioréacteur et Nkemka *et al.* (2015) et Manzini *et al.* (2015) en relèvent entre 24,9 et 41,3 %, alors que Kyazze *et al.* (2008) obtiennent des proportions plus élevées (50 % à 65 %).

1.2 Fermentation d'ensilage de maïs « frais » (lot 2) en réacteur semi-batch

La production d'H₂ par fermentation obscure a été testée en quatre réplicats sur le lot 2 d'ensilage de maïs, l'un d'eux présentant une productivité en H₂ différente des autres. La figure 92 présente l'évolution du débit de production d'H₂ et les concentrations en métabolites détectées dans le milieu fermentaire au cours du temps.



<u>Figure 92</u> : Evolution du débit de production d' H_2 en mL/min (a) et de la concentration en métabolites dans le fermentât (b) au cours de la fermentation endogène d'ensilage de maïs (lot 2). Les barres d'erreurs représentent la variabilité de la teneur en métabolites pour les réplicats (n=4).

Après une courte phase de latence (4 h), un pic de production d'H₂ est atteint avec un débit maximal variable et pouvant atteindre 1,8 mL_{H2}/min. Après ce pic, le débit de production d'H₂ diminue progressivement excepté pour le réplicat 3 qui présente un débit de production différent avec notamment un double pic de production à 10 h et 17 h et un temps de fermentation plus long (45 h), cette différence s'explique par un dysfonctionnement sur la régulation de pH modifiant l'évolution du débit de production, mais sans impact sur la production totale d'H₂ (970 ± 93 mL_{H2}/L_{bioréacteur} en moyenne sur les 4 réplicats, tableau 60).

D'un point de vue métabolique, le début de la fermentation est caractérisé par la production d'H₂, de CO₂, d'acétate, de butyrate et par la consommation du lactate. Entre 16 h et 25 h de fermentation, la production de butyrate augmente (+4,0 mM) alors que la production d'acétate reste globalement stable (+0,9 mM). Pendant cette période, les 7,6 mM de lactate restant dans le milieu réactionnel sont consommées. Notons également qu'une partie de la production d'H₂ semble avoir été stockée sous forme de formiate (+3,6 mM). Après 25h, le débit d'H₂ détecté en sortie du bioréacteur est considérablement réduit malgré la consommation quasiment totale du formiate (-3,7 mM) et un *shift* métabolique vers des voies non productrices d'H₂ semble intervenir : accumulation massive d'acétate (+25,7 mM), production d'éthanol (+4,5 mM) par solvantogenèse et production de propionate (+2,0 mM). La production d'acétate pourrait s'effectuer par acétogenèse et/ou par homoacétogenèse en utilisant l'H₂ et le CO₂ produit par la voie du butyrate ou par la dégradation du formiate.

Les résultats des paramètres de performances de production d'H₂ et ceux de l'équation de Gompertz sont présentés dans le tableau 60 et montrent que les réplicats présentent des données du même ordre de grandeur : la production et le rendement en H₂ ainsi que pour le rapport molaire H₂/CO₂.

Dáuliaat	Production	Ren	dement	Productivité max	Latence	Dama ant IL (CO	
Replicat	$(mL_{H_2}/L_{bioréacteur})$	(L/kg _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	Rapport H ₂ /CO ₂	
1	870	41	0,42	87	4,0	0,55	
2	1064	50	0,51	160	4,0	0,66	
3	1031	48	0,50	93	4,0	0,68	
4	914	43	0,44	86	4,0	0,63	
Moyenne	970 ± 93	46 ± 4	0,47 ± 0,05	106 ± 36	4,0 ± 0,1	0,63 ± 0,06	

<u>Tableau 60</u> : Performances de la production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de fermentation obscure de l'ensilage de maïs lot 2

Les productions d'H₂ s'échelonnent de 870 à 1064 mL_{H2}/L_{bioréacteur} avec un coefficient de variation 9,6 %. Cette production équivaut à un rendement moyen de production d'H₂ de 46 ± 4 L_{H2}/kg_{MS} et de 0,47 ± 0,05 mol_{H2}/mol_{sucres}. La productivité maximale de la biomasse est plus variable (de 86 à 160 mL/L/h) explicable potentiellement par des variations lors de l'échantillonnage de la biomasse pour le test de fermentation. Le rapport molaire H₂/CO₂ est de 0,63 ± 0,06, ce qui signifie qu'environ 40 % des gaz produits est de l'H₂, ce qui est dans le même ordre de grandeur que les valeurs obtenues par Nkemka *et al.* (2015) et Manzini *et al.* (2015) respectivement 24,9 et 41,3 %.

1.3 Fermentation d'ensilage de seigle « frais » en réacteur semi-batch

Un triplicat de fermentation endogène pour tester le potentiel H_2 de l'ensilage de seigle (lot 1) a été réalisé et un seul pour le lot 2.

La figure 93 représente l'évolution du débit de production d'H₂ pendant la fermentation obscure ainsi que les concentrations en métabolites dans le milieu de fermentation au cours du temps pour les deux lots.



<u>Figure 93 :</u> Evolution du débit de production d' H_2 en mL/min pour les deux lots d'ensilage de seigle « frais » (a) et de la concentration en métabolites et sucres dans le fermentât au cours de la fermentation endogène d'ensilage de seigle frais lot 1 (b) et lot 2 (c). Les barres d'erreurs représentent la variabilité de la teneur en métabolites des réplicats 1, 2 et 3.

Aucune trace de méthane n'a été détectée au cours de la fermentation d'ensilage de seigle. Seuls l'H₂ et le dioxyde de carbone ont été produits, de même que pour l'ensilage de maïs. Un volume d'H₂ de 275 ± 2 mL_{H2}/L_{bioréacteur} est obtenu en moyenne pour le lot 1 et de 237 mL_{H2}/L_{bioréacteur} pour le lot 2 (tableau 61).

La cinétique de production d'H₂ à partir de l'ensilage de seigle est constituée d'un pic unique dont le maximum est supérieur à 1 mL/min pour le lot 1 et de 0,22 mL/min entre 19 h et 22 h de fermentation pour le lot 2. Après ce pic, la production diminue progressivement, la fermentation dure environ 12 heures auxquelles il faut ajouter environ 8 h de phase de latence pour le lot 1 alors que pour le lot 2, avec une phase de latence similaire (10 h), la production s'étend sur une durée plus longue (20 h) à un débit plus faible pour décroître enfin au bout de 35 h. On notera que les profils de débit de production d'H₂ présentés pour le lot 1 sont répétables (figure 93a).

Initialement pour le lot 1, le milieu de fermentation de l'ensilage de seigle est riche en lactate (10,7 mM) et, dans une moindre mesure, en sucres monomériques solubles (glucose et fructose, respectivement 1,2 mM et 1,9 mM), en acétate (3,3 mM), en succinate (3,0 mM) et en butyrate (1,4 mM) (figure 93b). Une solubilisation des métabolites sous l'effet de l'agitation est observée sur les premières heures d'expérience ainsi que la production de formiate (+2,2 mM) et la consommation totale du glucose. La quantité de succinate reste stable au cours de la fermentation. À la fin de la fermentation, le glucose et le fructose sont consommés que partiellement. La production d'H₂ est accompagnée de la production de butyrate (+12,6 mM) et d'acétate (+11,7 mM), présents en fin de fermentation, en quantité quasi équivalente. Parmi les voies métaboliques concurrentes, notons principalement la production d'éthanol (+6,4 mM).

L'analyse des concentrations en métabolites solubles pour le lot 2 dans le milieu réactionnel initial montre une teneur importante en acides : acétate (9,8 mM), lactate (7,3 mM) et butyrate (4,0 mM) avec l'absence de glucose et de fructose. La phase de latence se caractérise par une augmentation de la quantité de butyrate (+4,4 mM) et de propionate (+1,7 mM) et une consommation le lactate (-5,9 mM) et dans une moindre mesure de l'acétate (-0,9 mM) sans la moindre production d'H₂ détectée. Ce fait expérimental différencie la fermentation du lot 2 d'ensilage de seigle des tests précédents où le lactate semblait plutôt consommé pendant la phase de production d'H₂. Un *shift* métabolique semble avoir lieu en fin de fermentation, probablement à cause de la consommation de lactate. En effet, les quantités d'acétate et de butyrate augmentent (+9,8 mM et +4,5 mM, respectivement) entre 6 h et 50 h. La quantité de propionate augmente légèrement (+2,7 mM) et la quantité d'éthanol diminue très légèrement (-0,5 mM).

Les performances de production d'H₂ et les paramètres de l'équation de Gompertz des deux lots d'ensilage de maïs sont présentés dans le tableau 61. Ils montrent la bonne reproductibilité de la fermentation du lot 1.

Tout comme pour l'ensilage de maïs, un faible rendement en H_2 est obtenu pour l'ensilage de seigle respectivement 0,33 mol_{H2}/mol_{sucres totaux} pour le lot 1 et 0,24 mol_{H2}/mol_{sucres totaux} pour le lot 2.

Tableau 61 : Performances de la production d'H ₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obs	cure de
l'ensilage de seigle (lot 1)	

	Páplicat	Production		dement	Productivité max	Latence (λ)	Pannart H /CO
	Replicat	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(L _{H2} /kg _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	Rapport H2/CO2
	1	274	14,3	0,16	119	6,6	1,14
1-+1	2	277	14,4	0,16	87	8,0	0,97
	3	275	14,4	0,16	87	7,8	0,78
	Moyenne	275 ± 2	$14,4 \pm 0,1$	0,16 ± 0,01	98 ± 18	7,5 ± 0,8	0,96 ± 0,18
Lot 2	1	237	14,4	0,16	21	9,0	0,46

Malgré une production modeste (275 ± 2 mL_{H2}/L_{bioréacteur} pour le lot 1 et 237 mL_{H2}/L_{bioréacteur} pour le lot 2) et des rendements faibles pour les deux lots en termes de matières sèches (14,4 ± 0,1 L_{H2}/kg_{MS}) et de sucres (0,16 ± 0,01 mol_{H2}/mol_{sucres} pour le lot 1 et 0,17 mol_{H2}/mol_{sucres} pour le lot 2), la productivité maximale est assez élevée pour le lot 1 (en moyenne 98 ± 18 mL_{H2}/L/h) mettant en évidence une cinétique de production en réacteur semi-batch rapide alors que la productivité maximale est très faible pour le lot 2 (21 mL_{H2}/L/h). Le rapport molaire H₂/CO₂ proche de 1 témoigne d'un métabolisme orienté vers la production d'H₂ pour le lot 1 et celui-ci est nettement moins favorable pour le lot 2 avec un rapport molaire H₂/CO₂ divisé par 2.

Annexe 2 : Stabilisation de la biomasse d'ensilage de maïs par congélation

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence les phénomènes pouvant intervenir pendant le stockage de la biomasse à l'air et montré leur impact sur la production d'H₂ par fermentation endogène. Ce fait expérimental souligne donc la nécessité de stabiliser la biomasse pour disposer d'une qualité de biomasse et d'un potentiel de production d'H₂ répétable dans le temps afin de pouvoir mener des études répétables sur l'utilisation de la biomasse. La congélation de la biomasse, qui permet de « figer » la matière fermentescible et les bactéries, pourrait offrir de telles garanties.

En effet, la congélation est un moyen de conservation dont le principe s'appuie sur deux phénomènes : la limitation de l'activité de l'eau (eau libre pour la croissance des microorganismes) et la réduction de la température à un seuil trop faible pour le développement de microorganismes mésophiles (Speck et Ray, 1977). La congélation peut également altérer la viabilité des microorganismes et peut réduire la charge bactérienne de la biomasse. Deux mécanismes ont été proposés : lors de la congélation, des cristaux de glace se forment dans le milieu intracellulaire et peuvent endommager la cellule par l'augmentation de son volume ou par l'augmentation de la concentration en sels pendant la phase de formation des cristaux dans le milieu intracellulaire (Stenberg 1998).

La congélation semble cependant dans notre cas être un bon compromis entre préservation du potentiel de production d'H₂ de la biomasse et conservation d'une flore endogène. Dans la littérature, d'autres méthodes

de stockage de la biomasse sont décrites. Celles-ci visent à maintenir la qualité de la biomasse sans tenir compte de la microflore de la biomasse puisque les fermentations sont inoculées à partir de *consortia* exogène. La méthode la plus utilisée pour les biomasses lignocellulosiques obtenues à partir de la plante de maïs est le séchage à basse température (< 60°C) qui permet d'éviter les pertes de matières volatiles. Benito Martin *et al.* (2017), Cao *et al.* (2009), Cheng *et al.* (2012), Guo *et al.* (2014) Li *et al.* (2014) mettent en œuvre cette technique avant le broyage de la biomasse et son conditionnement à température ambiante ou à 4°C.

Ainsi, la congélation peut être considérée comme un prétraitement favorisant les bactéries ayant des mécanismes de résistances au stress comme les bactéries sporulantes, parmi lesquelles des bactéries productrices d'H₂. Les objectifs de cette partie seront de déterminer les effets de la congélation sur la stabilisation du potentiel de production d'H₂. Pour ce faire, un triplicat de fermentation est réalisé aux environs de 100 jours de congélation et est complété par un essai de contrôle après 242 jours de congélation. Enfin, les effets de la congélation sur le potentiel de production d'H₂, le métabolisme, et les *consortia* fermentaires seront analysés par rapport aux données fermentaires de la biomasse fraîche.

2.1 Fermentation obscure d'ensilage de maïs congelé

La figure 94 présente le débit d'H₂ produit et la concentration des métabolites dans le milieu au cours de la fermentation d'ensilage de maïs congelé.



<u>Figure 94</u> : Débit d'H₂ (a) et concentration en métabolites (b) au cours de la fermentation d'ensilage de maïs congelé (-20°C) pour un triplicat à environ 100 jours et pour le test à 242 jours de congélation. Les barres d'erreurs représentent la variabilité sur les 4 échantillons (n = 4)

Les profils des débits d'H₂ extraits du bioréacteur sont similaires entre les réplicats et proches qualitativement de la cinétique décrite pour le maïs « frais » (Annexe 1), à savoir, une fermentation de 48 h, un pic de production d'H₂ initial suivi d'une phase de fermentation découpée en plusieurs étapes. Lors de la fermentation d'ensilage de maïs congelé, on note trois phases de production successives qui sont plus marquées que pendant la fermentation de la biomasse « fraîche ». En effet, pour la biomasse congelée, la deuxième phase de production (pic entre 20 h et 24 h de fermentation) présente des débits *maxima* équivalents à ceux de la première phase (0,6 - 0,8 mL/min). La troisième phase est également plus marquée dans le cas de l'ensilage congelé que pour la biomasse « fraîche ».

L'analyse des métabolites dans le milieu de fermentation révèle un métabolisme similaire à celui observé pour la biomasse « fraîche ». Une augmentation significative de la concentration en butyrate (+13,1 mM) et en acétate (+13,2 mM) dans le milieu réactionnel associée à une production d'H₂ et à la consommation du lactate (totale à partir de 32 h) est observée entre 8 h et 32 h ce qui est pertinent avec les phénomènes décrits dans l'annexe 1. Pendant cette période, la teneur en formiate augmente avant de diminuer, la teneur en éthanol et en propionate augmente et cette dynamique se poursuit jusqu'à la fin de la fermentation. Enfin, on note une concentration élevée en acétate en fin de fermentation (34,1 mM) issue de voies non productrices d'H₂ et qui démontre une diversification du métabolisme fermentaire en fin d'expérience.

Le tableau 62 présente les performances de production d'H₂ entre les réplicats.

<u>Tableau 62</u> : Rendements de la production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs congelé

Temps de stockage à -20°C	Production	Rendement		Productivité	Latence (λ)	Rapport
(jours)	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(L/kg _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	H ₂ /CO ₂
95	605	25,4	0,24	45	8,1	0,56
102	792	33,4	0,31	71	9,8	0,71
104	655	27,6	0,25	71	8,2	0,59
242	707	29,9	0,27	53	9,9	0,42
Moyenne	690 ± 80	29,1 ± 3,4	0,27 ± 0,03	60,3 ± 13,3	9,0 ± 1,0	0,57 ± 0,12

Les réplicats présentent des valeurs du même ordre de grandeur en termes de productions, de rendements, de productivité d'hydrogène et de rapport molaire de gaz produits. Notons toutefois que le potentiel de production d'H₂ du réplicat à 102 jours de stockage présente des valeurs de performances sensiblement supérieures aux trois autres réplicats (rendement supérieur à 33 L_{H2}/kg_{MS}).

Les valeurs de productions d'H₂ obtenues avec la biomasse stockée 242 jours à -20°C sont dans l'ordre de grandeur des données du triplicat de fermentation à 100 jours de congélation ce qui montre que la congélation a permis de stabiliser la biomasse sur une longue période.

Ainsi, les 4 essais de fermentation mettant en œuvre de la biomasse d'ensilage de maïs congelée sur une période allant de 95 à 242 jours montrent des performances de production d'H₂ assez répétables, qui sont illustrées par des profils de production de débit d'H₂ et des concentrations en métabolites dans le milieu réactionnel similaires entre les réplicats.

2.2 Effet du stockage de l'ensilage de maïs à -20°C sur la fermentation obscure par rapport à la biomasse « fraîche »

Les performances de production d'H₂ obtenues lors de la fermentation d'ensilage de maïs stocké à -20°C (95 - 242 jours) sont comparées directement avec les données des fermentations de biomasse « fraîche », stockée à 4°C pendant 10 jours.

La figure 95 illustre la comparaison du potentiel de production d'H₂ des biomasses d'ensilage de maïs « frais » et congelé.





Les fermentations à partir de biomasses « fraîches » et congelées présentent des cinétiques de production d'H₂ similaires sur les 20 premières heures de fermentation (figure 95a). À partir de cette durée, la production d'H₂ de la biomasse « fraîche » ralentit alors que celle de la biomasse congelée se maintient permettant une production cumulée totale plus importante pour cette dernière.

L'analyse des métabolites produits dans le milieu de fermentation (figure 95b) met en évidence un métabolisme globalement similaire en fin de fermentation obscure, quelle que soit la température de stockage. Notons tout de même l'amélioration du rapport molaire B/A (augmentation de la teneur en butyrate couplée à une baisse de la teneur en acétate) et une baisse de la concentration en éthanol lors de la fermentation d'ensilage congelé par rapport à la biomasse « fraîche », qui illustre une importante réduction de l'acétogenèse et de la solvantogenèse, expliquant certainement en partie l'augmentation du potentiel H₂.

Au cours de la fermentation, plusieurs espèces bactériennes ont émergé dans le milieu réactionnel (figure 95c). Les *Clostridii* majoritaires dans les deux expériences sont présentes avec des abondances assez proches. *Clostridium butyricum/beijerincki/diolis* (19%) coexistent avec *Clostridium sp.* (*15%*) en fermentation de la biomasse « fraîche », alors que *Clostridium sp.* (*26%*) est majoritaire dans le milieu fermentaire de la biomasse congelée suivi par *Clostridium butyricum/beijerincki/diolis* (13%). Le *taxon Clostridium ljundahli* est présent dans des proportions similaires dans les deux tests (8%). La différence de *consortium* bactérien entre biomasse fraîche et congelée est marquée au niveau des autres genres bactériens. Dans l'ensilage de maïs « frais », les bactéries lactiques et *Coprococcus sp.* sont très abondantes à 24h de fermentation. Lors de la fermentation de la biomasse congelée, les *E. coli* et *Enterococcus spp.* représentent une part significative des bactéries du *consortium*. Les bactéries lactiques ne sont pas présentes et le *taxon Coprococcus sp.* est peu abondant dans le milieu réactionnel. La régression de l'espèce *Lactobacillus plantarum* dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation de la biomasse congelée est tout à fait remarquable puisque cette bactérie présente un effet inhibiteur sur les bactéries productrices d'H₂ (Noike *et al.*, 2002 ; Saady, 2013).

Le métabolisme global de la fermentation de l'ensilage de maïs congelée semble plus efficace pour la production d'H₂ avec une production de butyrate plus importante et une production d'acétate par homoacétogenèse moins marquée. Ce métabolisme pourrait être lié à la présence spécifique dans le milieu des *E. coli* et des *Enterococcus spp.,* des bactéries productrices d'H₂ et à l'absence des bactéries lactiques. La congélation est donc favorable à des espèces bactériennes productrices d'H₂ et semble inhiber le développement des bactéries lactiques (*Lactobacillii*) (non productrices d'H₂).

Le tableau 63 présente les paramètres de performances de production d' H_2 et de l'équation de Gompertz de ces tests de fermentation.

<u>Tableau 63</u> : Performances de production d'H₂ et paramètres de l'équation de Gompertz lors de la fermentation obscure d'ensilage de maïs frais (4°C ; bleu) et d'ensilage de maïs congelé (-20°C ; orange).

Biomasse	Production	Ren	dement	Productivité	Latence (λ)	Rapport
(mode de stockage)	(mL _{H2} /L _{bioréacteur})	(L _{H2} /kg _{MS})	(mol _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	H_2/CO_2
Ensilage de maïs (frais)	535 ± 2	22,5 ± 0,2	0,21 ± 0,01	40,7 ± 13,1	8,4 ± 1,3	0,46 ± 0,00
Ensilage de maïs (congelé)	690 ± 80	29,1 ± 3,4	0,27 ± 0,03	60,3 ± 13,3	9,0 ± 1,0	0,57 ± 0,12

Le potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de maïs congelé est sensiblement supérieur à celui de l'ensilage de maïs frais à la fois en termes de production en H₂ (+29 %), de rendement en H₂ (+29 %) et de productivité en H₂ (+48 %).

Notons que le rapport H₂/CO₂ s'améliore avec la congélation, ce qui signifie que le métabolisme global des *consortia* bactériens est plus orienté vers la production d'H₂ que dans le cas de la biomasse fraîche. Cela peut être dû à l'inhibition des bactéries non productrices ou hydrogénotrophes constatée lors de l'analyse des communautés bactériennes dans le milieu réactionnel puisque la congélation peut être létale pour de nombreuses bactéries (Postgate et Hunter, 1961; Speck et Ray, 1977).

In fine, l'effet de la congélation sur la stabilisation de l'ensilage de maïs à 100 jours et 242 jours est satisfaisant et le potentiel de production d'H₂ de la biomasse est légèrement amélioré. La congélation semble inhiber une partie des bactéries lactiques concurrentes vis-à-vis du substrat et favorise des bactéries qui participent à la production d'H₂ (*Enterococcus* et *Escherichia*). Bien que ce mode de stockage ne soit pas réalisable à grande échelle, il est pertinent pour des tests à l'échelle laboratoire afin de maintenir les performances de production d'H₂ sur un lot d'ensilage de maïs.

2.3 Discussion sur l'impact de la congélation de la biomasse

Des travaux antérieurs au laboratoire ont montré que la congélation limitait la fermentation intrinsèque des sucres au cours du temps dans les biomasses riches en sucres solubles et permettait une stabilisation des biomasses en termes de production d'hydrogène (François-Lopez, 2016). Le constat est similaire pour notre étude où le potentiel H₂ de la biomasse est globalement conservé avec une légère amélioration de la production pour la biomasse congelée. À l'échelle du laboratoire, la congélation est donc un bon moyen de stockage de la biomasse pour conserver des performances et une reproductibilité acceptable.

En ce qui concerne l'amélioration du potentiel de production d'H₂ (objectif de seconde intention), des augmentations du volume d'H₂ produit de près de 30 % ont été notées pour l'ensilage de maïs. Les prétraitements frigorifiques des *consortia* bactériens ont été décrits dans la littérature à plusieurs reprises (Bundhoo *et al.*, 2015) et rapportés dans le tableau 64.

Tableau 64 : Effet du prétraitement de l'inoculum par congélation - décongélation (d'après Bundhoo et al., 2015 et complété)

Inoculum	Prétraitements	Rendement en H ₂	Référence
Digestat de réacteur anaérobie	<u>Substrat</u> : glucose Congélation : 24h (-10°C)	Contrôle : 21,84 mL/g _{glucose} Traité : 45,82 mL/g _{glucose}	Cheong et Hansen (2006)
	Decongelation : 6h (30°C)	Δ : +109,8 %	
		Préacidification de l'inoculum (pH = 3, 48h)	
		Contrôle : 11,77 mL/g _{glucose}	
		Traité : 78,80 mL/g _{glucose} Δ : +569,5 %	
Boue d'estran	<u>Substrat</u> : glucose	Contrôle : 0,20 mol/mol _{glucose}	Liu <i>et al</i> . (2009)
	Congélation : 24h (-17°C)	Traité : 0,17 mol/mol _{glucose}	
	Décongélation : 12h (25°C)	Δ:-15%	
Boues de réacteur	Substrat : glycérol résiduel du diesel	Contrôle : 1,20 %mol/g _{glycérol}	Rossi <i>et al</i> . (2011)
anaérobie	Congélation : 24 h (-10°C)	Traité : 13,4 %mol/g _{glycérol}	
	Decongelation : 6 h (30°C)	Δ:+11,6 %	
Clostridium	<u>Substrat</u> : boues d'eaux usées	Contrôle : 0,6 mmol/g _{DCO}	Wang <i>et al</i> . (2003)
bifermentans isolée à	Congélation : 24 h (-17°C)	Traité : 1,5 mmol/g _{DCO}	
partir de boues d'eaux usées	Décongélation : 12 h (25°C)	Δ:+150 %	
Digestat de réacteur	<u>Substrat</u> : effluents de pressoirs à palme	Contrôle : 28,9 mL/g _{DCO}	Mohammadi <i>et al</i> .
anaérobie	Congélation : 24 h (-10°C)	Traité : 45,7 mL/g _{DCO}	(2011)
	Décongélation : jusqu'à T _{amb. (} 30°C)	Δ:+58,3 %	
Granules de fond de	<u>Substrat</u> : effluents de pressoirs à palme	Contrôle : 11,31 mL/g _{DCO}	Mohammadi <i>et al</i> .
réacteur anaérobie	Congélation : 24 h (-10°C)	Traité : 14,87 mL/g _{DCO}	(2012)
	Décongélation : jusqu'à T _{amb. (} 30°C)	Δ:+31,5 %	
Boues de step/	Substrat : fraction organique des ordures	Prétraitement de l'inoculum	Dauptain <i>et al</i> . (2021)
Digestat anaérobie/	ménagères	(90°C, 15min)	
Lixiviats de décharge	Congélation : 7 jours (-20°C)	Contrôle : 30,8/15/33 mL/g _{MV}	
	Décongélation : 12 h (25°C)	Traité : $16/32/36 \text{ mL/g}_{MV}$	
	Culestant , dáskata alian autoirea	$\Delta: -48 / +113 / +9\%$	
	Substrat: decrets alimentaires	Pretraitement de l'inoculum	
	Décongélation : 12 h (25°C)	Contrôle : 115/96/129 ml /g.u.	
		Traité · 123/114/120 ml /g _{MV}	
		Δ:+7/+19/-7%	
Digestat anaérobie	<u>Substrat</u> : mix de poudre de riz et de laitue	Contrôle : 17,95 mL/g _{MV}	Dong <i>et al</i> . (2010)
	Congélation : 24 h (-17°C)	Traité : 25,63 mL/g _{MV}	
	Décongélation : 12 h (25°C)	Δ:+42,8 %	
Microflore endogène	Substrat : bourbes vitivinicoles	Contrôle : 1,30 mol/mol _{hexose}	François-Lopez (2016)
	Congélation : 35 j - 115 j (-20°C)	Traité : 1,74 mol/mol _{hexose}	
	Décongélation : 30 min (25°C)	Δ:+25,4 %	
Microflore endogène	<u>Substrat</u> : ensilage de maïs	Contrôle : 23,5 mL/g _{MV}	Cette étude
	Congélation : 100 j - 242 j (-20°C)	Traité : 30,4 mL/g _{MV}	
	Décongélation : 10 min (25°C)	Δ:+29,4 %	

L'analyse du tableau 64 montre qu'une grande partie des *inocula* bactériens est prélevée dans des milieux anaérobies (*consortia* issus de réacteurs en anaérobie). La congélation et décongélation sont sélectionnées dans la plupart des études comme un prétraitement pour enrichir des *inocula* provenant de milieux anaérobies en bactéries productrices d'H₂ et inhiber les bactéries consommatrices d'H₂ qui sont moins résistantes au froid (Dong *et al.,* 2010). Notre étude est la seule avec celle de François-Lopez (2016) à investiguer l'effet de la congélation sur la flore endogène totale de la biomasse.

Les protocoles de congélation sont assez homogènes : les *inocula* bactériens sont congelés à des températures variant de -10°C à -20°C pendant environ 24 h puis décongelés à 30°C pendant plusieurs heures (à l'exception des groupes de Dauptain *et al.* (2021) qui a congelé *l'inoculum* pendant 7 jours et de François-Lopez (2016) qui teste la stabilité du potentiel de production d'H₂ de bourbes vitivinicoles pendant 115 jours). Ainsi, les études de la littérature se sont principalement intéressées à des durées de congélation plutôt courtes au regard de celles qui ont été testées notre étude (100 et 242 jours).

En ce qui concerne le mode opératoire, des différences existent entre les études : Cheong and Hansen (2006) combinent leur traitement à une phase d'enrichissement avant fermentation obscure et une pré-acidification de l'*inoculum* bactérien pendant 48 h à pH = 3. Dauptain *et al.* (2021) prétraitent leur *inoculum* à 90°C pendant 15 min préalablement à la congélation pour inhiber l'activité des organismes méthanogènes.

Notons que dans certaines études (Cheong and Hansen, 2006; Dauptain *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2011), le temps de décongélation est assez long (entre 6 h et 12 h) et s'effectue parfois à 30°C, une température proche des *optima* de température pour la fermentation obscure ce qui pourrait entraîner une reprise de l'activité du métabolisme des bactéries de *l'inoculum*, mais des gains de production d'H₂ sont tout de même observés.

Les substrats utilisés sont divers avec notamment des monosaccharides (glucose), des effluents, déchets ou sous-produits (effluents de pressoirs à palme, boues de station d'épuration, glycérol, déchets alimentaires, bourbes vitivinicoles), des biomasses végétales (mixture de riz et de laitue, ensilage de maïs).

Les gains de production sont très variables et compris pour une majorité d'études entre 30 % et 50 %, conformes à nos observations. Ils s'échelonnent de -48 % à +569,5 %. Ces variations s'expliquent par la diversité des conditions testées même si les températures de fermentation favorisent toutes des communautés microbiennes mésophiles (35 - 37°C) et des *inocula* bactériens qui diffèrent malgré leur origine commune (milieux anaérobies).

Dans la plupart des études, la congélation a rempli son rôle et a permis d'améliorer le potentiel de production $d'H_2$ de l'*inoculum* comme l'illustre Cheong and Hansen (2006) ; Mohammadi *et al.* (2011) et Wang *et al.* (2003) et dans une proportion plus modeste Dong *et al.* (2010) et François-Lopez (2016) même si l'objectif de cette dernière étude était la stabilisation de la biomasse.

Cheong and Hansen (2006) montrent également que la congélation améliore nettement la productivité en hydrogène et de façon comparable à celle atteinte avec un prétraitement à l'acide perchlorique, qui dans cette étude, permet d'obtenir le meilleur potentiel H₂. Rossi *et al.* (2011) notent que l'augmentation de la production d'H₂ par le prétraitement s'accompagne aussi d'une augmentation de la consommation du substrat mesurée par l'efficacité d'utilisation du glycérol : de 48 % à 60 %. Ce résultat interroge quant à la

sélection des bactéries lors du prétraitement, puisqu'avec une diversité de bactéries moindre, la consommation du substrat est améliorée. Ce constat est partagé également par Mohammadi *et al*. (2012) qui observent une légère amélioration de la consommation de la DCO pour tous les prétraitements testés.

En revanche, pour Liu *et al.* (2009), la congélation n'améliore pas la production H₂ par rapport à la référence, ce qui montre les limites de la congélation dans le cas du prétraitement d'un *inoculum* issu d'un milieu à forte teneur en sel (boues d'estran). Les auteurs notent une modification du métabolisme de la fermentation puisque la proportion d'H₂ détectée dans les gaz du bioréacteur augmente de 12,2 % à 21,5 %. Dans cette étude, il semble que la congélation pendant 24 h n'a pas permis d'inhiber la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* dont l'effet inhibiteur sur les bactéries productrices d'H₂ pourrait avoir impacté le potentiel de production d'H₂ (Noike *et al.*, 2002 ; Saady, 2013), à l'inverse de notre étude où peu de bactéries lactiques sont détectées après congélation pendant de nombreux jours.

L'effet de la congélation sur la production de métabolites n'a pas été systématiquement rapporté. Dong et al. (2010) observent une augmentation de la production d'acétate par rapport au contrôle et une diminution du rapport molaire B/A puisque la production de butyrate reste stable. Cet acétate ne semble pas avoir été produit par une voie co-productrice d'H₂. Pour la fermentation du glycérol, l'effet est différent : le rapport molaire B/A augmente consécutivement à la diminution de production d'acétate et l'augmentation de la production de butyrate (Rossi et al. 2011) ; une quantité non négligeable de 1, 3 propanediol est détectée. Ce métabolite est typique de Klebsiella spp. qui fait partie des bactéries majoritaires pour la fermentation du glycérol (Rossi et al., 2011). La comparaison des mécanismes de fermentation de l'ensilage de maïs (nos travaux) aux travaux de Rossi et al. (2011) sur la fermentation du glycérol souligne des différences majeures entre les deux substrats, métabolites produits et bactéries fermentaires (Klebsiella spp. et Pantoea). François-Lopez (2016) note une modification significative du métabolisme au cours de la fermentation endogène de bourbes vitivinicoles congelées avec une inhibition de la production d'éthanol et une production significative d'acétate et de butyrate. Concernant l'effet à long terme de la congélation de la biomasse sur le métabolisme de la fermentation endogène de la biomasse, François-Lopez (2016) observe de très légères différences sur le métabolisme global de la fermentation, mais qui ne semblent pas être corrélées au temps de stockage à -20°C, ce qui est cohérent avec nos résultats obtenus avec la biomasse d'ensilage de maïs. Dauptain et al. (2021) observent des variations métaboliques cohérentes avec les variations de production d'H₂: l'augmentation de la production d'H₂ étant liée à une production accrue de butyrate et à l'inverse, la diminution de la production d'H₂ s'accompagne d'une diminution de la production d'acides ou d'une production accrue d'éthanol (voie métabolique non productrice d'H₂). Ils observent un enrichissement du consortium fermentaire en bactéries de la famille des Clostridiales après une semaine de congélation suggérant que la congélation est un traitement qui permet de sélectionner des bactéries sporulantes capables de produire de l'H2. Pour un temps de stockage à -20°C plus long (1 1/2 mois), l'augmentation du potentiel de production H₂ n'est plus significative par rapport aux inocula bactériens de référence non congelés et d'autre part une diversification des *consortia* fermentaires est observée avec l'apparition de *Clostridiales*, d'*Enterobacteriales* et de *Bacillales*. Avec la flore endogène de bourbes vitivinicoles, la diversité bactérienne semble régresser sur le long terme selon les travaux de François-Lopez (2016) avec une diminution de l'abondance des bactéries minoritaires au profit des bactéries du genre *Clostridium*. Cette réorientation du *consortium* ne semble cependant pas impacter positivement et de manière significative le potentiel de production d'H₂.

Ainsi, il apparaît que la congélation, quand elle est utilisée pour traiter des *inocula* bactériens issus de milieux anaérobies, améliore dans la plupart des cas le potentiel de production d'H₂. Au travers des études de la littérature, il semble difficile de statuer sur les modifications du métabolisme par la congélation. Cependant, dans notre étude, la stabilisation des performances de production de la biomasse ensilée et sa microflore sur le long terme lors du stockage à -20°C est mis en évidence et demeure à ce jour unique à l'examen de la littérature.

Annexe 3 : Stabilisation de l'ensilage de seigle par congélation

3.1 Production de gaz et de métabolites

L'ensilage de seigle (lot 1) a été stockée à -20°C dans le but de limiter tout phénomène biologique pouvant modifier le potentiel hydrogène de la biomasse afin de disposer d'une qualité de biomasse stable, condition *sine qua none* pour pouvoir mesurer l'effet des prétraitements appliqués.

La figure 96 représente le volume d'hydrogène cumulé, les métabolites produits et les molécules consommées au cours de la fermentation de l'ensilage de seigle en fonction de plusieurs durées de stockage (inférieures à 167 jours et supérieurs à 360 jours), ces données seront comparées aux valeurs obtenues pour la fermentation de l'ensilage de seigle « frais » (< 30 jours).



<u>Figure 96</u> : Effet de la durée de congélation de l'ensilage de seigle sur la production d'hydrogène et le métabolisme au cours de la fermentation obscure endogène. Les barres d'erreur indiquent la variabilité (Seigle congelé > 360 jours, n= 2 ; seigle congelé < 167 j, n = 4, seigle frais, n = 3).

Le tableau 65 présente les paramètres de performances de production d'hydrogène et de l'équation de Gompertz de la fermentation de l'ensilage de seigle lot 1 frais et congelé.

	Stockage	Production	Rendement	Productivité max	Latence	Rapport
(j)	$(mL_{H_2}/L_{bioréacteur})$	(mL _{H2} /mol _{sucres})	(mL _{H2} /L/h)	(h)	H ₂ /CO ₂	
Fraîche	50 j	275 ± 2	0,16 ± 0,01	98 ± 18	7,5 ± 0,8	1,0 ± 0,2
Congelée	< 167 j	318 ± 20	$0,19 \pm 0,01$	93 ± 21	8,9 ± 1,3	1,1 ± 0,1
Congelée	> 360 j	537 ± 17	0,32 ± 0,01	182 ± 12	10,3 ± 0,6	0,7 ± 0,1

<u>Tableau 65</u> : Effet de la durée de congélation sur les paramètres de performances et de l'équation de Gompertz de la production d'hydrogène de l'ensilage de seigle lot 1 frais et congelé par fermentation obscure.

La congélation a un effet positif sur le potentiel hydrogène de l'ensilage de seigle qui semble s'intensifier en fonction la durée de conservation à -20°C. Le stockage à -20°C a permis de stabiliser la biomasse et son potentiel de production d'hydrogène (+16 %) sur une période d'environ 167 jours. Une extension de la durée de stockage à 360 jours a montré une nette augmentation de la production d'H₂ (+95 %) et la productivité est quasiment doublée (de 93 à 182 mL_{H2}/L/h) par rapport aux expériences réalisées à 167 jours à -20°C. De plus, la congélation semble augmenter le temps de latence des *consortia* fermentaires comme l'avaient relevé Squires et Hartsell (1955) avec la bactérie *Escherichia coli*.

Au cours du stockage à -20°C, les métabolismes des tests de fermentation sont variables comme le montre l'évolution du rapport molaire Butyrate/Acétate. Lors de la fermentation d'ensilage de seigle frais, la production d'hydrogène s'effectue par les voies de l'acétate et du butyrate de façon équilibrée alors que le métabolisme fermentaire de la biomasse congelée à 167 jours présente une production de butyrate plus faible. Les tests de fermentation de biomasses stockées plus de 360 jours à -20°C se distinguent par une réorientation de la production d'hydrogène par la voie du butyrate et une diminution de la production d'acétate qui permettent d'améliorer le rendement de production d'H₂ (de 0,16 à 0,32 mol_{H2}/mol_{sucres}) issu majoritairement de la voie du butyrate (B/A = 2,1) malgré l'augmentation de la production de propionate. La congélation permet également la réduction de la production d'éthanol par solvantogenèse.

3.2 Etudes des consortia fermentaires

Les abondances des *consortia* au cours de la fermentation d'ensilage de seigle stocké selon différentes températures et durées sont présentées sur la figure 97.



<u>Figure 97</u> : Abondances relatives des séquences du gène codant pour l'ARN 16S des *consortia* bactériens de la fermentation endogène d'ensilage de seigle pendant la production d'H₂ pour différents temps et températures de stockage.

La congélation a un impact significatif sur les *consortia* fermentaires. Par rapport au test effectué avec de la biomasse fraiche où le taxon apparenté à *Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis* est majoritaire (49 %), la biomasse congelée à 167 jours est dominée par les *Enterobacter spp*. (62 %). Au terme de 360 jours de congélation, le taxon des *Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis* redevient le plus abondant parmi le *consortium* (54 %). On note également l'émergence de bactéries lactiques du genre *Enterococcus spp*. et le déclin des *Enterobacter spp*. pour des temps de conservation longs à -20°C. Ces modifications de flore fermentaire sont cohérentes avec les changements de métabolisme observés en fonction de la durée de congélation. En effet, la biomasse congelée 167 jours est dominée par les *Enterobacter spp*. dont le métabolisme est plus favorable à la production d'H₂ par la voie de l'acétate, d'où un ratio B/A favorable à l'acétate (Fabiano and Perego, 2002 ; Hu *et al.*, 2013 ; Ito *et al.*, 2005). Pour les autres tests de fermentation,

la production de butyrate semble associée à la présence du taxon apparenté à *Clostridium* butyricum/beijerinckii/diolis.

3.3 Conclusion sur l'effet de la congélation

Cette étude montre que le potentiel de production d'H₂ de l'ensilage de seigle peut être stabilisé à -20°C pendant 167 jours malgré des changements majeurs parmi les consortia fermentaires dont un métabolisme plus favorable à la production d'acétate. Après 360 jours de congélation, le potentiel de production d'H₂ est doublé. Cette amélioration résulte d'un métabolisme fermentaire efficace (réduction de la production d'acétate par homoacétogenèse) pour la production d'H₂ par la voie du butyrate associé à la présence du taxon *Clostridium butyricum/beijerinckii/diolis*.

La congélation impacte les *consortia* bactériens qui émergent lors de la fermentation de l'ensilage de seigle et oriente le métabolisme fermentaire. Par ailleurs, l'analyse des composés solubles au cours de la fermentation contribuerait à identifier les effets de la congélation sur la structure des cellules végétales de l'ensilage de seigle et sur la biodisponibilité en substrat.

Annexe 4 : Effet de la boucle de recirculation sur la production d' H_2 en BRM

4.1 Contexte et mise en œuvre

Le bioréacteur membranaire utilisé dans cette étude n'est pas agité. Dans la littérature, le manque d'agitation des bioréacteurs à bactéries fixées ou à bactéries granulaires est l'un de leur principal inconvénient (Fontes Lima et Zaiat, 2012). Le manque d'agitation limite les transferts de masse dans le bioréacteur entre, d'une part, les bactéries et le substrat et d'autre part, entre la phase gazeuse et la phase liquide (Kumar et al., 2016). Par ailleurs, le manque d'agitation peut conduire, notamment dans les bioréacteurs à lit fixe, à la mise en place d'un gradient de pH et de nutriments (Show et al., 2011 ; Tashyrev et al., 2017) associé à une distribution inhomogène des microorganismes et du métabolisme, réduisant ainsi la production d'H₂ (Tomczak et al., 2018). L'utilisation d'une boucle de recirculation a été identifiée comme une solution pour homogénéiser le milieu réactionnel. L'effet de la recirculation du milieu fermentaire a été relativement peu étudié dans la littérature. Fontes Lima et Zaiat (2012) obtiennent un optimum de production d'H₂ avec un taux de recirculation (rapport entre le débit de la recirculation et le débit d'alimentation) de 0,5 en bioréacteur à lit fixe. Un taux de recirculation identique est appliqué dans les travaux de dos Reis et Silva (2014) et Tomczak et al. (2018). En réacteur à biomasse granulaire ou fluidisée, le taux de recirculation est défini par la vitesse de circulation des liquides dans le réacteur. Peu d'études évaluent l'effet de la vitesse de circulation des liquides sur la production d'H₂, celle-ci étant fixée en fonction du support utilisé (dans le cas d'un réacteur à lit fluidisé). À titre d'exemple, Cavalcante de Amorim et al. (2009) et Ferreira et al. (2020) choisissent des vitesses de circulation 1,3 fois supérieures à la vitesse minimale requise pour fluidifier les supports, respectivement 1,61 cm/s et 1,24 cm/s. Wu et al. (2007) montrent une augmentation de la productivité en H₂ avec la vitesse de circulation dans le bioréacteur (maximum testé à 0,91 cm/s). À vitesse de circulation supérieure, dos Reis et Silva (2011) montre que la production d'H₂ est meilleure à une vitesse de circulation de 1,24 cm/s comparée à une vitesse de 1,88 cm/s.

Dans notre système la boucle de recirculation, placée à la sortie de l'effluent liquide, permet la recirculation des sucres non consommés et des bactéries lessivées et de doubler le débit de liquide dans le module, ce qui entraîne une diminution du temps de séjour dans la calandre par augmentation du débit des liquides améliorant ainsi l'homogénéisation du milieu réactionnel dans la calandre. Par ailleurs, il faut noter que la recirculation a un effet de dilution de la solution d'alimentation avec du fermentât riche en co-produits de fermentation (acides organiques et en alcools).

Une première étude est donc réalisée pour étudier l'impact de la recirculation du digestat sur la production d'H₂ lors de la fermentation obscure de glucose en bioréacteur membranaire. Pour ce faire, le BRM sera opéré à un DAS identique de 1,4 g/L/h permettant un taux de consommation des sucres proches de 100 % à chaque test. Sous cette condition, trois configurations du BRM seront testées. Les paramètres des 3 configurations testées sont présentés sur la figure 98.



Figure 98 : Configurations du BRM testées pour un fonctionnement avec ou sans boucle de recirculation.

Le premier test est réalisé dans la configuration de référence (taux de recirculation = 1) avec recirculation du fermentât (figure 98a). Dans cette configuration, le substrat injecté dans le système traverse deux fois la calandre grâce à la recirculation, avant d'être évacué ce qui améliore la mise en contact du substrat avec les bactéries.

Les fermentations des deuxième et troisième configurations sont réalisées sans boucle de recirculation, c'està-dire que la totalité du fermentât est évacuée du système après son passage dans la calandre. Les tests sont effectués respectivement à des TSH de 10 h (14 g_{glucose}/L dans la solution d'alimentation) et de 5 h (7 g_{glucose}/L dans la solution d'alimentation) pour un DAS équivalent de 1,4 g/L/h. La deuxième configuration (TSH = 10 h sans recirculation) teste l'impact du temps de séjour hydraulique et de l'agitation dans la calandre puisque la vitesse ascensionnelle est deux fois plus faibles pour le réacteur (figure 98b). Cette configuration a déjà été testée au laboratoire dans les conditions suivantes : DAS = 0,9 g/L/h et TSH = 13 h (alimentation = 11,7 g_{glucose}/L) (Clion, 2016). Elle permettra de déterminer si le fonctionnement du BRM L/G avec un TSH dans la calandre de 10 h (TSH local) est plus favorable qu'avec un TSH local de deux fois 5 h.

La troisième configuration permet d'examiner l'effet de la non-recirculation du substrat non consommé, des métabolites produits et des bactéries (figure 98c). Pour ce faire, le temps de séjour local (dans la calandre) est identique à celui de la référence (5 h) et la concentration de glucose dans la solution d'alimentation est divisée par deux (7 g/L), qui correspond à une teneur identique de celle de la configuration de référence en entrée de calandre quand le taux de consommation des sucres est de 100 %. Un triplicat de tests de fermentation est réalisé dans cette configuration.

4.2 Effet de la recirculation sur la production d'hydrogène

La figure 99 présente les profils de production d'H₂ pour les différentes configurations testées. La productivité est calculée sur une période de 40 h.



<u>Figure 99</u> : Débit de production d'H₂ par litre de bioréacteur en fonction du temps pour les tests de fermentation avec et sans boucle de recirculation. Le test de fermentation TSH = 5h sans recirculation est répété trois fois. Les barres d'erreurs rendent compte de la variabilité.

Sur les trois profils de production d'H₂ une évolution similaire est observée. La production d'H₂ intervient après une phase de latence comprise entre 3 et 8,6 h, le débit d'H₂ augmente jusqu'à un pic de production proche de 3,5 mL_{H2}/L/min, se stabilise puis diminue. L'effet de la configuration avec ou sans recirculation semble influencer le débit du pic de production d'H₂ au-delà de 40h et la stabilisation de la production. Avec recirculation (TSH = 10 h), le débit d'H₂ semble maintenu plus longtemps à des valeurs de productivité plus élevées par rapport aux autres tests. Pour ce même TSH (10 h) sans recirculation, après 50 h, le débit de production d'H₂ est décroissant. Sur le triplicat à TSH = 5 h, sans recirculation, des variations de débits sont observables de 15h à 32 h pendant la phase d'augmentation du débit (variations pendant la mise en charge du BRM) et cours de fermentation au-delà de 52 h.

Les performances de production d'H₂ obtenues pour ces tests sont regroupées dans_le tableau 66. Ces données sont complétées avec des résultats obtenus précédemment au laboratoire (Renaudie *et al.*, 2021b) pour confirmer les résultats de la configuration avec boucle de recirculation (TSH = 10 h ; DAS = 1,4 g/L/h ; avec recirculation) et fournir un test de comparaison supplémentaire (TSH = 5 h ; DAS = 1,4 g/L/h ; avec recirculation).

<u>Tableau 66</u> : Effet du taux de recirculation sur les valeurs de rendement, de productivité en H₂, de consommation de glucose et de rapport molaire H₂/CO₂ lors de la fermentation de glucose en BRM L/G

	Recirculation	Rendement H ₂ mol _{H2} /mol _{glucose ajouté}	Productivité en H ₂ (mL _{H2} /L/h)	Consommation du glucose (%)	H ₂ /CO ₂	Référence
TCU - 10 h	Avec	1,08	202 (240 – 156)	98	0,79	Cette étude
ISH = 10 h DAS = 1,4 g/L/h	Avec	1,13	210	81,9	1,02	Renaudie <i>et al</i> . (2021b)
	Sans	0,93	172 (226 – 108)	97	0,72	Cette étude
TSH = 5 h	Avec	1,00	184	100	1,04	Renaudie <i>et al</i> . (2021b)
DAS = 1,4 g/L/h	Sans	0,98 ± 0,07	181 ± 13 (226 – 136)	97 ± 3	1,01 ± 0,08	Cette étude

Les rendements et les productivités en H₂ s'échelonnent respectivement de 0,93 à 1,13 mol_{H2}/mol_{glucose ajouté} et de 172 à 210 mL_{H2}/L/h. La configuration avec recirculation à TSH = 10 h est la plus favorable avec une productivité et un rendement en H₂ respectivement supérieurs à 200 mL_{H2}/L/h et 1,05 mol_{H2}/mol_{glucose ajouté}. Les performances de production en H₂ obtenues lors de ce test sont dans le même ordre de grandeur que les résultats obtenus au laboratoire lors d'une étude précédente (Renaudie *et al.*, 2021b), seule la consommation des sucres et le rapport molaire H₂/CO₂ sont variables. Ces résultats soulignent la robustesse du procédé puisque les tests ont été reproduits dans deux modules membranaires différents.

Les tests à TSH = 10 h sans recirculation et à TSH = 5 h donnent des rendements et des productivités en H₂ inférieurs. À TSH = 5 h, la concentration de la solution d'alimentation a été réduite à 7 g/L, or il avait été montré dans une étude précédente qu'un optimum des performances de production d'H₂ était atteint pour une alimentation concentrée à 14 g/L (Renaudie *et al.*, 2021b). À TSH = 10 h sans recirculation, les performances de production d'H₂ inférieures peuvent s'expliquer par une hydrodynamique dans le bioréacteur moins favorable avec un débit liquide circulant dans la calandre deux fois plus faible malgré le fait que l'on ne recycle pas les acides organiques dans le milieu réactionnel.

Ainsi, on observe que les tests de fermentation à TSH = 10 h avec recirculation obtiennent les meilleures valeurs de production d'H₂ et le débit d'H₂ est maintenu plus longtemps. Au DAS testé, l'effet de la

recirculation ne semble pas impacter la consommation des sucres qui reste élevée dans nos tests (> 90 %) indépendamment de la configuration testée. Le transfert de masse dans la calandre entre les bactéries et le substrat est donc satisfaisant dans les configurations testées. Le bénéfice de la recirculation semble plutôt provenir de l'homogénéisation du milieu réactionnel causé par l'augmentation du débit dans la calandre permettant ainsi d'éviter la création d'un gradient de pH et par voie de conséquence une distribution hétérogène de l'activité ou de la croissance microbienne non favorable au maintien d'une production en H₂ stable (Show *et al.*, 2011). L'homogénéisation du milieu réactionnel dans la calandre et un temps de séjour local (interne à la calandre) court sont des paramètres critiques du fonctionnement du BRM.

Effet de la recirculation sur la production de métabolites

L'effet de la recirculation sur les productions de métabolites est présenté sur la figure 100 et dans le tableau 67.



<u>Figure 100</u>: Productivités des métabolites, consommation de glucose dans l'effluent en sortie du BRM. Les données métaboliques correspondent à la période de 40 h pendant laquelle les productions de gaz ont été calculées. Les barres d'erreur représentent la variabilité des productions de métabolites sur plusieurs prélèvements sur la période (TSH = 10 h, avec et sans recirculation) et des sur plusieurs prélèvements des 3 réplicats (TSH = 5 h, sans recirculation).

	Recirculation	Métabolites (g/L)	B/A	$\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$	Homoacétogenèse estimée (mmol _{acétate} /L/h)
TSH = 10 h	Avec	4,4	1,01	1,01	0,0
DAS = 1,4 h	Sans	4,8	0,58	0,81	0,3
TSH = 5 h DAS = 1,4 h	Sans	4,2	0,94	0,86	0,2

<u>Tableau 67</u> : Teneurs totales en métabolites, rapports molaires B/A et $\frac{H_2}{2 \times (B+A)}$ dans l'effluent en sortie du BRM.

Les productivités en métabolites en mmol/L/h sont du même ordre de grandeur pour les 3 configurations et comportent de légères variations notamment sur les productions d'éthanol et d'acétate qui peuvent provenir de voies métaboliques non-productrices d'H₂ (homoacétogenèse et solvantogenèse) et sur la production de butyrate.

La production d'acétate est plus importante dans les tests sans recirculation et la production d'éthanol est supérieure dans les tests à TSH = 10 h. Le test à TSH = 10 h sans recirculation présente la production d'H₂ la plus faible et le métabolisme le moins favorable à la production d'H₂ : production d'acétate et d'éthanol importante associée à une faible production de butyrate, ceci se traduit d'une part par un rapport molaire B/A faible et d'autre part, par un rapport molaire $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ inférieur aux autres tests. Le fonctionnement du BRM à TSH = 5 h sans recirculation divise par deux la quantité d'acides organiques dans le milieu réactionnel au cours des phases de production d'H₂, ce qui contribuerait à réduire les phénomènes d'inhibition liés à la présence d'acides gras volatils et d'éthanol, mais qui nécessite en contrepartie de diluer la solution d'alimentation et qui est sans effet sur la production d'hydrogène.

De manière générale, le métabolisme fermentaire est favorable à la solvantogenèse, ce qui contraste avec les données de Renaudie *et al.* (2021b) où la production d'éthanol est faible par rapport aux productions d'acides gras volatils. Toutefois, les rapports molaires $\frac{H_2}{2\times(B+A)}$ sont très proches de 1 ce qui signifie que la production d'acétate sans co-production d'H₂ est faible, ce résultat est cohérent avec les données de Clion (2016).

4.3 Conclusion sur l'effet de la recirculation

Au terme de l'analyse des productions de gaz et de métabolites, il apparaît que la configuration TSH = 10 h avec recirculation soit la plus favorable à la production d'H₂ en sortie.

Du point de vue de la mise en œuvre du procédé sur ce système, la réduction du temps de séjour dans la calandre permet d'améliorer la régulation du pH du milieu réactionnel en diminuant le temps entre l'injection de la soude et la mesure pH du milieu réactionnel en sortie. De plus, à un TSH interne à la calandre de 5 h, la production d'hydrogène est mieux stabilisée mettant en évidence une croissance bactérienne favorisée dans ces conditions alors qu'à un TSH de 10 h sans recirculation, la croissance et l'activité bactériennes ne XXIV

semblent pas être compensées par le possible phénomène de lessivage d'une partie des bactéries. La diminution du TSH interne à la calandre permettrait une meilleure agitation du milieu circulant dans la calandre ce qui augmente la productivité en H₂ tout en conservant le TSH global de 10 h.

Cette étude montre l'intérêt de la recirculation pour le fonctionnement du BRM. En effet, la dilution de la solution d'alimentation avec une partie de l'effluent sortant permet une meilleure homogénéisation du milieu réactionnel dans la calandre afin de maintenir une production d'H₂ relativement stable et de faire fonctionner le BRM malgré le recyclage d'une partie des acides organiques produits. La recirculation est donc utilisée pour la suite des expériences.



Paul ZANONI

Fermentation obscure de biomasses ensilées : stratégies d'amélioration de la bioproduction d'hydrogène et optimisation de la mise en œuvre en bioréacteur membranaire



Résumé

Cette étude porte sur la bioproduction d'hydrogène par fermentation obscure issu de la conversion de biomasses ensilées (maïs, seigle) en acides organiques avec pour finalité une production continue en bioréacteur membranaire (BRM) de type contacteur liquide/gaz. Les travaux explorent les mécanismes fermentaires endogènes à la biomasse ensilée (hydrolyse de sucres complexes *in situ*, conversion hydrogénogène du lactate) avec l'émergence d'une flore bactérienne dominée par *Clostridium*. Pour extraire de la biomasse une solution liquide riche en composés fermentescibles, des prétraitements de broyage et d'hydrolyse hydrothermique ont permis de multiplier par 3 le potentiel biohydrogène de l'ensilage de maïs (jusqu'à 147 L_{H2}/kg_{MS}). Le fonctionnement du BRM servant de réservoir bactérien (pas de réensemencement nécessaire) a été optimisé sur substrat modèle ; alimenté avec de l'ensilage de maïs hydrolysé par autoclavage, une productivité maximale de 8,6 L_{H2}/L/j a été obtenue à un TSH de 4 h.

Mots clés : biohydrogène, fermentation obscure, fermentation endogène, bioréacteur membranaire, biomasse ensilées, prétraitements de la biomasse

Abstract

This study focuses on the bioproduction of hydrogen by dark fermentation from the conversion of ensiled biomass (corn, rye) into organic acids with the aim of continuous production in a liquid/gas membrane bioreactor (MBR). The work explored the endogenous fermentative mechanisms of the ensiled biomass (*in situ* hydrolysis of complex carbohydrates, hydrogenogenic conversion of lactate) with the emergence of a bacterial flora dominated by *Clostridium*. To extract from the biomass a liquid solution rich in easily fermentable compounds, grinding and/or hydrothermal pretreatments allowed to multiply by 3 the biohydrogen potential of the corn silage (up to 147 L_{H2}/kg_{DM}). The operation of the BRM serving as a bacterial supply (no reseeding required) was optimized on model substrate; fed with autoclaved hydrolyzed corn silage, a maximum productivity of 8.6 $L_{H2}/L/d$ was obtained at a hydraulic retention time of 4 h.

Keywords : biohydrogen, dark fermentation, endogenous fermentation, membrane bioreactor, ensiled biomass, biomass pretreatments