UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT
DROIT D'AUTEUR

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. Toute contrefaçon, plagiat ou reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
34 COURS LÉOPOLD — CS 25233
54052 NANCY CEDEX
TÉL : 03 54 50 54 00
CONTACT@UNIV-LORRAINE.FR
WWW.UNIV-LORRAINE.FR

Université de Lorraine (UL)

École Doctorale Science et Ingénierie des Molécules, des Produits, des Procédés et de l'Énergie (ED SIMPPÉ)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

Thèse de Doctorat

présentée par

Ludovic Vauthier

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention « Procédés biotechnologiques »

Sous la direction de Stéphane Delaunay et Emmanuel Guedon

16/12/2025

Optimisation d'un procédé de production d'hydrogène par fermentation sombre en vue d'un couplage avec la biométhanation

Composition du jury :

Mme Hélène CARRÈRE	Directrice de Recherche, INRAE Occitanie-Montpellier, LBE – Rapportrice
Mme Isabelle MEYNIAL-SALLES	Professeure d'Université, INSA Toulouse, TBI – Rapportrice
M. Michel FICK	Professeur d'Université, UL, LRGP – Examinateur, Président du jury
Mme Hélène LICANDRO	Maîtresse de conférences, UBFC, Institut Agro Dijon – Examinatrice
M. Stéphane DELAUNAY	Professeur d'Université, UL, LRGP – Examinateur, Directeur de thèse
M. Emmanuel GUEDON	Directeur de Recherche, CNRS, LRGP – Examinateur, Co-directeur de thèse
M. Emmanuel RONDAGS	Maître de conférences, UL, LRGP – Invité, Co-encadrant de thèse
Mme Céline LOUBIÈRE	Maîtresse de conférences, UL, LRGP – Invitée, Co-encadrante de thèse

« Mes parents n'étaient pas des scientifiques.
Ils ne connaissaient presque rien à la science.
Mais en m'initiant simultanément au scepticisme et à l'émerveillement,
ils m'ont enseigné deux modes de pensée qui cohabitent difficilement
et qui sont au cœur de la méthode scientifique. »

Carl Sagan, *Shadows of Forgotten Ancestors*

« La vie a plus d'imagination que toi. »

Ma mère

Remerciements

Cette partie pourrait prendre la place d'un chapitre entier, tant j'ai eu la chance d'être accompagné de nombreuses personnes dans ce chapitre de vie qu'a été cette thèse, et même plus globalement durant ma présence à l'ENSAIA, où j'ai eu l'occasion d'arriver il y a 7 ans. À ces personnes m'ayant accompagné de près ou de loin dans le travail ou la vie personnelle, sans qui ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour, je tiens à vous remercier profondément ici, en vous dédiant cette thèse.

Je tiens d'abord à remercier le LRGP, notamment sa direction et l'Axe BioProMo, qui m'ont permis de réaliser l'ensemble de mes travaux dans leurs locaux.

Je souhaite également remercier les personnes me faisant l'honneur d'avoir accepté de constituer mon jury, qui auront pris le temps de lire ce manuscrit et d'évaluer le fruit du travail accompli durant ces trois années.

Dans la même idée d'évaluation et de correction de mon travail, j'aimerais adresser mes remerciements et ma gratitude les plus sincères à l'ensemble de mes encadrants, dont les remarques constructives m'ont été d'une grande aide, et pour leurs paroles rassurantes quand le syndrome de l'imposteur venait frapper à ma porte. En plus de cela, j'ai eu la chance d'avoir une grande équipe, aux compétences très diverses et qui m'ont été essentielles pour traiter l'ensemble du sujet, et pour leur patience remarquable lorsqu'il fallait se pencher sur mes rédactions ou comprendre ce que je disais en réunion. Donc merci à Stéphane Delaunay, pour ta sagesse exemplaire, pour la transmission de tes connaissances en biométhanation et pour avoir su assurer la direction de cette thèse, me permettant d'arriver jusqu'au bout. Merci à Emmanuel Guedon, pour ces discussions enrichissantes et ton expertise sur nos bêbêtes que sont les *Clostridium*. Un jour elles n'auront plus aucun secret pour nous. Merci à Emmanuel Rondags, pour son aide à la conduite des bioréacteurs, de jour comme de nuit, ainsi que sa bonne humeur que j'ai pu connaître depuis mes débuts sur ce campus. Mercis significatifs à Céline Loubière, pour ton aide sur tous les aspects numériques, statistiques et mathématiques concernant le traitement de mes données, ainsi que ton soutien sans faille. Merci à Xavier Framboisier, pour la gestion de l'Axe et de H3, me permettant d'accomplir efficacement mes tâches sans retard, et pour son expertise en mesures analytiques. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Je tiens aussi à remercier les stagiaires Khaniza et Aruzhan, que j'ai pu encadrer et dont le travail a été essentiel pour le cumul de données expérimentales, en leur souhaitant un très bel avenir.

J'aimerais adresser mes remerciements aux personnes que j'ai pu rencontrer à l'occasion de Ma Thèse en 180 secondes, que ce soit les autres doctorantes et doctorants avec qui j'ai pu échanger sur nos sujets, ainsi qu'aux équipes organisatrices et au formateurs, pour nous avoir permis d'exprimer et de partager avec passion nos connaissances au grand public.

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer au sein de BioProMo et de l'ENSAIA en général. Mais je souhaite remercier en particulier Alaric et Mathieu, mes fidèles collègues du « bureau des gogols », accompagnés d'Emma (merci aussi pour ta grande aide pour les analyses et les commandes, tu passeras aussi mes remerciements au Taton et à Colin, de très belles rencontres et de très belles personnes également), Benjamin (notre pièce rapportée du LIBio) et Alexandre (merci pour la logistique des bouteilles de gaz et pour les aventures nocturnes d'accès à l'ENSAIA) avec qui j'ai pu également emplir mon quotidien au labo de nombreux instants de joie, quand notre SCIENCE fonctionnait, et pour tous nos délires qui auront été essentiels pour bien vivre ces 3 ans. Mais je n'oublie évidemment pas tous les autres, que je ne peux nommer ici tant la liste est longue, mais avec qui j'ai pu partager d'agréables moments.

Parce qu'un chameau ne serait rien sans son poulpe et sa licorne, je tiens à remercier avec intensité et ferveur Nicolas et Quentin, pour cette amitié sincère cultivée depuis 12 ans à l'heure où j'écris ces lignes, toujours présents dans les bons comme les mauvais moments, ainsi que le reste de la troupe avec Flore, Romain C, Marine, Léa, Chloé et Clémence, pour toutes les âneries qu'on a pu faire, les rires partagés ensemble depuis l'adolescence jusqu'à la plongée dans la « vie d'adulte ».

J'aimerais également dire merci à ceux pour qui je n'ai pas forcément pu être très présent et mobile ces 3 dernières années, mais sans qui je ne serais jamais devenu la personne que je suis à présent, capable de faire face à cette thèse. Ceci s'adresse à Valentin (YEET !), Myriam, Dilan, Adrien, Romain P, Shino et Milky (ta présence inattendue à MT180 m'a fait sincèrement très plaisir).

Merci aux Marsaiens du côté IA de la force, avec qui ce fut un plaisir d'évoluer pendant nos années ingés, et de continuer à discuter et de se soutenir encore malgré la distance. Remerciements particuliers à J-C, toujours prêt à m'embarquer faire la fête, mais surtout d'une gentillesse et d'une attention toute particulière envers moi, que je n'ai pas forcément toujours rendues à la hauteur de ce que tu donnes, et qui a été là même lorsque le cœur n'y était plus. J'espère que tout se passe bien en Inde, et que l'on se reverra très vite.

Enfin, je souhaite exprimer mes remerciements les plus chaleureux envers ma famille, mes parents en premier lieu, grâce à qui j'ai pu réaliser ce formidable parcours de thèse, mais aussi de vie, qui m'ont toujours aidé et porté pour aller là où je voulais et faire ce que j'ai toujours souhaité. Finalement, c'est grâce à vous que j'ouvre grand les portes de la recherche scientifique.

Table des matières

Remerciements **4**

Table des matières **6**

Liste des figures et tableaux **10**

Liste des abréviations et acronymes **14**

Liste des publications et communications **15**

Contexte du sujet d'étude et introduction générale **16**

I. Étude bibliographique **22**

I.1. Le dihydrogène gazeux : demandes et productions 22

I.1.a. Utilisation du H_2 et accroissement des besoins *22*

I.1.b. La biophotolyse *25*

I.1.c. La photofermentation *26*

I.1.d. La fermentation sombre *28*

I.1.e. Diversité des méthodes de bioproduction de H_2 ..... *30*

I.2. Les bactéries du genre *Clostridium* 31

I.2.a. Caractéristiques du genre bactérien *31*

I.2.b. Utilisations historiques et industrielles *33*

I.2.c. Mécanismes fermentaires chez les bactéries du genre Clostridium *34*

I.2.d. Rôles des hydrogénases chez le genre Clostridium *45*

I.3. Orientations récentes de la recherche sur l'utilisation du genre *Clostridium* pour la production de H_2 47

I.3.a. Regain d'intérêt de la fermentation sombre *47*

I.3.b. Effets des conditions et modes de culture *47*

I.3.c. Approches étudiées pour l'amélioration de la production *51*

I.3.d. Limitations pour l'extrapolation du procédé et de l'utilisation du H_2 comme vecteur énergétique *56*

I.4. Production de méthane par voie biologique : la biométhanisation et la biométhanation 57

I.4.a. La méthanisation : principe général, atouts et limites *57*

I.4.b. Essor de la méthanation biologique à partir de la méthanisation *59*

I.4.c. Conditions physico-chimiques en biométhanation *60*

I.5. Essor de la biométhanation *ex-situ* et premières approches de couplage avec la production biologique de H_2 63

I.5.a. Intérêts de la méthanation ex-situ *63*

I.5.b. Populations microbiennes et voies métaboliques impliquées *64*
I.5.c. Configurations de bioréacteurs pour l'amélioration de la biométhanation ex situ *67*
I.5.d. Les couplages de bioprocédés pour la production de méthane *69*
Conclusion 71
Stratégie scientifique de la thèse 73
II. Matériel et méthodes 75
II.1. Fermentation sombre 75
II.1.a. Micro-organismes utilisés *77*
II.1.b. Levée de dormance des spores *78*
II.1.c. Pré-culture *80*
II.2. Cultures en bioréacteurs pour la production de H_2 81
II.2.a. Équipement et régulation *81*
II.2.b. Cultures en mode discontinu *82*
II.2.c. Cultures en mode continu *83*
II.3. Culture d'un consortium méthanogène 84
II.4. Méthodes analytiques 86
II.4.a. Suivi de la croissance microbienne *86*
II.4.b. Analyse du milieu de culture *87*
II.4.c. Analyse des gaz produits *89*
II.4.d. Analyses métagénomiques *91*
III. Comparaison de la production de H_2 en mode discontinu chez plusieurs espèces du genre *Clostridium* 92
III.1. Avant-propos 92
III.2. Étude des fermentations de différentes espèces de *Clostridium* en mode discontinu 93
III.2.a. Analyse comparative des performances de production de H_2 ..... *93*
Abstract 95
Introduction 96
Materials and methods 99
Results 102
Discussion 109
Conclusions 113
III.2.b. Devenir de l'acétate lors de la culture de C. tyrobutyricum CNRZ 510 ..... *118*
III.3. Impact de la nature du substrat carboné et énergétique 121

III.4. Évaluation des méthodes d'analyse du gaz produit 125
III.5 Conclusions 127

IV. Optimisation de la production de biohydrogène lors de cultures continues de *C. pasteurianum* ATCC 6013 129

IV.1. Avant-propos et stratégie scientifique 129
IV.2. Délimitations du champ d'étude du plan d'expériences 130
IV.3. Application de la démarche d'optimisation par plan d'expériences de la production continue de H_2 par *C. pasteurianum* ATCC 6013 132
Abstract 133
Introduction 133
Materials and methods 136
Results and discussion 141
Conclusions 155
References 156
IV.4. Adaptation des conditions de culture pour un couplage avec la méthanation biologique 160
IV.4.a. Conditions optimales issues du plan d'expériences 160
IV.4.b. Sensibilité de la production de H_2 au pH et au taux de dilution autour de la condition optimale 161
IV.4.c. Sensibilité de la production de H_2 à S_f autour de la condition optimale 163
IV.4.d. Conclusions 165

V. Couplage de la culture continue de *Clostridium pasteurianum* avec la biométhanation 167

V.1. Performances du couplage de la fermentation sombre avec la biométhanation par transfert direct du H_2 et CO_2 167
V.1.a. Production de gaz et croissance 168
V.1.b. Production de métabolites 172
V.1.c. Effets du couplage sur les populations microbiennes du consortium méthanogène 174
V.1.d. Bilan du couplage entre la fermentation sombre et la biométhanation 178
V.3. Expérience de couplage avec capture partielle du CO_2 180
V.3.a. Choix de la méthode 180
V.3.b. Dispositif de capture appliqué au procédé de couplage 181
V.3.c. Performances du dispositif 184
V.4. Expérience de couplage avec étude des effets du transfert de la fraction liquide issue de la culture de *C. pasteurianum* 186

V.4.a. Influence sur la production de biogaz *186*
V.4.b. Évolution des concentrations en métabolites *188*
V.4.c. Conclusions et perspectives d'amélioration du procédé couplé *191*
Conclusion générale, discussion et perspectives 193
Références bibliographiques 200
Annexes 220
Résumé 222

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Évolution des demandes énergétiques mondiales entre 2023 et 2024 – Global Energy Review 2025..... 17

Figure 2. Représentation de l'évolution du coût de production de l'électricité en France entre 2012 et 2022 (ADEME 2024)..... 18

Figure 3. Évolution des demandes mondiales en H_2 entre 2019 et 2024 et prévisions pour 2030 – Global Hydrogen Review 2024..... 23

Figure 4. Microphotographie de *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 après coloration de Gram..... 32

Figure 5. Cycles de vie de *C. acetobutylicum* (Tiré de Dürre et al. 2014)..... 35

Figure 6. Voies métaboliques générales du métabolisme carboné présentes chez *Clostridium*..... 36

Figure 7. Voies métaboliques de l'assimilation du glycérol, typiquement présentes chez *C. pasteurianum* et *C. butyricum*..... 40

Figure 8. Proportion des molécules finales lors d'une acidogenèse type chez *C. pasteurianum*..... 43

Figure 9. Déroulement de la sporulation chez *C. difficile* après phosphorylation de Spo0A et représentation des cascades d'activation des facteurs sigma (Tiré de Pereira et al. 2013)..... 45

Figure 10. Représentation spatiale du H-cluster des hydrogénases [FeFe] chez *C. pasteurianum* (Tiré de McGlynn et al. 2007)..... 46

Figure 11. Support minéral de fibres creuses utilisé pour l'immobilisation de *C. butyricum* (Tiré de Fritsch et al. 2008)..... 51

Figure 12. Image microscopique de *Clostridium* sp. T2 immobilisés sur mycélium d'*Aspergillus niger* (tiré de Zhao et al. 2012)..... 52

Figure 13. Représentation des approches possibles d'intensification de la méthanogenèse (Tiré de Angelidaki et al. 2018)..... 60

Figure 14. Voies métaboliques du cycle de Wolfe présentes chez les archées méthanogènes hydrogénotrophes (Tiré de Thauer 2012)..... 65

Figure 15. Systèmes de bioréacteurs utilisés pour la méthanation biologique en vue d'améliorer le transfert de H_2 et d'obtenir un taux de conversion maximal..... 68

Figure 16. Schéma descriptif du déroulé du travail de thèse et son inscription dans les démarches actuelles de production d'énergie..... 74

Figure 17. Illustration du protocole de démarrage d'une fermentation sombre type de *Clostridium*..... 76

Figure 18. Culot de spores de *C. pasteurianum* ATCC 6013 en milieu RCM après sédimentation..... 77

Figure 19. Différence entre la technique traditionnelle (A) de culture de micro-organismes anaérobies en tubes de Hungate et celle pratiquée dans le cadre de cette thèse (B)..... 79

Figure 20. Production gazeuse lors de la levée de dormance en tube de Hungate de *C. acetobutylicum* ATCC 6013..... 80

Figure 21. Schéma du bioréacteur de 2 L utilisé et de son équipement..... 82

Figure 22. Dispositif expérimental mis en place pour le couplage entre la fermentation sombre en mode continu et la biométhanation..... 86

Figure 23. General metabolic pathways and their effects on hydrogen production in genus *Clostridium*..... 98

Figure 24. Kinetic parameters representation for a typical *C. acetobutylicum* ATCC 824 cultivation..... 105

Figure 25. Kinetic parameters representation for a typical *C. pasteurianum* ATCC 6013 cultivation..... 106

Figure 26. Kinetic parameters representation for a typical *C. butyricum* DSM 5431 cultivation..... 107

Figure 27. Kinetic parameters representation for a typical *C. tyrobutyricum* CRNZ 510 cultivation..... 108

Figure 28. Distribution of metabolites production and the associated gas productivities when the maximum gas production was reported, depending on the *Clostridium* strain used in our experiments..... 113

Figure 29. Évolution de la concentration en acétate lors d'une culture de *C. tyrobutyricum* CNRZ 510..... 118

Figure 30. Voies métaboliques spécifiquement impliquées dans la conversion directe de l'acétate en butyrate décrite chez *C. beijerinckii* Br21..... 119

Figure 31. Évolution des concentrations en biomasse (A), métabolites (B) et en glucose (A et B) lors d'une culture de *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 supplémentée en acétate..... 120

Figure 32. Croissance (□) et productions de gaz (•) et des métabolites chez *C. pasteurianum* ATCC 6013 cultivée en utilisant le glycérol comme substrat carboné et énergétique..... 122

Figure 33. Valeurs du rapport R_{H_2/CO_2} selon la méthode utilisée (estimation à partir des analyses en produits de fin de fermentation par HPLC en couleur vive ou par µGC en couleur pâle)..... 125

Figure 34. Concentration en biomasse (A) et production volumique totale de gaz (B) lors d'une culture continue de *C. pasteurianum* ATCC 6013 à D = 0,200 h^{-1} et S_f = 15 g/L..... 131

Figure 35. Metabolic pathways and representations of electronic and carbon flows of *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 depending on the fermentation phase..... 134

Figure 36. Cubic representation of the face centered central composite design, showing the setpoints of each parameter (real value and normalized value) and the order of runs..... 139

Figure 37. Monitoring of biomass (A), metabolites (B) and gas (C) productions during a typical continuous culture with *C. pasteurianum* ATCC 6013, when testing three conditions..... 142

Figure 38. Effect of the dilution rate only on H_2 productivity (A), R_{H_2/CO_2} (B), $Y_{H_2/S}$ (C), and residual glucose (D), when the pH and the feeding substrate concentration are kept constant at their central value..... 144

Figure 39. Specific production rates of organic acids (A) and solvents (B) of *C. pasteurianum* ATCC 6013 in continuous culture at pH = 7.0, depending on the pyruvate specific production rate..... 145

Figure 40. Specific production rate of pyruvate depending on specific glucose consumption rate at pH = 7.0..... 146

Figure 41. Effect of the pH on H_2 productivity (A), R_{H_2/CO_2} (B), $Y_{H_2/S}$ (C), and residual glucose (D), when the dilution rate and the feeding substrate concentration are kept constant at their central value..... 147

Figure 42. Effect of the feeding substrate concentration on H_2 productivity (A), R_{H_2/CO_2} (B), $Y_{H_2/S}$ (C), and residual glucose (D), when the dilution rate and the pH are kept constant at their central value..... 149

Figure 43. 2D-responses surfaces of the four evaluated parameters, as functions of pH, dilution rate and feeding substrate concentration..... 152

Figure 44. Concentrations en métabolites (A) et production gazeuse (B) mesurées à l'état stabilisé en chemostat, avec trois conditions de test (pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 17 g/L ; pH = 6,8 / D = 0,180 h^{-1} / S_f = 17 g/L ; pH = 6,5 / D = 0,290 h^{-1} / S_f = 17 g/L) réalisées en mode continu lors l'étude de la sensibilité de la production de H_2 au pH et au taux de dilution..... 162

Figure 45. Concentrations en métabolites (A) et production gazeuse (B) mesurées à l'état stabilisé en chemostat, avec trois conditions de test (pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 18 g/L ; pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 20 g/L ; pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 25 g/L) réalisées en mode continu lors l'étude de la sensibilité de la production de H_2 à S_f..... 164

Figure 46. Mise en évidence de l'augmentation de la production volumique de gaz par *C. pasteurianum* après couplage avec le bioréacteur de méthanation..... 169

Figure 47. Évolution de la biomasse (A) dans chaque bioréacteur, des pourcentages (B) et débits (C) en CH_4, H_2 et CO_2 dans le réacteur de biométhanation suite au transfert du biogaz issu de la culture de *C. pasteurianum*..... 171

Figure 48. Évolution de la concentration des métabolites produits par *C. pasteurianum* ATCC 6013 au cours de la fermentation sombre et effet du couplage avec la biométhanation..... 172

Figure 49. Évolution de la concentration en métabolites au sein de la culture du consortium méthanogène lors du transfert direct de gaz, de la fermentation sombre vers la biométhanation..... 174

Figure 50. Abondance relative des populations d'archées au sein du consortium méthanogène au début et en fin de la culture méthanogène..... 175

Figure 51. Abondance relative des populations de bactéries au sein du consortium méthanogène au début et à la fin de la culture méthanogène..... 177

Figure 52. Variation de la capacité de capture du CO_2 et de la concentration en ions d'une solution à 3% de NaOH (tiré de Yoo et al. 2013)..... 181

Figure 53. Variation des proportions de gaz en sortie de bioréacteur de fermentation sombre, avec différents essais de capture du CO_2 en solution d'hydroxyde de sodium..... 182

Figure 54. Dispositif expérimental de capture du CO_2 à l'aide d'une solution de NaOH à 3 mol/L, pour l'obtention d'un gaz sortant à 80% de H_2 et 20% de CO_2..... 184

Figure 55. Proportion des gaz au sein du biogaz final issu de la biométhanation suite aux essais de capture du CO_2..... 185

Figure 56. Variation des proportions et débits de gaz mesurés lors de la méthanation et de l'étude de l'effet de l'ajout de la fraction liquide issue du premier bioréacteur de culture de *C. pasteurianum*..... 187

Figure 57. Concentrations en métabolites au sein de la culture du consortium méthanogène avec transfert du gaz et de l'effluent liquide issus de la culture de *C. pasteurianum*..... 188

Tableau 1. Comparaison des productions de *C. butyricum* selon la nature du substrat utilisé (d'après les résultats de Abbad-Andaloussi et al. 1998 et Saint-Amans et al. 2001)..... 41

Tableau 2. Exemple de données de la littérature sur les performances de production de dihydrogène à partir de glucose, par fermentation sombre anaérobie chez des bactéries du genre *Clostridium*..... 50

Tableau 3. Récapitulatif des performances de la fermentation sombre anaérobie par modification des techniques de cultures et des micro-organismes (données de la littérature scientifique)..... 55

Tableau 4. Liste des différentes molécules analysées par HPLC et leur temps de rétention associé..... 89

Tableau 5. Liste des différentes molécules analysées par chromatographie en phase gazeuse et leur temps de rétention associé..... 91

Table 6. Kinetic key parameters values and their associated standard deviation for each strain..... 104

Tableau 7. Exemples de concentrations des produits de fin de fermentation en fin de cutlures de *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 (= DSM 525) lorsque le glycérol est utilisé comme substrat..... 124

Table 8. Face centered central composite design matrix..... 138

Table 9. Calculation of carbon and electronic flows, with specific consumption and production (in meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}) and several ratios for the fermentation experiments carried out at pH = 7.0. 143

Table 10. Predicted values of each response and their associated optimal factor setpoints, depending on the chosen optimized response(s). 153

Table 11. Comparison between the theoretical performances of H_2 production at the optimal setpoint provided by the DoE, and the results of the fermentation experiments. 154

Tableau 12. Résultats expérimentaux des cultures de vérification de l'optimum du modèle 165

Tableau 13. Points-clés de l'évolution de la concentration en métabolites lors du transfert du milieu de culture issu de la culture de *C. pasteurianum* 190

Liste des abréviations et acronymes

ABE (fermentation) : Acétone-Butanol-Ethanol

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGV : Acide(s) gras volatil(s)

ADP : Adénosine diphosphate

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

CFD : Computational Fluid Dynamics

CNRZ : Centre National de Recherches Zootechniques

D : Taux de dilution (h^{-1})

DoE : Design of Experiments = plan d'expériences

DSM(Z) : Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)

Fd : Ferrédoxine

HPLC : High Performance Liquid Chromatography = chromatographie liquide à haute performance

kDa : kiloDalton

kpb : kilo paire de bases

NAD^+/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit

pH : potentiel hydrogène

Pi : Phosphate inorganique

PSI : Photosystème I (complexe enzymatique)

PSII : Photosystème II (complexe enzymatique)

RCM : Reinforced Clostridial Medium = Milieu clostridial renforcé

$R_{Ac/Bu}$: Ratio molaire de la concentration en acétate par rapport au butyrate (mol/mol)

R_{H_2/CO_2} : Ratio molaire de la quantité de H_2 par rapport à la quantité de CO_2 (mol/mol)

rpm : rotations par minute

S_f : Concentration en substrat de l'alimentation

VTG : Vitesse de transfert du gaz

v/v : Volume par volume

Y_{H_2}/S : Rendement molaire en H_2 par rapport au substrat (mol/mol)

µGC : Micro chromatographe en phase gazeuse

Liste des publications et communications

Publications :

Vauthier L, Rondags E, Loubière C, Pen N, Framboisier X, Guedon E, Delaunay S. « Rational comparison of biohydrogen production using Clostridium species through dark fermentation during anaerobic batch processes ». Accepté à *Journal of Biotechnology* le 20 octobre 2025

Vauthier L, Loubière C, Rondags E, Framboisier X, Delaunay S, Guedon E. « Optimization of biohydrogen production by Clostridium pasteurianum in continuous culture using a Design of Experiments approach ». Soumission prévue à *Frontiers in Microbiology* en janvier 2026.

Communications :

- Présentation d'un poster à un congrès international :

Vauthier L, Guedon E, Rondags E, Loubière C, Framboisier X, Pen N, Delaunay S. « Comparative analysis and improvement of biological hydrogen production in Clostridium genus ». *Process Development Symposium Europe 2024, AIChE*. ENSIC, Nancy, 26-28 juin 2024.

- Médiation scientifique :

Vauthier L. « Couplage de la fermentation sombre anaérobie et de la biométhanation pour la production de biométhane ». Concours *Ma Thèse en 180 secondes*. Finale Régionale Université de Lorraine – Premier prix du jury, Nancy, 22 février 2024. Demi-finale nationale – Qualification pour la finale nationale, Paris, 29 mars 2024. Finale nationale – Nice, 05 juin 2024.

Contexte du sujet d'étude et introduction générale

La production et la consommation d'énergie mondiale : une part importante du fossile

« Énergie ». Un mot si commun et pourtant si important, applicable pour la description des particules élémentaires en mécanique quantique, ainsi que pour la quantité colossale annuelle d'électricité générée par l'ensemble des centrales du monde, en passant par les calories encore utilisées en diététique et illustrant la quantité d'énergie qu'un aliment pourra fournir aux cellules de notre organisme pour leur fonctionnement. D'une manière générale, il s'agit d'une grandeur physique qui se conserve ou s'échange sous diverses formes (mécanique, thermique, lumineuse ou chimique, pour ne citer qu'elles) et influant sur l'état d'un système défini. Si le terme d'énergie est au centre de toutes les attentions aujourd'hui, et ce depuis plusieurs décennies, c'est parce que son rôle est fondamental à chaque seconde de la vie d'un individu, et qu'elle a contribué au façonnement de nos sociétés à travers les âges. Cela se confirme par le fait qu'une « crise énergétique », où l'accès à une forme d'énergie fortement compromise, résulte généralement en une crise économique et une crise sociale. De plus, la majorité de l'énergie produite de nos jours repose encore sur l'utilisation de ressources fossiles (charbon, pétrole et gaz naturel) dont l'extraction, le raffinage et la combustion sont fortement polluants, entraînant une augmentation drastique de la concentration en dioxyde de carbone (CO_2) dans l'atmosphère. Cette augmentation du CO_2, un puissant gaz à effet de serre dont les effets sur le dérèglement climatique ne sont plus à prouver, suscite des réflexions quant à la production et l'approvisionnement énergétique futur.

D'après le rapport « Global Energy Review 2025 » (International Energy Agency 2025), la demande en énergie totale à travers le monde est en augmentation, en raison de la croissance de la population ainsi que de l'amélioration globale du niveau de vie. Cela sera encore le cas dans les années à venir si la tendance actuelle se poursuit, à raison de + 2,2 % pour l'énergie totale entre 2023 et 2024 et + 4,3 % pour l'énergie électrique seule (Figure 1). Parmi ces nouvelles demandes en énergie en 2024, une grande partie est représentée par l'électricité d'origine renouvelable. Celle-ci représente 80% des nouvelles demandes en électricité (énergie photovoltaïque, éolien et barrages hydroélectriques sont comptabilisés dans ce calcul), ou encore 38% des nouvelles demandes en énergie totale. Cela en fait la première forme de demande énergétique entre 2023 et 2024. Cependant, de nombreux secteurs continuent d'exploiter des ressources d'origine fossile et ont vu leur demande augmenter entre 2023 et 2024. C'est notamment le cas du gaz naturel pour la production d'énergie électrique (28% des nouvelles demandes énergétiques), et le pétrole pour la production de carburant (11%), nécessaire pour de nombreux véhicules, dont le parc mondial est très loin d'être remplacé par les véhicules

électriques. Enfin, bien que l'augmentation de la demande en charbon devienne de moins en moins forte, cela n'en reste pas moins une augmentation (15% des nouvelles demandes), contribuant ainsi à l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre.

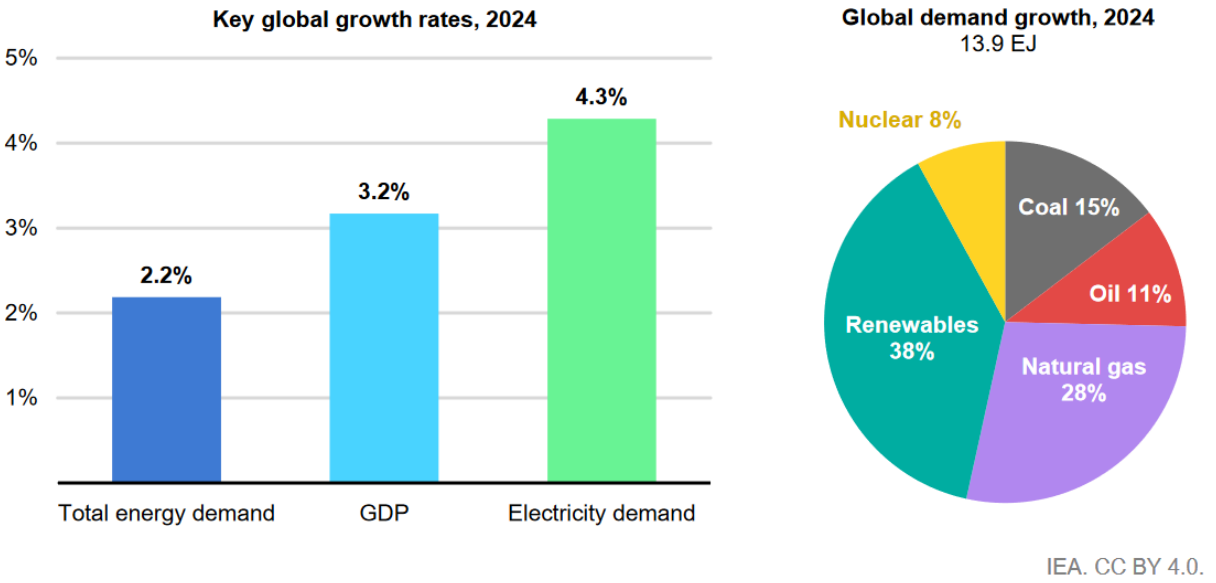


Figure 1. Évolution des demandes énergétiques mondiales entre 2023 et 2024 – Global Energy Review 2025. (GDP = *Gross Domestic Product* = Produit Intérieur Brut).

Avec ce constat sans appel, il est possible d'affirmer que l'essor des énergies renouvelables vient plutôt s'additionner à l'utilisation des énergies fossiles, au lieu de les substituer, comme on l'imaginerait de prime abord. Cela peut s'expliquer par une certaine inertie du système. Pour les carburants, le changement du parc automobile pour des véhicules équipés de nouveaux moteurs reposant dans une moindre mesure sur les énergies fossiles (électrique, hybride, « superéthanol » E85) ne peut s'effectuer dans l'immédiat, notamment pour les particuliers, principalement pour des raisons financières. Pour la production électrique, le temps d'installation d'une nouvelle centrale pour en remplacer une ancienne peut prendre plusieurs années, voire une décennie, expliquant le fort taux de centrales électriques au gaz ou au charbon à l'heure actuelle. Intuitivement, il serait logique de penser que la principale raison du maintien de ces centrales serait un moindre coût de production électrique. Pourtant, le coût de production électrique des énergies renouvelables s'avère de moins en moins élevé. D'après la version 17.0 du rapport de Lazard « Levelized Cost Of Energy », aux États-Unis, un pays se reposant pourtant sur une forte exploitation des ressources fossiles, et notamment du gaz de schiste, les coûts de production ont atteint en moyenne 50 $/MWh en 2024 pour l'électricité éolienne et 61 $/MWh pour l'électricité solaire, contre 76 $/MWh pour l'électricité sortant d'une centrale à gaz à cycle combiné (CCGT) et même 118 $/MWh pour l'électricité généré par une centrale à charbon (Lazard, 2024).

En France, le rapport de l'ADEME « Évolution des coûts des énergies renouvelables et de récupération en France entre 2012 et 2022 » dépeint une situation semblable (Figure 2). Le coût de production de l'électricité renouvelable oscillant en moyenne entre 59 et 71 €/MWh (à l'exception des très petites installations de panneaux photovoltaïques), contre 172 €/MWh pour les centrales à gaz à cycle combiné (ADEME, 2024).

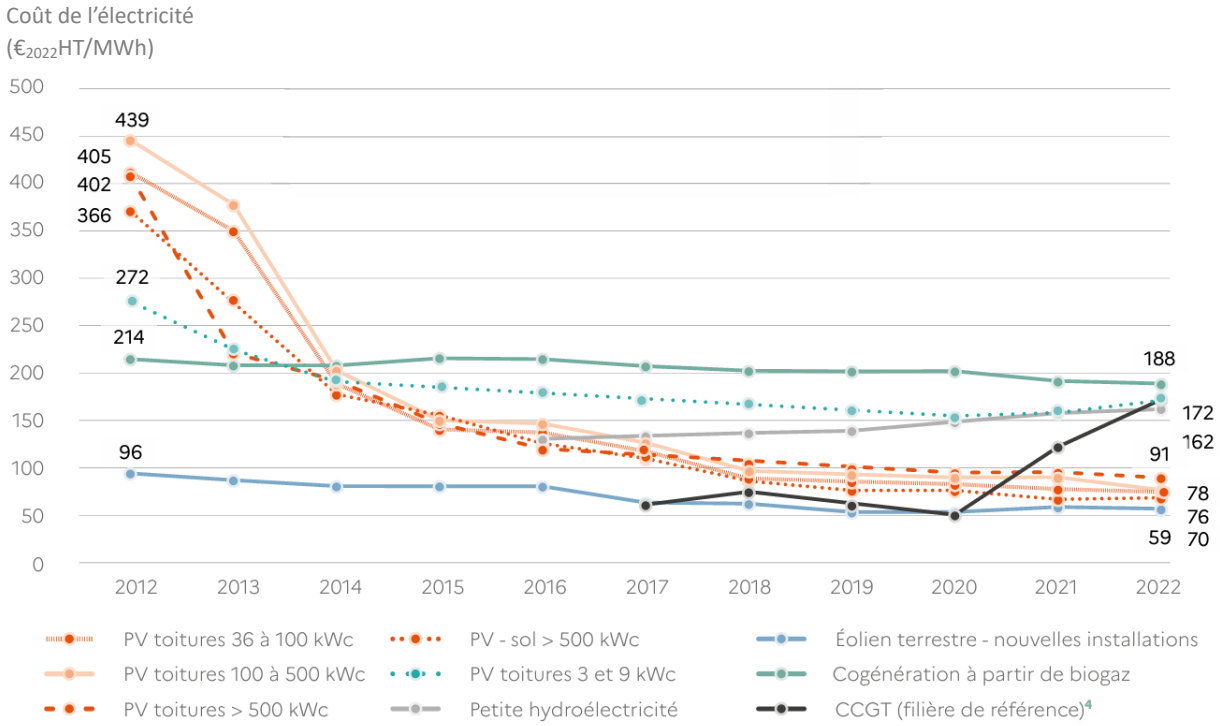


Figure 2. Représentation de l'évolution du coût de production de l'électricité en France entre 2012 et 2022 (Coût actualisé de l'énergie, prenant en compte les dépenses d'investissement et d'exploitation ainsi que les recettes selon le prix de vente de l'électricité, actualisées annuellement). (ADEME, 2024).

Néanmoins, ces tendances peuvent présenter des variations plus localisées, selon les disponibilités des ressources sur un territoire donné, des installations existantes, ou bien les accords commerciaux en vigueur. Ainsi, le coût global de production de l'électricité ne se révèle pas systématiquement être le facteur déterminant le choix d'une source d'énergie. De fait, les énergies fossiles, et particulièrement le gaz naturel, sembleront toujours représenter une part conséquente des approvisionnement énergétiques à venir si la tendance reste la même.

La production de biométhane

Il existe plusieurs technologies pouvant produire du biométhane sans exploiter de ressources fossiles, qui font aujourd'hui l'objet d'importants investissements et développements, s'inscrivant dans la transition énergétique nécessaire. Parmi elles, la méthanisation, bien que connue depuis la fin du

XVIII^{ème} siècle, est revenue sur le devant de la scène depuis le début des années 2000 comme une alternative intéressante pour générer du biométhane (CH_4), sans exploiter de gisement fossile. En effet, cette approche a pour vocation la valorisation énergétique de la biomasse, une ressource concentrant à elle seule 550 milliards de tonnes de carbone. La biomasse végétale représente la majeure fraction en masse de cette ressource (450 milliards de tonnes) et a la particularité de pouvoir être considérée comme renouvelable (Bar-On et al. 2018). En effet, les émissions de CO_2 lors de l'exploitation anthropique des végétaux (hors cas de déforestation) sont en partie compensées par la capture du CO_2 atmosphérique lors de la croissance de la plante. Cela n'est pas le cas lors de la combustion de gaz fossile, car son temps de formation s'effectue sur des échelles de temps de plusieurs millions d'années.

En 1902, le chimiste français Paul Sabatier décrit un procédé thermochimique permettant de convertir 1 mole de CO_2 et 4 moles de H_2 en 1 mole de méthane ainsi que 2 moles d'eau. Néanmoins, cette réaction demeure très « énergivore » car nécessite de travailler à des températures généralement comprises entre 250 °C et 400°C ainsi qu'une pression de l'ordre d'une trentaine de bars (Vogt et al. 2019; Burkhardt et Busch 2013).

Plus récemment, la méthanation biologique a vu le jour en se développant à partir de la méthanisation. Il s'agit ici de la conversion microbienne directe de CO_2 et de dihydrogène H_2 gazeux en CH_4. Cette perspective présente en revanche des besoins conséquents en H_2, de l'ordre de 4 fois la quantité en moles de CO_2 traité (Lecker et al. 2017).

La production de dihydrogène

Plus petite molécule de l'univers, le dihydrogène est une ressource cruciale qui suscite un intérêt grandissant en raison de son utilisation dans de nombreux domaines industriels et chimiques, mais aussi grâce à ses capacités en tant que vecteur énergétique. Malheureusement, la production mondiale de H_2 repose essentiellement sur l'utilisation d'énergies fossiles d'après le rapport « Global Hydrogen Review 2024 ». Les données de 2023 décrivent une production de H_2 à 60% par vaporeformage du méthane, 20% par gazéification du charbon et 15% en tant que co-produit de l'industrie pétrolière, résultant là aussi à une forte accumulation de gaz à effet de serre dans l'atmosphère (International Energy Agency 2024). Ainsi, de nouvelles approches font surface afin d'appliquer la transition énergétique à la production de dihydrogène.

La méthode présentant l'essor le plus significatif est l'électrolyse de l'eau, qui consiste en la décomposition des molécules d'eau à l'aide de l'énergie issue d'un courant électrique, pouvant s'écrire selon l'équation (1).

$$2\ H_2O \xrightarrow{énergie\ électrique} 2\ H_2 + O_2 \quad (1)$$

Dans ce cas, les émissions de gaz à effet de serre sont directement reliées au moyen de production électrique en question. En revanche, cette technique de production présente de faibles rendements en considérant l'énergie thermique de la combustion du H_2 par rapport à l'énergie électrique nécessaire pour la formation de H_2, qui sont de l'ordre de 56% à 73% pour les installations courantes d'électrolyse en conditions alcalines (Holladay et al. 2009).

Enfin, de nouvelles approches microbiologiques émergent afin de valoriser la biomasse en H_2. La fermentation sombre réalisée par les bactéries du genre *Clostridium* fait partie de ces approches et se révèle de plus en plus étudiée en laboratoire depuis une quinzaine d'années pour la production de ce gaz en vue d'une production à plus grande échelle. Ce procédé de culture microbienne présente l'atout particulier de pouvoir être réalisé en mode « continu », fournissant ainsi un débit continu et constant de H_2. Néanmoins, le mode de culture continue reste moins étudié que le mode culture discontinu, ou « batch » et les aspects d'optimisation du procédé restent peu approfondis. Ce travail de thèse consistera à lever des verrous sur certains de ces aspects.

Contexte du travail de thèse

Cette thèse portera principalement sur la production de biohydrogène par fermentation sombre par des bactéries du genre *Clostridium*. Cet hydrogène ayant pour vocation à être utilisé dans un procédé de méthanation biologique, sa production devra donc être optimisée. C'est-à-dire dans des conditions physico-chimiques où la productivité bactérienne en H_2 sera maximale. De premières expériences de méthanation biologiques seront réalisées afin de déterminer l'efficacité du procédé couplé ainsi que ses limitations et perspectives d'amélioration.

Après une étude bibliographique faisant le point sur l'état de l'art des fermentations sombres et de la méthanation biologique, constituant le premier chapitre de cette thèse, l'ensemble des matériels et méthodes utilisés lors du travail de thèse seront détaillés dans un deuxième chapitre. Les résultats obtenus seront exposés dans trois chapitres, retraçant les principaux questionnements et étapes de la méthodologie.

→ La fermentation sombre réalisée en culture discontinue, permettant la mise au point des conditions de culture et le choix d'une espèce de *Clostridium* privilégiée pour la production de H_2. Ce choix a été décidé après une analyse comparative des paramètres cinétiques des cultures discontinues. Cette partie sera présentée sous la forme d'une publication scientifique acceptée pour publication par *Journal of Biotechnology*.

→ La fermentation sombre réalisée en culture continue avec la souche précédemment sélectionnée. L'aboutissement de cette partie est l'optimisation de la production de H_2, tant en termes de productivité volumique que de rendement. Un article scientifique est actuellement en cours de rédaction en vue d'une publication dans *Frontiers in Microbiology* sur ce sujet.

→ Les premières expériences de couplage entre le procédé continu de bioproduction de H_2 optimisé déterminé préalablement, avec la méthanation biologique à proprement parler. Les ratios et flux des différents gaz ont été suivis en temps réel. Les résultats préliminaires ont permis de relever les différents verrous technologiques, et de proposer des pistes d'améliorations de ce procédé couplé.

I. Étude bibliographique

Au cours de ce travail de thèse, la voie biologique de production d'hydrogène a été étudiée à travers la fermentation sombre. Celle-ci présente un intérêt pour la production de méthane via la biométhanation. Pour être entièrement biologique, cette dernière réaction nécessite l'utilisation de dihydrogène gazeux, produit par le vivant en lieu et place du dihydrogène produit à partir d'énergies fossiles. La synthèse bibliographique qui va suivre dressera les principales connaissances nécessaires pour saisir les démarches effectuées lors de cette thèse, suivant cinq parties.

La première partie exposera les enjeux concernant le dihydrogène, de la dépendance de notre société à cette ressource et de la nécessité de sa bioproduction, tout en décrivant les principaux aspects des procédés de bioproduction de H_2 existants, leurs avantages et inconvénients. La deuxième partie présentera une vue d'ensemble et historique du genre bactérien *Clostridium*, capable de croître en fermentation sombre anaérobie, en produisant notamment du H_2. La troisième section se penchera sur les utilisations et les capacités des clostridies en bioprocédés. Les mécanismes de la méthanisation et de la biométhanation seront décrits dans une quatrième partie, notamment sur l'aspect des besoins en H_2. Enfin, la dernière partie sera axée sur les procédés de couplage existants pour la production de méthane à partir de H_2. Les problématiques et limites seront relevées, puisqu'elles permettront de justifier et guider les expérimentations de ce travail de thèse.

I.1. Le dihydrogène gazeux : demandes et productions

I.1.a. Utilisation du H_2 et accroissement des besoins

L'hydrogène atomique est l'élément le plus abondant sur Terre. Pourtant, l'hydrogène moléculaire sous forme de H_2 n'est pratiquement pas existant à l'état naturel, bien que de nombreux procédés chimiques nécessitent son utilisation. Assurer sa production et son approvisionnement est une facette essentielle au bon fonctionnement de l'industrie. Plus récemment, c'est en tant que vecteur énergétique que le H_2 suscite un intérêt grandissant. En effet, sa combustion au sein de piles à combustible n'émet pas de CO_2 et son pouvoir calorifique $\Delta_r H^0$ est nettement supérieur à ceux d'autres hydrocarbures (Akal et al. 2020).

- $\Delta_r H^0$(dihydrogène) = 119,9 - 141,6 MJ/kg
- $\Delta_r H^0$(méthane) = 50,0 - 55,5 MJ/kg
- $\Delta_r H^0$(propane) = 45,6 - 50,3 MJ/kg
- $\Delta_r H^0$ (essence) = 44,5 - 47,3 MJ/ kg

Le rapport « Global Hydrogen Review 2024 » indique que la demande globale en H_2 dans le monde a atteint plus de 97 Mt en 2023 et pratiquement 100 Mt en 2024 (International Energy Agency 2024). La tendance se dirige vers une augmentation, tout comme la demande en énergie globale. En effet, les principaux secteurs utilisateurs de H_2 sont le raffinage du pétrole à hauteur de 43% et l'industrie chimique (production d'ammoniac, principalement pour les engrais phosphatés, production de méthanol et production d'acier) à hauteur de 56%, loin devant l'utilisation en tant que carburant pour les transports ou l'énergie.

Pourtant, ces deux derniers secteurs devraient se développer de façon conséquente pour respecter le scénario « Zéro Émission Nette 2050 » (NZE), ce qui explique l'augmentation de la demande prévisionnelle (Figure 3).

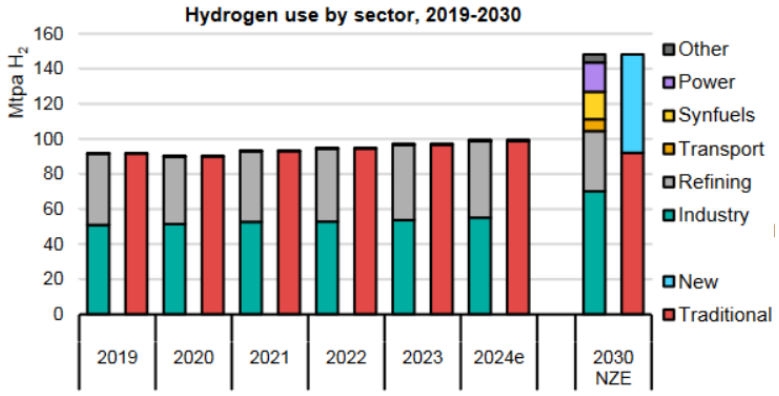


Figure 3. Évolution des demandes mondiales en H_2 entre 2019 et 2024 et prévisions pour 2030 – Global Hydrogen Review 2024 (International Energy Agency 2024).

En outre, les productions et demandes en H_2 progressent de façon locale, notamment dans les pays d'Europe, pour des raisons de souveraineté. En effet, la filière hydrogène est principalement dominée par les industries de la Chine (28% de la production mondiale), des États-Unis (14%), du Moyen-Orient (14%) et de l'Inde (9%), là où tous les pays d'Europe cumulés ne représentent que 8% (International Energy Agency 2024). Pourtant, les projections jusqu'à 2050 estiment que l'Europe sera la région la plus demandeuse en hydrogène décarboné (Wan et al. 2024). Des constats similaires peuvent être faits avec la production d'ammoniac, directement dépendante de la disponibilité en H_2. En 2022, la Chine est le premier pays producteur avec 42 millions de tonnes d'ammoniac, suivi par la Russie, avec 16 millions de tonnes, puis les États-Unis avec 13 millions de tonnes (Bora et al. 2024).

La stratégie adoptée depuis la fin des années 2010, et en pleine expansion aujourd'hui, est la conversion de l'électricité excédentaire issue des énergies renouvelables, évitant ainsi la perte de ladite électricité et garantissant un dihydrogène avec un faible impact carbone. Cela rentre dans la stratégie dite « Power-to-Gas », au même titre que les procédés de méthanation utilisant cet « hydrogène renouvelable » (Sterner et Specht 2021).

Néanmoins, la satisfaction des besoins prévisionnels en H_2 via cette voie seule nécessiterait des politiques de développement des énergies renouvelables accompagnées d'investissements plus que conséquents, et il est raisonnable de penser que, bien que souhaitable, cet effort est infaisable. De plus, le dihydrogène présente plusieurs inconvénients en raison de ses caractéristiques physico-chimiques, notamment les risques de fuites et son explosivité. Il est difficile d'estimer le niveau des fuites sur l'ensemble des installations impliquant du dihydrogène. La première vaste étude à ce sujet, réalisée par l'Environmental Defense Fund, aura lieu en 2026. Mais dès lors, il est possible d'affirmer que la compression, le stockage et la distribution de manière sécurisée de H_2 nécessiteront de forts investissements et l'installation de nombreuses infrastructures. Par exemple, pour comprimer un gaz avec un ratio de compression de 8, la compression de H_2 requiert deux à trois fois plus d'énergie que la compression de CH_4 (Tsiklios et al. 2025). Ces facteurs pris en compte, il convient donc d'utiliser cet hydrogène rapidement et à proximité de son lieu de production, ce qui est judicieux dans le cas des électrolyseurs installés près des unités de méthanation. En revanche, l'autre inconvénient notable dans ce cas est la disponibilité du H_2, car la quantité d'électricité renouvelable en excès éventuel subit de grandes variations saisonnières et quotidiennes. Sachant que les procédés de méthanation ont pour objectif la production continue de méthane, il est nécessaire d'avoir une alimentation continue en H_2 pour ce faire.

Les bioprocédés producteurs de H_2 apparaissent alors comme une des solutions aboutissant à une production constante de cette molécule. Contrairement aux procédés physico-chimiques, ces procédés biologiques présentent le double-avantage d'être moins intenses en termes de demande énergétique (les conditions de production ne demandent pas de très hautes températures ou pressions) et permettent de valoriser la biomasse au lieu de se fonder sur l'utilisation de ressources fossiles. Cela pris en compte, les émissions de gaz à effet de serre qui en résultent sont alors bien moindres (Fatima et al. 2018; Megía et al. 2021). Le développement de ces procédés biologiques est une alternative sérieuse pour s'inscrire dans la démarche de transition énergétique (Meher Kotay et Das 2008). Ces bioprocédés peuvent être divisés en trois grandes catégories, à savoir la biophotolyse, la photofermentation et la fermentation sombre.

I.1.b. La biophotolyse

Certains micro-organismes photosynthétiques sont capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour diviser les molécules d'eau, générant ainsi du dihydrogène et du dioxygène. Il est possible de distinguer la biophotolyse directe et la biophotolyse indirecte, selon les micro-organismes considérés (Fatima et al. 2018; Sarangi et Nanda 2020).

Concernant la biophotolyse directe, l'énergie lumineuse captée est directement utilisée pour le craquage des molécules d'eau. À l'instar de l'électrolyse de l'eau, comme présenté Eq. (2).

$$2\,H_2O \xrightarrow{\substack{énergie\\ lumineuse}} 2\,H_2 + O_2 \qquad (2)$$

Les espèces catalysant cette réaction sont des micro-algues, appartenant principalement aux genres *Chlamydomonas* et *Cyanobacteria*, possèdant les systèmes photosynthétiques PSI et PSII, au même titre que la plupart des végétaux (Ni et al. 2006). Le système PSI a pour rôle la production de cofacteurs réduits (conversion du $NADP^+ + H^+$ en NADPH) et d'énergie sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP), et travaille de concert avec le système PSII. Ce dernier est responsable de la décomposition des molécules d'eau, formant de l'O_2, des protons H^+ et des électrons (Ni et al. 2006; Nelson et Yocum 2006). Ces électrons sont transférés via une ferrédoxine (protéine fer-soufre) vers une hydrogénase, enzyme capable de catalyser la formation de H_2 à partir de protons H^+ et d'électrons, ainsi que la réaction inverse, en cas d'un besoin électronique, notamment suite à un changement métabolique (Eq. 3).

$$2\,H^+ + 2\,\bar{e} \rightleftharpoons H_2 \qquad (3)$$

Dans le cas de la biophotolyse indirecte, les complexes PSI et PSII dirigent l'énergie lumineuse vers la formation de matière organique (sous la forme d'hexoses) au lieu du dihydrogène, par réduction du CO_2, de façon identique à la photosynthèse connue chez les végétaux selon l'équation (Eq. 4).

$$6\,H_2O + 6\,CO_2 \xrightarrow{\substack{énergie\\ lumineuse}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \qquad (4)$$

Par la suite, les hexoses préalablement produit sont fermentés par l'organisme en l'absence de lumière, menant à la formation d'acétate, de CO_2 et de H_2 (Eq.5).

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_3COOH + 2\,CO_2 + 4\,H_2 \quad (5)$$

Ensuite, l'acétate sert lui-même de substrat pour la formation de H_2 et de CO_2 supplémentaire, quand la lumière est à nouveau présente (Eq. 6).

$$2\,CH_3COOH + 4\,H_2O \xrightarrow{énergie\ lumineuse} 8\,H_2 + 4\,CO_2 \quad (6)$$

(Ni et al. 2006; Hallenbeck 2002; Sarangi et Nanda 2020; Troshina 2002; Vargas et al. 2014)

Anabaena variabilis (cyanobactérie), *Gloeocapsa alpicola* (cyanobactérie) ou encore *Chlamydomonas reinhardtii* (micro-algue verte) sont des micro-organismes notables capables de catalyser ces réactions et qui ont été utilisées en recherche à cette fin (Markov 1997; Troshina 2002; Benemann 2000).

Les recherches sur les technologies de biophotolyse ont gagné en intérêt au début des années 2000 puis se sont intensifiées. Leur avantage principal réside dans le fait que la lumière soit une source d'énergie et que l'eau soit le substrat principal de ces réactions, et non un substrat organique à fournir. De plus, au regard des équations métaboliques, les rendements théoriques en H_2 semblent élevés (une mole de H_2 peut être obtenue à partir d'une mole d'eau, que ce soit via la biophotolyse directe ou indirecte) puisque les cultures se déroulent en milieu aqueux. Cependant, ces procédés présentent des productivités très limitées, allant de 1 à 15 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ (Melitos et al. 2021; Rather et Srivastav 2021; Sarangi et Nanda 2020) en raison de la problématique de l'éclairage. Celui-ci ne peut effectivement être identique au sein de tout un bioréacteur en raison de l'opacification du milieu, en plus de présenter des coûts élevés en énergie pour le maintien en permanence de lumière artificielle. Cela limite ainsi fortement la transposition du procédé sur de plus gros volumes de cuves, nécessaire pour l'utilisation à l'échelle industrielle. Il convient de préciser également que certaines hydrogénases impliquées dans la formation de H_2 sont très sensibles et inhibées irréversiblement par l'O_2, alors que ce gaz est justement produit dans les premières réactions de la biophotolyse. L'intensification du procédé s'avère alors très complexe à mettre en œuvre (Melitos et al. 2021; Allakhverdiev et al. 2010).

I.1.c. La photofermentation

Le concept de ce procédé est d'utiliser des bactéries photosynthétiques, comme celles des genres *Rhodobacter* ou *Chlorobium*, capables de dégrader des acides organiques à courte chaîne, aussi appelés acides gras volatils (AGV), en H_2 (Ni et al. 2006; Fatima et al. 2018; Baeyens et al. 2020). Dans

ces conditions, l'énergie lumineuse captée est utilisée pour la génération d'ATP nécessaire au déroulement des autres réactions. Les acides organiques servant de substrat sont alors source de protons et d'électrons, qui seront ensuite transportés par une ferrédoxine jusqu'à une nitrogénase (complexe enzymatique), responsable de la synthèse de H_2. Les acides utilisés pour la photofermentation dépendent de l'affinité de la bactérie utilisée envers le substrat (Hallenbeck 2002; Ni et al. 2006). Les équations métaboliques peuvent alors s'écrire selon les Eqs. (7) à (10) (Baeyens et al. 2020) :

$$\text{- lactate : } C_3H_6O_3 + 3\,H_2O \xrightarrow[lumineuse]{énergie} 6\,H_2 + 3\,CO_2 \quad (7)$$

$$\text{- acétate : } C_2H_4O_2 + 2\,H_2O \xrightarrow[lumineuse]{énergie} 4\,H_2 + 2\,CO_2 \quad (8)$$

$$\text{- propionate : } C_3H_6O_2 + 4\,H_2O \xrightarrow[lumineuse]{énergie} 7\,H_2 + 3\,CO_2 \quad (9)$$

$$\text{- butyrate : } C_4H_8O_2 + 6\,H_2O \xrightarrow[lumineuse]{énergie} 10\,H_2 + 4\,CO_2 \quad (10)$$

Tout comme pour la biophotolyse, les rendements théoriques en H_2 de la photofermentation sont globalement intéressants, variant entre 4 et 10 moles de H_2 par mole d'acide organique consommé. Néanmoins, ce constat est à nuancer, en raison de la moins grande efficacité des nitrogénases à catalyser la formation de H_2, par rapport aux hydrogénases. C'est notamment le cas en présence de diazote (N_2) gazeux qui va alors être fixé par la bactérie puis réduit en ammoniac par la nitrogénase (Eq. 11), enzyme dont le rôle évolutif est justement la fixation de l'azote atmosphérique. La réaction considérée montre un rendement bien moins élevé en gaz, et entre alors en concurrence avec la conversion directe des protons et électrons en H_2. Néanmoins, des rendements satisfaisants situés entre 2,3 et 8,3 $mol_{H_2}/mol_{substrat}$ sont rapportés dans la littérature. Les productivités sont alors meilleures que *via* la biophotolyse, avec des valeurs variant entre 18 et 130 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ (Allakhverdiev et al. 2010; Menia et al. 2019; Melitos et al. 2021).

$$N_2 + 8\,H^+ + 8\,\bar{e} \rightarrow 2\,NH_3 + H_2 \quad (11)$$

Ainsi, il est nécessaire de s'assurer de la non-infiltration de N_2 dans le système, ce qui comporte des difficultés lors du passage à de larges systèmes, souvent étendus dans l'espace en raison de l'éclairage à maintenir. Cet éclairage constant, tout comme dans le cas de la biophotolyse, représente un coût en énergie à ne pas négliger pour la mise en œuvre du procédé. Un éclairage naturel peut être envisagé pour limiter ces coûts, mais se heurte alors aux problématiques de variabilités de l'intensité de la lumière solaire. En se penchant sur l'efficacité énergétique (*i.e.* le rapport entre l'énergie exploitable par le H_2 produit et l'énergie lumineuse absorbée), les différentes expériences menées rapportent des valeurs allant de 6% à 24% en considérant seulement l'énergie issue des longueurs d'ondes utiles à la photosynthèse. Ces valeurs tombent entre 3% et 10% en prenant en compte l'énergie diffusée par tout le spectre lumineux (Fatima et al. 2018; Akkerman et al. 2002; Greenbaum 1988).

I.1.d. La fermentation sombre

La fermentation sombre, parfois appelée fermentation obscure, est une fermentation anaérobie ayant lieu sans le besoin d'énergie lumineuse. Ici, des molécules plus ou moins complexes issues de la matière organique sont réduites et converties principalement en acides organiques, (tels que l'acétate, le formiate ou le butyrate), en alcools (éthanol, butanol, 1,3-propanediol) ou encore en acétone. Cette réduction participe à la génération de protons et d'électrons, qui seront ensuite transportés par une ferrédoxine et convertis en H_2 par une hydrogénase. L'anaérobiose est donc primordiale à maintenir, afin de ne pas inactiver les hydrogénases. Cette approche permet l'utilisation d'une large gamme de substrats organiques, principalement glucidiques, ainsi que de nombreux micro-organismes différents capables de réaliser cette fermentation (Hay et al. 2013; Rittmann et Herwig 2012). Trois grandes catégories de réactions aboutissant à la formation de H_2 peuvent se dégager, mais toutes ont en commun l'oxydation d'un substrat carboné, ici le glucose choisi comme substrat modèle pour illustrer la majorité des fermentations sombres, en pyruvate via la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, Eq. (12)). Celle-ci a pour intérêt la formation d'ATP et de coenzymes réduits, nécessaires pour un certain nombre d'autres réactions métaboliques.

Conversion du glucose en pyruvate :

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,NAD^+ + 2\,(ADP + Pi) \rightarrow 2\,C_3H_4O_3 + 2\,NADH + 2\,ATP + 2\,H_2O \qquad (12)$$

La première possibilité du devenir du pyruvate est de réagir avec la coenzyme A (CoA) pour former du formiate et de l'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) (Eq. 13). Ce formiate est ensuite décomposé en H_2 et CO_2 (Eq. 14).

$$C_3H_4O_3 + CoA \xrightarrow{\substack{pyruvate-formiate \\ lyase}} Acétyl - CoA + HCOOH \quad (13)$$

$$HCOOH \xrightarrow{\substack{formiate-hydrogène \\ lyase}} H_2 + CO_2 \quad (14)$$

Cette voie peut être empruntée chez des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae,* et notamment chez *Escherichia coli* (Hay et al. 2013; Oh et al. 2011; Azoulay et Marty 1970).

La deuxième voie consiste en la décarboxylation oxydative du pyruvate, qui va réagir avec la CoA ainsi que la ferrédoxine sous la forme oxydée (Eq. 15). Celle-ci, sous la forme réduite, devra se régénérer sous la forme oxydée en transférant ses électrons. Pour ce faire, une hydrogénase les captera via la ferrédoxine réduite, conduisant à la génération de H_2 par réduction de protons (Eq. 16).

$$C_3H_4O_3 + CoA + 2\,Fd_{ox} \xrightarrow{\substack{pyruvate-ferrédoxine \\ oxydoréductase}} CO_2 + Acétyl - CoA + 2\,Fd_{réd} \quad (15)$$

$$2\,Fd_{réd} + 2\,H^+ \xrightarrow{hydrogénase} 2\,Fd_{ox} + H_2 \quad (16)$$

Ces réactions sont typiques des bactéries du genre *Clostridium* (Hay et al. 2013; Baeyens et al. 2020; Oh et al. 2011).

Dans les deux cas présentés, l'un des produits issus du pyruvate est l'acétyl-CoA, molécule centrale pour la synthèse des acides organiques, caractéristique des fermentations sombres anaérobies.

La troisième catégorie de réactions possibles fait directement intervenir les cofacteurs NAD^+/NADH pour apporter le surplus d'électrons issus du catabolisme à la ferrédoxine (Eq. 17), qui seront ensuite utilisés par l'hydrogénase (Eq. 18).

$$2\,NADH + 4\,Fd_{ox} \xrightarrow{\substack{NADH-ferrédoxine \\ oxydoréductase}} 2\,NAD^+ + 4\,Fd_{réd} \quad (17)$$

$$4\,Fd_{réd} + 4\,H^+ \xrightarrow{hydrogénase} 4\,Fd_{ox} + 2\,H_2 \quad (18)$$

Ces réactions peuvent également se produire chez certaines espèces de *Clostridium*, ou chez des bactéries thermophiles du genre *Caldicellulosiruptor* ou *Thermoanaerobacterium* (Oh et al. 2011; Hay et al. 2013; Rittmann et Herwig 2012; Talapko et al. 2023).

Contrairement à ce qui peut être constaté avec la biophotolyse ou la photofermentation, les rendements théoriques en H_2 s'avèrent moins élevés, s'élevant à 4 moles de H_2 par mole d'hexose au maximum (Thauer et al. 1977). Pourtant, la fermentation sombre a fait l'objet d'un nombre conséquent d'études, car cette réaction globale reste relativement sobre en énergie, et a trouvé de nombreuses applications dans le traitement des eaux usées ou des déchets, et qui représentent un très faible coût en substrat (Baeyens et al. 2020; Singh et Wahid 2015; Sarangi et Nanda 2020; Ni et al. 2006; Talapko et al. 2023; Guo et al. 2010).

Il est à noter qu'un certain nombre bactéries du genre *Clostridium* sont capables d'utiliser conjointement les deuxième et troisième ensembles de réactions présentés précédemment. Ainsi, lors d'un flux important de substrat carboné, de nombreuses voies métaboliques sont disponibles pour l'évacuation des électrons, résultant potentiellement en un flux important de H_2. Ces bactéries sont donc les plus performantes en terme productivité volumique de H_2 (de l'ordre de quelques centaines de $mL_{H_2}/L_{culture}/h$), ce qui explique pourquoi les études se penchent davantage sur l'utilisation de ces bactéries (Rittmann et Herwig 2012; Baeyens et al. 2020; Wang et Yin 2021).

I.1.e. Diversité des méthodes de bioproduction de H_2

D'après les avantages et inconvénients des méthodes évoquées précédemment, il est possible d'affirmer plus simplement que les procédés de bioproduction de H_2 utilisant la lumière présentent des rendements en H_2 par rapport au substrat plus élevés que les procédés de fermentation sombre. En revanche, ces derniers montrent des capacités de productivité bien plus importantes, ce qui est essentiel pour satisfaire des demandes importantes en H_2. C'est pourquoi les recherches se focalisent davantage sur les procédés de fermentation sombre. En effet, entre 2008 et 2023, 7750 articles ont concerné la production de H_2 par fermentation sombre. Ce nombre n'est que d'environ 3500 pour la photofermentation et d'à peine 500 pour la biophotolyse sur cette même période (Teke et al. 2023). Ainsi, les pistes actuelles sur la fermentation sombre s'attachent à l'intensification de la production de H_2, notamment en augmentant les rendements et en utilisant des sources de substrat peu onéreuses afin d'obtenir un procédé viable économiquement. C'est par exemple le cas de la production de H_2 à partir de glycérol (Sarma et al. 2019).

L'une des pistes envisagées concerne le couplage, via des procédés bi-étagés, de la fermentation sombre d'une part, et de la photofermentation d'autre part, afin de dégrader les acides organiques préalablement produits, et de générer du H_2 supplémentaire (Hay et al. 2013; Fatima et al. 2018; Baeyens et al. 2020). Une autre piste s'appuie sur des co-cultures de clostridies avec d'autres micro-organismes (des genres *Enterobacter* ou *Rhodopseudomonas*, par exemple) menées au sein d'un même bioréacteur, afin que les produits issus du métabolisme des clostridies puissent servir de substrats pour les autres et générer du H_2 supplémentaire (Ergal et al. 2020; Du et al. 2020). Ergal et al. sont ainsi parvenus, avec une co-culture de *Clostridium* et *Enterobacter* à un rendement maximal de 5,6 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ et une productivité de 230 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$). Les autres aspects explorés sont les systèmes éléctrobiochimiques, où les cultures de clostridies sont exposées à un léger courant électrique. Les électrodes agissent alors comme donneurs (cathode) ou accepteurs d'électrons (anode), créant ainsi une force motrice pour la production de H_2 par les bactéries électrosensibles. Lalaurette et al. ont obtenu un rendement de 9,95 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ dans leurs travaux mais avec une productivité de seulement 70 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ (Lalaurette et al. 2009; Choi et al. 2014; Truong et al. 2024).

I.2. Les bactéries du genre *Clostridium*

I.2.a. Caractéristiques du genre bactérien

D'après la « List of Prokaryotic Names with Standing Nomenclature » établie par l'Institut Leibniz DSMZ (« Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen »), le genre *Clostridium* compte 169 espèces répertoriées en 2025, dont 2 nouvelles espèces introduites en 2025 et 9 en 2024, témoignant de la recherche active dans ce domaine. Il s'agit de bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes*, en forme de bâtonnets (diamètre de l'ordre du micromètre, et longueur de 3 à 7 µm), Gram positives, au métabolisme strictement anaérobie, ne possédant pas d'activité sulfato-réductrice et capables de former des endospores (Figure 4). La fermentation anaérobie qu'elles réalisent est une fermentation acides/solvants faisant partie des fermentations sombres. Leur milieu de vie est variable, tant qu'il y a absence de dioxygène et obéit à des conditions généralement mésophiles. C'est pourquoi on les retrouve principalement dans les sols ou le tractus digestif des animaux (Dworkin et al. 2006; Cruz-Morales et al. 2019). Certaines espèces sont tout de même thermophiles et se développent préférentiellement à des températures aux environs de 50°C, telles que *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermobutyricum* ou *Clostridium thermopapyrolyticum*. Ces dernières ont été isolées dans des milieux plus extrêmes, comme des stations de traitement de déchets ou des sédiments rocheux (Wagner et Wiegel 2008). Les spores, dont la paroi est composée principalement de peptidoglycane,

ne sont pas biologiquement actives, mais sont des formes de dormance, et cette paroi leur confère une résistance notamment thermique et chimique. Lorsque les conditions environnementales leur sont favorables, ces spores sont capables de germer et d'aboutir à une cellule vivante et au métabolisme actif. Ce mécanisme est particulièrement problématique d'un point de vue sanitaire, car l'introduction de spores de *Clostridium* pathogènes dans un organisme humain ou animal vulnérable (ingestion ou blessure), peut amener à la prolifération de bactéries pouvant sécréter des toxines potentiellement mortelles. C'est par exemple le cas de *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile*. En revanche, cela a un intérêt particulier du point de vue des bioprocédés, car cette forme de résistance permet le stockage à long terme et à température ambiante des souches, sans la nécessité d'équipements particuliers et onéreux (cryotube et congélateurs industriels) (Cruz-Morales et al. 2019; Dürre 2014).

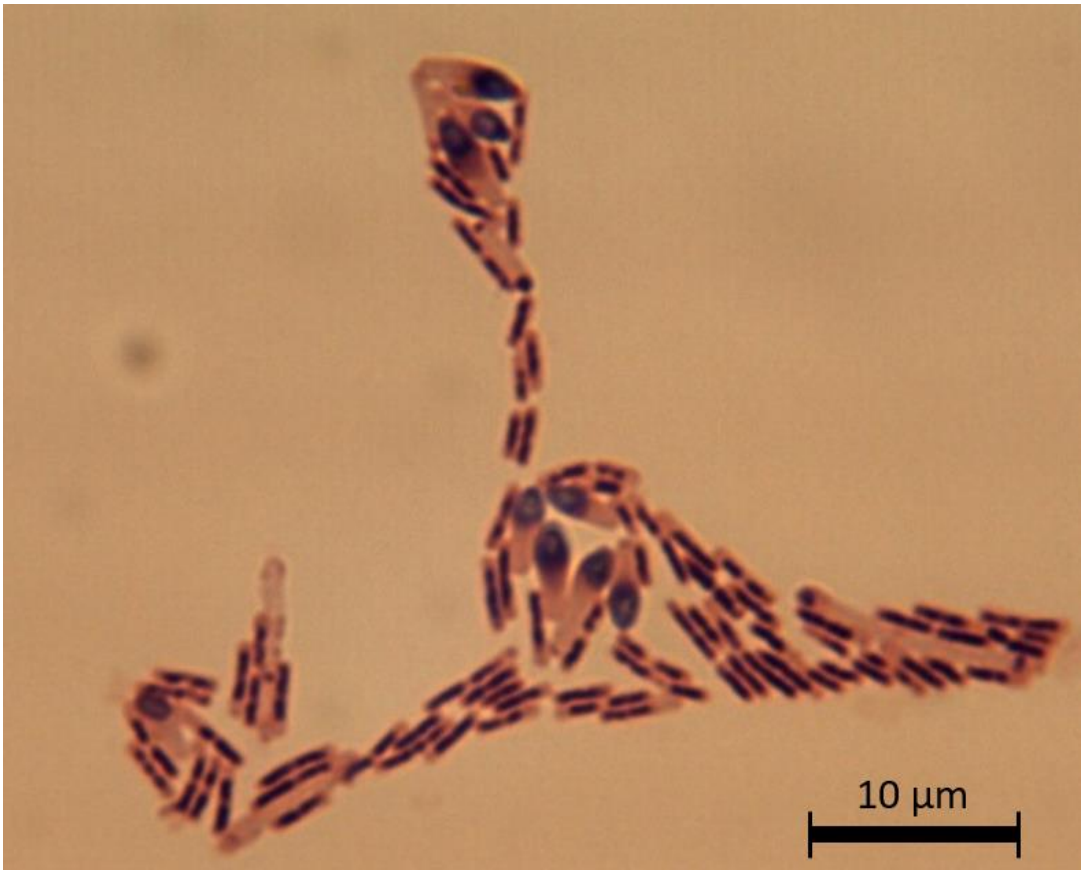


Figure 4. Microphotographie de *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 après coloration de Gram. Il est possible de distinguer les formes végétatives (bâtonnets bleus sur l'ensemble de la cellule) des formes sporulées (plus grosses, aux parois fragilisées colorées en rose, et présentant un gonflement coloré en bleu, correspondant à l'endospore).

I.2.b. Utilisations historiques et industrielles

C'est en 1861 que Louis Pasteur rapporte une fermentation ayant lieu à l'abri de l'air, réalisée par ce qu'il nomme à cette époque « un vibrion butyrique ». Il introduit ensuite dans ses écrits les notions d'organismes « aérobies » et « anaérobies » (Pasteur 1880). Plus tard, en 1880, Adam Prażmowski identifie dans sa thèse de doctorat un bacille produisant des endospores, mais dont les spores sont deux fois plus grosses que celles produites par les bactéries du genre *Bacillus* décrit par Ferdinand Cohn. Prażmowski attribue donc à ce genre le nom de *Clostridium* (Prażmowski 1880).

Dès le début du XX^{ème} siècle, les fermentations par *Clostridium* ont été transposées à l'échelle industrielle pour leur haute capacité à produire des solvants à partir de ressources riches en glucides. Ces solvants étaient utilisés pour la production de caoutchouc synthétique. Lors de la Première Guerre Mondiale, Chaim Weizmann isole une souche de *Clostridium acetobutylicum* pour la production massive d'acétone à partir de d'amidon, nécessaire à la fabrication de la cordite, un explosif sans fumée. Le « Procédé Weizmann » était né, exploitant pleinement les capacités de ce qui se nommera couramment « fermentation ABE » (pour Acétone-Butanol-Éthanol), résultant en l'obtention de métabolites en solution, avec des ratios massiques de 30% d'acétone, 60% de butanol et 10% d'éthanol environ. Son utilisation s'est maintenue et répandue jusqu'à la fin de la Seconde Guerre Mondiale, notamment pour la fabrication de peintures à séchage rapide, où la souche *C. acetobutylicum* ATCC 824 s'est imposée comme souche de référence, et reste encore actuellement très utilisée en recherche (Killeffer 1927; Sauer 2016; Oehlenschläger et al. 2025).

Cependant, dans les années 1950, avec l'avènement de la pétrochimie, le procédé Weizmann a été rendu obsolète pour la production de solvants, car devenu non-compétitif économiquement parlant. Néanmoins, depuis les chocs pétroliers des années 1970 et avec la volonté d'obtenir des solvants ne se reposant pas sur l'exploitation des produits pétroliers, les fermentations par *Clostridium* ont peu à peu suscité à nouveau de l'intérêt. En outre, l'intérêt ne se porte plus seulement sur les effluents liquides, mais aussi sur le gaz produit, riche en H_2. Néanmoins, depuis ces années, aucune production industrielle à grande échelle de H_2 d'origine biologique n'existe encore à ce jour (Hastings 1971; Sauer 2016; Oehlenschläger et al. 2025). Ainsi, les données bibliométriques au sujet de la production de H_2 par *Clostridium* rapportent moins de 15 articles publiés entre 1976 et 2004, contre un peu moins de 60 entre 2005 et 2009, plus 70 entre 2010 et 2014, et 120 entre 2015 et 2021.

I.2.c. Mécanismes fermentaires chez les bactéries du genre Clostridium

Le cycle de vie en culture sans contrôle de l'environnement des clostridies se déroule en deux phases (Figure 5) :

- Une phase acidogène (ou acidogenèse), durant laquelle les bactéries vont présenter une croissance rapide et exponentielle, accompagnée d'une forte consommation du substrat, ainsi qu'une forte production d'acides organiques et de gaz (H_2 et CO_2). Cette phase est responsable de l'acidification du milieu.

- Une phase solvantogène (ou solvantogenèse), illustrée par un ralentissement de la croissance, voire une phase stationnaire. Les bactéries se maintiennent en vie en consommant une partie des acides préalablement produits pour les convertir en solvants et alcools, menant à une légère remontée du pH. La production gazeuse est également diminuée, avec une diminution de la production de H_2, et une proportion de CO_2 plus élevée. Si les conditions du milieu ne s'améliorent pas, cette solvantogénèse mène ensuite à la sporulation des bactéries.

D'un point de vue microscopique, ces phases sont bien distinctes. Néanmoins, à l'échelle macroscopique d'un bioréacteur, la frontière entre les deux est plus poreuse, et autant de solvants que d'acides organiques peuvent se retrouver simultanément dans le milieu de culture.

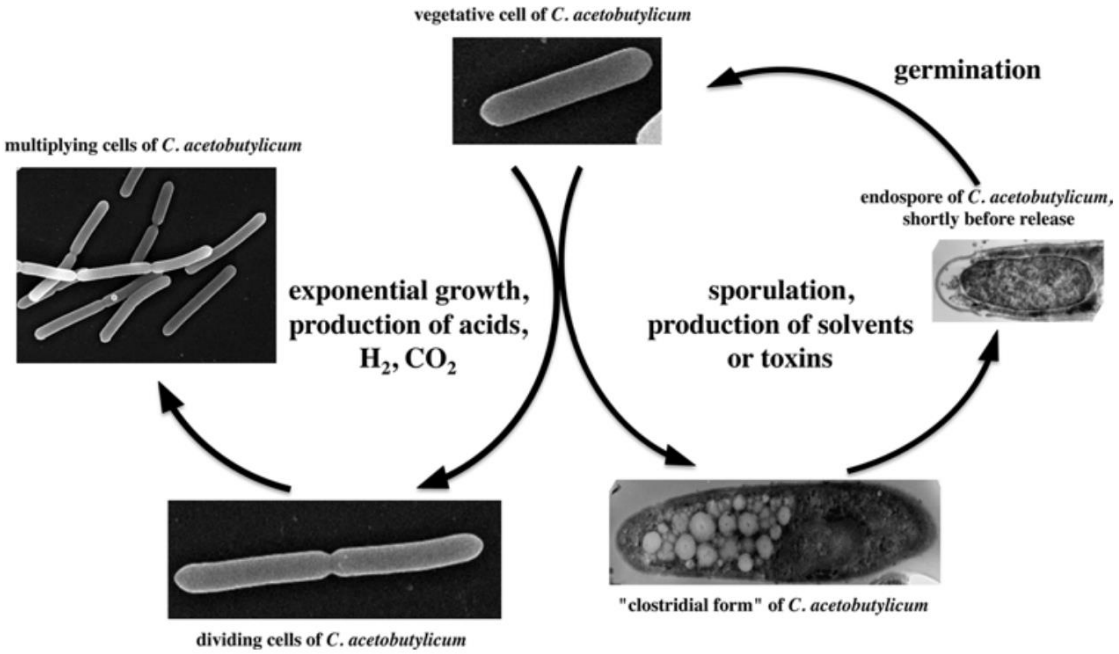


Figure 5. Cycles de vie de *C. acetobutylicum*, illustrant le cycle des cellules végétatives à gauche, à l'instar de la plupart des bactéries, et le cycle de la sporulation à droite, induite par les mauvaises conditions du milieu. (Tiré de Dürre et al. 2014)

Voie catabolique commune : la glycolyse

La voie de la glycolyse est commune à l'acidogenèse et la solvantogenèse. Elle est utilisée pour la production d'une molécule précurseur, le pyruvate, de coenzyme réduit sous la forme de NADH, ainsi que d'énergie pour la cellule sous la forme d'ATP (Figure 6). Ce pyruvate est ensuite converti en différents métabolites selon les besoins de la cellule. Le métabolisme des clostridies est donc un métabolisme branché, menant à la synthèse de divers métabolites dans des proportions variables, par opposition à un métabolisme linéaire.

Il convient de noter que la glycolyse est plus intense durant la phase acidogène que durant la phase solvantogène. Conséquemment, plus la voie de la glycolyse est sollicitée, plus il y aura de NADH produit qui devra être réoxydé en NAD^+ afin de conserver l'équilibre électronique. Cela peut se faire de la NADH-ferrédoxine oxydoréductase vers l'hydrogénase (voir I.2.d). Ainsi, il existe une équivalence théorique pouvant s'écrire 1 NADH ⇔ 1 H_2.

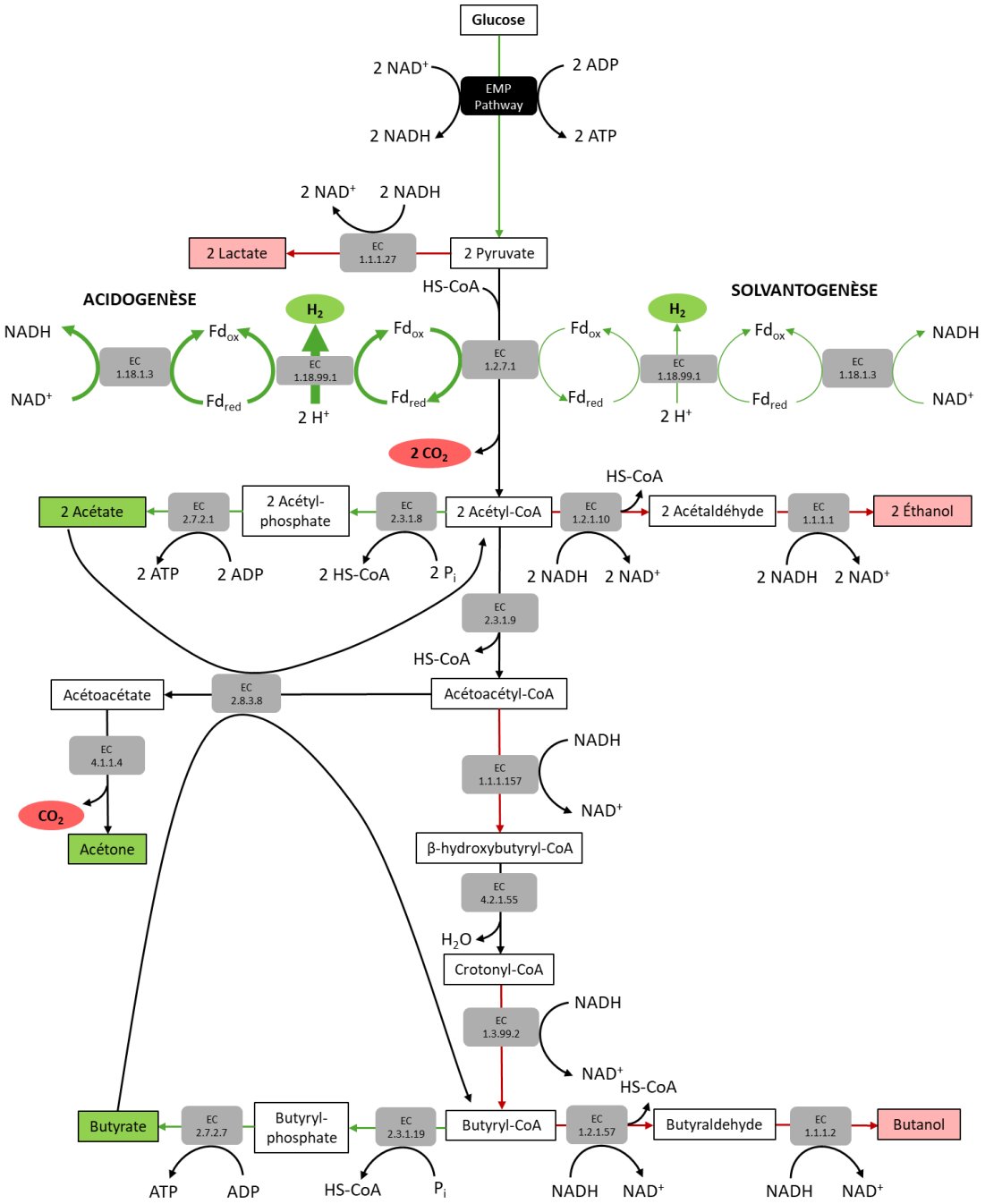


Figure 6. Voies métaboliques générales du métabolisme carboné présentes chez *Clostridium*. Enzymes présentes : EC 1.1.1.27, lactate déshydrogénase; EC 1.2.7.1, pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase; EC 1.18.99.1, hydrogénase; EC 1.18.1.3, NADH-ferrédoxine oxydoréductase; EC 2.3.1.8, phosphotransacétylase; EC 2.7.2.1, acétate kinase; EC 1.2.1.10, acétaldéhyde déshydrogénase; EC 1.1.1.1, éthanol déshydrogénase; EC 2.3.1.9, acétoacétyl-CoA thiolase; EC 2.8.3.8, acétoacétyl-CoA:acyl-CoA transférase; EC 4.1.1.4, acétoacétate décarboxylase; EC 1.1.1.157, beta-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase; EC 4.2.1.55, crotonase; EC 1.3.99.2, butyryl-CoA déshydrogénase; EC 2.3.1.19, phosphotransbutyrylase; EC 2.7.2.7, butyrate kinase; EC 1.2.1.57, butyraldéhyde déshydrogénase; EC 1.1.1.2, butanol déshydrogénase.

La phase acidogène

Pendant l'acidogenèse les principaux acides organiques produits sont l'acétate et le butyrate. D'une part, deux molécules d'acétyl-CoA (issues de la décarboxylation oxydative du pyruvate) sont converties en acétyl-phosphate par une phosphotransacétylase, ce qui mène à la captation d'un phosphate inorganique (Pi). Cet acétyl-phosphate sera ensuite converti en acétate par une acétate kinase. Le Pi préalablement capté va réagir avec une molécule d'ADP, menant à la formation d'un ATP supplémentaire. La voie de l'acétate mène donc à une forte production d'énergie.

D'autre part, les deux molécules d'acétyl-CoA peuvent également être condensées en une seule molécule d'acétoacétyl-CoA par une thiolase. Cela mènera à la formation d'un β-hydroxybutyryl-CoA via une β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase et la conversion d'un NADH en NAD^+. Cela aboutit ensuite à la formation de crotonyl-CoA par une crotonase, puis de butyryl-CoA par une butyryl-Coa déshydrogénase et l'utilisation d'un NADH. Ce butyryl-CoA va ensuite capter un Pi à la place du CoA et devenir du butyryl-phosphate grâce à une phosphotransbutyrylase, lequel sera finalement converti en butyrate accompagné d'un ATP en faisant intervenir une butyrate kinase. Il est à noter que cette réaction nécessite la conversion de 2 NADH en NAD^+. C'est autant de NADH qui ne pourront pas être convertis en H_2 via le couple NADH-ferrédoxine oxydoréductase et hydrogénase. Cette réaction est donc moins favorable à la production de dihydrogène.

Enfin, il est possible que ces voies métaboliques se retrouvent saturées. L'excès de pyruvate est alors converti directement en lactate via une lactate déshydrogénase et l'utilisation de NADH. Cette réaction sert de voie de délestage, et n'est associée à aucune émission de gaz, et est électroniquement équilibrée si on considère le bilan de la production de lactate à partir de glucose. Elle permet en outre de générer une petite quantité d'énergie (les 2 ATP de la glycolyse) sans mobiliser de nombreux enchaînements de réactions enzymatiques.

Bilan du métabolisme du glucose lors de l'acidogenèse

Le bilan du métabolisme du glucose lors de l'acidogenèse peut être établi à partir des Eqs. (19) à (21).

- Production d'acétate : ➔ Coenzymes : + 2 NADH / - 2 NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O\ + 4\,(ADP + Pi) \rightarrow 2\,C_2H_4O_2 + 2\,CO_2 + 4\,H_2 + 4\,ATP \qquad (19)$$

- Production de butyrate : ➔ Coenzymes : à l'équilibre entre NADH et NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 3\,(ADP + Pi) \rightarrow C_4H_8O_2 + 2\,CO_2 + 2\,H_2 + 3\,ATP \qquad (20)$$

- Production de lactate : ➔ Coenzymes : à l'équilibre entre NADH et NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ (ADP + Pi) \rightarrow 2\ C_3H_6O_3 + 2\ ATP \quad (21)$$

La phase solvantogène

Dans le cas de la solvantogenèse, l'éthanol et le butanol peuvent être des produits des clostridies solvantogènes.

D'un côté, les deux molécules d'acétyl-CoA deviennent des molécules d'acétaldéhyde sous l'action d'une acétaldéhyde déshydrogénase, avec la conversion de deux molécules de NADH en NAD^+. Cet acétaldéhyde est ensuite réduit en éthanol via une alcool déshydrogénase, impliquant la consommation de NADH supplémentaire.

De l'autre côté, il faut repartir de la molécule de butyryl-CoA. Cette fois-ci, elle sera convertie en butyraldéhyde par une butyraldéhyde déshydrogénase et l'utilisation de NADH. Cela conduira à la formation de butanol à l'aide d'une butanol déshydrogénase et à la consommation de NADH.

La conversion du pyruvate en ces deux alcools nécessite ici la conversion de 4 NADH en NAD^+, ce qui n'est pas favorable à la production de H_2.

Le cas de la production d'acétone est plus particulier, car celle-ci a lieu en fin de solvantogénèse et nécessite la production préalable d'acétate ou de butyrate. En effet, une molécule d'acétate (ou de butyrate) réagit ici avec une molécule d'acétoacétyl-CoA pour former à nouveau de l'acétyl-CoA (ou butyryl-CoA) et de l'acétoacétate, faisant intervenir une CoA transférase. L'acétoacétate est alors converti en CO_2 et acétone par une acétoacétate décarboxylase. Dans le cas de l'utilisation de butyrate, il en résulte une molécule de butyryl-CoA, ce qui deviendra alors une nouvelle molécule de butyrate ou de butanol (Wang et Yin 2021; Jang et al. 2012; Vasconcelos et al. 1994).

Bilan du métabolisme du glucose lors de la solvantogenèse

Le bilan du métabolisme du glucose en acidogenèse peut être établi à partir des Eqs. (22) à (25).

- Production d'éthanol : ➔ Coenzymes : - 2 NADH / + 2 NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ (ADP + Pi) \rightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2 + 2\ ATP \quad (22)$$

- Production de butanol : ➔ Coenzymes : - 2 NADH / + 2 NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ (ADP + Pi) \rightarrow C_4H_{10}O + 2\ CO_2 + H_2O + 2\ ATP \quad (23)$$

- Production d'acétone à partir de l'acétate : ➔ Coenzymes : + 2 NADH / - 2 NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 3\ (ADP + Pi) \rightarrow C_3H_6O + 3\ CO_2 + 4\ H_2 + 3\ ATP \quad (24)$$

- Production d'acétone à partir du butyrate : ➔ Coenzymes : + 1 NADH / - 1 NAD^+

$$C_6H_{12}O_6 + 3\ (ADP + Pi) \rightarrow 0{,}5\ C_3H_6O + 0{,}5\ C_4H_8O_2 + 0{,}5\ H_2O + 2{,}5\ CO_2 + 3\ H_2 + 3\ ATP \quad (25)$$

Cas particulier de la croissance sur glycérol

Le glycérol est un co-produit majeur des industries, notamment agro-alimentaires, de production de carburant (biodiesel), ou des industries de saponification. Plusieurs espèces de *Clostridium* (notamment *C. pasteurianum* et *C. butyricum*) sont capables d'utiliser cette molécule comme substrat, ce qui constitue un moyen de valoriser énergétiquement cette ressource relativement bon-marché.

Chez ces clostridies, le glycérol peut suivre une voie oxydative (Figure 7) au sein de laquelle il finira par être converti en pyruvate, qui mènera ensuite à la formation de molécules identiques au métabolisme carboné du glucose. Cette voie permet la génération de deux coenzymes sous forme réduite NADH ainsi que deux ATP par molécule de glycérol, à l'instar du glucose par la glycolyse. La différence réside en l'obtention d'une seule molécule de pyruvate par molécule de substrat, et non deux.

Néanmoins, l'autre branche du métabolisme que constitue la voie réductrice entre en concurrence avec la voie oxydative (Figure 7), et se trouve même très largement sollicitée, en raison de la nécessité de régénérer les coenzymes sous la forme oxydée NAD^+. Ainsi, les métabolites produits à l'issue d'une fermentation du glycérol par *Clostridium* sont majoritairement des alcools, et notamment le butanol et le 1,3-propanediol, présentant finalement un rendement en H_2 par rapport au substrat souvent inférieur à celui du glucose (Viana et al. 2014; Sarma et al. 2012; Biebl 2001; Johnson et Rehmann 2020; Raynaud et al. 2003).

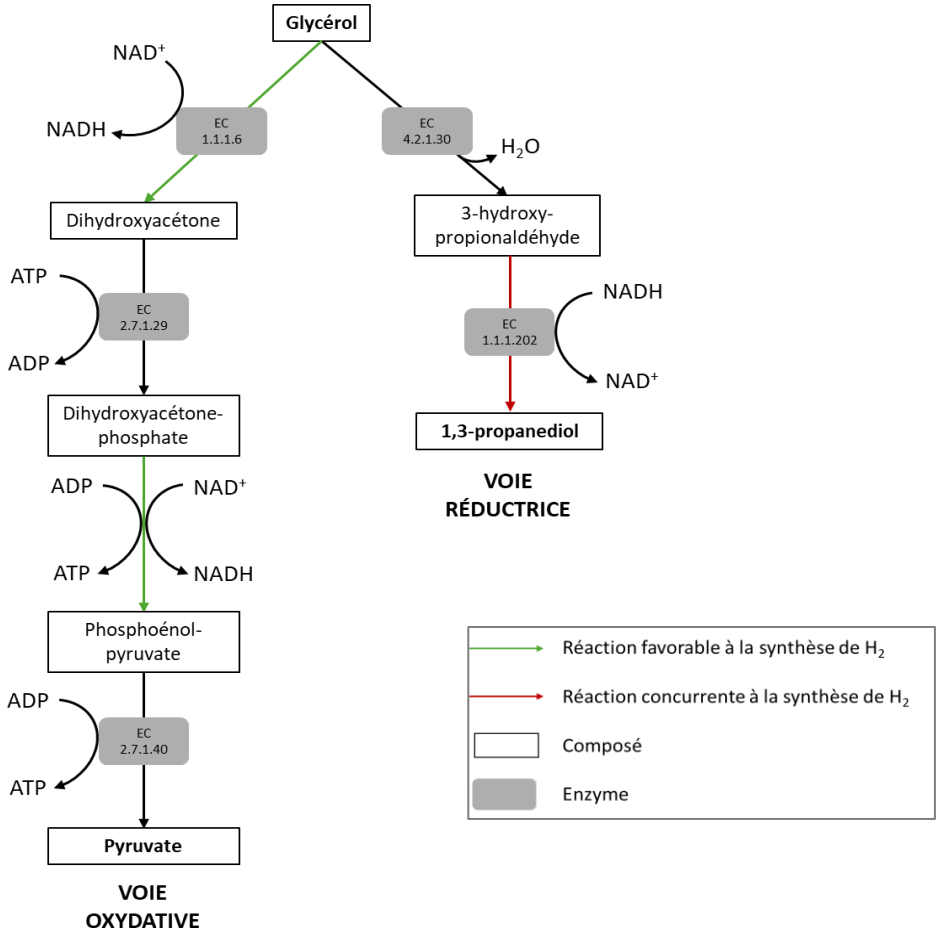


Figure 7. Voies métaboliques de l'assimilation du glycérol, typiquement présentes chez *C. pasteurianum* et *C. butyricum*. Enzymes présentes : EC 1.1.1.6, glycérol déshydrogénase; EC 2.7.1.29, dihydroxyacétone kinase; EC 2.7.1.40, pyruvate kinase; EC 4.2.1.30, glycérol déshydratase; EC 1.1.1.202, 1,3-propanediol déshydrogénase.

Bilan du métabolisme du glycérol par la voie oxydative

D'après ces branches, et la production des métabolites à partir du pyruvate, on obtient alors les Eqs. (26) à (30).

- Production d'acétate : ➔ Coenzymes : + 2 NADH / - 2 NAD^+

$$C_3H_8O_3 + H_2O + 2\,(ADP + Pi) \rightarrow C_2H_4O_2 + CO_2 + 3\,H_2 + 2\,ATP \qquad (26)$$

- Production de butyrate : ➔ Coenzymes : + 2 NADH / - 2 NAD^+

$$2\,C_3H_8O_3 + 3\,(ADP + Pi) \rightarrow C_4H_8O_2 + 2\,CO_2 + 4\,H_2 + 3\,ATP \qquad (27)$$

- Production de lactate : ➔ Coenzymes : + 1 NADH / - 1 NAD^+

$$C_3H_8O_3 + 1\,(ADP + Pi) \rightarrow C_3H_6O_3 + H_2 + 1\,ATP \qquad (28)$$

- Production d'éthanol : ➔ Coenzymes : à l'équilibre entre NADH et NAD^+

$$C_3H_8O_3 + 1\ (ADP + Pi) \rightarrow C_2H_6O + \ CO_2 + H_2 + 1\ ATP \quad (29)$$

- Production de butanol : ➔ Coenzymes : à l'équilibre entre NADH et NAD^+

$$2\ C_3H_8O_3 + 2\ (ADP + Pi) \rightarrow C_4H_{10}O + 2\ CO_2 + \ 2\ H_2 + H_2O + 2\ ATP \quad (30)$$

Ce bilan montre plusieurs différences par rapport au métabolisme du glucose. Par exemple, toutes les voies sont potentiellement émettrices de H_2, bien que le rendement le plus élevé soit toujours avec la voie de l'acétate, mais avec un rendement théorique maximal de 3 $mol_{H_2}/mol_{substrat}$ seulement, contre 4 pour le glucose. En outre, les voies du butyrate et du lactate ne sont plus neutres électroniquement, comme cela est le cas pour le glucose. En revanche, les voies des alcools le sont. Ainsi, pour conserver l'équilibre électronique, la NADH-ferrédoxine oxydoréductase sera potentiellement plus mobilisée, en synergie avec l'hydrogénase. Néanmoins, il est également possible que la bactérie utilise la voie réductrice, consommatrice d'une molécule de NADH par molécule de glycérol utilisée (Figure 7).

D'un point de vue pratique, les expérimentations réalisées avec *C. butyricum* montrent que la croissance sur glycérol a tendance à produire une grande quantité de 1,3-propanediol et moins d'acides que les cultures utilisant le glucose, avec des proportions de H_2 bien inférieures par rapport au CO_2 (Tableau 1) (Abbad-Andaloussi et al. 1998; Saint-Amans et al. 2001), bien que le glycérol soit un substrat plus réduit, menant à une synthèse de cofacteurs réduits NADH plus élevée.

Tableau 1. Comparaison des productions de *C. butyricum* selon la nature du substrat utilisé (d'après les résultats de Abbad-Andaloussi et al. 1998 et Saint-Amans et al. 2001).

	Glucose	**Glycérol**
Concentration biomasse	+ +	+
Production acétate	+ +	+
Production butyrate	+ + +	+ +
Production lactate	+	-
Production éthanol	+	+
Production butanol	ND	ND
Production 1,3-propanediol	-	+ + +
H_2	+ + +	+
CO_2	+ + +	+ +

-, production inexistante ou traces ; +, légère production ; + +, production modérée ; + + +, production intense ; ND, non déterminé

Effet du pH du milieu sur le pH intracellulaire et la fermentation

Il a déjà été évoqué que le pH jouait un rôle important dans les mécanismes de la croissance bactérienne et sur la bascule entre l'acidogenèse et la solvantogenèse. Plus précisément, la raison de cette bascule est la toxicité des acides organiques produits durant l'acidogenèse à des pH plus acides aux alentours de 4,5-5.

En effet, lorsque le pH du milieu de culture est proche de la neutralité (6,0 à 7,0), le pH intracellulaire est du même ordre de grandeur (6,5 à 7,0). Ce constat change lorsque le pH du milieu de culture est plus faible (4.0 à 5.0), où le pH intracellulaire déterminé est alors plus élevé (5,7 à 6,0) (Huang et al. 1986). Cela a une incidence sur la forme des métabolites produits durant l'acidogenèse, notamment au niveau de leur charge en raison de leur valeur de pKa. Pour l'acétate, le butyrate et le lactate, on trouve respectivement pKa_{ac} = 4,7, pKa_{but} = 4,9 et pKa_{lac} = 3,5. Une part significative de ces acides est alors sous la forme -COOH dans le milieu de culture, ce qui leur laisse la possibilité de rentrer à l'intérieur de la cellule via la membrane lipidique. À l'intérieur de la cellule, le pH intracellulaire étant plus élevé, l'acide carboxylique va alors être déprotoné et se retrouver sous la forme de la base conjuguée $-COO^-$. La présence de la charge se traduit par l'impossibilité pour ces molécules de traverser à nouveau la membrane cellulaire, générant un cumul de ces molécules et de protons dans le cytoplasme de la cellule. L'évacuation des protons est nécessaire afin de garantir la force proton-motrice pour les transports de métabolites. Cela fait intervenir un mécanisme transmembranaire et nécessite l'utilisation d'ATP, laquelle n'est pas utilisée pour la croissance, ce qui se traduit par son ralentissement. La conversion des acides en solvants est alors un mécanisme des bactéries afin de garantir leur intégrité (Haus et al. 2011; Padan et al. 1981).

Il apparaît que les principales voies permettant une plus importante production d'énergie et de H_2 sont davantage empruntées pendant l'acidogenèse, ce qui génère des coenzymes réduits, dont la régénération (réoxydation des coenzymes réduits) vient mobiliser l'hydrogénase (Figure 6).

En particulier, il est aisé de constater que les voies de l'acétate et du butyrate sont les voies les plus prolifiques en termes de rendements en H_2 et énergie, avec des rendements de 4 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ 4 et $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ respectivement (Eqs. 19 et 20). Il est donc pertinent de maintenir une culture de clostridies en acidogenèse par une régulation du pH du milieu, afin de maintenir les cellules en croissance le plus longtemps possible et ainsi favoriser la production de H_2.

Ainsi, le rendement maximal théorique pourrait être de 4 moles de H_2 par mole de glucose si seul l'acétate était produit (Eq. 19). Cette valeur est fréquemment qualifiée de « limite de Thauer » dans la littérature, limite que les chercheurs tentent d'approcher le plus possible voire de dépasser, bien que

Rudolf Thauer n'ait jamais employé ce terme dans ses travaux (Ergal et al. 2020; Thauer et al. 1977). En revanche, il explique que cette valeur ne peut pas être atteinte dans le cas d'une culture pure de *Clostridium*, car l'acétate ne peut être le seul métabolite produit. Tout d'abord, cette culture n'est pas neutre électriquement en raison du cumul du coenzyme réduit NADH. Bien que ce coenzyme puisse être réoxydé par l'intermédiaire de la NADH Fd oxydoréductase, ce mécanisme ne peut suffire à convertir des quantités de NADH si importantes. En outre, Thauer et al. (1977) expliquent que la forte production d'énergie par la voie de l'acétate est incompatible avec les besoins thermodynamiques des cellules. En effet, une telle génération d'énergie, et donc du niveau d'entropie des cellules, est incompatible avec le maintien de leur intégrité (Decker et al. 1970; Popovic 2019). En conséquence de ces deux phénomènes, le flux carboné est alors systématiquement redirigé vers la production de butyrate, ou de lactate, voire en solvants (Figure 8), avec des proportions variables selon l'espèce considérée.

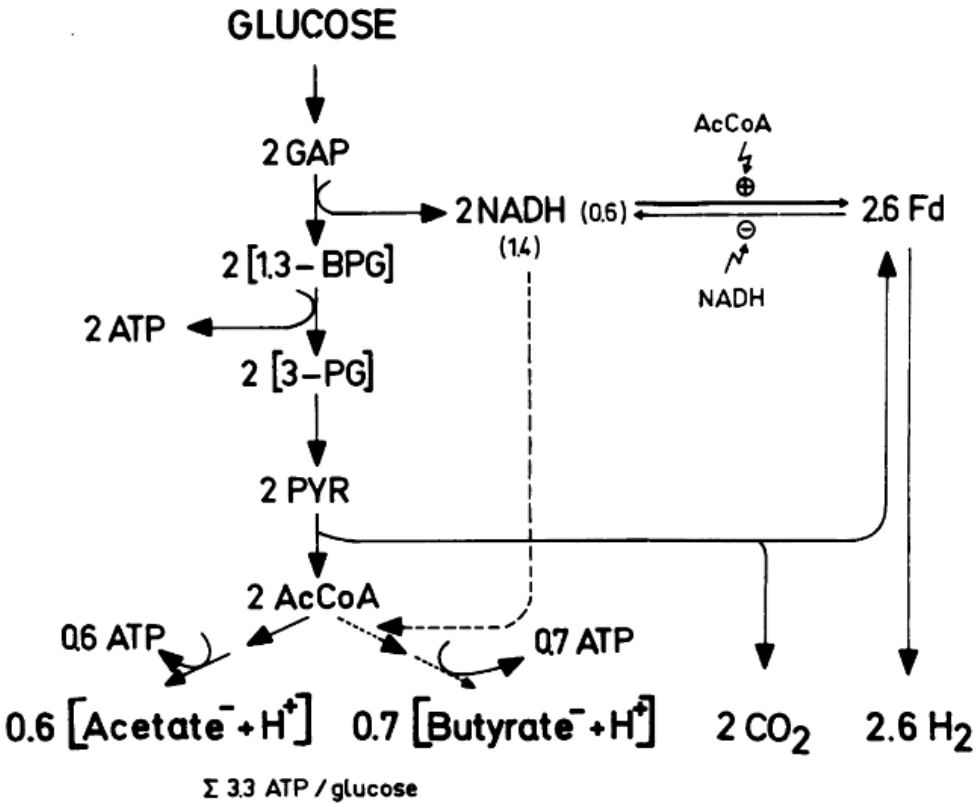


Figure 8. Proportion des molécules finales lors d'une acidogenèse type chez *C. pasteurianum*. Le rendement affiché ici est de 2,6 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ pour 3,3 ATP/glucose (tiré de Thauer et al. 1977).

Mécanismes de la sporulation

Les gènes codant les enzymes des voies métaboliques de la solvantogenèse et les gènes de la sporulation sont tous portés par le même mégaplasmide, ce qui témoigne de l'étroite relation entre la solvantogenèse et la sporulation qui s'ensuit. Chez *C. acetobutylicum* ATCC 824, il s'agit d'un mégaplasmide de 210 kpb, nommé pSOL1 (Guerrero et al. 2021; Cornillot et al. 1997).

Bien que les causes physico-chimiques de l'environnement induisant la sporulation ne soient pas parfaitement élucidées chez *Clostridium*, il semble que la limitation en nutriments et le stress cellulaire associé mènent à la phosphorylation du facteur régulateur de transcription Spo0A, présent à la fois chez certaines espèces du genre *Clostridium* et chez *Bacillus subtilis*, et bien décrit pour ce dernier (Dürre et Hollergschwandner 2004). Chez les clostridies, les gènes codant Spo0A sont donc situés sur pSOL1. Une fois la phosphorylation de Spo0A effectuée, les gènes menant à la division asymétrique de la cellule sont exprimés, et va alors se dérouler une cascade d'activation de plusieurs facteurs sigma (Figure 9). Spo0A et le facteur de régulation σ^H vont conjointement induire l'expression de σ^E et σ^F, responsables de la synthèse de l'enveloppe de la spore. σ^F va ensuite activer l'expression de σ^G situé dans la pré-spore, dont les gènes associés sont impliqués dans la formation de la paroi résistante de la spore. Ce facteur σ^G va finalement activer σ^K localisé dans la cellule-mère, et dont les gènes sont principalement responsables de la maturation finale de la spore, puis de la lyse de la cellule-mère (Dürre et Hollergschwandner 2004; Dürre 2014; Castilla-Llorente et al. 2006; Pereira et al. 2013).

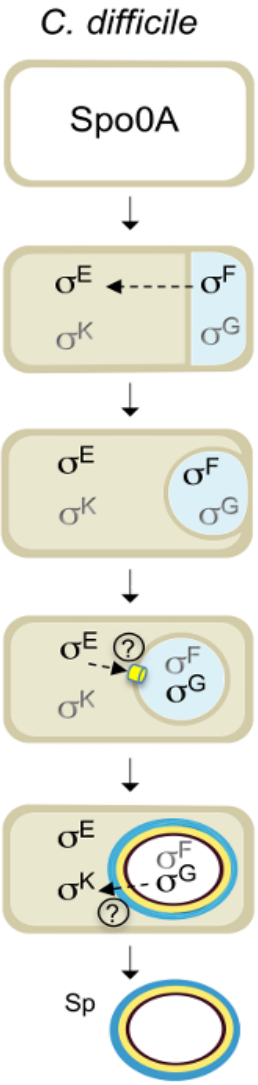


Figure 9. Déroulement de la sporulation chez *C. difficile* après phosphorylation de Spo0A et représentation des cascades d'activation des facteurs sigma. (Tiré de Pereira et al. 2013)

I.2.d. Rôles des hydrogénases chez le genre Clostridium

Les hydrogénases sont des métalloenzymes présentes dans un grand nombre de micro-organismes. Il existe de nombreux types d'hydrogénases, pouvant être classées selon les métaux composant leur site actif : on y trouve les hydrogénases à fer [FeFe], les hydrogénases nickel/fer [NiFe] et les hydrogénases à fer simple [Fe] (Morra 2022). Dans le cas de *C. acetobutylicum*, deux hydrogénases [FeFe], appelées HydA1 et HydA2 et une hydrogénase [NiFe] ont été identifiées. D'après les mesures des activités enzymatiques, c'est HydA1 qui serait la principale responsable de la synthèse de H_2. Pour *C. pasteurianum*, trois hydrogénases [FeFe] ont été trouvées. Alors que l'une d'elles semble

être la principale productrice de H_2, les autres sont au contraire plus enclines à capter ce gaz et à en faire des protons et électrons pour la formation d'équivalents réduits (Morra 2022; Demuez et al. 2007; King et al. 2006; Adams et Mortenson 1984). Cela témoigne donc de la grande diversité des hydrogénases ainsi que de leur rôle. Malgré ces différences, les hydrogénases [FeFe] possèdent systématiquement un site actif d'environ 40 kDa appelé « H-cluster ». Ce cluster est lui-même composé d'un sous-cluster cubique [4Fe-4S] responsable du transfert d'électrons depuis la ferrédoxine jusqu'au site catalytique, correspondant à l'autre sous-cluster [2Fe-2S] (Figure 10) (Calusinska et al. 2010; Xuan et al. 2023; McGlynn et al. 2007).

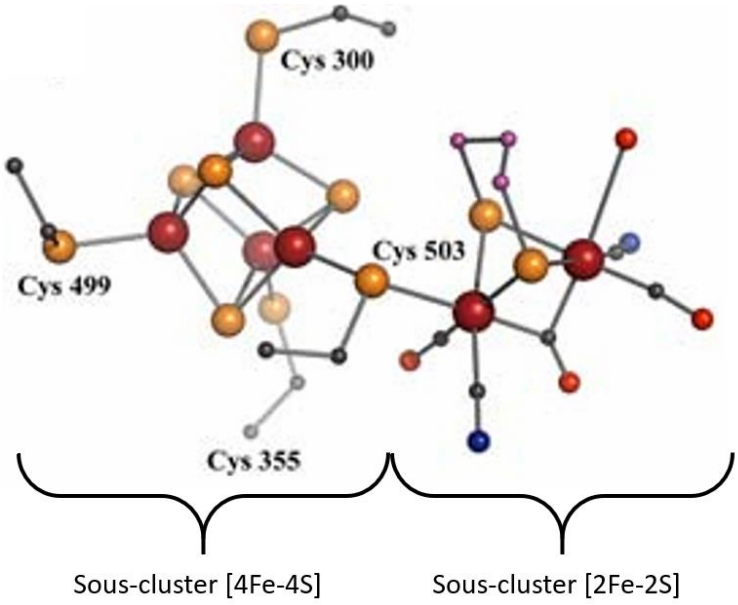


Figure 10. Représentation spatiale du H-cluster des hydrogénases [FeFe] chez *C. pasteurianum.* (tiré de McGlynn et al. 2007).

Les hydrogénases [FeFe] chez le genre *Clostridium* sont particulièrement sensibles au dioxygène de l'air. En effet, l'O_2 est capable de s'introduire dans un sous-cluster catalytique [2Fe-2S] et d'être converti en dérivé réactif de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Ces molécules peuvent réagir fortement avec le cluster et entrainer sa destruction par perte des atomes de fer le composant (Swanson et al. 2015; Morra 2022).

En outre, l'élévation de la pression partielle en H_2 est inhibitrice de l'activité de synthèse de H_2. Les hydrogénases peuvent alors catalyser la réaction inverse, en décomposant le dihydrogène en protons et électrons (Eq. (3)), et ce afin de garantir un équilibre électronique au sein des cellules (Oh et al. 2009; Morra 2022). Par exemple, chez *C. butyricum* TM-9A, l'abaissement de la pression partielle de H_2 de 33,90 kPa à 10,12 kPa a entraîné une production de H_2 2,61 fois plus élevée (Junghare et al. 2012).

I.3. Orientations récentes de la recherche sur l'utilisation du genre *Clostridium* pour la production de H_2

I.3.a. Regain d'intérêt de la fermentation sombre

La fabrication de plusieurs produits par voie fermentaire a revu le jour dans les années 1980 suite aux chocs pétroliers de 1973 et de 1979. Le nombre de publications portant sur les cultures de *Clostridium* a connu une croissance qui a débuté à la fin des années 1980. Cela est notamment constaté pour les publications portant sur *C. acetobutylicum*, dont le nombre a rencontré une nette accélération en 2008 avec environ 350 publications enregistrées dans *Scopus* cette année-là jusqu'à atteindre plus de 1000 publications en 2022 (Oehlenschläger et al. 2025). Une augmentation est également notable concernant les publications sur le biohydrogène, dont le nombre enregistré en accès libre dans *Scopus* est passé de 3 en 2007 à 60 en 2020, puis 87 en 2023 (Umunnawuike et al. 2024). Pourtant, les publications portant sur la production de H_2 par le genre *Clostridium* représentent une fraction peu importante de ces publications (au profit de la production de solvants), comptabilisant seulement 120 publications entre 2015 et 2021 (Wang et Yin 2021). Les demandes croissantes en hydrogène à faible impact carbone nécessitent pourtant d'approfondir les connaissances des fermentations par le genre *Clostridium*.

I.3.b. Effets des conditions et modes de culture

La diversité des conditions pour la production de biohydrogène

Les conditions de culture pour la production de biohydrogène sont très diverses et dépendent directement des micro-organismes et des substrats utilisés, du mode de culture considéré, ainsi que de la température, du pH, ou de l'hydrodynamique (transfert de matière et homogénéité) dans le bioréacteur, pour ne citer que ces exemples. En conséquence, cela représente plus de 2000 conditions différentes existantes pour la production de H_2 évaluées en 2012 par Rittmann et Herwig (ce chiffre est donc probablement nettement supérieur à l'heure actuelle), ce qui rend les études difficilement comparables entre elles (Rittmann et Herwig 2012). Dans leur revue, les valeurs du rendement molaire en hydrogène par rapport au substrat Y_{H_2}/S rapportées se situent alors en moyenne à 1,87 ± 1,10 mol/mol pour 464 articles sur *Clostridium* pris en compte. Il en va de même pour la productivité volumique maximale de H_2, affichée à 9,75 ± 8,41 mmol/$L_{culture}$/h. Un très fort écart-type est donc observable, témoignant de la diversité des expérimentations réalisées.

Étant donné que les clostridies font partie du microbiote du tractus digestif chez certains animaux et également chez l'humain, les températures de culture rapportées se situent généralement entre 30°C et 40°C, avec une prépondérance des cultures réalisées à 37°C. Les cultures réalisées en mode discontinu sont approximativement 3 à 4 fois plus nombreuses que les études réalisées en mode continu. Or, dans de nombreux cas, le pH n'est pas régulé, menant à la formation de solvants, impactant négativement le rendement $Y_{H_2/S}$. Aussi, pour près d'une culture discontinue sur deux, l'enceinte de réaction est fermée, ne permettant pas l'évacuation des gaz produits. Or, il est connu que la pression partielle en H_2 est inhibitrice de l'activité des hydrogénases, qui peuvent alors catalyser la réaction inverse. Dans ces conditions, l'utilisation de glucose n'est pas complète, et la productivité maximale de gaz s'en trouve très fortement réduite (Rittmann et Herwig 2012; Hu et al. 2013).

Mode de culture discontinu (« batch »)

Ce mode de culture est le plus « classique » et consiste en un mélange initial du milieu de culture avec l'inoculum microbien. Le volume de culture est ici constant, et la concentration en biomasse croît de façon exponentielle, avant de rentrer dans une phase stationnaire puis de déclin. La productivité en métabolites (et ici en gaz) croît et passe également par un maximum avant de ralentir. Si les cultures en mode discontinu demeurent plus largement utilisées, cela peut s'expliquer par la facilité de mise en place des expérimentations, demandant moins d'équipement, et permettant l'obtention de résultats plus rapides. Néanmoins, les productivités en culture discontinue ne sont pas constantes, et le calcul de valeurs moyennes entre deux intervalles de temps ne reflètent pas toujours les valeurs à tout instant.

Mode de culture continu

Avec le mode continu, après la mise en culture initiale, du milieu de culture frais est ajouté progressivement dans la cuve à un débit choisi, tout en soutirant au même débit du milieu au sein du bioréacteur. Le volume de culture reste constant tout au long de la culture continue. Le taux de dilution (rapport débit/volume du bioréacteur) va imposer la vitesse de croissance des bactéries, à la condition qu'un substrat, disponible en quantité limitée (la source de carbone généralement) soit présent dans le milieu d'alimentation. Cette méthode a été inventée par Jacques Monod, qui en a établi les bases mathématiques et postule le maintien en continu de la croissance microbienne (Monod 1978). En d'autres termes, cela permet de « figer dans le temps » et de maintenir une condition que l'on aurait obtenue à un instant unique en culture discontinue. Après des oscillations des productions lors du lancement de la culture, toutes les concentrations, y compris celle en biomasse, finissent par être constantes. Cela se traduit par une production constante des métabolites (et donc de la production de gaz, le cas échéant), d'une concentration résiduelle en substrat limitant maintenue constante

également. Le réacteur atteint alors l'équilibre (état dit « stabilisé ou encore « steady state »), puisque l'environnement physicochimique est dès lors maintenu constant. On peut alors parler de « chemostat ».

Plus complexes à mettre en œuvre qu'en mode discontinu, les cultures continues sont particulièrement intéressantes pour une production constante de H_2, notamment dans le cadre d'une demande industrielle. De plus, le renouvellement continu du milieu permet l'évacuation progressive des acides organiques produits, évitant leur cumul à des concentrations toxiques, mais aussi de certaines cellules en ralentissement de croissance, qui sont celles produisant le moins de H_2. L'optimisation du procédé (hausse de la productivité, ou amélioration de la pureté du gaz, par exemple) est également plus pertinente à réaliser avec le mode de culture continu. En réduisant le champ d'études aux seules bactéries du genre *Clostridium*, la plateforme *Web of Science* recense 283 articles dont le titre comporte les termes « *Clostridium* » OU « ABE » ET « continuous » OU « chemostat ». Ce nombre tombe à 31 si l'on rajoute le terme « hydrogen » dans les thématiques d'étude, ce qui est étonnament peu, en sachant que la fermentation ABE figure parmi les plus anciens bioprocédés existants.

Mode de culture alimenté (« fed-batch »)

Ici, du milieu de culture frais est continuellement ajouté dans le bioréacteur, mais sans soutirage du milieu de celui-ci, se traduisant par une augmentation progressive du volume de culture. Ce mode comporte des avantages pour maintenir une haute concentration cellulaire et obtenir de hautes concentrations en produits, ou bien lorsque le substrat est inhibiteur de la croissance bactérienne à des concentrations élevées. Cette technique est très rare dans le cas de la production de H_2 par le genre *Clostridium*, comptant seulement 5 publications en tout dans une analyse bibliométrique datant de 2012, soit moins de 0,3% des publications de cette analyse. Cela s'explique par le fait que l'accumulation en métabolites devient rapidement toxique pour les clostridies, inhibant alors sa croissance et donc sa production de H_2. (Rittmann et Herwig 2012).

Il est possible de passer en revue les expériences de cultures réalisées pour la production de biohydrogène via la fermentation sombre chez les bactéries du genre *Clostridium*, et de constater rapidement que les performances s'avèrent très hétérogènes, selon les souches et les conditions de culture considérées (Tableau 2). Ces résultats peuvent présenter encore plus de différences en considérant la très grande variété de sources de substrats.

Tableau 2. Exemple de données de la littérature sur les performances de production de dihydrogène à partir de glucose, par fermentation sombre anaérobie chez des bactéries du genre *Clostridium*.

Souche bactérienne	Concentration en glucose (g/L)	Conditions opératoires	Productivité en H_2 ($mLH_2/L_{culture}/h$)	Rendement molaire H_2/substrat YH_2/S ($molH_2/mol_{glucose}$)	Référence
***C. butyricum* KCCM 35433**	5	Discontinu (bouteille fermée de 100 mL) à 35°C	62 à 88	1,23 à 1,57	(Park et al. 2021)
***C. butyricum* W5**	10	Discontinu (bioréacteur de 1,5 L) à 39°C et pH régulé= 6,5	170 (max)	0,81	(Wang et al. 2009)
***C. butyricum* TM-9A**	10	Discontinu (bioréacteur de 9 L) à 37°C et pH initial = 8,0	1500 (max)	3,33	(RamKumar et al. 2021)
***C. butyricum* DSM 10702**	5	Discontinu (flasque fermée de 200 mL) à 30°C et pH initial = 7,5	< 50	0,16	(Fang et al. 2006)
***C. butyricum* LMG 1213t1**	10	Continu (bioréacteur de 1,2 L) à 37°C, pH régulé entre 5,1 et 7,1 et taux de dilution entre 0,040 h^{-1} et 0,222 h^{-1}	88 à 484	1,67 à 1,84	(Heyndrickx et al. 1986)
***C. acetobutylicum* ATCC 824**	5	DIscontinu (bioréacteur de 1 L) à 30°C et pH initial à 6,2	155	2,89	(Hassan et Morsy 2015)
***C. acetobutylicum* ATCC 824 (sans pSOL1)**	30	Continu (bioréacteur de 2 L) à 37°C, pH régulé = 5,5 et taux de dilution de 0,1 h^{-1}	254	2,39	(Guerrero et al. 2021)
***C. acetobutylicum* ATCC 824**	10	DIscontinu (bioréacteur de 4 L) à 37°C et pH initial = 5,5	100	1,06	(Son et al. 2021)
***C. acetobutylicum* PTCC 1456**	9	Discontinu (bouteille fermée de 250 mL) à 35°C et pH initial = 6,5	85	1,46	(Shaterzadeh et Ataei 2017a)
***C. beijerinckii* IB4**	60	DIscontinu (bioréacteur de 2 L) à 35°C et pH régulé entre 4,9 et 6,0	114 à 148	0,79 à 0,92	(Wu et al. 2017)
***C. beijerinckii* Br21**	1 à 30	Discontinu (bouteille fermée de 645 mL) à 35°C et pH initial = 6,5	4 à 22	0,21 à 2,23	(Constante Fonseca et al. 2019)
***C. pasteurianum* ATCC 6013**	10	Discontinu (flacon à sérum de 10 mL) à 37°C et pH initial = 6,5	56	3,07	(Zhang et al. 2019)
***C. pasteurianum* ATCC 6013**	5	DIscontinu (bioréacteur de 18 L) à 30°C et pH régulé = 5,4	900 (max)	1,19	(Masset et al. 2012)
***C. pasteurianum* CH5**	5	Discontinu (bouteille fermée de 100 mL) à 35°C et pH initial = 7,0	283	2,0	(Hsieh et al. 2016)
***C. tyrobutyricum* JM1 (= ATCC 25755)**	5 à 60	Discontinu (bioréacteur de 3 L) à 35°C et pH initial = 6,5	NI	0,56 à 2,05	(Jo et Kim 2016)
***C. tyrobutyricum* ATCC 25755**	30	Alimenté (bioréacteur de 2 L) à 37°C et pH régulé à 6,0	800	1,44	(Liu et al. 2006)

I.3.c. Approches étudiées pour l'amélioration de la production

Cellules immobilisées

L'une des causes menant à la baisse du rendement molaire Y_{H_2}/S est l'utilisation d'une fraction significative du substrat pour la formation directe de biomasse, qui n'est alors pas dirigée vers la production de métabolites et de gaz. Cette fraction est d'autant plus importante lors d'une culture continue en raison de la perte des cellules en sortie de réacteur et du maintien de la croissance des bactéries restantes. Ce phénomène est croissant avec l'augmentation du taux de dilution. Afin de contrecarrer cet effet, des études ont été menées sur les capacités obtenues avec des clostridies immobilisées, présentant une grande variabilité de résultats selon les techniques mises au point. Par exemple, des supports minéraux poreux en fibres creuses peuvent être utilisés pour l'immobilisation des cellules (Figure 11) (Fritsch et al. 2008). Néanmoins, dans cette expérience en mode discontinu, la productivité volumique en H_2 a été mesurée au maximum à 230 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ pour un rendement $Y_{H_2/S}$ = 0,82 mol_{H_2}/mol_{hexose}. Ces performances se sont révélées inférieures en comparaison avec un bioréacteur en colonne, avec une productivité de 383 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ pour un rendement $Y_{H_2/S}$ = 0,95 mol_{H_2}/mol_{hexose}. Les auteurs expliquent cela en raison de la moindre quantité de biomasse pouvant se développer sur les supports, par rapport à celle atteinte lorsque les cellules sont planctoniques. En revanche, pour les expériences en continu de cette même étude, les valeurs de productivité et de rendement sont meilleures avec des cellules immobilisées (selon les concentrations en substrat de l'alimentation, les productivités sont de 88 – 305 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ avec $Y_{H_2/S}$ = 0,44 – 0,92 mol_{H_2}/mol_{hexose}) qu'avec des cellules en suspension (productivités de 61 – 225 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ avec $Y_{H_2/S}$ = 0,31 – 0,71 mol_{H_2}/mol_{hexose}), ce qui remplit les attentes initiales de l'utilisation de cellules immobilisées (Fritsch et al. 2008).

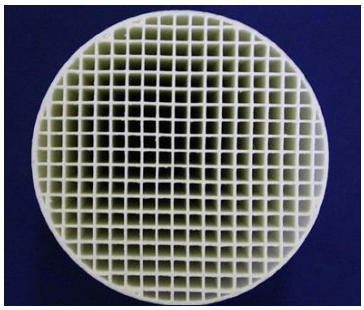


Figure 11. Support minéral de fibres creuses utilisé pour l'immobilisation de *C. butyricum* (tiré de Fritsch et al. 2008).

Une autre approche consiste en l'immobilisation de ces cellules sur des supports en suspension dans un bioréacteur agité, afin de garantir une meilleure homogénéité. Dans les expérimentations en culture continue de Zhao et al., *Clostridium* sp. T2 a été immobilisé sur des billes d'alginate de sodium ainsi que sur des granules d'agrégats mycéliens synthétisés par *Aspergillus niger* (Figure 12). Les productivités en H_2 se sont révélées jusqu'à 13,8% et 11,0% plus élevées avec les billes d'alginate et les agrégats de mycélium respectivement, par rapport à une culture de bactéries en suspension sans support. Les résultats présentent également une meilleure utilisation du substrat, entre 80% et 90%, contre 60% à 70% sans cellules immobilisées (Zhao et al. 2012; Li et al. 2019).

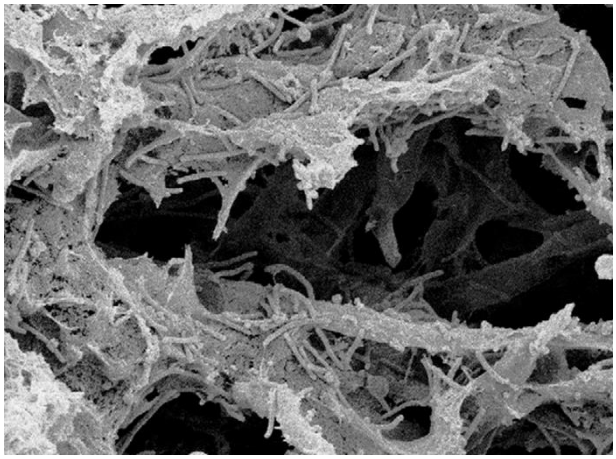


Figure 12. Image microscopique de *Clostridium* sp. T2 immobilisés sur mycélium d'*Aspergillus niger* (tiré de Zhao et al. 2012).

Pourtant, les bactéries utilisées dans ces procédés présentent souvent une diminution de leurs capacités fermentaires au fur et à mesure de la répétition et/ou de l'allongement de la durée des expérimentations. Liu et al. ont réalisé sept cultures discontinues avec des clostridies immobilisées sur des bagasses de canne à sucre. Alors que les deux premières expériences se sont montrées satisfaisantes avec des productivités d'environ 170 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ et plus de 90% d'utilisation du glucose, ces valeurs chutent jusqu'à atteindre à 40 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ et moins de 50% d'utilisation du glucose lors de la septième culture. Ces résultats sont expliqués par une plus forte production de solvants, et notamment d'éthanol, par rapport aux acides au fur et à mesure des répétitions (Liu et al. 2019). Finalement, ces systèmes ne conviennent pas pour une production constante de métabolites et de gaz en raison des pertes de performance des bactéries. Il est donc primordial de recommencer régulièrement les cultures à partir de nouvelles cellules obtenues par la levée de dormance de spores.

Ingénierie génétique

Des expérimentations de modifications génétiques ont été réalisées dans le but d'améliorer la productivité et/ou le rendement en H_2. Celles-ci consistent soit à surexprimer certains gènes, soit à en inactiver d'autres, afin de rediriger le flux de carbone et d'électrons vers les voies favorables à la production de H_2 (Oh et al. 2011; Charubin et al. 2018).

Dans le premier cas, il est possible de surexprimer des gènes impliqués dans la synthèse d'enzymes de la glycolyse, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Kim et al. 2023) ou bien la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Son et al. 2021). Cela a pour effet une intensification de la consommation de glucose, et de faire pencher la balance des coenzymes en faveur du NADH. Bien que la production de H_2 soit légèrement améliorée, cela mène aussi à la formation de solvants ou de lactate en raison de la nécessité d'utiliser l'excès de NADH pour équilibrer la balance NADH/NAD^+. Ainsi, le rendement en hydrogène par rapport au substrat s'avère moins bon que chez une souche sauvage. Les approches visant à surexprimer les gènes codant les hydrogénases actives dans la synthèse de H_2 semblent plus prometteuses. Les résultats obtenus restent néanmoins hétérogènes. Dans une étude chez *C. acetobutylicum* DSM 792 (= ATCC 824), la production de H_2 à l'échelle de la culture n'a pas été améliorée (1810 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ avec la souche sauvage, contre 1650 – 1740 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ chez les souches mutées), malgré l'augmentation de l'activité spécifique de HydA (Klein et al. 2010). Dans le cas de la modification de *C. tyrobutyricum* JM1, les auteurs ont montré que la surexpression de l'hydrogénase a mené à une production spécifique de H_2 50 % plus élevée que la souche sauvage, mais n'exposent pas de résultats quant à la productivité à l'échelle de la culture (Jo et al. 2010).

Dans le second cas, les voies métaboliques inactivées peuvent être celles menant aux produits de la solvantogenèse, en cultivant des souches ne possédant plus le plasmide pSOL1 (Guerrero et al. 2021). Bien que les acides soient synthétisés en plus grande concentration, augmentant la quantité spécifique de H_2 produit, la concentration bactérienne avant la phase stationnaire est plus faible (3,82 g/L pour la souche sauvage contre 2,61 g/L pour la souche mutante). Celles-ci ne sont également plus capables de consommer tout le substrat, témoignant d'une inhibition par les produits obtenus. Il est aussi possible de stopper la synthèse de lactate, en inactivant les gènes codant la lactate déshydrogénase, redirigeant ainsi les produits vers les acides acétiques et butyriques, ce qui semble présenter des améliorations en termes de productivités et rendements combinés en H_2. Yoshida et al. ont, par exemple, conjointement surexprimé les gènes codant la formiate-hydrogène lyase (Eq. (14)) tout en inactivant les gènes codant la lactate déshydrogénase chez *E. coli* K-12 W3110. Ces modifications ont abouti à l'augmentation du rendement $Y_{H_2/S}$, de 1,08 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ à 1,82 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ tout en mesurant jusqu'à 20200

$mL_{H_2}/L_{culture}/h$ avec une concentration cellulaire de 94,3 g/L (Yoshida et al. 2006). D'autre part, Wang et al. ont inactivé la lactate déshydrogénase chez *C. perfringens* W11, rapportant un rendement $Y_{H_2/S}$ = 2,03 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$, contre $Y_{H_2/S}$ = 1,63 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ chez la souche sauvage, sans rapporter de valeurs pour la productivité volumique (Wang et al. 2011).

Enfin, il a été également exploré la possibilité d'inactiver les hydrogénases ayant tendance à catalyser la production de protons et électrons à partir de H_2. Cela a notamment été réalisé chez *E. coli* K-12 BW25113 où plusieurs combinaisons d'inactivations de gènes ont été réalisées, afin de supprimer jusqu'à 4 hydrogénases ainsi que d'autres voies métaboliques. Cette approche semble apporter des améliorations seulement lorsqu'il y avait combinaison avec l'inactivation d'autres voies. En effet, la suppression des hydrogénases seules ont conduit à une production spécifique de H_2 équivalente à 0,1 fois celle de la souche sauvage, pour un rendement $Y_{H_2/S}$ = 0,02 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$. En revanche, les meilleurs résultats sont obtenus lorsqu'il y avait suppression des gènes codant les hydrogénases 1 et 2, de la protéine répressive du gène codant la formiate-hydrogène lyase, de la formiate-déshydrogénase-O, de la protéine membranaire de la fumarate réductase, de la lactate déshydrogénase ainsi que de la pyruvate déshydrogénase. Ces mutations ayant conduit à une production spécifique de H_2 4,6 fois plus élevée que celle de la souche sauvage, avec un rendement $Y_{H_2/S}$ = 1,32 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ (Maeda et al. 2007).

Bien que ces travaux portent majoritairement sur l'utilisation de glucose comme substrat, il est alors possible d'imaginer leur application étendue à d'autres types de substrat.

Tableau 3. Récapitulatif des performances de la fermentation sombre anaérobie par modification des techniques de cultures et des micro-organismes (données de la littérature scientifique).

	Production de biomasse	**Vitesse/taux de consommation du substrat**	**Productivité volumique en H_2**	**Rendement molaire $Y_{H_2/S}$**
Cellules planctoniques non modifiées	=	=	=	=
Cellules immobilisées sur support fixe (ex : fibres creuses) (Fritsch et al. 2008)	- (discontinu) - (continu)	- (discontinu) - (continu)	- (discontinu) + (continu)	- (discontinu) = (continu)
Cellules immobilisées sur support en suspension (ex : billes d'alginate) (Zhao et al. 2012)	-	+	+	+
Ingénierie génétique pour intensification de la glycolyse (Kim et al. 2023; Son et al. 2021)	+	+	+	-
Ingénierie génétique pour intensification de l'activité de production de H_2 des hydrogénases (Klein et al. 2010; Jo et al. 2010)	ND	=	=	+
Ingénierie génétique pour inhibition de l'activité de consommation de H_2 des hydrogénases (Maeda et al. 2007)	=	ND	-	-
Ingénierie génétique pour inhibition de synthèse de lactate (Yoshida et al. 2006; Wang et al. 2011)	=	=	ND	+
Ingénierie génétique pour inhibition de la solvantogenèse (Guerrero et al. 2021)	-	-	=	+

-, valeur moins élevée par rapport à l'absence de modification ; =, valeur similaire par rapport à l'absence de modification ; +, valeur plus élevée par rapport à l'absence de modification ; ND, non déterminé

I.3.d. Limitations pour l'extrapolation du procédé et de l'utilisation du H_2 comme vecteur énergétique

À l'heure actuelle, il n'existe pas d'installation industrielle utilisant des *Clostridium* pour la production de H_2 d'origine biologique. La vaste majorité des études reste à l'échelle du laboratoire, et seuls quelques articles mentionnent des bioréacteurs à l'échelle pilote. Le plus grand volume de bioréacteur dans la bibliographie à ce jour est de 100 L, avec une culture de *C. thermocellum* 7072, une souche cellulolytique thermophile utilisée pour la valorisation des tiges de maïs (Cheng et Liu 2011). Le non-développement de cette filière s'explique par le manque de rentabilité du procédé par rapport aux procédés utilisant des ressources fossiles. Le coût du H_2 produit par fermentation sombre variant entre 3,2 et 49,0 $/kg, alors qu'il n'est que de 1,4 à 3,5 $/kg (Teke et al. 2023). Il existe tout de même des installations industrielles utilisant la fermentation sombre pour la production de H_2, mais utilisant plutôt des consortia microbiens issus de boues de stations d'épuration pour catalyser la réaction, et des déchets agricoles à très faible coût en tant que substrat (Wang et al. 2010; Preethi et al. 2019). Il est également à noter que des approches de modélisation par mécanique des fluides numérique (CFD, Computational Fluid Dynamics) sont mises en œuvre pour la production de biohydrogène de façon générale afin d'identifier les problématiques potentielles de perte d'efficacité des bioprocédés lors de la montée en échelle (Teke et al. 2023; Sarangi et Nanda 2020; Ren et al. 2011). Environ deux tiers des études CFD portent sur des aspects hydrodynamiques, tels que les effets de l'agitation (type d'agitateur et vitesse) sur l'homogénéité du bioréacteur et la production de H_2 par *Clostridium* qui en découle (Niño-Navarro et al. 2016), ou encore les effets des interactions entre la phase liquide et la phase gazeuse pour la prédiction de formation des produits (Tiong et al. 2025). Le tiers restant des études en CFD regroupe les publications traitant de la modélisation des cinétiques biochimiques, du transfert de chaleur et du transfert de lumière pour la production de H_2 par photofermentation (Teke et al. 2023). Si ces recherches aboutissent à des résultats prometteurs et que la demande en H_2 s'intensifie (faisant monter sa valeur), alors des procédés de production industrielle de H_2 plus rentables à partir de culture de *Clostridium* pourraient voir le jour (Teke et al. 2023; Ren et al. 2011).

À cela, il est important de souligner les difficultés de stockage et d'acheminement du gaz que constitue le H_2, dont la compression est très coûteuse, et dont toutes les installations fonctionnant avec ce gaz doivent se soumettre aux normes ATEX (atmosphère explosive), représentant encore des coûts additionnels. Par exemple, le H_2 peut réagir avec l'acier des pipelines, qui doivent alors comporter un revêtement interne spécifique. L'installation seule d'un réseau de H_2 est estimée 10% plus chère que celui d'un réseau de gaz naturel (Galimova et al. 2023). En comptant le transport uniquement (sans les investissements d'installation), le coût du transport du H_2 est estimé entre 0,21 et 2,20 $/km/kW, tandis

qu'il est estimé entre 0,04 et 0,16 $/km/kW pour le transport de gaz naturel. Ainsi, des progrès doivent encore être réalisés pour le transport du H_2 afin d'être rentable. Néanmoins, les évolutions des coûts du gaz naturel et du H_2 selon l'offre et la demande peuvent également pencher dans la balance dans le futur.

La fermentation sombre produit en outre une quantité non négligeable de CO_2 (généralement entre 40% et 50% de la quantité totale de gaz produit), qu'il est nécessaire de séparer et de traiter autrement. Ainsi, l'utilisation de H_2 ne concerne que quelques applications particulières, le principal vecteur énergétique gazeux restant alors le gaz naturel, composé principalement de méthane CH_4. En marge de cela, la biométhanation, dont le principe est la conversion du H_2 et CO_2 en CH_4, est une filière en réel développement pour la valorisation du H_2 issu de l'électrolyse de l'eau, combiné à l'ajout de CO_2 exogène. En définitive, l'application de la biométhanation directement à la suite de la fermentation sombre prendrait alors tout son sens, puisque les deux gaz nécessaires sont d'ores et déjà présents.

I.4. Production de méthane par voie biologique : la biométhanisation et la biométhanation

I.4.a. La méthanisation : principe général, atouts et limites

La méthanisation, ou encore « digestion anaérobie », est un enchaînement de réactions microbiologiques se déroulant en l'absence de dioxygène (O_2), conduisant à la dégradation de la matière organique en un mélange gazeux, encore appelé biogaz. C'est au XVII^{ème} que Jean-Baptiste van Helmont remarque que les animaux et végétaux en décomposition produisaient un gaz inflammable. En 1776, Alessandro Volta observe une relation entre la quantité de matière organique décomposée et la quantité de gaz inflammable généré. Plus tard, entre 1804 et 1808, les travaux de John Dalton et Humphrey Davy concluent que ce gaz inflammable est le méthane (Abbasi et al. 2012). Il faudra attendre les années 1970, après les chocs pétroliers, pour qu'une véritable politique d'installation d'unités de méthanisation voit le jour en Europe (notamment en Allemagne, en Autriche et aux Pays-Bas), permettant le traitement des eaux usées, des déchets agro-alimentaires et des effluents d'élevage principalement. À l'heure actuelle, de plus en plus d'unités de méthanisation s'implantent afin de valoriser la biomasse non utilisable dans d'autres domaines.

Le biogaz issu de la méthanisation est composé d'approximativement 55% de méthane (CH_4), 40% de dioxyde de carbone (CO_2) et 5% d'autres composés (N_2, O_2, H_2, H_2S, NH_3, acides gras volatils).

Ces proportions pouvant varier légèrement selon le type de méthanisation effectué ainsi que les intrants utilisés (Calbry-Muzyka et al. 2022). Dans les unités de méthanisation, ce biogaz a pour vocation, principalement, d'être soit brûlé sur place, l'énergie est alors valorisée en cogénération de chaleur et d'électricité, soit épuré préalablement à l'injection dans le réseau de gaz naturel. L'autre atout de la méthanisation est l'obtention d'un digestat, composés de résidus de matière organique solides et liquides, pouvant être utilisé comme amendement organique par épandage sur des surfaces agricoles.

D'après les données de l'ADEME au 1er janvier 2024, plus de 1300 unités de méthanisation sont installées en France, ce qui représente 12,1 TWh d'énergie produite. Les objectifs pour 2030 sont de monter la proportion de biométhane utilisé dans le réseau de gaz naturel à 10% de la consommation de gaz totale. Il y a donc une forte dynamique de développement de cette filière pour tenter de répondre aux enjeux de la transition énergétique. Localement, il est à noter que les attentes sociétales ont pointé du doigt plusieurs aspects, comme les potentielles nuisances sonores ou olfactives auprès de la population, ou la pollution des sols à proximité des unités de méthanisation en cas d'accident éventuel lors de l'exploitation. La compétition entre les cultures à visée alimentaire, parfois délaissées pour des cultures à visée énergétique (plus rentables pour l'agriculteur) peut également être mentionnée, bien que l'apport de cultures brutes pour la méthanisation soit limité à 15% en masse des intrants totaux.

Le processus de dégradation de la matière organique au sein d'un méthaniseur se déroule en plusieurs étapes distinctes, menant à la formation de divers composés :

- **l'hydrolyse**, où les macromolécules et les polymères sont dégradés en plus petites molécules (sucres fermentescibles, acides gras, acides aminés).

- **l'acidogenèse**, durant laquelle les molécules préalablement obtenues sont converties en alcools, acides organiques, CO_2 et H_2.

- **l'acétogenèse**, menant à la formation de précurseurs nécessaires à la synthèse de méthane, comme l'acide acétique, de formule CH_3COOH (aux valeurs de pH dans un méthaniseur, c'est surtout la forme de la base conjuguée, l'acétate de formule CH_3COO^-, qui est présente), ainsi que du CO_2 et H_2 additionnels.

- **la méthanogenèse**, étape finale du procédé où les molécules mentionnées ci-dessus sont converties en méthane (Adekunle et Okolie 2015).

La méthanogenèse se caractérise par 2 réactions microbiologiques. Il s'agit, d'une part, de la réduction de l'acétate (Eq. 31).

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \quad (31)$$

D'autre part, s'y déroule également la réduction du dioxyde de carbone, encore appelée méthanation biologique ou biométhanation, par opposition à la méthanation par voie chimique (Eq. 32).

$$CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O \qquad \Delta H^0 = -165\,kJ/mol \quad (32)$$

Dans un souci de réduire l'impact carbone de l'utilisation de gaz naturel, la méthanisation fait l'objet d'un très grand nombre de publications afin de démocratiser et rentabiliser son utilisation. Plus de 10 900 articles comportant les termes « anaerobic digestion » dans le titre sont recensés sur *Web of Science* entre 2010 et 2025. Ces derniers traitent une très large proportion de concepts liés à la méthanisation, du choix du substrat et son éventuel prétraitement en amont, aux utilisations et coûts de distribution en aval, tout en étudiant de plus près les aspects biochimiques et rhéologiques au sein d'un méthaniseur (Adekunle et Okolie 2015; Meegoda et al. 2018; Karki et al. 2021). La finalité est en toute logique, l'amélioration continue de ce bioprocédé afin d'en accroître notamment la productivité et/ou les rendements en CH_4. Les prochains paragraphes se focaliseront essentiellement sur la microbiologie et la biochimie impliquées dans ce bioprocédé.

I.4.b. Essor de la méthanation biologique à partir de la méthanisation

Parmi les pistes d'amélioration des unités de méthanisation, celles permettant de meilleurs rendements en méthane sont particulièrement explorées. Leurs objectifs sont d'augmenter les capacités de production totale de biogaz, tout en réduisant la quantité de matière organique à exploiter. Ainsi, l'injection de dihydrogène gazeux exogène (H_2) permettant d'intensifier l'étape de méthanogenèse a été étudiée de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote. On distinguera les procédés *in-situ*, consistant à l'injection directe du dihydrogène dans un méthaniseur afin de convertir l'excédent de CO_2 issu des activités de dégradation biologique en CH_4 additionnel, des procédés *ex-situ* (Figure 13). Dans ce cas particulier, seule la réaction de méthanation biologique (Eq. 32) est réalisée , à part du méthaniseur (Angelidaki et al. 2018). Il est en effet possible de cultiver les micro-organismes spécialement responsables de cette réaction de méthanation, faisant partie des archées méthanogènes hydrogénotrophes anaérobies. Ces derniers proviennent généralement des milieux de

méthaniseurs agricoles ou des boues activées de stations d'épuration (Spyridonidis et al. 2023). Cette voie présente également l'avantage d'utiliser le CO_2 préalablement produit lors des autres étapes de la méthanisation, ce qui en réduira la quantité à épurer à l'issue du procédé.

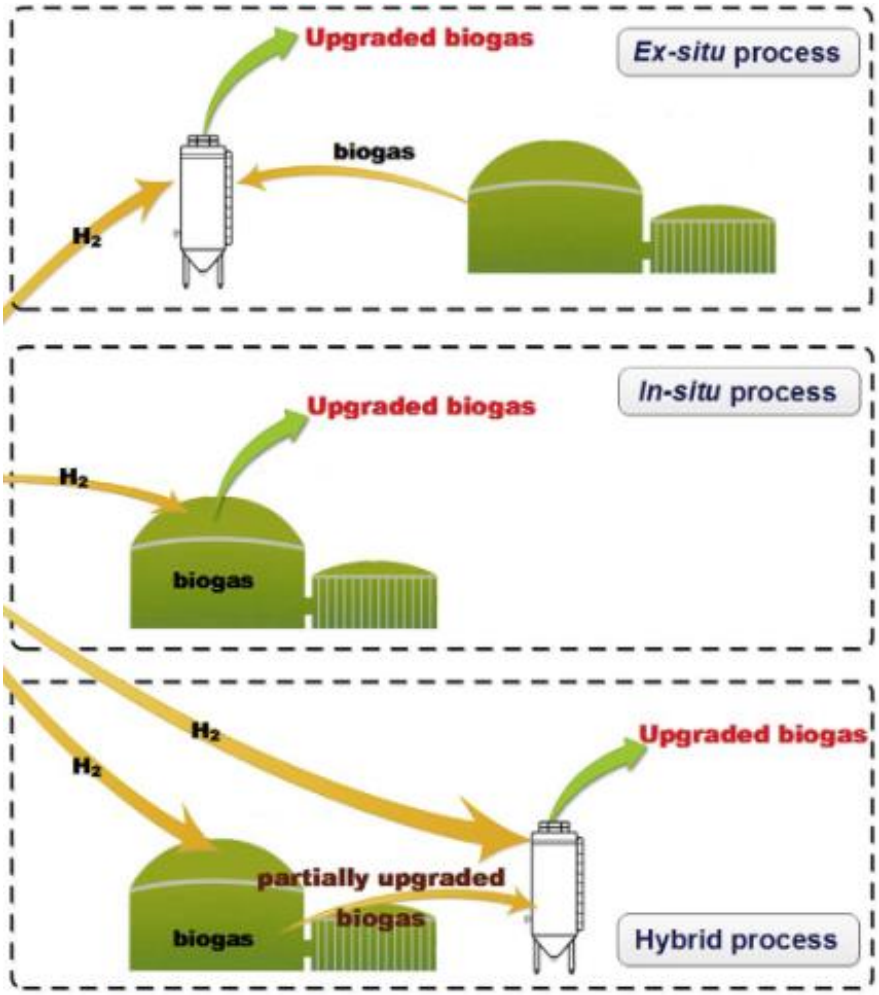


Figure 13. Représentation des approches possibles d'intensification de la méthanogenèse (Tiré de Angelidaki et al. 2018).

En revanche, une telle réaction se révèle être très demandeuse en dihydrogène d'un point de vue stœchiométrique (4 molécules de H_2 pour 1 molécule de CO_2), nécessitant alors un apport conséquent de ce gaz si cette technologie vient à se développer plus largement.

I.4.c. Conditions physico-chimiques en biométhanation

Constituant une réaction parmi d'autres au sein de la méthanisation dans son ensemble, la méthanation a d'abord été abordée *in-situ*. Pourtant, les systèmes *in-situ* n'exploitent pas les capacités

des micro-organismes à leur maximum, en raison des conditions physico-chimiques optimales des différentes populations microbiennes. Cette approche fait donc face à plusieurs complications, qu'il convient d'identifier afin d'y apporter des solutions.

Impact du pH

Les micro-organismes participant aux premières réactions de la méthanisation ont un pH optimal de fonctionnement globalement situé entre 6,0 et 7,0. À l'inverse, ceux responsables de la méthanation évoluent à des pH optimaux aux alentours de 8,0 voire 8,5. Par ailleurs, la consommation du CO_2 dans les procédés *in-situ* participe à l'augmentation du pH du milieu (Wasserfallen et de Macario 2000; Luo et al. 2012; Fachal-Suárez et al. 2024). Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse que les capacités métaboliques de chaque micro-organisme ne sont pas pleinement exploitées.

Impact de la rhéologie sur le transfert de gaz

D'une manière générale, le problème majeur auquel font face les bioprocédés microbiens, est le transfert du gaz aux micro-organismes. Pour ce faire, le gaz doit d'abord se dissoudre pour passer de la phase gazeuse à la phase liquide. La vitesse de transfert du gaz (VTG en mol/(L·h)) peut se définir par :

$$VTG = k_L a\,(C^* - C)$$

Où $k_L a$ est le coefficient volumique de transfert du gaz (dont la valeur est propre à chaque gaz et aux conditions de culture), C^* est la concentration saturante en gaz dissous (mol/L), et C (mol/L) est la concentration en gaz dissous.

C^* peut se calculer pour chaque gaz à l'aide de la loi de Henry, dont la loi générale est :

$$p \times x_s^g = k_{H_s} \times x_s^l$$

Où p est la pression totale de la phase gazeuse, x_s^g est la fraction molaire de la molécule considérée dans la phase gazeuse, x_s^l est la fraction molaire de la molécule considérée dans la phase liquide et k_{H_s}est la constante de Henry de la molécule. Cette constante est propre à chaque gaz et possède la même dimension qu'une pression. Elle est donc directement dépendante de la température. Une autre façon de l'écrire et qui consiste à l'exprimer directement en fonction de la concentration est :

$$C^* = p \times H_s^{cp}$$

Où C^* est la concentration molaire du gaz dissous. H_s^{cp}est alors une constante, donnée généralement en mol/(m^3·Pa) pour différentes valeurs de température dans les liste de données (Sander 2023). Pour

le H_2, on trouve $H_s^{cp} = 7{,}7 \times 10^{-6}\ mol/(m^3 \cdot Pa)$ à 25°C (Sander 2023), température que l'on jugera proche de la température réelle au niveau du bioréacteur. Il est alors possible de calculer :

$$C_{H_2}^* = 101325 \times 7{,}7 \times 10^{-6} = 0{,}78\ mol/m^3$$

Soit $7{,}8 \times 10^{-4}\ mol/L$ ou encore $1{,}56\ mg/L$

Pour le CO_2, on obtient :

$$C_{CO_2}^* = 101325 \times 3{,}3 \times 10^{-4} = 33{,}44\ mol/m^3$$

Soit $3{,}344 \times 10^{-2}\ mol/L$ ou encore $1471\ mg/L$

On a alors une solubilité molaire maximale du CO_2 42,9 fois plus élevée que celle du H_2, alors que les besoins sont inférieurs. La concentration massique en CO_2 dissous est, quant à elle, 943 fois plus importante. Ainsi, la solubilisation du H_2 constitue sans équivoque l'étape limitante de la biométhanation par rapport au CO_2.

Dans le cas de la méthanation *in-situ*, le milieu des méthaniseurs présente une rhéologie complexe de fluide non-newtonien au comportement rhéofluidifiant (la viscosité diminue avec la contrainte de cisaillement), pouvant évoluer dans le temps, rarement homogène, et avec beaucoup de particules solides en suspension (Wu et Chen 2008; Megue Kamkeng et al. 2024). La présence d'autres éléments dissous limite d'autant plus la dissolution des gaz, et donc du H_2, dans le milieu liquide, empêchant son transfert vers les micro-organismes. Luo et Angelidaki ont par exemple mesuré une concentration en H_2 dissous trois à huit fois inférieure à la valeur théorique donnée par la loi de Henry (Luo et Angelidaki 2012; 2013; Lebranchu et al. 2017). En outre, ce milieu est sujet à la formation de flocs, limitant l'accès au gaz dissous pour les micro-organismes situés à l'intérieur dudit floc. Par conséquent, la réaction de méthanation ne peut être réalisée dans des conditions optimales. Enfin, des conditions thermophiles (courantes en biométhanation) ne facilitent pas la dissolution du H_2 en phase liquide. Ce phénomène s'avère moins délétère pour la solubilité du CO_2, qui présente alors une solubilité supérieure au H_2 d'un facteur 500 environ à 60°C (Rafrafi et al. 2021). Il en résulte une accumulation de H_2 dans le biogaz obtenu. Or, en se projetant dans le scénario de réinjection du biogaz dans le réseau de gaz naturel, il convient de respecter un seuil maximal de proportion de dihydrogène dans le réseau de gaz naturel, pour des raisons de sécurité. Réussir à contrôler le taux de H_2 en sortie de méthanation est d'autant plus important que le seuil toléré est variable selon les pays. Il est par exemple de 10% maximum en

fraction molaire en Allemagne, 6% en France, mais tombe à 0,1% en Belgique et au Royaume-Uni (Rusmanis et al. 2019).

La méthanation *ex-situ* apparaît alors comme une solution car le milieu de culture est essentiellement aqueux, sans présence de particules ou de sels pouvant limiter la solubilisation du H_2.

De plus, les conditions des travaux en biométhanation *ex-situ* dans la littérature reposent sur un autre phénomène. La force motrice de la VTR peut être maintenue tant que la solubilisation maximale du gaz n'est pas atteinte. Cela est le cas lorsque la vitesse de consommation du gaz est supérieure à la vitesse de transfert de gaz. Le terme $(C^* - C)$ est alors grand puisque la concentration réelle en gaz dissous est très faible. La forte activité biologique en biométhanation et l'utilisation de bioréacteurs en colonne ou d'une très forte agitation pour augmenter le temps de séjour des gaz constituent des mécanismes pour avoir une vitesse de consommation de gaz élevée. Il s'agit alors de l'étape limitante (et non plus la VTR), et la différence de solubilité des différents gaz n'est alors plus un verrou, permettant l'injection de H_2 et de CO_2 avec un ratio de 4:1 sans présence dans le biogaz final (Rafrafi et al. 2021; Kougias et al. 2017).

I.5. Essor de la biométhanation *ex-situ* et premières approches de couplage avec la production biologique de H_2

I.5.a. Intérêts de la méthanation ex-situ

Dans le cas de la méthanation *ex-situ*, où la culture est focalisée seulement sur les organismes méthanogènes, le milieu de culture est généralement aqueux et de composition simple, alimenté en H_2 et CO_2 servant de substrat pour les archées. L'intérêt envers la biométhanation *ex-situ* a débuté au début des années 2010. Ce procédé a pour vocation la conversion du CO_2 issu des activités anthropiques en méthane (selon la réaction en Eq. 32) grâce au H_2 issu de l'électrolyse de l'eau utilisant l'excès d'électricité des énergies renouvelables (approche « Power-to-Gas »). Il est également possible de traiter le monoxyde de carbone (CO) présent dans le syngaz (gaz de synthèse issu de la gazéification du charbon ou de la biomasse dans les industries) via ce procédé (Eq. 33) et l'utilisation d'autres micro-organismes (Lecker et al. 2017; Ren et al. 2020).

$$CO + 3\,H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \qquad \Delta H^0 = -206\ kJ/mol \qquad (33)$$

Par rapport à la méthanation traditionnellement utilisée par voie chimique avec la réaction de Sabatier, la méthanation biologique présente aussi l'avantage de demander une quantité d'énergie bien moindre. En effet, les conditions de culture sont généralement comprises entre 15°C et 90°C et à pression atmosphérique (ou jusqu'à 10 bars), tandis que la méthanation traditionnelle se déroule plutôt entre 300°C et 500°C à une pression d'environ 30 bars (Liu et Whitman 2008; Lecker et al. 2017; Chatzis et al. 2024). La biométhanation est également une réaction biologique sobre en substrat, étant donné que les apports en H_2 et CO_2 couplés aux éléments minéraux et organiques apportés par le milieu de provenance suffisent généralement au maintien en vie des micro-organismes (Luo et al. 2012; Lecker et al. 2017). En comparaison avec la méthanation in-situ, les performances de productivité de CH_4 sont généralement plus élevées, avec jusqu'à 30-40 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour *ex-situ*, contre moins de 5 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour au maximum *in-situ* (Rafrafi et al. 2021).

Néanmoins, les installations de méthanation biologique peinent encore à dépasser les stades de développement au-delà de l'échelle pilote en raison de la faible production de méthane en termes de débit, ce qui ne permet pas d'obtenir un procédé rentable (Lecker et al. 2017; Angelidaki et al. 2018). Les recherches s'évertuent donc à mieux cerner les différents phénomènes et à améliorer les productivités en CH_4.

I.5.b. Populations microbiennes et voies métaboliques impliquées

Les micro-organismes au sein d'un méthaneur sont très diversifiés et dépendent directement de leur milieu d'origine. Le nombre d'espèces représentées reste logiquement moins grand que dans un méthaniseur, étant donné que seuls les méthanogènes hydrogénotrophes seront dans des conditions favorables pour leur croissance. Bien que certaines espèces de bactéries puissent être présentes, ce sont majoritairement des archées (ou Archaea) qui sont en plus forte abondance. Parmi ces archées, les espèces présentes varient selon les conditions physico-chimiques du milieu. La plupart du temps, les conditions de température pour la méthanation sont de l'ordre de 50°C à 70°C, favorisant le développement des archées thermophiles. Il est alors possible d'y retrouver des organismes appartenant aux genres *Methanothermobacter*, *Methanococcus* ou *Methanothermus* (Jones et al. 1987; Rusmanis et al. 2019; Spyridonidis et al. 2023). Il existe également des procédés de méthanation dans des conditions mésophiles, impliquant des archées appartenant plutôt aux genres *Methanobrevibacter*, *Methanobacter* ou *Methanosarcina*. Bien que moins coûteux en énergie à apporter pour la chauffe, ces procédés sont moins avantageux en raison de performances moins

intéressantes qu'en conditions thermophiles. Dans la comparaison réalisée par Luo et Angelidaki, la consommation de H_2 par un consortium mésophile n'était que de 409 $mL/L_{culture}/h$, contre 699 $mL/L_{culture}/h$ pour un consortium thermophile, toutes choses égales par ailleurs. La production spécifique de méthane chez les thermophiles s'est avérée également environ 50% plus élevée (Wasserfallen et de Macario 2000; Spyridonidis et al. 2023; Luo et Angelidaki 2012).

L'assimilation du H_2 et du CO_2 et leur conversion en CH_4 est réalisée durant le cycle de Wolfe, faisant intervenir plusieurs cofacteurs et coenzymes (Figure 14). (Thauer 2012; Fachal-Suárez et al. 2024).

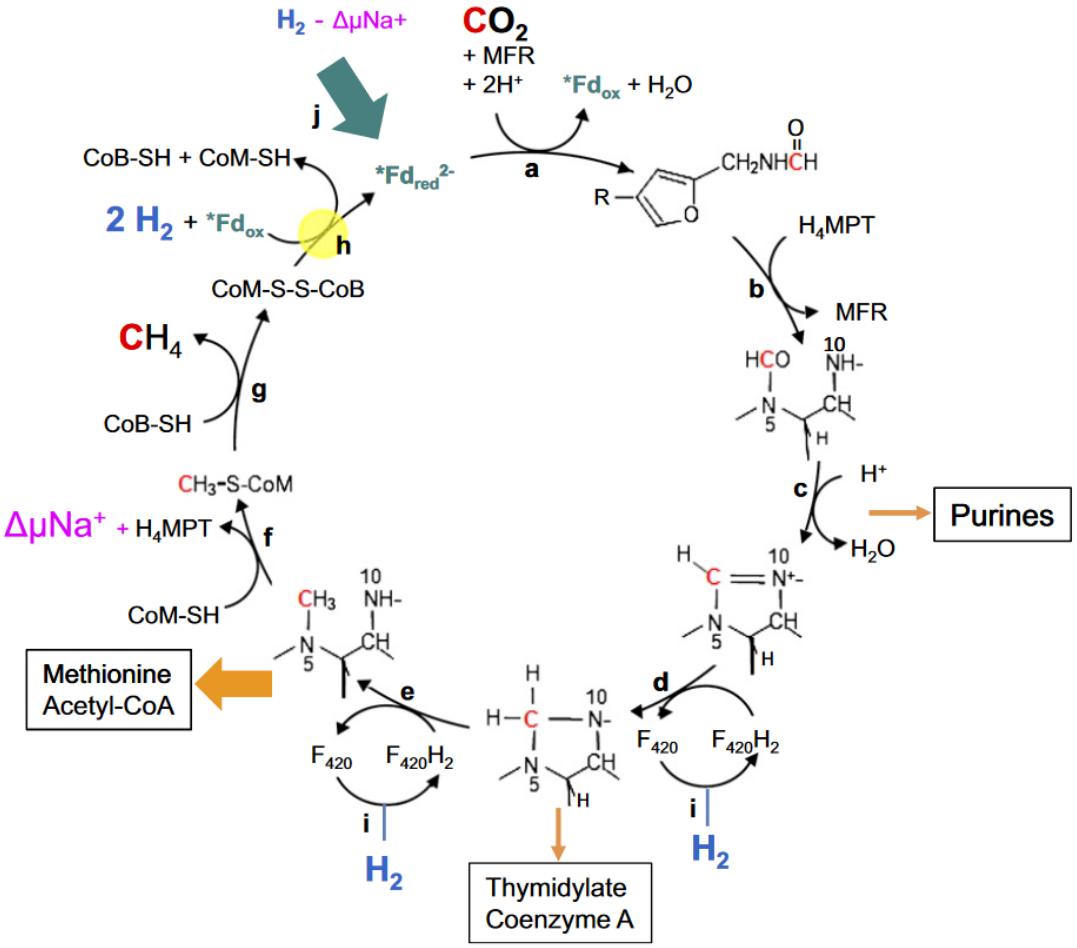


Figure 14. Voies métaboliques du cycle de Wolfe présentes chez les archées méthanogènes hydrogénotrophes (tiré de Thauer 2012). Nomenclature : F_{420}, coenzyme 420 ; Fd, ferrédoxine ; MFR, méthanofurane ; H_4MPT, tétrahydrométhanoptérine ; CoB, coenzyme B ; CoM, coenzyme M ; $\Delta\mu Na^+$, potentiel électrochimique de l'ion sodium ; a = EC 1.2.99.5, formylméthanofurane déshydrogénase ; b = EC 2.3.1.101, formylméthanofurane/tétrahydrométhanoptérine formyltransférase ; c = EC 3.5.4.27, méthényl-tétrahydrométhanoptérine cyclohydrolase ; d = EC 1.5.98.1, méthylène-tétrahydrométhanoptérine déshydrogénase ; e = EC 1.5.98.2, méthylène-tétrahydrométhanoptérine réductase ; f = EC 2.1.1.86, méthyl-tétrahydrométhanoptérine/coenzyme M méthyltransférase ; g = EC 2.8.4.1, méthyl-coenzyme M réductase ; h = complexe hydrogénase/hétérodisulfide réductase bifurcateur d'électrons ; i = EC 1.12.98.1, coenzyme F_{420} hydrogénase ; j = hydrogénase de conversion énergétique catalysant la réduction de la ferrédoxine par le H_2 induite par la force motrice du sodium.

Il est possible de remarquer l'entrée et la sortie de plusieurs éléments intermédiaires au sein de ce cycle. C'est notamment le cas de la ferrédoxine réduite, qui doit alors être apportée par d'autres réactions. Il en va de même pour la sortie des purines, ou de l'acétyl-CoA. Ces réactions en interaction avec le cycle de Wolfe, sont dites anaplérotiques. Bien que la réaction de méthanation soit suffisante pour les apports énergétiques du métabolisme des archées, aucune molécule d'ATP n'est pourtant synthétisée directement à l'issue du cycle de Wolfe. En revanche, la sortie d'acétyl-CoA, molécule « carrefour » de nombreuses réactions métaboliques, est essentielle et peut servir d'intermédiaire à la production d'autres métabolites par les archées, accompagnée de la génération d'ATP (Thauer 2012; Lyu et al. 2018).

Toutefois, le H_2 et CO_2 peuvent également suivre d'autres voies métaboliques comme la voie de Wood-Ljungdahl, menant à la synthèse d'acétate à partir de ces gaz (Eq. 34). Cet acétate peut ensuite être converti en CH_4 et CO_2 par des archées méthanogènes acétotrophes, si celles-ci sont présentes dans le consortium microbien (Eq.35). C'est pourquoi cette synthèse a majoritairement lieu lors d'expériences de méthanation *in-situ*. Les réactions globales peuvent alors s'écrire :

$$2\,CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2\,H_2O \qquad \Delta H^0 = -95\,kJ/mol \qquad (34)$$

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \qquad \Delta H^0 = -31\,kJ/mol \qquad (35)$$

En prenant en compte la stœchiométrie de ces deux réactions dans un bilan global, il y a bien consommation d'une molécule de CO_2 et de 4 molécules de H_2 pour la formation d'une molécule de CH_4. Ainsi, cette voie n'entre pas en concurrence avec la méthanation directe et peut même se dérouler en parallèle si les enzymes du cycle de Wolfe sont saturées. En revanche, s'il n'y a pas d'archées acétotrophes, notamment dans le cas d'une méthanation *ex-situ*, il y a alors un risque de cumul d'acétate, ce qui risque d'inhiber la croissance des micro-organismes, en plus de faire diminuer le rendement en méthane par rapport à la quantité de gaz injecté (Ragsdale et Pierce 2008; Angelidaki et al. 2018; Treu et al. 2018; De Jonge et al. 2022).

I.5.c. Configurations de bioréacteurs pour l'amélioration de la biométhanation ex situ

Augmentation de la pression ou de la pression partielle en H_2

Des cultures peuvent être réalisées avec des pressions supérieures à la pression atmosphérique afin d'augmenter la solubilité du H_2 dans la phase liquide. Cependant, selon les populations présentes, une surpression en H_2 au-delà de 10 Pa inhibe la méthanation, au profit de la formation d'autres composés comme le lactate, le propionate ou l'éthanol (Liu et Whitman 2008). De même, lorsque que le ratio entre H_2 et CO_2 est plus élevé que 4:1, la formation d'acétate est alors plus intense, aux dépens du méthane si absence d'archées acétotrophes dans le milieu (Agneessens et al. 2017).

Bioréacteurs à percolation

Des alternatives au simple bioréacteur parfaitement agité ont émergé afin de répondre à cette problématique, et ont été transposées jusqu'à l'échelle pilote. Parmi elles, il est possible de trouver les bioréacteurs à percolation (Figure 15). Le principe de ces bioréacteurs est d'injecter sous forme de gouttelettes la phase liquide contenant la biomasse sur un lit fixe de particules, le tout dans une atmosphère gazeuse (ici, l'injection de H_2 et de CO_2 généralement avec un ratio de 4:1). Ceux-ci présentent également l'avantage de ne pas nécessiter d'agitation. Les conversions du H_2 en CH_4, très efficaces avec ce modèle, sont rapportées entre 85% et 100% en conditions stabilisées. En revanche, les productivités volumiques sont globalement plus faibles et très hétérogènes, comprises entre 0,2 et 15,4 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour, mais ne dépassant généralement pas 2,0 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour (Burkhardt et Busch 2013; Strübing et al. 2017; Burkhardt et al. 2019; Rafrafi et al. 2021), là où les bioréacteurs continuellement agités présentent des productivités de gaz généralement entre 2,5 et 20 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour (Nishimura et al. 1992; Kim et al. 2013; Burkhardt et al. 2019; Angelidaki et al. 2018). Cependant, en jouant sur la pression en surface du bioréacteur, augmentée à 3×10^5 Pa, Peillex et al. ont pu obtenir l'équivalent de 288 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour, une fois la pression rapportée à pression atmosphérique (Peillex et al. 1990).

Bioréacteurs à membrane

Les bioréacteurs à membranes peuvent également être d'un grand intérêt, dans la mesure où le H_2 n'est pas directement injecté dans le bioréacteur, mais traverse la membrane par perméation (Figure 15). Ainsi, il n'est pas présent (ou alors en très petite quantité) dans le biogaz final et peut même être réinjecté via une boucle de recirculation. Les performances présentées sont intermédiaires, avec des

taux de conversion du H_2 compris entre 60% et 90% et des débits sortants de méthane entre 1,13 et 8,84 $L_{CH_4}/L_{culture}$/jour (Ju et al. 2008; Díaz et al. 2015; Rafrafi et al. 2021). Avec ce modèle de bioréacteurs, la concentration en H_2 est plus importante en surface des membranes, conduisant à la formation de biofilm à la surface de celles-ci. Cela peut parfois être recherché dans le cas où les archées méthanogènes sont majoritaires, mais cela se traduit également par une forte hétérogénéité du transfert de H_2, et par conséquent de la production de CH_4 pour l'ensemble du bioréacteur (Ju et al. 2008; Jensen et al. 2019; Fachal-Suárez et al. 2024).

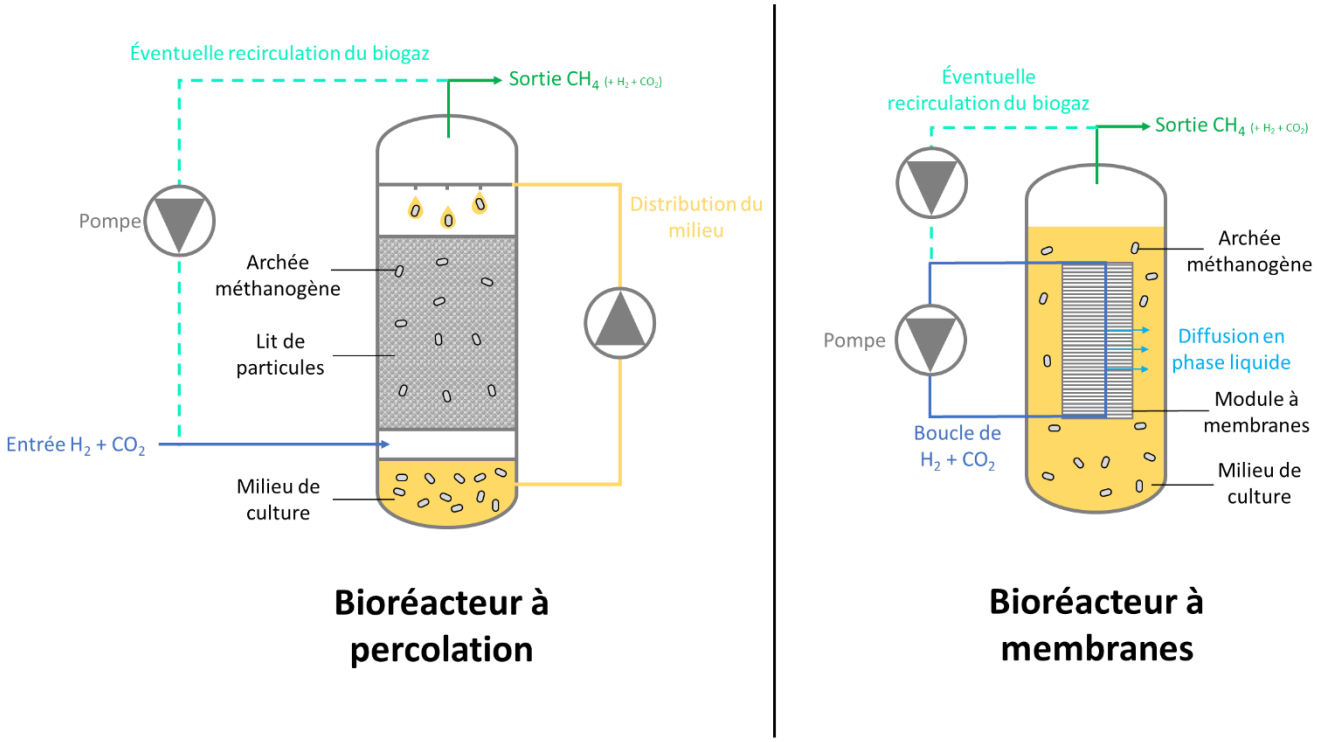


Figure 15. Systèmes de bioréacteurs utilisés pour la méthanation biologique en vue d'améliorer le transfert de H_2 et d'obtenir un taux de conversion maximal.

Le développement de ces technologies à plus grande échelle est toujours en cours, notamment en Allemagne, en Suisse ou encore au Danemark, avec une installation nouvellement implantée (*E-fuel Project, Biogasclean*) capable de produire environ 500 000 m^3 de CH_4 par heure.

Bioréacteurs parfaitement agités

Ces bioréacteurs, bien que plus « classiques », restent couramment utilisés, notamment à l'échelle de laboratoire, pour la caractérisation des activités microbiennes, des mécanismes de transfert gazeux, ainsi que du design du bioréacteur, en vue d'une amélioration par la suite lors de la montée en échelle (Chatzis et al. 2024; Angelidaki et al. 2018). L'avantage ici est le mode de transfert de gaz via un

diffuseur de gaz, couplé au maintien d'une forte agitation, permettant la formation de bulles de diamètres très réduits, et donc une meilleure homogénéité des transferts de gaz à l'échelle de la cuve (Angelidaki et al. 2018; Rusmanis et al. 2019). Néanmoins, le taux de conversion du H_2 est parfois insuffisant selon les débits appliqués en entrée de bioréacteur, ce qui amène à des valeurs très variables situées entre 18% et 99% (Rafrafi et al. 2021). Pour éviter cela, la recirculation du biogaz en sortie de bioréacteur afin de convertir la totalité du H2 existant apparaît donc comme une solution, mais pouvant se faire au détriment de la productivité totale de CH4 en raison de la diminution du débit de H_2 et de CO_2 entrant (Kougias et al. 2017).

I.5.d. Les couplages de bioprocédés pour la production de méthane

Couplage méthanisation/méthanation biologique

Étant donné que les procédés de méthanisation et de méthanation biologique sont étroitement liés d'un point de vue microbiologique, il semble logique que ces deux procédés puissent être utilisés conjointement. En effet, le CO_2 utilisé pour la méthanation est de source biogénique, lui-même contenu dans le biogaz issu de la méthanisation.

En France, le projet DENOBIO porté par *Enosis* a permis l'installation d'un premier démonstrateur industriel de méthanation biologique *ex-situ* en mars 2025 dans les Hauts-de-France. Le CO_2 est issu du biogaz d'une unité de méthanisation et le H_2 d'une unité d'électrolyse de l'eau, tous deux situés à proximité du site. D'après le document *« Note relative à la méthanation : veille technologique et projets de développement en cours »* de l'Ineris sur la biométhanation, publié en 2024, cinq autres projets similaires de valorisation de CO_2 à grande échelle provenant de la méthanisation via la biométhanation sont en cours de réalisation en France. Elles demeurent néanmoins les seules installations ayant dépassé l'échelle pilote dans ce domaine.

Dans le rapport *« Mapping e-methane plants and technologies »* publié par l'European Biogas Association, le nombre de projets de méthanation entièrement renouvelable (*i.e.* CO_2 d'origine biogénique et H_2 issu de l'électricité renouvelable) est de 32 actifs en Europe en 2023, majoritairement situés en Allemagne, en Finlande et en France. Il convient de préciser que ces projets regroupent la méthanation biologique et catalytique.

Couplage production biologique de H_2/méthanation biologique

Comme décrit dans la section I.3.d, le dihydrogène gazeux pose de nombreuses contraintes liées à son exploitation et à la sécurité, sa compression étant onéreuse en énergie, et son stockage à long terme est associé à une perte non négligeable sous la forme de fuites. Cela rend difficilement imaginable sa distribution sur de longues distances, ce qui n'est pas le cas du méthane, dont le réseau est d'ores et déjà existant. C'est pourquoi quelques travaux ont été rapporté dans la littérature sur le couplage entre la production biologique de H_2 et la biométhanation.

Le premier consistait en la production en mode continu de H_2 à partir de paille de blé par *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSMZ 8903 couplé à de la méthanation *in-situ*, directement au sein d'un méthaniseur. Le milieu liquide du bioréacteur où se déroulait la fermentation sombre a pu être transféré et également valorisé dans le méthaniseur. Ces travaux ont résulté en la formation d'un biogaz composé de 46% de H_2, 53,6% de CH_4 et 0,4% de CO_2, à hauteur de 6,1 $L_{gaz}/L_{culture}$/jour (soit 140 $mL_{CH_4}/L_{culture}$/h) , non utilisable en l'état et nécessitant une séparation des gaz (Willquist et al. 2012).

Le second utilisait des résidus d'épluchures de pommes de terre comme source d'amidon pour la fermentation sombre par *C. saccharolyticus*, où deux approches ont été testées. L'une avec une forte production volumique de H_2 (1000 $mL_{H_2}/L_{culture}$/h), associée à un faible rendement (1,32 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$), l'autre avec une faible production volumique (230 $mL_{H_2}/L_{culture}$/h) mais un meilleur rendement (3,48 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$). Dans les deux cas, le gaz du méthaniseur était mis en recirculation dans le bioréacteur où a lieu la fermentation sombre, afin d'aider au maintien de l'anaérobiose et de créer une boucle de gaz permettant un taux de conversion maximal. Dans le premier cas, le biogaz en sortie du méthaniseur était composé de 37% d'hydrogène et 63% de méthane. Dans le second, ce ratio était de 65% d'hydrogène pour 35% de méthane. En revanche, rapporté au volume du méthaniseur, cela revenait à ne pas dépasser 100 $mL_{CH_4}/L_{culture}$/h. Les analyses techno-économiques réalisées au sein de cette même étude ne permettaient pas de qualifier ce couplage de procédés comme viable, en considérant le coût des milieux de culture par rapport à la valeur actuelle du méthane (Ljunggren et Zacchi 2010).

Dans les deux publications, *C. saccharolyticus* est le micro-organisme utilisé pour la fermentation sombre. Or, cet organisme ne présente pas les meilleures capacités de production volumique en H_2 par rapport à d'autres espèces et son mode de culture est thermophile, ce qui représente des coûts non négligeables pour le maintien de la température entre 50°C et 70°C (Rittmann et Herwig 2012; van Niel et al. 2002). En outre, les substrats utilisés dans ces études doivent subir un pré-traitement (par hydrolyse ou explosion à la vapeur), représentant des coûts additionnels.

En France, le projet « Metha-HYn », financé par l'ADEME et impliquant ENGIE, l'INRAE et l'APESA, vise à développer un procédé couplé de production biologique d'hydrogène avec la biométhanation *in-situ* au niveau des méthaniseurs déjà en fonctionnement. Les premiers résultats rapportent une augmentation de 30% de la productivité en méthane (Communiqué de presse INRAE et ENGIE du 05 septembre 2024).

Conclusion

Cette synthèse bibliographique a permis de mettre en évidence la forte dépendance de l'industrie mondiale vis-à-vis du H_2. Cette tendance est vouée à augmenter encore suite à l'intérêt relativement nouveau envers le H_2 en tant que vecteur énergétique pour diverses utilisations. Il est dorénavant primordial de générer cette énergie via des procédés à faible impact carbone, en raison du dérèglement climatique causé par les activités anthropiques.

Plusieurs procédés microbiologiques existent pour la conversion de substrats organiques en H_2. Ceux-ci peuvent utiliser la lumière comme source d'énergie, comme dans le cas de la photo-fermentation, mais présentent des productivités relativement faibles. La fermentation sombre anaérobie, quant à elle, s'affranchit de l'utilisation de lumière, et présente des productivités en H_2 intéressantes pour des utilisations ultérieures. Parmi les micro-organismes réalisant cette fermentation, les bactéries du genre *Clostridium* se distinguent par leurs hautes performances de production et les connaissances accumulées à leur sujet depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Plusieurs stratégies de recherche sont encore mises à l'œuvre à l'heure actuelle dans un souci d'amélioration des productivités et des rendements du procédé, tout en valorisant des matières considérées jusqu'alors comme des déchets. Néanmoins, le H_2 pose plusieurs problématiques de sécurité et de coûts de stockage et d'acheminement. Ces problématiques sont moins importantes concernant le gaz naturel, composé principalement de méthane et largement utilisé depuis plusieurs décennies, et dont les infrastructures de distribution existent déjà. Ainsi, la conversion du H_2 en CH_4 comme vecteur énergétique apparaît comme plus pertinente. Pour ce faire la méthanation biologique *ex-situ*, inspirée des étapes finales de la méthanisation, s'avère être une solution intéressante. Celle-ci permet la conversion directe du H_2 et du CO_2 en CH_4 par l'utilisation d'archées méthanogènes hydrogénotrophes. Là encore, la recherche scientifique se penche sur ce procédé afin d'en améliorer les capacités de production de méthane et de monter en échelle.

Ces deux bioprocédés pris en compte, leur couplage a donc vu le jour dans le but de valoriser la biomasse inutilisée en biométhane au sein d'un procédé global. À la différence de la méthanisation où l'ensemble des réactions se déroule au sein d'un même compartiment, le procédé couplé sépare physiquement les micro-organismes et les réactions associées. Ceci permet d'améliorer la productivité en H_2, puis en CH_4, en exploitant pleinement les capacités du métabolisme de chaque micro-organisme. Ces approches de procédés couplés sont encore peu nombreuses, et ont utilisé d'autres bactéries que celles du genre *Clostridium* pour la production de H_2. Or, la biométhanation est une réaction particulièrement demandeuse en H_2 (quatre molécules de H_2 sont nécessaires pour la production d'une molécule de CH_4). Ce travail de thèse étudiera donc les capacités des bactéries du genre *Clostridium*, afin de développer un procédé de bioproduction de H_2 en continu capable de soutenir les forts besoins de la biométhanation. Les aspects de caractérisation du métabolisme des clostridies seront primordiaux dans un souci d'optimisation de la productivité en H_2. Néanmoins, le transfert d'une grande quantité de H_2 fait ressortir la problématique de la faible solubilité de ce gaz, qui doit pourtant se dissoudre en phase aqueuse pour être consommé par les archées méthanogènes. Ainsi, le transfert du gaz en sortie de fermentation sombre vers la cuve de biométhanation risque de représenter un verrou technologique à lever pour une production de CH_4 suffisante et efficace.

Stratégie scientifique de la thèse

Au sein de ce travail de thèse, l'objectif global consiste à produire une quantité idéale de H_2 d'origine biologique (productivité suffisante et maximisation du ratio H_2/CO_2) pour la conversion en CH_4 via la biométhanation. C'est-à-dire qui soit suffisamment soutenue pour que les archées méthanogènes puissent croître, mais qui ne doit pas être trop importante, au risque de retrouver une quantité résiduelle de H_2 trop importante dans le biogaz final. Ici, le mélange H_2/CO_2 sera apporté par la fermentation sombre avec *Clostridium*, genre bactérien présentant une productivité volumique en H_2 élevée tant que maintenue en acidogenèse et cultivable dans des conditions mésophiles.

Dans un premier temps, la démarche expérimentale consistera à identifier les paramètres influençant la production de H_2 au moyen de cultures discontinues. Dans le même temps, plusieurs souches de *Clostridium* seront testées afin de conserver la plus intéressante en termes de performances de production.

Dans un second temps, la souche présentant à la fois les meilleures performances de production de H_2 et la meilleure vitesse de croissance (déterminée grâce aux cultures discontinue) sera cultivée en mode continu afin d'avoir une productivité constante de gaz. Le mode continu présentant une forte demande en ATP pour le maintien de la population microbienne en croissance, l'hypothèse d'une sollicitation plus intensive des voies de l'acétate et du butyrate, favorable à une augmentation de la production de H_2 peut être formulée et sera, entre autres, testée. Une optimisation sera réalisée au moyen d'un plan d'expériences afin d'obtenir un optimum de la production de H_2 qui soit adéquat pour le couplage avec la biométhanation, en termes de débit et en s'approchant le plus possible du ratio 4:1 au vu des coefficients stœchiométriques de la réaction.

Dans un dernier temps, des premières expériences de transfert du gaz produit lors de la fermentation sombre dans un second bioréacteur pour la biométhanation sera réalisé. Les performances du consortium méthanogène seront évaluées, ainsi que les effets du transfert gazeux sur l'intégrité de ce consortium. En effet, le mélange de H_2 et de CO_2 sera dans d'autres proportions que celui de 4:1 idéal d'après le bilan stœchiométrique, et potentiellement accompagné par d'autres composés (AGV, éthanol). Nous nous attacherons à évaluer l'impact de l'injection de ce mélange gazeux pour la méthanation sur les micro-organismes mis en culture. Les performances du procédé couplé seront évaluées en comparaison avec ceux identifiés précédemment. Il restera primordial d'identifier les verrous technologiques à lever pour une potentielle montée en échelle.

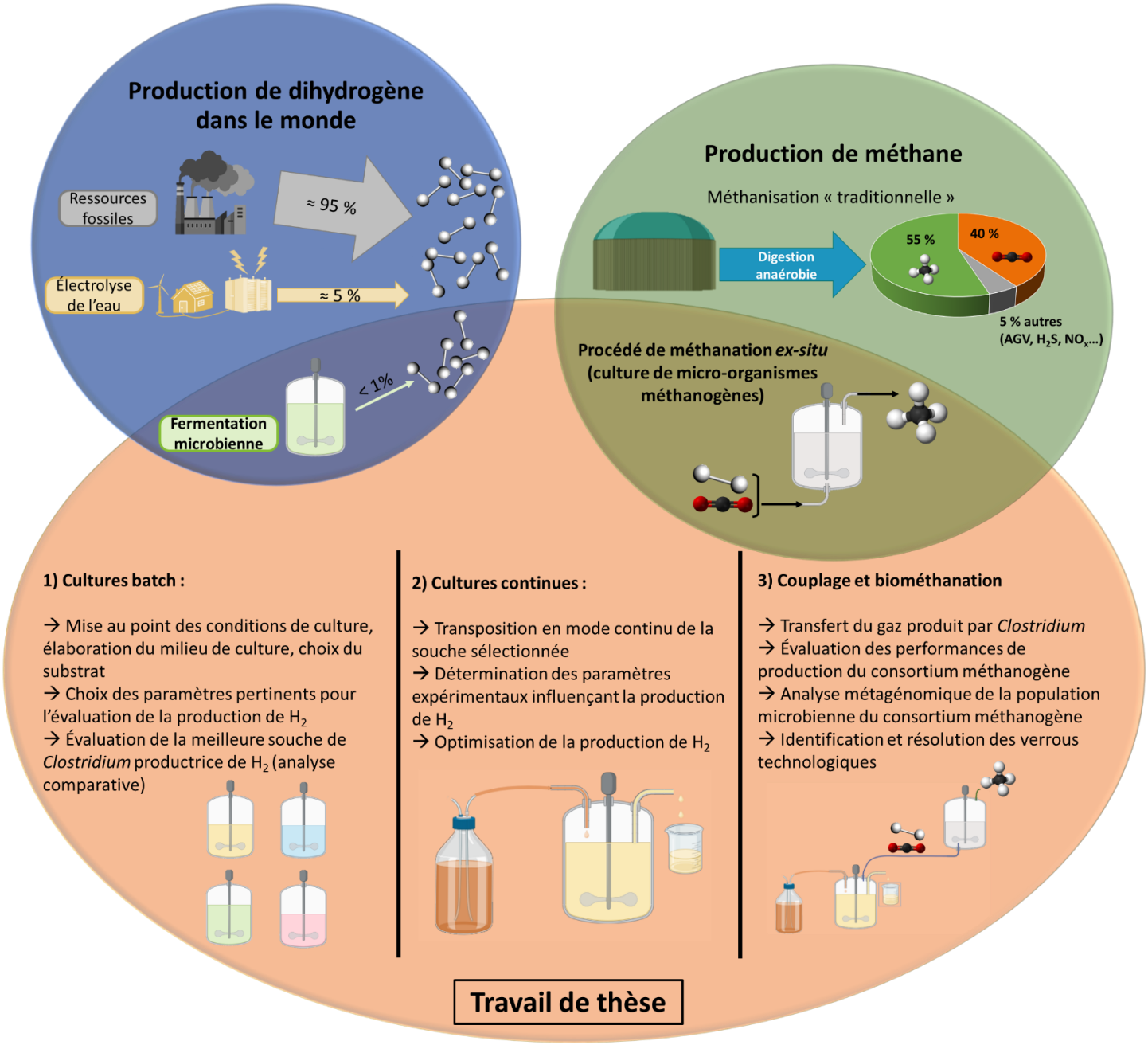


Figure 16. Schéma descriptif du déroulé du travail de thèse et son inscription dans les démarches actuelles de production d'énergie.

II. Matériel et méthodes

II.1. Fermentation sombre

Le démarrage d'une fermentation de *Clostridium* s'étale sur trois jours et se déroule en trois grandes étapes (Figure 17) :

- La levée de dormance des spores via un choc thermique, afin d'obtenir des bactéries en suspension actives.

- La pré-culture, où les bactéries sont cultivées dans un milieu similaire à celui de la culture principale et servant aussi à augmenter la quantité de biomasse.

- L'ensemencement du milieu en bioréacteur avec la pré-culture réalisée.

Afin de garantir l'anaérobiose nécessaire à la croissance bactérienne, toutes ces étapes ont lieu en milieu liquide dans des tubes afin de limiter la surface d'échange entre l'interface gazeuse et le milieu liquide. En outre, les gaz produits lors de la croissance des clostridies permettent d'entretenir les conditions anaérobies.

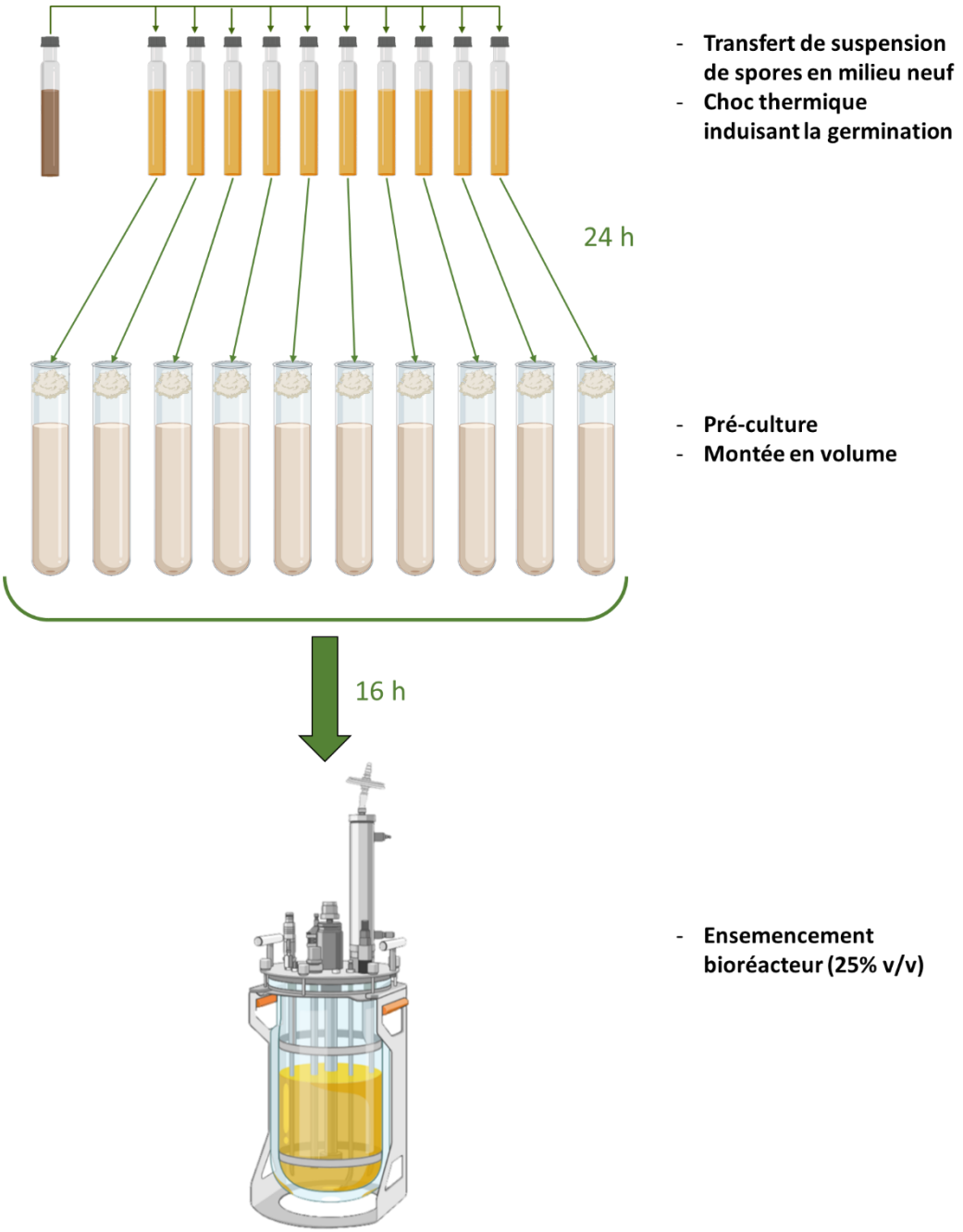


Figure 17. Illustration du protocole de démarrage d'une fermentation sombre type de *Clostridium*.

II.1.a. Micro-organismes utilisés

En considérant les principales espèces du genre *Clostridium* utilisées historiquement dans la littérature, et connaissant les potentiels métaboliques desdites espèces, quatre souches d'entre elles ont été sélectionnées. Leurs cutures ont été réalisées à partir de solutions de milieu RCM (Reinforced Clostridial Medium, Hirsch et Grinsted) contenant les spores stockées à 4°C. Ces 4 souches sont :

- *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (identique à DSM 792), très largement étudiée et souche de référence pour l'ensemble de la fermentation acétonobutylique et notamment la production de H_2,

- *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 (identique à DSM 525), étudiée à la fois pour la production d'hydrogène et pour la production de solvants,

- *Clostridium butyricum* DSM 5431, plutôt utilisée pour la production de 1,3-propanediol,

- *Clostridium tyrobutyricum* CNRZ 510, qui est un agent contaminant du lait, se retrouvant ensuite dans les produits laitiers tels que le fromage. Cette bactérie est alors capable de consommer des nutriments issus du fromage pour sa croissance, générant ainsi du gaz responsable de l'éclatement des meules (Bergere et al. 1969).



Figure 18. Culot de spores de *C. pasteurianum* ATCC 6013 en milieu RCM après sédimentation.

II.1.b. Levée de dormance des spores

Préparation des tubes pour la levée de dormance des spores

Le principe général pour faire germer les spores consiste à dégrader physiquement et/ou chimiquement l'enveloppe de la spore dans un milieu aux conditions favorables à la reprise du cycle végétatif des clostridies. Ce milieu est du milieu RCM, apportant les éléments essentiels pour leurs besoins (peptone 10 g/L, extrait de bœuf 10 g/L, extrait de levure 3 g/L, dextrose 5 g/L, chlorure de sodium 5 g/L, amidon soluble 1 g/L, chlorhydrate de cystéine 0,5 g/L, acétate de sodium 3 g/L, agar 0,5 g/L, pH ajusté à 6,8). L'aspect le plus important lors de la reprise du cycle végétatif de *Clostridium* est de créer une atmosphère exempte de O_2 afin de garantir l'intégrité des bactéries et une croissance suffisante pour les étapes suivantes. Pour ce faire, des tubes de Hungate (Bellco Glass, États-Unis), spécifiquement conçus pour la culture de bactéries anaérobies ont été utilisés. Ceux-ci sont constitués d'un tube en verre à fond rond de dimensions 16 x 125 mm, d'un septum en butyle imperméable aux gaz et d'un bouchon à vis en bakélite avec une ouverture de 9 mm, laissant apparaître le septum. Les parois en verre sont relativement épaisses et conçues pour résister à plusieurs bars de pression, interne ou externe.

Le mode de préparation couramment utilisé consiste à verser le milieu de culture dans ces tubes, puis de faire buller un gaz inerte à l'intérieur (comme du diazote ou de l'argon) afin d'éliminer l'oxygène dissous, et ce pendant plusieurs dizaines de minutes (généralement une demi-heure). Ces tubes sont ensuite rapidement refermés et le bouchon à vis est fortement serré, avant d'être autoclavés pendant 20 minutes à 121°C pour leur stérilisation (Figure 19A) (Hungate 1969; Gniese et al. 2013). Néanmoins, cette méthode peut s'avérer contraignante pour traiter un grand nombre d'échantillons, et le court intervalle de temps entre la fin de l'alimentation en gaz inerte et la fermeture du septum peut suffire à laisser des niveaux significatifs de O_2 dans le tube.

Dans notre cas (Figure 19B), 9 mL de milieu RCM sont d'abord versés dans les tubes. Le septum est ensuite déposé sur l'ouverture, et le bouchon à vis est vissé d'un seul tour, sans le serrer complètement. Ces tubes sont ensuite autoclavés pendant 20 minutes à 121°C. Le fait de ne pas serrer complètement le bouchon permet au septum de se soulever pendant le cycle de stérilisation en raison de l'augmentation de la pression. L'air peut alors s'échapper, et est remplacé par la vapeur d'eau présente dans l'enceinte. Lors du refroidissement, cette eau se liquéfie progressivement, générant un léger vide dans le tube et le septum se plaque à nouveau contre l'ouverture en raison de la pression atmosphérique. À l'issue de l'autoclavage, le bouchon est vissé complètement et ainsi, l'air n'est présent dans le tube qu'en bien moindre quantité. En outre, le vide généré est favorable à la croissance des clostridies car la pression partielle en H_2 sera plus faible que lors d'une croissance démarrant à pression atmosphérique.

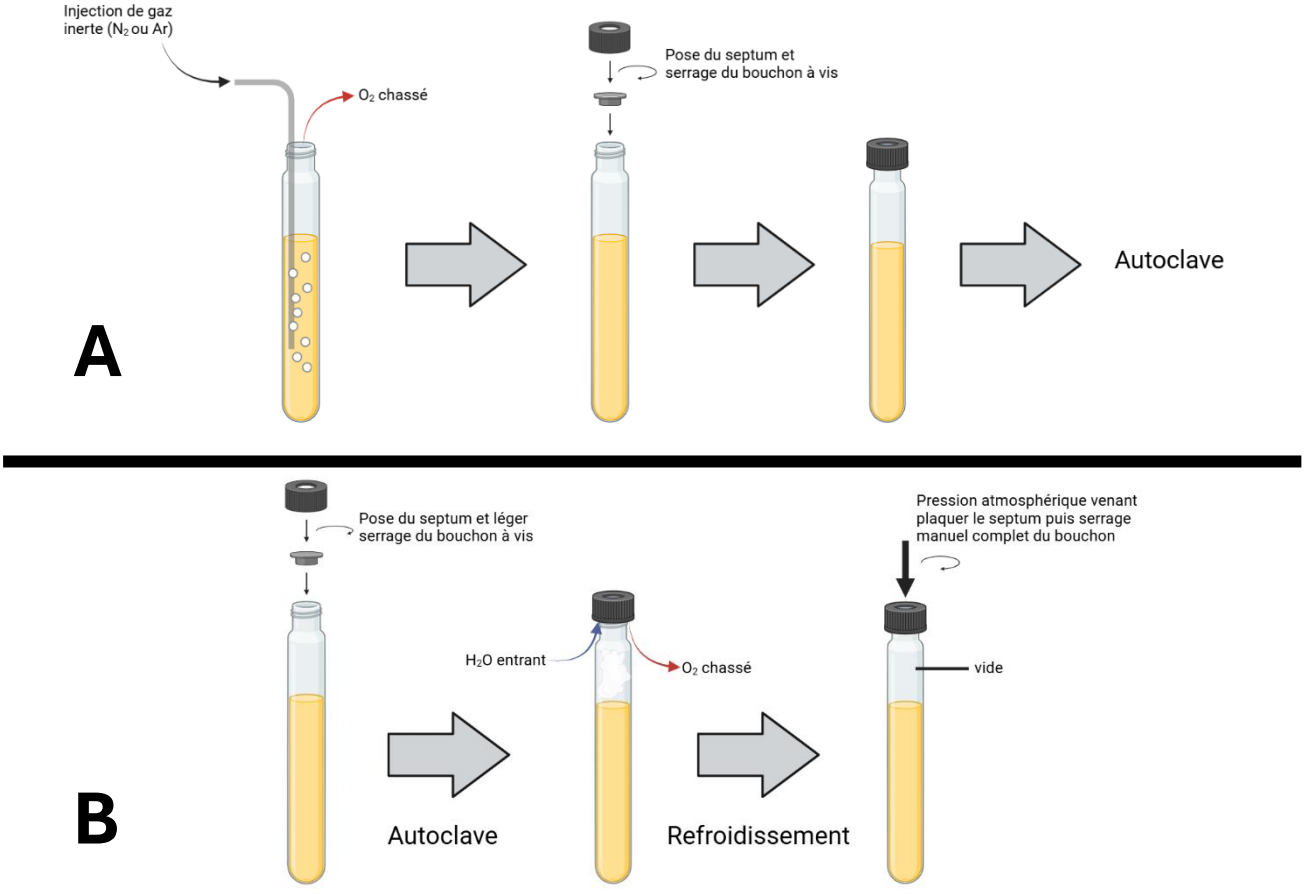


Figure 19. Différence entre la technique traditionnelle (A) de culture de micro-organismes anaérobies en tubes de Hungate et celle pratiquée dans le cadre de cette thèse (B).

De plus, le chlorhydrate de cystéine joue également le rôle d'agent réducteur, limitant ainsi les effets oxydants d'éventuelles traces de O_2.

Protocole de levée de dormance

La préparation de cette étape consiste à injecter, à travers le septum via une seringue, 1 mL d'une solution RCM contenant des spores bactériennes dans un tube préalablement préparé.

Ces tubes sont ensuite chauffés à 80°C pendant 15 minutes puis plongés dans de la glace pendant 10 minutes afin de réaliser le choc thermique qui va fragiliser la paroi des spores. Cela permet l'entrée de milieu nutritif à l'intérieur des spores, ce qui va induire les mécanismes enzymatiques pour la germination. Cette méthode a également l'avantage de synchroniser dans le temps la levée de dormance des spores au sein d'un même tube, mais également entre chaque tube. Ces tubes sont ensuite entreposés dans une étuve à 37°C. Au bout de 24h, les clostridies sont en phase de croissance, caractérisé par un milieu de culture plus trouble (formation de biomasse) ainsi que l'émission de bulles de gaz s'accumulant en surface (Figure 20). La pré-culture suivante peut alors être réalisée.



Figure 20. Production gazeuse lors de la levée de dormance en tube de Hungate de *C. acetobutylicum* ATCC 6013.

II.1.c. Pré-culture

Cette étape a pour but d'augmenter la quantité de bactéries en croissance avant ensemencement du milieu de culture en bioréacteur. Pour ce faire, un milieu de culture aqueux est préparé selon la formule suivante : D-glucose 20 g/L, extrait de levure 1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 g/L, $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 1 g/L, $CaCl_2$ 0,15 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, K_2HPO_4 0,5 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 10

mg/L, biotine, 40 µg/L, $CaCO_3$, 3g/L est réparti dans plusieurs tubes à essais de dimensions 20 x 200 mm, à raison de 30 mL par tube. Les tubes sont ensuite refermés à l'aide de coton cardé et d'une feuille d'aluminium puis autoclavés à 115°C pendant 15 minutes. Ces paramètres sont légèrement inférieurs au cycle « classique » d'autoclave afin de limiter les réactions de Maillard entre le glucose et les acides aminés présents dans l'extrait de levure. Ce milieu contient un tampon phosphate afin d'atténuer les variations de pH dues à la production des acides organiques. L'ajout de fer est essentiel car il entre directement dans la composition des hydrogénases et ferrédoxines des clostridies. Il est à noter que le $CaCO_3$ n'est pas soluble dans l'eau et se dépose au fond des tubes. Il ne contribue pas directement à la croissance bactérienne mais réagit avec les acides organiques produits par les bactéries, ce qui va émettre du CO_2 (Eq.36), garantissant l'anaérobiose au sein de ces tubes lors de la croissance bactérienne.

$$CaCO_3 + 2\,RCOOH \rightarrow Ca(RCOO)_2 + CO_2 + H_2O \qquad (36)$$

Chaque tube de la levée de dormance est versé rapidement en conditions stériles dans un tube de pré-culture, résultant en un volume final de 40 mL dans ces derniers (= 25% v/v). Ceux-ci sont mis à 37°C pendant 16h afin d'obtenir des bactéries en croissance suffisante pour l'inoculation du milieu de culture en bioréacteur. Dix tubes de précultures seront nécessaires pour cette étape d'ensemencement.

II.2. Cultures en bioréacteurs pour la production de H_2

II.2.a. Équipement et régulation

Les bioréacteurs utilisés pour réaliser la fermentation sombre sont des cuves en verre de 2 L à fond rond fabriqués par GPC (Global Process Concept, La Rochelle, France) et équipés d'une sonde de mesure du pH (InPro 3100i/SG/225, Mettler Toledo, Suisse), d'une sonde polarographique de mesure du dioxygène dissous (InPro 6850i/12/220, Mettler Toledo, Suisse) ainsi que d'une sonde Pt100 pour la mesure de la température à l'intérieur de la cuve. L'agitation de la culture est assurée grâce à une turbine Rushton de 4 pales d'un diamètre de 60 mm. Une canule plongeante équipée d'un diffuseur de gaz (« sparger ») est utilisée pour toute injection potentielle de gaz. La cuve est munie d'une double-paroi en verre au sein de laquelle circule de l'eau chauffée par un cryothermostat (Lauda, Allemagne) pour la régulation de la température (Figure 21). Les consignes et applications de régulation sont commandées grâce au logiciel C-BIO 1 de GPC.

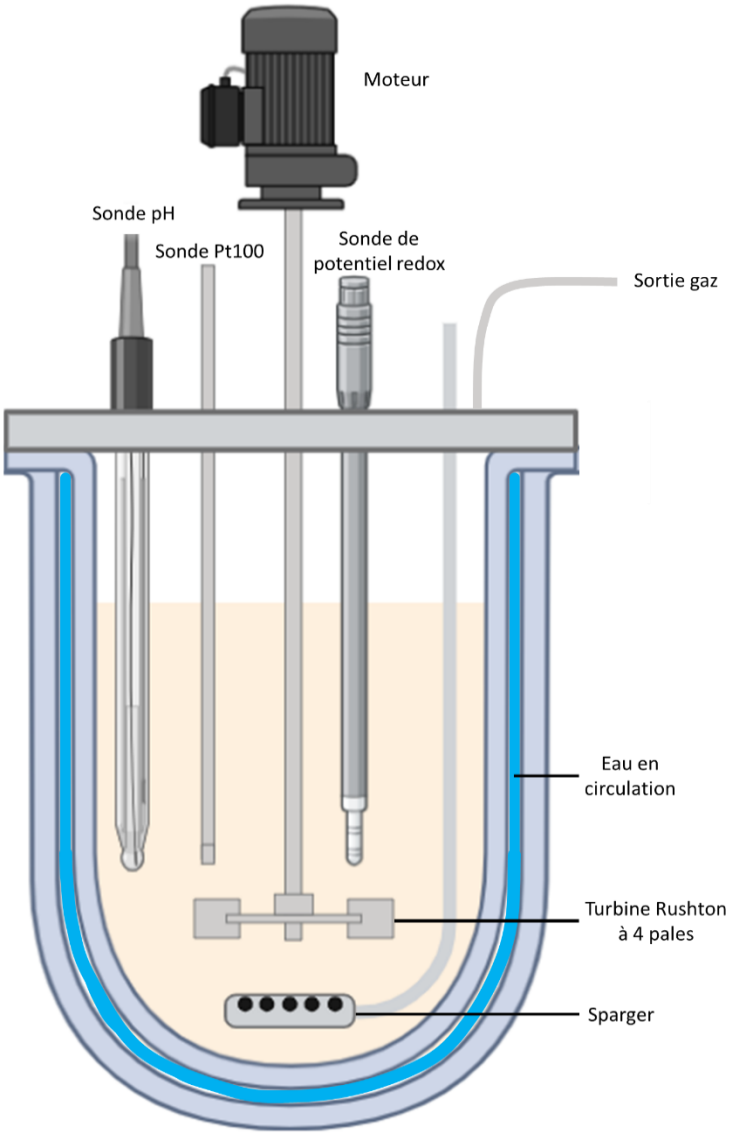


Figure 21. Schéma du bioréacteur de 2 L utilisé et de son équipement.

II.2.b. Cultures en mode discontinu

1,2 L d'un milieu de culture très proche de celui utilisé pour la pré-culture (D-glucose 20 g/L, extrait de levure 1 g/L, chlorhydrate de cystéine 1 g/L, NH_4Cl 1,5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,2 g/L, KCl 0,65 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, K_2HPO_4 0,5 g/L, $MnSO4 \cdot H_2O$ 10 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 10 mg/L, acide 4-aminobenzoïque 8 mg/L, biotine 40 µg/L) est préparé puis versé directement dans le bioréacteur. Après vérification de son étanchéité, le bioréacteur contenant le milieu de culture est autoclavé à 115°C pendant 15 minutes. Là encore, le cycle est plus court et moins élevé pour éviter les réactions de Maillard. Des essais de fermentation avaient été préalablement réalisés sans l'utilisation

d'extrait de levure (ce dernier contient, en outre, des sources de carbone non comptabilisables, ce qui pose une certaine incertitude pour le calcul du recouvrement carboné). Cependant, les croissances bactériennes se retrouvaient fortement ralenties, voire inexistantes, car l'extrait de levure contient des nutriments essentiels. Il a donc été décidé de conserver une concentration de 1 g/L pour les cultures. Des expérimentations complémentaires ont été réalisées en utilisant le glycérol comme substrat. La concentration est alors de 20,5 g/L afin d'avoir une équivalence en termes de quantité d'atomes de carbone (*i.e.* 0,1111 mol_C/L).

À la sortie de l'autoclave, un léger flux de diazote N_2 gazeux stérilisé à l'aide d'un filtre de porosité de 0,2 µm est injecté dans le milieu à l'aide de la canule et du diffuseur, sous une agitation de 300 rpm, afin de chasser le dioxygène dissous, et ce, pendant 14 à 16h. Le milieu de culture est ensuite inoculé dans un périmètre stérile avec 400 mL de suspension bactérienne issues de la pré-culture (= 25% v/v), pour un volume de travail égal à 1,6 L. L'apport de N_2 est interrompu juste après l'inoculation, les bactéries assurant ensuite leur propre anaérobiose grâce aux émissions de H_2 et CO_2.

La culture est alors régulée à 37°C, sous une agitation de 150 rpm et une valeur de pH = 6,0, régulée grâce à une solution de NaOH concentrée à 1 mol/L afin d'assurer des conditions acidogènes jusqu'à épuisement du substrat. Dans ces conditions, aucun vortex n'est généré par l'agitation et en raison des nombreux objets plongeants dans la culture. Aucune chicane n'est donc nécessaire pour ces expérimentations. 2 mL du milieu de culture sont prélevés chaque heure, et jusqu'à arrêt de la croissance pour le suivi de la culture, et réaliser des analyses du moût de culture ultérieurement.

II.2.c. Cultures en mode continu

Préparation

Pour la réalisation des cultures continues, le volume de travail a été abaissé à 1,0 L. Afin d'avoir un volume d'inoculation qui soit toujours de 25% v/v, 0,760 L de milieu de culture est préparé selon la procédure utlisée pour les cultures en mode discontinu, puis 240 mL de suspension des tubes de pré-culture y sont versés. La culture débute avec une phase discontinue durant de 4 à 8h afin d'avoir une quantité de biomasse en croissance suffisante (> 2 g/L) pour supporter le passage en mode continu. Le pH est ici régulé à l'aide d'une solution de NaOH concentrée à 2 mol/L. Pour le mode continu à proprement parler, une bouteille de 9 L contenant le milieu de culture de composition identique à celle du bioréacteur (à l'exception de la concentration en glucose, variable selon les conditions cherchées) est connectée au bioréacteur via des tuyaux flexibles passant par une pompe péristaltique réglée sur le débit souhaité. Le bioréacteur est également équipé d'une canule plongeante supplémentaire dont

la hauteur est réglable, afin de d'ajuster le volume du milieu de culture à 1 L. Cette canule sert ainsi de sortie et est connectée à une autre pompe péristaltique dont le débit est réglé sur une valeur légèrement supérieure à celle de la pompe en entrée compte tenu des ajouts de la solution de NaOH dans les variations de volume.

L'objectif des cultures continues étant de trouver les conditions optimales de production de H_2, le pH, le taux de dilution et la concentration en glucose dans le flux entrant sont des paramètres qui ont été choisis pour être variables.

Optimisation des performances en culture continue

Afin de trouver les conditions optimales de pH, de concentration en substrat et de taux de dilution, il a été décidé de réaliser un plan d'expériences avec ces trois paramètres en facteurs réglables. Après plusieurs expériences préalables, les limites du domaine d'étude ont pu être déterminées. Il a été choisi de passer par un plan composite à faces centrées, aussi appelé « Box-Wilson » où chaque facteur peut prendre trois valeurs, appelées niveaux. Ce modèle permet d'obtenir des résultats expérimentaux situés aux frontières du domaine d'étude. Pour une même culture en mode continu, deux à quatre conditions ont pu être testées. Quatre réponses ont été mesurées et évaluées via ce plan d'expériences, à savoir la productivité horaire en H_2, le ratio H_2/CO_2, le rendement molaire en hydrogène par rapport au substrat ainsi que la concentration en glucose résiduel. Celles-ci ont pu être représentées par des surfaces de réponses à l'aide du logiciel *MODDE 13* (Sartorius, Allemagne).

II.3. Culture d'un consortium méthanogène

Les micro-organismes utilisés pour cette partie proviennent d'un consortium méthanogène utilisé dans des expériences de biométhanation *ex-situ* à la ferme expérimentale de l'ENSAIA à la Bouzule (Laneuvelotte, France). Ce consortium a l'avantage de pouvoir être conservé à température ambiante plusieurs mois, peu importe la concentration en micro-organismes, et d'être utilisable à n'importe quel moment.

Pour les expérimentations de biométhanation, le bioréacteur utilisé est de même configuration que le bioréacteur où se déroule la fermentation sombre (GPC, La Rochelle, France, Figure 22). Le milieu de culture utilisé ici consiste en une solution aqueuse contenant 1 g/L d'hydrolysat pour les apports en micro-nutriments (Henry et al. 2024). Les gaz H_2 et CO_2 servent de substrats énergétiques et carbonés pour ces micro-organismes. Au début de ce travail de thèse la composition de la communauté microbienne n'était pas connue. Le consortium étant cultivé en conditions thermophiles, la

température de fonctionnement des cultures réalisées est fixée à 55°C. Le pH est régulé à 8,0 à l'aide d'une solution de NaOH à 2 mol/L. Néanmoins, les variations de pH sont nettement moins importantes qu'avec les cultures de *Clostridium*. Le volume de travail est variable, entre 1,0 L et 1,5 L selon les conditions recherchées. Le volume d'inoculation varie entre 13% v/v et 33% v/v selon la DO_{600} initiale du consortium disponible. Enfin, les effets de l'agitation sur la dissolution des gaz et leur disponibilité pour les archées ont été testés, en faisant varier l'agitation entre 300 rpm et 1100 rpm, à l'aide d'une turbine Rushton de 4 pales. Le transfert du gaz depuis le premier bioréacteur est effectué grâce à une pompe péristaltique afin de surmonter la perte de charge induite par le diffuseur de gaz situé en fond de cuve dans le second bioréacteur où se déroule la biométhanation. Dans les premières heures après inoculation, 2 mL de culture sont prélevés chaque heure pour des analyses ultérieures et le suivi de la croissance. Lorsqu'un état stabilisé est atteint, ce prélèvement est effectué toutes les 3h.

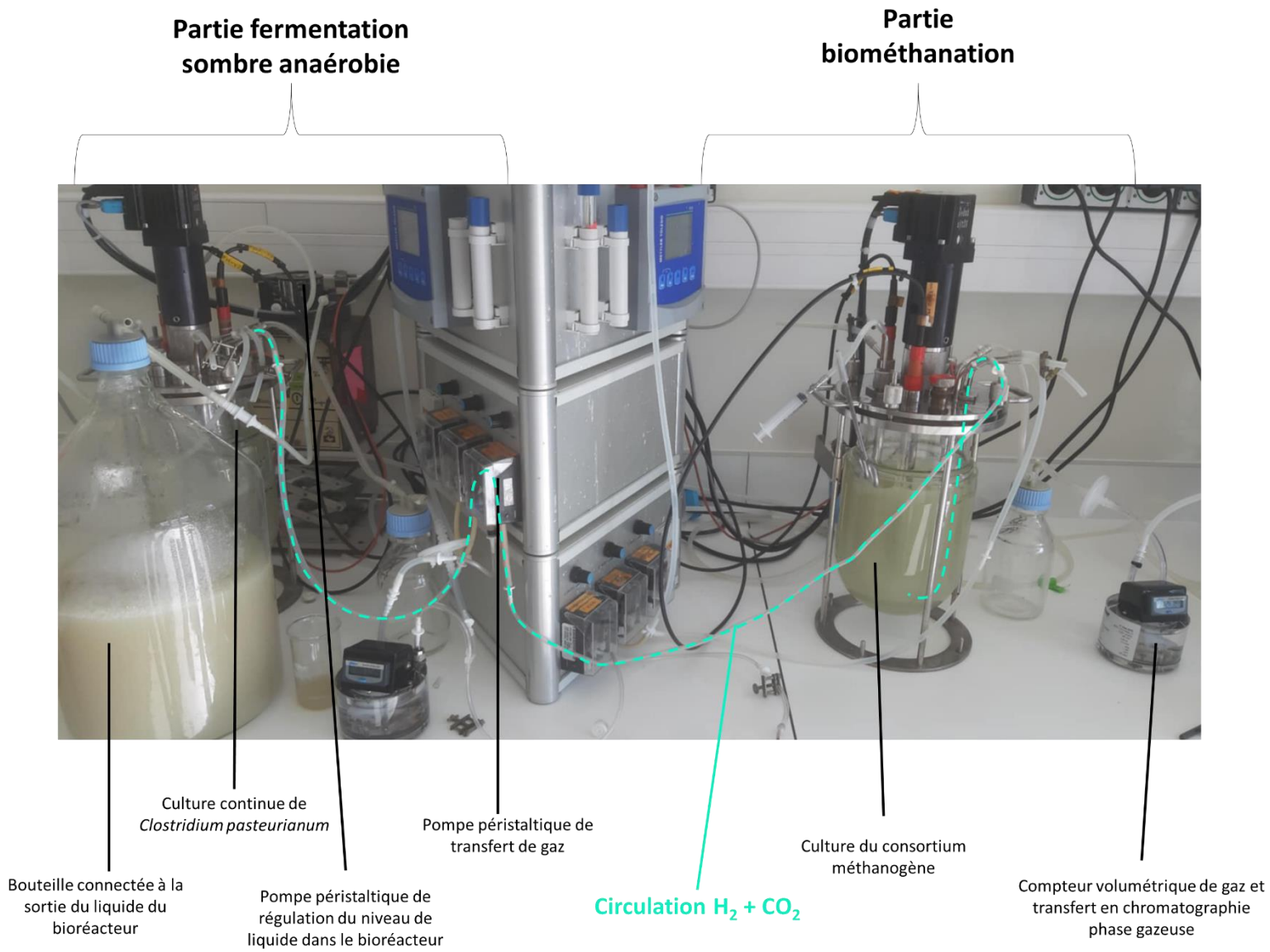


Figure 22. Dispositif expérimental mis en place pour le couplage entre la fermentation sombre en mode continu et la biométhanation.

II.4. Méthodes analytiques

II.4.a. Suivi de la croissance microbienne

À partir des échantillons de milieux de culture collectés, la densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (UV-1280, Shimadzu, Japon). L'échantillon est dilué au préalable afin de mesurer une DO comprise dans le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert, c'est-à-dire à une valeur inférieure à 0,8. Dans la littérature, la relation entre la DO_{600} et la concentration en cellules chez les espèces du genre Clostridium sont rapportées entre 0,317 g/L et 0,472 g/L pour une unité de DO_{600} (Cotter et al. 2009). Dans ce travail, la

valeur de la concentration en biomasse a été estimée à 0,34 g/L par unité de DO_{600}, comme dans la publication de Groeger et al. qui utilise également *C. pasteurianum* ATCC 6013 (Groeger et al. 2017).

Concernant le consortium méthanogène, celui-ci est constitué d'une population de micro-organismes divers, dont la taille et la relation entre la DO et leur concentration peuvent varier. Il a donc été décidé de n'utiliser que les unités DO_{600} pour les mesures.

Le restant des échantillons est ensuite centrifugé à 9600 x g pendant une à trois minutes afin de se débarrasser du culot microbien et de ne garder que le surnageant. Celui-ci est conservé à -20°C avant l'analyse du contenu en métabolites.

II.4.b. Analyse du milieu de culture

Chaque échantillon est décongelé puis filtré à 0,22 µm. Ils sont ensuite analysés par HPLC. Le volume d'injection est de 5 µL et passe à travers une colonne échangeuse de cations Aminex HPX-87H de 300 x 7,8 mm (Bio-Rad, Californie, États-Unis) chauffée à 65°C, adaptée pour la sépration des glucides simples, des acides organiques et des solvants à courtes chaînes. La phase mobile est une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 concentrée à 0,005 mol/L circulant à un débit de 0,7 mL/min. Les molécules passent ensuite à travers deux détecteurs, à savoir un réfractomètre (RID) de modèle RID-10A (Shimadzu, Japon) et un détecteur UV-visible PDa de modèle SPD-M40 (Shimadzu, Japon) balayant les longueurs d'ondes de 190 à 400 nm. La plupart des données de concentrations sont issues du détecteur RID. Le détecteur PDA est alors utile pour différencier deux composés ayant des temps de rétention proches et pouvant être co-élués, résultant en un signal commun au détecteur RID (Tableau 4). C'est, par exemple, le cas du butyrate et de l'acétone, ayant des temps de rétention proches de 17 minutes. Néanmoins, le butyrate présente un signal à 210 nm au PDA, tandis que l'acétone n'en possède pas, et inversement, l'acétone renvoie un signal au PDA à une longueur d'onde de 280 nm, là où l'acétone n'en renvoie pas.

Pour chaque composé, une gamme étalon est réalisée à l'aide de 4 niveaux de dilution (1/1000, 1/400, 1/200 et 1/100) d'une solution de pureté initiale > 99% (à l'exception du lactate, d'une pureté de 90%) afin de déterminer le coefficient de corrélation entre l'aire sous la courbe du signal et la concentration correspondante. Le glucose, sous forme solide, a été dissous à des concentrations de 0,5 g/L, 1 g/L, 2,5 g/L, 5 g/L et 10 g/L pour la réalisation de sa gamme d'étalonnage.

À l'aide des concentrations mesurées, les productivités horaires de chaque composé ont été calculées. Pour les cultures discontinues utilisant le glucose comme substrat, cela a permis d'estimer les productions en H_2 et CO_2, comme suit :

- pour 1 mol d'acétate est associée l'émission de 2 mol de H_2 et de 1 mol de CO_2.
- pour 1 mol de butyrate est associée l'émission de 2 mol de H_2 et de 2 mol de CO_2.
- pour 1 mol d'éthanol est associée l'émission de 1 mol de CO_2.
- pour 1 mol de butanol est associée l'émission de 1 mol de CO_2.

Ces estimations ont pu être réalisées en parallèle d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse, le cas échéant, afin de s'assurer de résultats similaires. En raison du maintien des cultures en acidogenèse, aucune production d'acétone n'a été relevée.

Dans nos conditions de travail et de mesures, le CO_2 dissous en conditions neutres à basiques peut former des ions hydrogénocarbonates HCO_3^-, résultant en un signal négatif au détecteur RID à un temps de rétention de 16,5 min. Néanmoins, cette mesure ne permet pas d'estimer la quantité totale de CO_2 produit, les concentrations étant relativement faibles (1,5 à 2 g/L au maximum, ce qui est atteint en moins de 2h au vu des productivités gazeuses).

Tableau 4. Liste des différentes molécules analysées par HPLC et leur temps de rétention associé.

Composé	Temps de rétention	Longueur d'onde d'observation au PDA
Glucose	7,6 min	210 nm
Glycérol	11,2 min	ND
Pyruvate	7,8 min	190 nm
Succinate	9,4 min	ND
Lactate	10,5 min	ND
Formiate	11,4 min	ND
Acétate	12,3 min	ND
Propionate	14,3 min	ND
Butyrate	17,2 min	210 nm
Valérate	22,7 min	ND
1,3-propanediol	14,9 min	ND
Méthanol	16,4 min	ND
Acétone	17,9 min	280 nm
Éthanol	18,7 min	ND
2-propanol	20,7 min	ND
1-propanol	23,2 min	ND
1-butanol	30,9 min	ND

II.4.c. Analyse des gaz produits

Pour toutes les cultures réalisées, le gaz a pu sortir par un conduit prévu à cet effet au niveau de la platine du bioréacteur. Un filtre de porosité 0,2 µm est connecté afin d'éviter l'entrée d'éventuels contaminants. Ce gaz passe ensuite par un compteur volumétrique de gaz, fonctionnant avec un système de bascule, correspondant à un volume donné de gaz (MilliGascounter, Ritter, Allemagne). Ce dispositif permet de mesurer la quantité cumulative de gaz produit, et de calculer les productivités.

À la suite de cela a été installé un dispositif compact de chromatographie en phase gazeuse, (MicroGC Fusion, Chemlys, France & Inficon, Suisse) afin de séparer et de déterminer quantitativement les proportions de chaque gaz dans le mélange en sortie des bioréacteurs. Cet appareil (µGC) a été programmé afin de prélever un échantillon de gaz toutes les heures. Le temps de prélèvement de

chaque échantillon par l'appareil est de 10 secondes. Les analyses ont été réalisées une fois pour chaque espèce de *Clostridium* en culture discontinue, afin de confirmer les calculs des émissions gazeuses obtenues d'après les données HPLC (voir II.4.b). Ensuite, ces analyses ont été systématiquement réalisées pour les cultures de *Clostridium* en continu, ainsi que pour les expériences de biométhanation.

Deux modules d'analyse font partie des équipements de cet appareil. Le premier module (module A) utilise l'argon comme gaz vecteur et contient une colonne « Rt-Molsieve 5Å, 0.25 mm-10m » pour la rétention des gaz. Cette colonne est chauffée à 80°C pendant le temps de l'analyse, soit 90 secondes. Enfin, les gaz séparés passent successivement au sein d'un détecteur à catharomètre TCD (Thermal Conductivity Detector) chauffé à 70°C, capable d'envoyer un signal en raison de la différence de conductivité thermique entre le gaz vecteur et le gaz issu de l'échantillon. Ce signal est ensuite traité informatiquement afin d'observer un pic, dont l'aire est proportionnelle à une certaine fraction volumique de gaz. Ce premier module est utile à la détection des molécules de gaz les plus petites, telles que le O_2, le N_2, le H_2 ainsi que le CH_4 (Tableau 5). Le second module (module B) utilise l'hélium comme gaz vecteur et est équipé d'une colonne « Rt-U-Bond, 0.25mm-12m » chauffée à 80°C pendant 25 secondes avant une augmentation progressive jusqu'à 130°C sur 25 secondes puis un maintien à 130°C pendant 40 secondes (temps total d'analyse de 90 secondes également). Un détecteur TCD est disposé en aval de cette colonne et chauffé à 60°C pendant le temps d'analyse. Ce module B ne permet pas de séparer les composés précédemment évoqués (d'où la nécessité du module A) mais permet de séparer et d'analyser le CO_2, l'H_2O ainsi que l'H_2S (Tableau 5).

Afin de relier l'aire d'un pic à une fraction précise de gaz, des bouteilles de calibration contenant un mélange prédéfini de différents gaz sont utilisées en effectuant des mesures en triplicats pour chacune. Trois mélanges différents ont été utilisés pour réaliser les droites de calibration, à savoir :

- une bouteille avec 90,0% de N_2 et 10,0% de H_2 (Pr : 320102, Air Products, États-Unis).
- une bouteille avec 80,0% de N_2 et 20,0% de CH_4 (Pr : 334457, Air Products, États-Unis).
- une bouteille avec 59,1% de N_2, 20,9% de O_2 et 20,0% de CO_2 (Pr : 316926, Air Products, États-Unis)

Tableau 5. Liste des différentes molécules analysées par chromatographie en phase gazeuse et leur temps de rétention associé.

Composé	Temps de rétention	Module utilisé pour l'observation
H_2	42 sec	A
O_2	50 sec	A
N_2	54 sec	A
CH_4	64 sec	A
CO_2	30 sec	B
H_2S	44 sec	B
H_2O	72 sec	B

II.4.d. Analyses métagénomiques

Les populations microbiennes contenues dans le consortium méthanogène n'étaient initialement pas connues. Ainsi, des échantillons ont été récupérés en début de culture, puis en fin de culture afin de réaliser une extraction leur ADN microbien. Les volumes des échantillons sont ici compris entre 2 et 50 mL selon leur densité optique, puis centrifugés à 5500 x g pendant 10 minutes, correspondant à un culot microbien pesant entre 5 et 15 mg. L'extraction est réalisée à l'aide du kit *DNeasy PowerBioFilm* (Qiagen, Allemagne) en suivant le protocole fourni.

La qualité de l'ADN extrait du consortium méthanogène est en premier lieu estimée à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, États-Unis). Cet appareil est capable de déterminer la concentration en ADN d'un échantillon, qui doit être supérieure à 10 ng/µL pour la suite des analyses, ainsi que sa pureté. Celle-ci est déterminée en calculant le rapport DO_{260}/DO_{280}, dont la valeur doit être comprise entre 1,8 et 2,0 pour être considérée comme satisfaisante.

Les échantillons ont ensuite été pris en charge par le prestataire Novogene (Novogene Europe, Munich Sequencing Center, Allemagne) dans le but de réaliser une analyse métagénomique afin de déterminer les populations microbiennes initiales et leur évolution suite aux expériences de biométhanation. La méthode de séquençage a été réalisée sur les amplicons avec la méthode Illumina Sequencing PE250. L'ADN des bactéries a été amplifié au niveau des régions V3 et V4 codant pour l'ARN ribosomique 16S, via des amorces de séquences 5' CCTAYGGGRBGCASCAG 3' et 5' GGACTACNNGGGTATCTAAT 3'. L'ADN des archées a été amplifié au niveau des régions V4 et V5 codant pour l'ARN ribosomique 16S, à l'aide des amorces 5' CAGCCGCCGCGGTAA 3' et 5' GTGCTCCCCCGCCAATTCCT 3'.

III. Comparaison de la production de H_2 en mode discontinu chez plusieurs espèces du genre *Clostridium*

III.1. Avant-propos

Ce chapitre de thèse s'attachera à décrire les premières expérimentations mises en œuvre, qui avaient notamment pour objectif premier la prise en main des expérimentations de culture des clostridies. Les données extraites sont néanmoins essentielles à la détermination et la standardisation de conditions expérimentales en bioréacteur pour la production de biohydrogène. Dans la littérature scientifique, tous paramètres pris en compte, plus de 2000 conditions de culture existent dans le domaine de la fermentation sombre (voir I.3.b), ce qui amène à des résultats difficilement comparables (Rittmann et Herwig 2012). C'est notamment le cas des cultures avec un pH non régulé, aboutissant à la bascule en solvantogenèse avant utilisation de la totalité du substrat et avec des productivités de H_2 réduites, ou le cas des cultures en milieu fermé, pour lesquelles l'augmentation de la pression partielle en H_2 a pour effet de ralentir la productivité en H_2. En outre, les principales espèces du genre *Clostridium* étudiées pour la production de H_2 sont *C. butyricum* (26% des publications), *C. acetobutylicum* (12,2% des publications, avec une part très importante de la souche ATCC 824) et *C. beijerinckii* (12,8% des publications) (Wang et Yin 2021). Néanmoins, *C. butyricum* et *C. beijerinckii* sont connues pour leur forte production de butyrate, aux dépens de la production d'acétate, pourtant plus favorable à la formation de H_2, ce qui peut susciter des interrogations quant à leurs réelles capacités de production. C'est pourquoi il a été décidé de réaliser des fermentations en mode discontinu de plusieurs espèces de *Clostridium* en culture pure, afin d'évaluer leurs performances en vue d'une production continue de H_2. Pour ce faire, il a donc été primordial de définir et fixer des conditions standardisées pour la mise en place des cultures et de comparer les performances des espèces. Les souches étudiées ont été *C. acetobutylicum ATCC 824* (identique à la DSM 792), *C. pasteurianum* ATCC 6013 (identique à la DSM 525), *C. butyricum* DSM 5431 et *C. tyrobutyricum* CNRZ 510.

Lors de cultures utilisant le glucose comme substrat, différents résultats expérimentaux (productivité volumique de gaz, ratio molaire H_2/CO_2, rendement en H_2 par rapport au substrat) ont été pris en compte en fonction de leur pertinence pour la production d'hydrogène en mode continu qui sera étudiée dans la suite de ce travail. Ces expérimentations ont également permis de sélectionner la souche la plus performante pour la suite des travaux de thèse. Ces différents résultats ont fait l'objet d'une publication soumise et acceptée à *Journal of Biotechnology*.

Enfin, des expériences complémentaires ont été réalisées afin d'apporter des informations supplémentaires sur les phénomènes observés et sur le métabolisme des clostridies.

Une attention particulière a, enfin, été portée sur la question de la méthode de quantification des gaz produits lors des cultures, étant donné qu'il s'agit du paramètre le plus important pour évaluer la productivité en H_2.

III.2. Étude des fermentations de différentes espèces de *Clostridium* en mode discontinu

III.2.a. Analyse comparative des performances de production de H_2

Cette section se penche sur le travail de comparaison de quatre espèces du genre *Clostridium*, connues pour leur production d'hydrogène et répertoriées dans la littérature scientifique. Les objectifs consitent en l'évaluation des paramètres pertinents concernant la production de H_2 en culture discontinue (capacité de croissance des bactéries, vitesse de consommation du substrat, productivité volumique maximale de H_2, ratio H_2/CO_2, rendement H_2/glucose). À l'issue des différentes fermentations réalisées (n = 5 pour chaque souche), l'espèce présentant les meilleures capacités sera sélectionnée pour sa transposition en culture continue dans la suite des travaux. L'ensemble de ces démarches a fait l'objet de la rédaction d'un article de recherche, accepté dans *Journal of Biotechnology* (Elsevier) le 20 octobre 2025.

Rational comparison of biohydrogen production using *Clostridium* species through dark fermentation during anaerobic batch processes

Ludovic VAUTHIER[1], Emmanuel RONDAGS[1], Céline LOUBIERE[1], Nakry PEN[1], Xavier FRAMBOISIER[1], Emmanuel GUEDON[1]*, and Stéphane DELAUNAY[1]

Keywords

Biohydrogen, dark fermentation, glucose, Clostridium, stirred tank bioreactor

Highlights

Biohydrogen production by *Clostridium* species through dark fermentation were compared

Standardized cultures conditions were implemented for rational comparison

pH regulation and gas outlet are essential to avoid growth and production inhibition

High acetate to butyrate ratios are not correlated with high hydrogen productions

Clostridium pasteurianum displayed the best capabilities in hydrogen production

[1] Université de Lorraine, CNRS, LRGP, 54000 Nancy, France

*Corresponding author :

Université de Lorraine, CNRS, LRGP, 54000 Nancy, France. Email adress: emmanuel.guedon@univ-lorraine.fr (E. Guedon)

Université de Lorraine, CNRS, LRGP, 54000 Nancy, France. Email adress: stephane.delaunay@univ-lorraine.fr (S. Delaunay)

Abstract

Bacteria of the genus *Clostridium* are remarkable for their ability to produce hydrogen from a wide range of substrates through dark fermentation. This type of fermentation has been extensively studied in the literature. However, a large number of culture conditions were applied, making it difficult to compare different strains in terms of hydrogen production performance. The potential of *Clostridium* is therefore not fully explored. This study compared the performances of four clostridial strains in terms of hydrogen production under batch conditions, in a stirred tank with a regulated pH, at atmospheric pressure. Glucose was used as the sole carbon substrate. *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 (= DSM 525) was the strain with the highest gas volume production of 866 (± 291) $mL_{gas}/(L_{bioreactor} \cdot h)$. This strain is able to exhibit a hydrogen to substrate yield of 1.73 (± 0.12) mol/mol and a hydrogen to carbon dioxide ratio of 1.03 (± 0.13) mol/mol, which are values comparable to those of other strains studied. By combining every parameter, it appears that ATCC 6013 is a certain strain of interest for high-volume H_2 production.

Nomenclature

μ: $specific\ growth\ rate\ \left(\frac{g_{formed\ biomass}}{g_{biomass} \cdot h}\right)$

μ_{max}: $maximum\ specific\ growth\ rate\ \left(\frac{g_{formed\ biomass}}{g_{biomass} \cdot h}\right)$

R_{H_2/CO_2}: $hydrogen\ to\ carbon\ dioxide\ molar\ ratio\ (mol/mol)$

$R_{Ac/Bu}$: $acetate\ to\ butyratemolar\ ratio\ (mol/mol)$

$Y_{\frac{H_2}{S}}$: $hydrogen\ to\ substrate\ yield\ (mol_{h2}/mol_{hexose})$

Introduction

It is widely admitted that hydrocarbon combustion is a major source of greenhouse gas emissions, contributing to climate change, and research efforts must be focused on alternative energy sources, with lower environmental impacts. From this point of view, gaseous hydrogen (H_2) seems to be a promising energy source due to its very high energy content (142 kJ/g) [1]. Nowadays, more than 100 methods of hydrogen production have been reported using chemical or biological processes [2]. However, the vast majority of the world's hydrogen supply relies on methods that use fossil resources, such as oil refining (16%), coal gasification (21%), or methane steam reforming (62%), resulting in high CO_2 emissions. Water electrolysis using renewable electricity is often seen as a potential sustainable way to produce molecular hydrogen. However, the availability of such electricity faces several discontinuities due to variations in meteorological conditions, and the yield of this conversion remains quite low [3], [4].

Therefore, new ways to produce hydrogen with lower greenhouse gas emissions are needed. Biological routes through fermentation processes are some of the solutions in the sense that they can be based on a wide range of biomass resources, which are often considered as by-products. Among the existing biohydrogen production processes, biophotolysis, photo-fermentation, and dark fermentation are deeply investigated, and a growing number of publications are reported [5], [6]. Light-dependent processes exhibit high theoretical hydrogen yields, but generally low productivities [2]. However, recent advances relying on the addition of photo-nanocatalysts to improve charge transferring during the fermentation resulted in higher hydrogen production [7], [8].

Dark fermentation is still the most common approach for biohydrogen production, since it is more efficient in terms of hydrogen production rate and does not require providing light energy, resulting in cheaper processes [6], [9]. Several microbial genera, such as *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus,* or *Thermoanaerobacterium* are known to produce significant amounts of hydrogen by anaerobic digestion of organic matter through pure cultures [10], [11]. Comparative analyses on fermentation capabilities were reported. In particular, *Clostridium* species such as *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum,* and *Clostridium beijerinckii* tend to show 3 to 7 times higher cumulative hydrogen productions, 3 to 10 times higher specific hydrogen production rates, and 2 to 31 times higher yields (mol_{H_2}/mol_{hexose}) than *Enterobacter* species [12], [13], [14]. The most interesting species for H_2 bioproduction in pure culture therefore, belong to the *Clostridium* genus.

Clostridia are Gram-positive, strictly anaerobic, and endospore-forming bacteria, whose genus comprises 163 validated species according to the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature from DSMZ [15]. Several *Clostridium* species were particularly investigated and numerous information, knowledges, and applications are available. They are capable of degrading organic matter such as hexoses, starch or cellulose through an acid-solvent fermentation, known as dark

fermentation. The final products are valuable chemicals, such as organic acids, alcohols, or solvents, along with H_2 and CO_2 as gaseous emissions [16], [17]. Whereas alcohol and solvent production was investigated during the early 20th century before the oil-based mass production [18], researchers are now focusing on the biogas fraction. Hydrogen production with *Clostridium* cultivations for further uses is particularly explored, emphasizing the importance of elucidating the mechanisms involved during the life cycle of these bacteria. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 remains a reference strain for this purpose, due to its capability to produce acetone and butanol in addition to other products (ethanol, acetate, and butyrate). However, all metabolisms of *Clostridium* species share similar characteristics, with specific branched pathways varying by species (Figure 23). Based on reaction stoichiometry, the maximum theoretical yield for hydrogen production from direct glucose consumption is 4 moles of H_2 per mole of glucose. This 4:1 ratio is often referred to as the "Thauer limit" and is associated with the theoretical production of acetate alone [19], [20]. Interestingly, co-cultures with different species can lead to yields higher than 4 mol_{H_2}/mol_{hexose}, which is higher than the theoretical threshold with a pure culture, since the metabolites from one species can be the substrate of the other [19], [20].

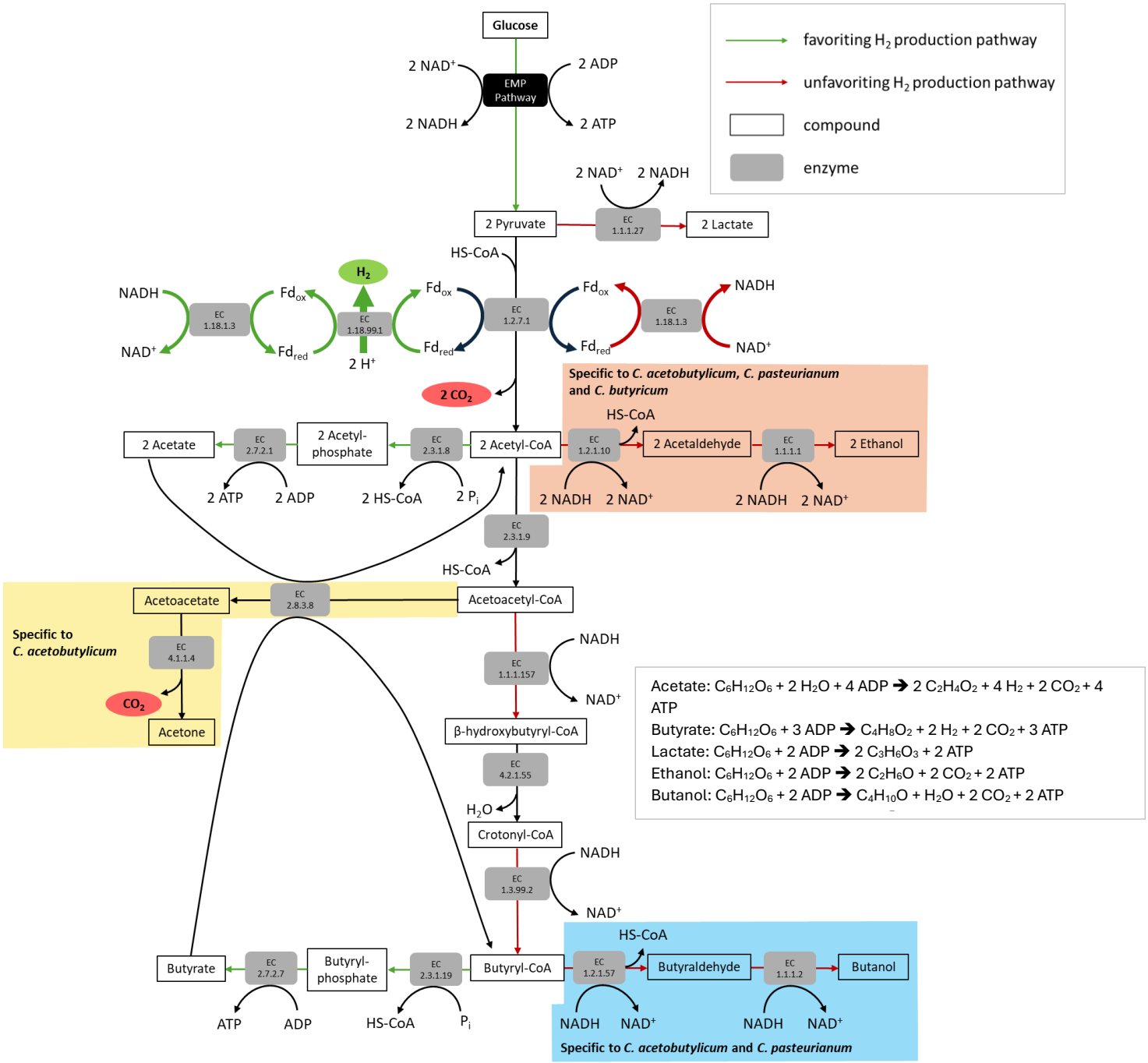


Figure 23. General metabolic pathways and their effects on hydrogen production in genus *Clostridium*. Involved enzymes: EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase; EC 1.2.7.1, pyruvate ferredoxin oxidoreductase; EC 1.18.99.1, hydrogenase; EC 1.18.1.3, NADH ferredoxin oxidoreductase; EC 2.3.1.8, phosphotransacetylase; EC 2.7.2.1, acetate kinase; EC 1.2.1.10, acetaldehyde dehydrogenase; EC 1.1.1.1, ethanol dehydrogenase; EC 2.3.1.9, acetoacetyl-CoA thiolase; EC 2.8.3.8, acetoacetyl-CoA:acyl-CoA transferase; EC 4.1.1.4, acetoacetate decarboxylase; EC 1.1.1.157, beta-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; EC 4.2.1.55, crotonase; EC 1.3.99.2, butyryl-CoA dehydrogenase; EC 2.3.1.19, phosphotransbutyrylase; EC 2.7.2.7, butyrate kinase; EC 1.2.1.57, butyraldehyde dehydrogenase; EC 1.1.1.2, butanol dehydrogenase

However, considering data on hydrogen production by *Clostridia* species only, significant differences in yields ($Y_{H_2/S}$) are reported in the literature, even with the same species, with values varying from 1 to 30 times higher [14]. This could be due to strong differences in culture conditions used [21]. Most of clostridial cultures (77%) were carried out in batch mode, which remains the most commonly used culture method for obtaining data quickly. The remaining studies were performed in continuous cultures. Moreover, among batch cultures, 51 % were performed in a closed container [21]. However, this condition is critical for hydrogen production, since hydrogenase activities can be inhibited even at low hydrogen partial pressures, which is typically the case when working in a closed vessel [22], [23]. This wide variation in culture conditions makes the results and bacterial performances difficult to compare.

This present study focuses on the relevant parameters influencing biohydrogen production by *Clostridium* species and proposes to evaluate the production performances of known hydrogen-producing strains. For that purpose, four *Clostridium* species were studied and compared in a standardized manner based on their capabilities to support high hydrogen productivity. Such productivity is usually associated with acid production, mostly acetate and butyrate. Fermentation studies were all performed in controlled bioreactors with gas outlets and at a regulated pH in order to maintain acidogenesis. Comparative analyses were based on objective parameters. The most important one was the maximum volume productivity of gases produced associated with the H_2/CO_2 ratio (R_{H_2/CO_2}), allowing the estimation of the hydrogen outflow. Other parameters, such as the maximum specific growth rate (μ_{max}), the hydrogen to substrate yield ($Y_{H_2/S}$), and the acetate to butyrate ratio ($R_{Ac/Bu}$) were also investigated in order to establish a rational comparison of biohydrogen production using bacteria from the *Clostridium* genus.

Materials and methods

Bacterial strains and pre-cultures

The bacterial strains used were *C. acetobutylicum* ATCC 824 (= DSM 792), *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 (= DSM 525), *C. butyricum* DSM 5431, and *Clostridium tyrobutyricum* CNRZ 510. Spores were stored at 6°C in collection tubes filled with Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) containing the following ingredients in 1 L of distilled water: peptone, 10 g; beef extract, 10 g; yeast extract, 3 g; dextrose, 5 g; NaCl, 5 g; soluble starch, 1 g; cysteine-HCl, 0.5 g; sodium acetate, 3 g; agar, 0.5 g; pH adjusted to 6.8.

To induce spore germination, 1 mL of the spore suspension was transferred to 9 mL of fresh RCM, previously autoclaved in Hungate tubes at 121°C for 15 minutes. They were immersed in hot water at 80°C for 15 minutes and then placed on ice for 10 minutes. The tubes were

then stored at 37°C for 24 h. The content of each Hungate tube was then poured into test tubes containing 30 mL of culture medium whose composition is, for 1 L of distilled water: D-glucose, 20 g; yeast extract, 1 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 g; $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$, 1 g; $CaCl_2$, 0.15 g; KH_2PO_4, 0.5 g; K_2HPO_4, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot\ H_2O$, 10 mg; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg; biotin, 40 µg; $CaCO_3$, 3g. Each tube was capped with carded cotton. $CaCO_3$ reacts with organic acids to produce CO_2 to ensure anaerobiosis within the test tubes. Those tubes were stored at 37°C for 12 h.

Batch fermentation experiments

Bacterial cultures were performed in a 2 L bioreactor (GPC, France). 1.2 L of culture medium, containing the following elements for 1 L of distilled water, was prepared inside the tank: D-glucose, 20 g; yeast extract, 1 g; cysteine-HCl, 1 g; NH_4Cl, 1.5 g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.2 g; KCl, 0.65 g; KH_2PO_4, 0.5 g; K_2HPO_4, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 mg; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg; 4-aminobenzoic acid, 8 mg; biotin, 40 µg.

Both the bioreactor and the medium were autoclaved at 115°C for 15 minutes. Temperature and time were voluntarily lower than the usual procedure to avoid Maillard reaction. Before running the culture, the autoclaved medium was sparged with pure N_2 to ensure anaerobic conditions. Inoculation was carried out with 400 mL of the precultures in the test tubes, containing bacteria in exponential growth state, for a final working volume of 1.6 L. The temperature was maintained at 37°C. The pH was regulated at 6.0 using 1 M NaOH to ensure acidogenesis. Agitation was provided by a four-bladed Rushton turbine at 150 rpm. These parameters were monitored by the C-BIO 1 software (GPC, France). The fermentation lasted until bacterial growth and gas production ceased and/or substrate complete depletion. The experiments were performed five times for each clostridial strain.

Analytical devices and methods

Every hour, a few milliliters of the culture medium were collected. The optical density of the sample was then measured at 600 nm (OD_{600}). The biomass concentration, X, was related to OD_{600} by the formula: $X\ (g/L) = OD_{600} \times 0.34$. The sample was then centrifug~~at~~ed at 9600 G for 3 minutes to collect the supernatant. The samples were analyzed by HPLC using an Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) column (BioRad, USA) to separate glucose, acetate, butyrate, lactate, acetone, ethanol, and butanol. HPLC analyses were performed at 80°C with 0.05 M H_2SO_4 as mobile phase at a flow of 0.7 mL/min. Compounds were revealed by a refractive index detector and a photodiode array detector.

The volume of total biogas was evaluated with a gas counter “Ritter MilliGascounter®” (Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, Germany). The total volume is measured hourly to determine the total biogas productivity.

For each strain, one experiment was performed with a gas chromatograph “Micro GC Fusion®” (Chemlys, France), added after the gas counter. It was equipped with two modules to measure

quantitatively the composition of the whole biogas. The first module was composed of a column "Rt-Molsieve 5A, 0.25 mm-10m" heated at 80°C for 90 seconds and a Thermal Conductivity Detector set at 70°C to detect O_2, N_2, and H_2 using argon as carrier gas. The second module was composed of a column "Rt-U-Bond, 0.25mm-12m" set at 80°C for 25°C. Then, the temperature was increased to 130°C in 25 seconds and was held at this value for 40 seconds (total analysis time = 90 seconds). A TCD set at 60°C was used to measure CO_2.

Calculations and graphical methods

To determine the maximum specific growth rate μ_{max} (h^{-1}), the biomass concentration X (g/L) evolution was considered. The focus is on the exponential growth phase, where X follows the equation:

$X = X_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}$ where X_0 (g/L) is the initial biomass concentration right after inoculation and t is the time (h).

Concentrations of H_2 and CO_2 were estimated by HPLC analysis of metabolite concentrations, knowing that the formation of:

- 1 acetate is accompanied by 2 H_2 and 1 CO_2.
- 1 butyrate is accompanied by 2 H_2 and 2 CO_2.
- lactate is not accompanied by any gas production.
- 1 ethanol is accompanied by 1 CO_2.
- 1 butanol is accompanied by 2 CO_2.

Thus, the R_{H_2/CO_2} molar ratio was calculated. Since only acetate and butyrate productions influenced H_2 generation during acidogenesis, the $R_{Ac/Bu}$ molar ratio was determined over the entire duration of the cultures. Similarly, the hydrogen to glucose molar ratio, $Y_{H_2/S}$ was also calculated.

The comparative analysis was made by statistically comparing the mean values obtained for the key parameters of each strain. These comparisons were calculated using the software "R". The statistical procedure consisted first in realizing a two-sided Fisher-test of equality of variances. If $p_{value} \leq \alpha$ (level of significance) set to 0.05, the variances were considered as significantly different. Otherwise, if $p_{value} \geq \alpha$, the variances cannot be considered significantly different. When the variances were equivalent, the means were compared using a unilateral right-tailed Student's t-test. When the variances were not equivalent, the means were compared using a unilateral right-tailed Welch's t-test.

Results

Kinetics of anaerobic fermentation with *C. acetobutylicum* ATCC 824 (= DSM 792), *C. pasteurianum* ATCC 6013 (= DSM 525), *C. butyricum* DSM 5431, and *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 were performed in a controlled bioreactor and in discontinuous mode. Each culture was repeated 5 times. Representative kinetics are reported in figures 24 to 27.

Kinetics of glucose consumption and biomass synthesis

In all experiments, glucose was exhausted by the bacteria, except with *C. tyrobutyricum*. Two types of growth were observed. *C. acetobutylicum* ATCC 824 and *C. butyricum* DSM 5431 tend to have a relatively short and fast growth phase, not exceeding a few hours. Then, an increase in biomass concentration appeared to be much slower. The final biomass concentrations were 0.8 ± 0.1 and 1.24 ± 0.19 g/L, respectively (Table 6, figures 24 & 26). On the contrary, *C. pasteurianum* ATCC 6013 and *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 reached both higher biomass concentrations, from 3.70 g/L to 6.50 g/L and from 2.36 to 6.47 g/L for *C. pasteurianum* and *C. tyrobutyricum,* respectively (Table 6, Figures 25 & 25). *C. pasteurianum* ATCC 6013 was capable of maintaining a growth phase for 8 to 12 hours until glucose depletion (Figure 25). An additional experiment was carried out (data not shown) with an initial glucose concentration of 50 g/L. In this condition, growth slowdown was still observed after 12 hours of culture, whereas the glucose was not depleted.

Regarding the maximum specific growth rate, μ_{max}, no significant difference ($\alpha = 0.05$) was determined between *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, and *C. butyricum* (Table 6). On the contrary, these 3 strains showed a significantly higher μ_{max} than *C. tyrobutyricum*, with 137% higher for *C. acetobutylicum*, 175% higher for *C. pasteurianum*, and 94% higher for *C. butyricum*.

Kinetics of product formations

Due to the maintenance of the acidogenesis phase by pH regulation, no acetone production was detected in experiments involving *C. acetobutylicum* (Figure 24). As expected, no acetone production was measured with the 3 other-*Clostridium* strains studied (Figures 25 to 27).

Lactate, acetate, butyrate, and ethanol productions were measured during all the cultures. *Clostridium butyricum* DSM 5431 was the only strain that was not able to produce butanol in the culture conditions studied (Figure 26). Butyrate and acetate were the main organic acid produced, except with *C. acetobutylicum* for which lactate was a major product (Figure 24). It is also interesting to report that for *C. acetobutylicum* and *C. pasteurianum*, both ethanol and butanol were produced in important proportions (more than 10 % of the final metabolite concentrations), even with pH regulation, which is not supposed to happen during the acidogenic phase.

In this study, the only strain that produced more acetate than butyrate was *C. pasteurianum* ATCC 6013, with ratio $R_{Ac/Bu}$ of 1.07 ± 0.27 mol/mol (Table 6). This value was about three times higher than those obtained with *C. acetobutylicum* and four times higher than the ratio measured with *C. butyricum* in this study (Table 6). While this organic acid was also widely produced by *C. acetobutylicum* and *C. butyricum* (Figures 24 and 26), *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 produced very little acetate (Figure 27). A decrease in the acetate concentration was measured at the beginning of the culture with this strain, following the culture inoculation, and at the end of the culture (Figure 27). This is why the ratio $R_{Ac/Bu}$ cannot be determined in this condition. In an additional experiment in which the medium was supplemented with 5 g/L of acetate immediately after the inoculation of the bioreactor, 57% of the acetate was co-consumed by the bacteria with glucose. At the same time, butyrate production increased sharply (data not shown). Considering that 1 mole of glucose can be converted into 1 mole of butyrate, and that in this experiment, more butyrate was formed than glucose was consumed, it can be assumed that acetate was used as a co-substrate by this strain for butyrate synthesis.

Kinetics of gas production

Despite a low biomass formation, *C. acetobutylicum* ATCC 824 was able to produce a significant volume of gas, making this strain the best in terms of specific biogas production rate, with maximum values over 1800 $mL_{H_2}/g_{cells}/h$. However, the R_{H_2/CO_2} of 0.86 (± 0.27) mol/mol with *C. acetobutylicum* seems to be lower than with other strains (Table 6). Considering the volume productivity, *C. pasteurianum* ATCC 6013 displayed better capabilities with a gas production rate twice that *C. acetobutylicum*, and four times higher than *C. butyricum* and *C. tyrobutyricum*. In the present work, a $Y_{H_2/S}$ of 1.25 mol/mol was obtained with *C. acetobutylicum*, which was also 23% to 30% lower compared to the three other strains (Table 6). This may be due to a significant lactate synthesis (Figure 28). On the other hand, the *Clostridium* strain showing both the highest R_{H_2/CO_2} and $Y_{H_2/S}$ in this study was *C. butyricum* DSM 5431, with 1.10 (± 0.03) mol/mol and 1.79 (± 0.09) mol/mol, respectively. The lactate production was the highest in our experimental conditions (Figure 28), with a low gas volume productivity.

It should be noticed that the estimated H_2 fraction in the total gas produced ranged between 47% and 53% for the four *Clostridia* species, i.e. $R_{H_2/CO_2} \approx 1$, despite certain differences in terms of acetate, butyrate, and solvents proportions (Figure 28).

Table 6. Kinetic key parameters values and their associated standard deviation for each strain. Each batch culture were performed five times for a same strain (n=5) $R_{Ac/Bu}$ and $R_{H2/CO2}$ were calculated by considering the period of growth (μ >0). This time is between 9 and 20 hours for *C. acetobutylicum*, 9 and 15 hours for *C. pasteurianum*, 20 and 29 hours for *C. butyricum*, 22 and 31 hours for *C. tyrobutyricum*. For the same parameter, two different symbols mean that the difference between each value is significant for α = 0.05. No $R_{Ac/Bu}$ have been calculated because acetate concentration was lower at the end of the culture than at the beginning.

	Formed biomass (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	Out_{biogas} ($mL_{gas}/L_{bioreactor}/h$)	$R_{Ac/Bu}$ (mol/mol)	Estimated $R_{H2/CO2}$	$Y_{H_2/S}$ (mol/mol)
***C. acetobutylicum* ATCC 824**	0.80 (± 0.10) *	0.30 (± 0.12) *	418 (± 76) *	0.33 (± 0.09) *	0.88 (± 0.27) *	1.25 (± 0.13) *
***C. pasteurianum* ATCC 6013**	4.97 (± 1.06) ●	0.35 (± 0.12) *	866 (± 291) ◊	1.04 (± 0.21) ●	1.03 (± 0.13) * ●	1.73 (± 0.12) ● ◊
***C. butyricum* DSM 5431**	1.24 (± 0.19) ◊	0.25 (± 0.07) *	281 (± 93) ●	0.33 (± 0.08) *	1.12 (± 0.04) ●	1.79 (± 0.09) ● ◊
***C. tyrobutyricum* CNRZ 510**	4.09 (± 1.65) ●	0.13 (± 0.05) ●	207 (± 108) ●	ND	1.03 (± 0.06) *	1.62 (± 0.16) ●

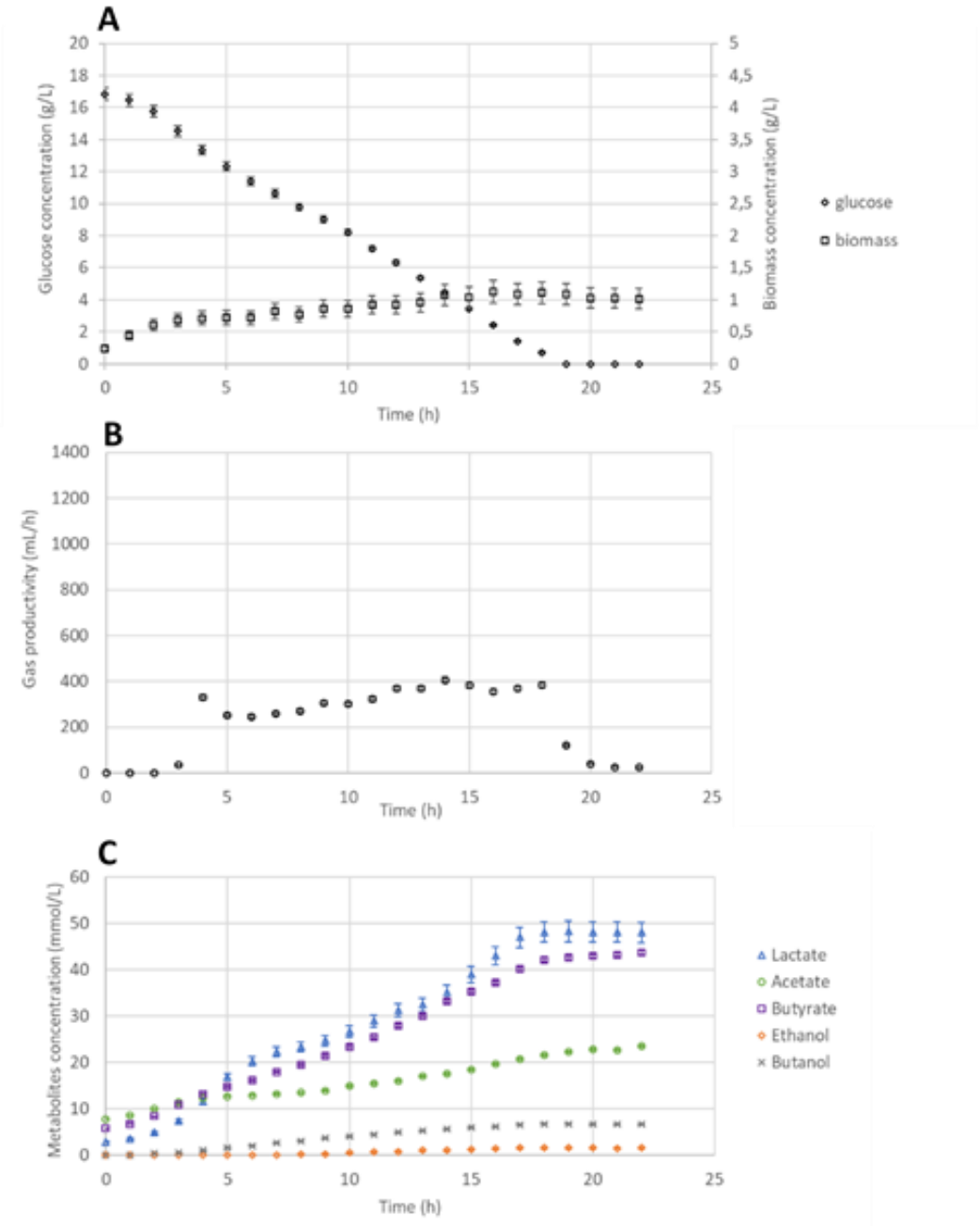


Figure 24. Kinetic parameters representation for a typical *C. acetobutylicum* ATCC 824 cultivation.

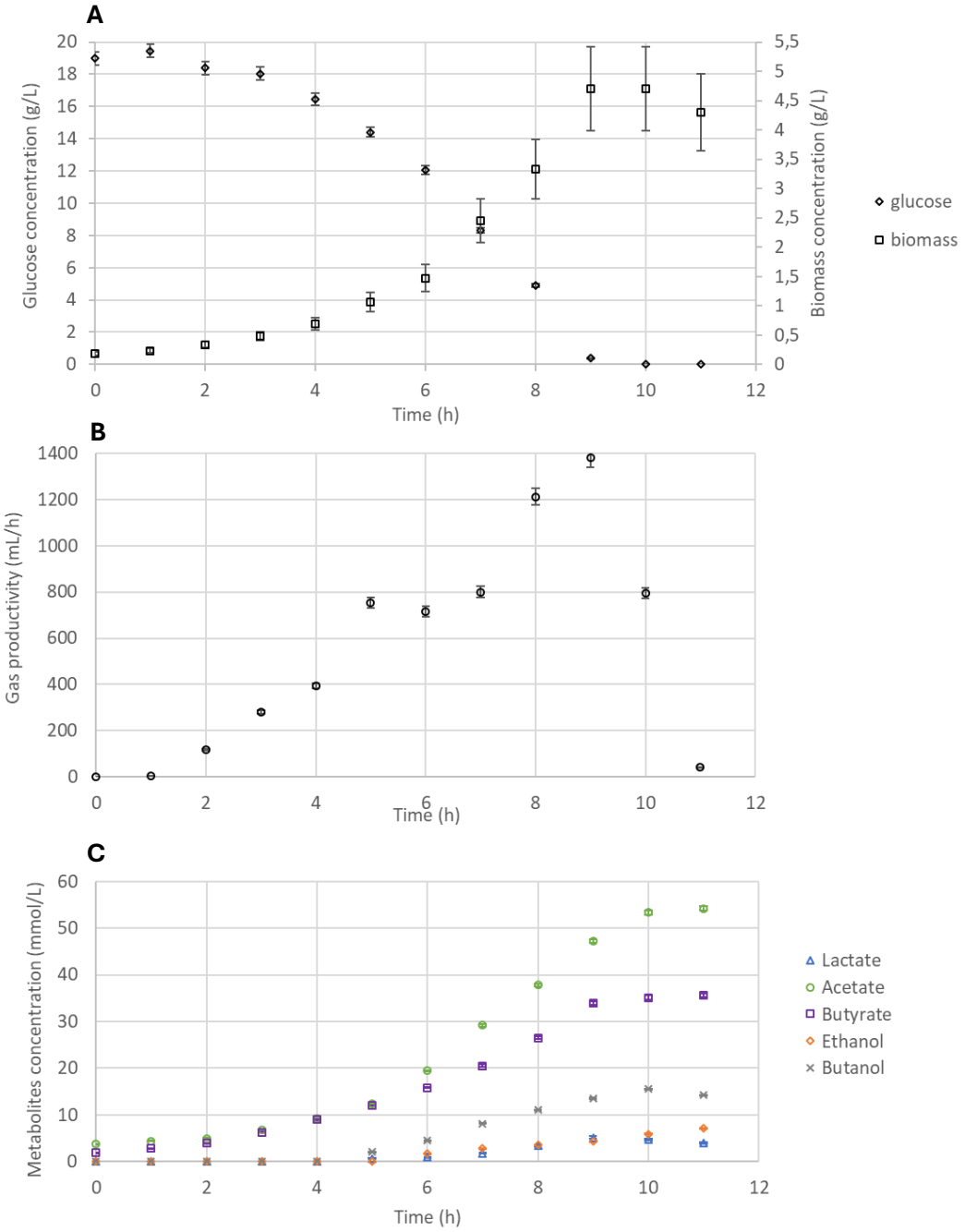


Figure 25. Kinetic parameters representation for a typical *C. pasteurianum* ATCC 6013 cultivation.

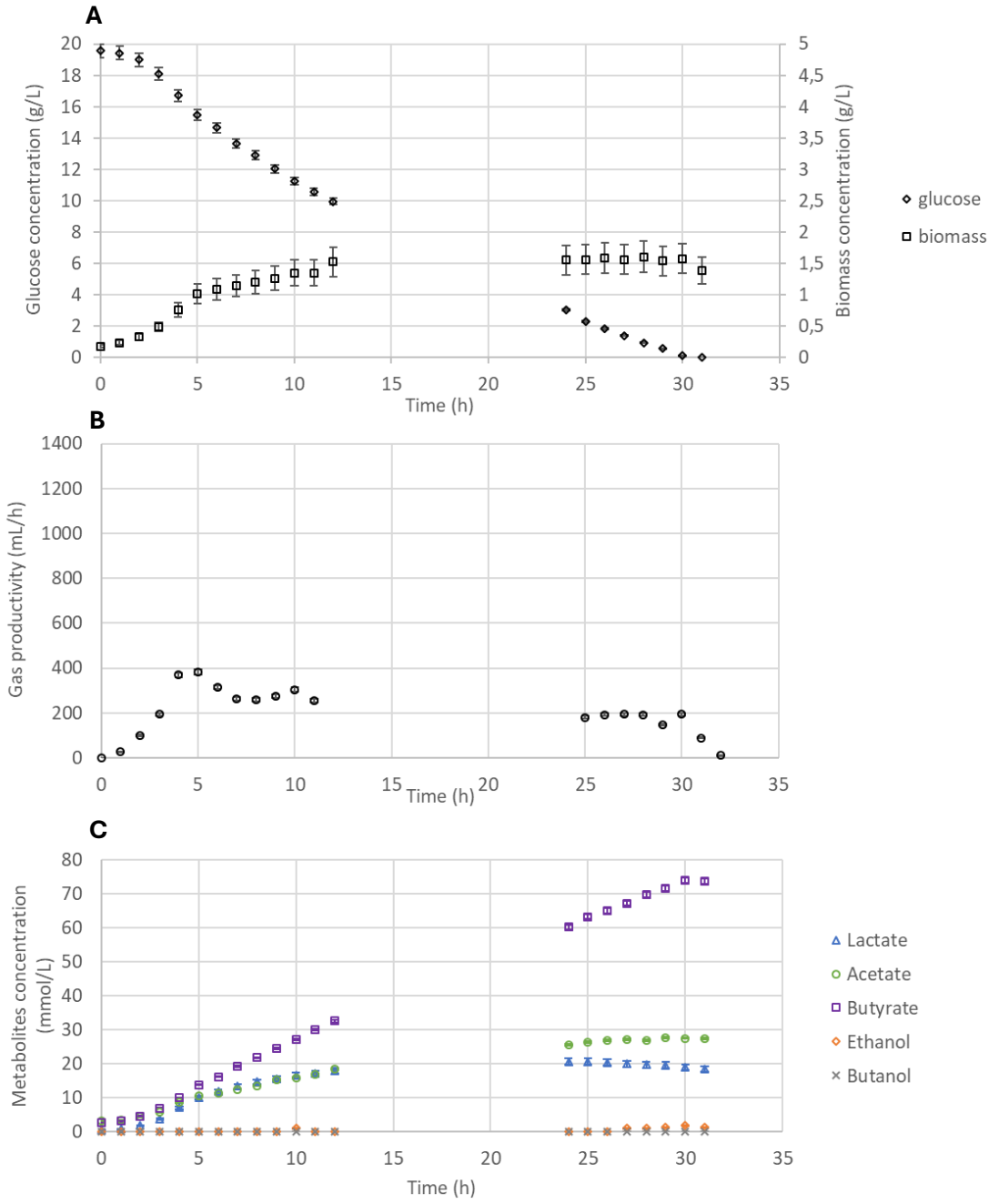


Figure 26. Kinetic parameters representation for a typical *C. butyricum* DSM 5431 cultivation.

III. Comparaison de la production de H2 en mode discontinu chez plusieurs espèces du genre Clostridium

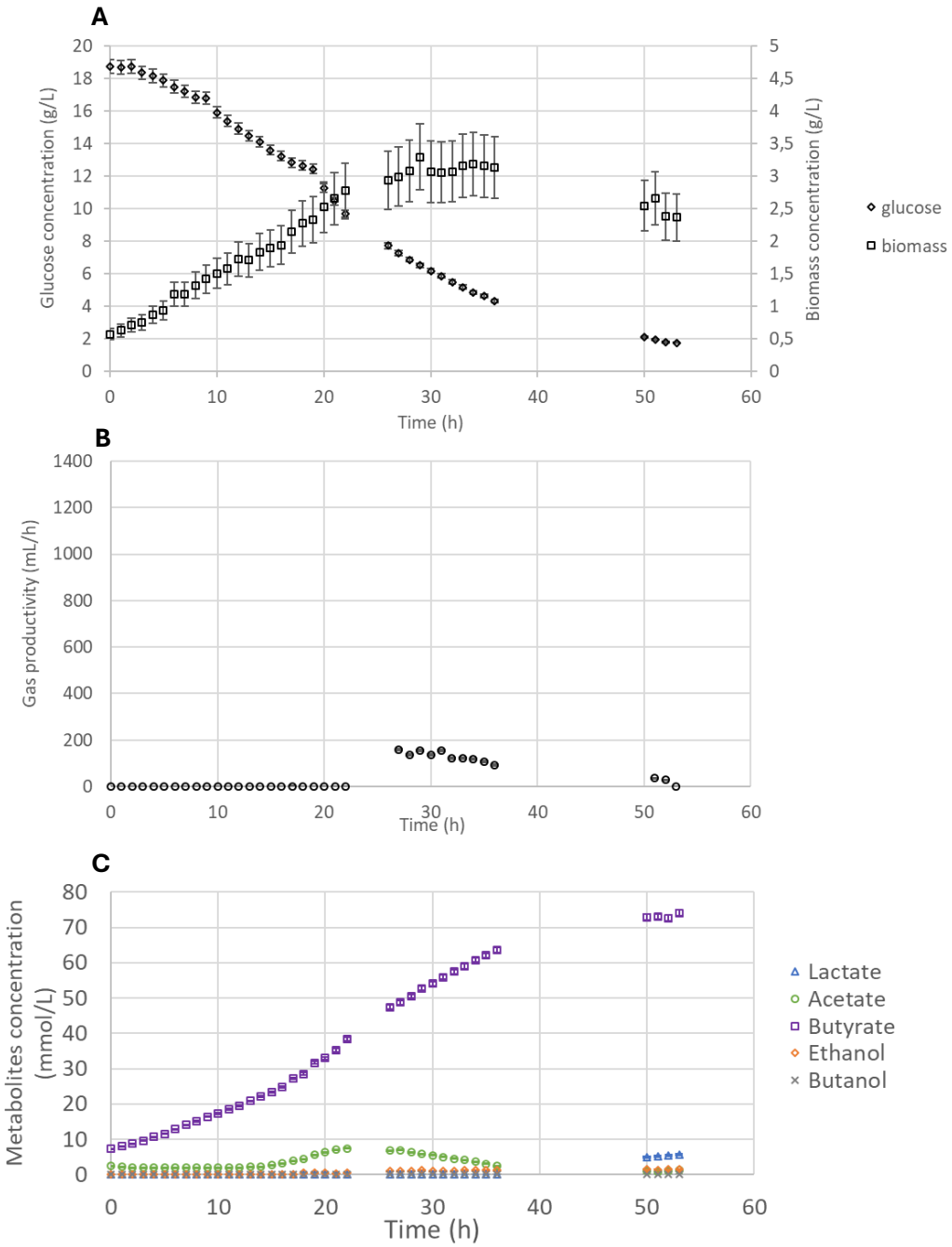


Figure 27. Kinetic parameters representation for a typical *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 cultivation.

Discussion

Numerous studies concerning the biohydrogen production with *Clostridium* species have been reported in the literature [1], [14], [21], [24], [25]. However, as many different culture conditions have been used, their comparison remains difficult.

Clostridium growth and biomass production

The growth kinetics obtained in our study are commonly reported with these bacterial strains cultivated in similar conditions [26], [27], [28]. However, Buendia-Kandia *et al.* were able to achieve a maximum cell biomass above 2 g/L with *C. acetobutylicum* ATCC 824 using the same initial glucose concentration of 20 g/L, a temperature of 37°C, and a pH of 5.5, which is more than two times higher than our results. This lower biomass concentration was not the result of glucose depletion, as the beginning of the stationary phase happened when the remaining glucose concentration was between 5 g/L and 8 g/L, and lasted until complete glucose depletion. This may suggest that a growth threshold was quickly reached, and that the remaining substrate was used for energy, metabolites and gas production. The remaining substrate was mainly converted into alcohol, which is not favorable for hydrogen production, in agreement with elements already reported with the same strain [29]. An important parameter known to affect bacterial growth and therefore glucose uptake, is the partial pressure of hydrogen, as its accumulation could inhibit some hydrogenase activities [11]. In a previous study during which cultivations were performed in a closed vessel with the same glucose initial concentration of 20 g/L, it was found that *C. pasteurianum* ATCC 6013 consumed only 20.9% of the available glucose [12]. It showed the importance of evacuating the gas and working under atmospheric pressure. The growth of *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 lasted for 10 to 20 hours and took more than 40 hours to consume all the carbon substrate. Since this strain was isolated from dairy products [30], it may be possible that glucose is not the best carbon and energy substrate. No culture process in a bioreactor has been reported to date. On the other hand, another commonly used strain, *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, has been studied in batch culture and can consume a significant amount of glucose i.e. 30 g/L in 30 hours. However, the final biomass concentration reached between 1.0 and 1.7 g/L at the end of the culture, which is 2.35-fold lower than the final concentration obtained with *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 in the present study [29], [30]. In fact, *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 appears to have growth and glucose uptake kinetics closer to *C. acetobutylicum* ATCC 824 or *C. butyricum* DSM 5431. Depending on the purpose of the culture process, its high biomass concentration may be useful because it is the catalyst for biochemical reactions, including the production of hydrogen. Consequently, the instantaneous volume production at a given time will be greater with a higher cell biomass. However, this also means that a larger fraction of the substrate will be used only for biomass production and not for metabolites and gases, resulting in lower specific production and lower yields.

Concerning the maximum specific growth rate, μ_{max}, comparable results can be found in other studies, although this is not always an evaluated parameter. Guerrero *et al.* found a μ_{max} of 0.25 h^{-1} with *C. acetobutylicum* ATCC 824 cultivated in a batch bioreactor. This lower value certainly relies on the difference in pH, which was set at 5.5 in their experiments, which is closer to solventogenic conditions. This was evidenced by the high butanol concentration at the end of their culture (approximately 8 g/L) [31]. Similar results were obtained by Buendia-Kandia *et al.* with a μ_{max} value of 0.26 h^{-1} when this strain was cultivated in a bioreactor at pH = 5.5 [26].

For *C. pasteurianum* ATCC 6013, the vast majority of the reported kinetic studies in bioreactors used glycerol as the substrate, because it is a more reduced substrate than glucose, resulting in the production of valuable alcohols, mainly butanol and 1,3-propanediol. Nevertheless, when glucose was used as the sole carbon source, the μ_{max} value was estimated to 0.41 h^{-1} at pH = 6.5 [32], whereas it was reported to be 0.37 h^{-1} when cells were grown on glycerol at pH = 6.0 [33]. Both results are similar to the value of 0.35 h^{-1} in the present study, suggesting that the nature of the carbon substrate has no significant effect on *C. pasteurianum* ATCC 6013 growth.

With *C. butyricum* DSM 5431, kinetic fermentation studies were essentially focused on alcohol production when grown on glycerol as a carbon source. However, growth inhibition of *C. butyricum* by high concentrations of glycerol was reported [34], especially with crude glycerol, containing impurities such as methanol or free fatty acids. However, even with pure glycerol at a concentration of 20 g/L, Rehman *et al.* measured a relatively low μ_{max} value of 0.158 h^{-1}, compared to an average value almost twice as high measured in this study, indicating that glucose is a more suitable substrate for *C. butyricum* DSM 5431 growth performance [35].

Several cultures were carried out with *C. tyrobutyricum* CNRZ 500 (a strain close to CNRZ 510) on RCM medium with the addition of lactate, NaCl, and/or glycerol. μ_{max} values were estimated between 0.017 and 0.040 h^{-1}. However, small cups of 400 µL were used for fermentation cultures, which corresponded to culture conditions really different from those in a stirred bioreactor. The resulting in μ_{max} values were 3 to 7.5 times lower than the specific growth rate measured with the strain CNRZ 510, as performed in this study [36]. For the reference strain *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, Yu *et al.* reported μ_{max} = 0.208 ± 0.003 h^{-1}, making it a high-performance strain in terms of growth [37].

Metabolites production

The $R_{Ac/Bu}$ values found in previous works may vary considerably. As in our study, A 1:1 molar ratio was found by Masset *et al.* [38] with *C. pasteurianum* ATCC 6013, whereas a lower ratio of 3:4 was reported by Choi *et al*. [32]. Surprisingly, a $R_{Ac/Bu}$ ration reaching 3.63 mol/mol was reported by Hu *et al.* [12]. This last result may be attributed to the lack of pH regulation and the absence of a gas outlet from the culture vessel. These culture conditions resulted in short growth and production periods, allowing

acetate, which is the first produced metabolite in the early stage of clostridial growth, to remain dominant throughout the culture. As already reported, the acetate pathway is prioritized by *Clostridia*, since it enables the production of more ATP, before redirecting the carbon flow toward ~~to~~ the butyrate and lactate pathways to maintain the electronic and thermodynamic balance [20], [39].

A significant difference was observed between the value of $R_{Ac/Bu}$ in the present study with *C. acetobutylicum* ATCC 824 (0.86 ± 0.20 mol/mol) and the one reported by Guerrero *et al.* (2.99 mol/mol) [31]. One can assume that it is due to the relatively acidic conditions, pH = 5.5, applied in this work, which increased the butyrate toxicity. However, the majority of the publications reported higher butyrate concentrations than acetate. Huang *et al.* measured more butyrate than acetate with this strain under culture conditions with a pH ranging from 4.5 to 6.5 [40]. In addition, for Guerrero *et al*. [31], the main organic acid produced remained lactate, which is also observed in this study. This pathway is associated with the absence of gas production, resulting in a decrease in $Y_{H_2/S}$.

The same trends occurred with *C. butyricum* DSM 5431, with a low $R_{Ac/Bu}$ of 0.26 ± 0.06 mol/mol measured, whereas it was reported to be found 3 times higher under similar culture conditions [27].

Gas production by *Clostridium* species as a consequence of carbon and electron flows

R_{H_2/CO_2} values varied a lot. For instance, with *C. acetobutylicum* ATCC 824, reported values were found between 0.4 to 3.3 [12], [17], [31], [38], [41], [42], [43]. The values found for ~~the~~ all the strains studied in this work fall within this range. For each species, lactate formation occurred mainly when acetate and butyrate were produced at a constant rate (resulting in a straight line for the metabolites accumulation graphs), showing that the lactate pathway is used as a load-shedding pathway for the cells when other pathways are overwhelmed [31] [44].

Compared to the other species, the $Y_{H_2/S}$ value (1.25 mol/mol) observed with *C. acetobutylicum* ATCC 824 in this study may be due to the important lactate production (Table 6, Figure 24). Lactate production might vary a lot, depending on the strain considered, the culture conditions, and the nature of the substrate. This could explain the wide range of $Y_{H_2/S}$ values found in the literature, varying, for *Clostridium* species cultivated in batch mode and with glucose as the substrate, from 0.23 to 3.55 mol/mol [14]. Surprisingly, *C. butyricum* DSM 5431 showed both the highest lactate production and $Y_{H_2/S}$ values. This performance could be explained by the highest R_{H_2/CO_2} values for this strain. In fact, *C. butyricum* DSM 5431 and also *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 displayed low productivities of gas, ~~that~~ which cannot be explained only by lactate production. Very few H_2 was produced at the scale of the bioreactor, probably due to the low $R_{Ac/Bu}$ values obtained, in association with low apparent rates of glucose consumption (Figures 28 and 29). Indeed, these strains produced mainly butyrate and some acetate but barely any alcohol, which can still explain why $R_{H_2/CO_2} > 1$ mol/mol and $Y_{H_2/S} > 1.6$ mol/mol.

For *C. pasteurianum* ATCC 6013, values of $Y_{H_2/S}$ reported are in the same range, compared to those obtained in our study [12] [13] [32] [38] [45]. Contrary to other *Clostridium* species, *C. pasteurianum* ATCC 6013 depicted the highest gas productivity in the fermentation process, because of a high apparent rate of glucose consumption as reported in the present work (Figures 25 and 27). With similar values of R_{H_2/CO_2} and $Y_{H_2/S}$ to that of *C. butyricum* DSM 5431 and *C. tyrobutyricum CNRZ 510*, *C. pasteurianum* ATCC 6013 can be seen as the best H_2 producer in this study. It is also interesting to note that *C. pasteurianum* was the only strain capable of combining a fast growth rate and a long acidogenesis period, both of which are favorable factors for high production rates of gases.

Considering that the maximum R_{H_2/CO_2} achievable is 2 mol/mol when acetate is the only produced metabolite, the range of H_2 proportions obtained in the present study remained satisfying [13], [41], [43]. Though, according to the difference of solubility between H_2 and CO_2, respectively of 1.5 x 10^{-3} g/L and 1.4 g/L at atmospheric pressure and at 25°C, there is a possibility that a significant part of CO_2 remained dissolved in the liquid phase since no stripping gas, i.e. N_2, was sparged during the run of bioreactors. The reactor geometry can also contribute to the enrichment of the biogas in H_2. A longitudinal shape (diameter/length ratio of 1:10), which allowed H_2, to flow out of the bioreactor, whereas CO_2 was not efficiently striped and accumulated in the liquid phase, resulting in a gas ratio richer in H_2 than in CO_2 in the head space [41]. In this study and according to our experimental conditions, two different metabolic patterns could be distinguished. Some species produced more butyrate, which is an electronically balanced pathway, contrary to that of acetate ($R_{Ac/Bu} < 1$, with *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. tyrobutyricum* CNRZ 510). With the two other species, i.e. *C. butyricum* DSM 5431 and *C. pasteurianum* ATCC 6013, the acetate production was more significant with $R_{Ac/Bu} \approx 1$, meaning that the whole metabolism has to be electronically equilibrated either by the formation of additional H_2, alcohol, or the production of lactate. Therefore, despite its common use in the scientific literature [13], [41], [46], the $R_{Ac/Bu}$ ratio is not always a relevant indicator for predicting biohydrogen production rates, and is not necessarily correlated with the R_{H_2/CO_2} ratio. Based on all data, it appeared that the gas productivity remained one of the key parameters of a process dedicated to H_2 production.

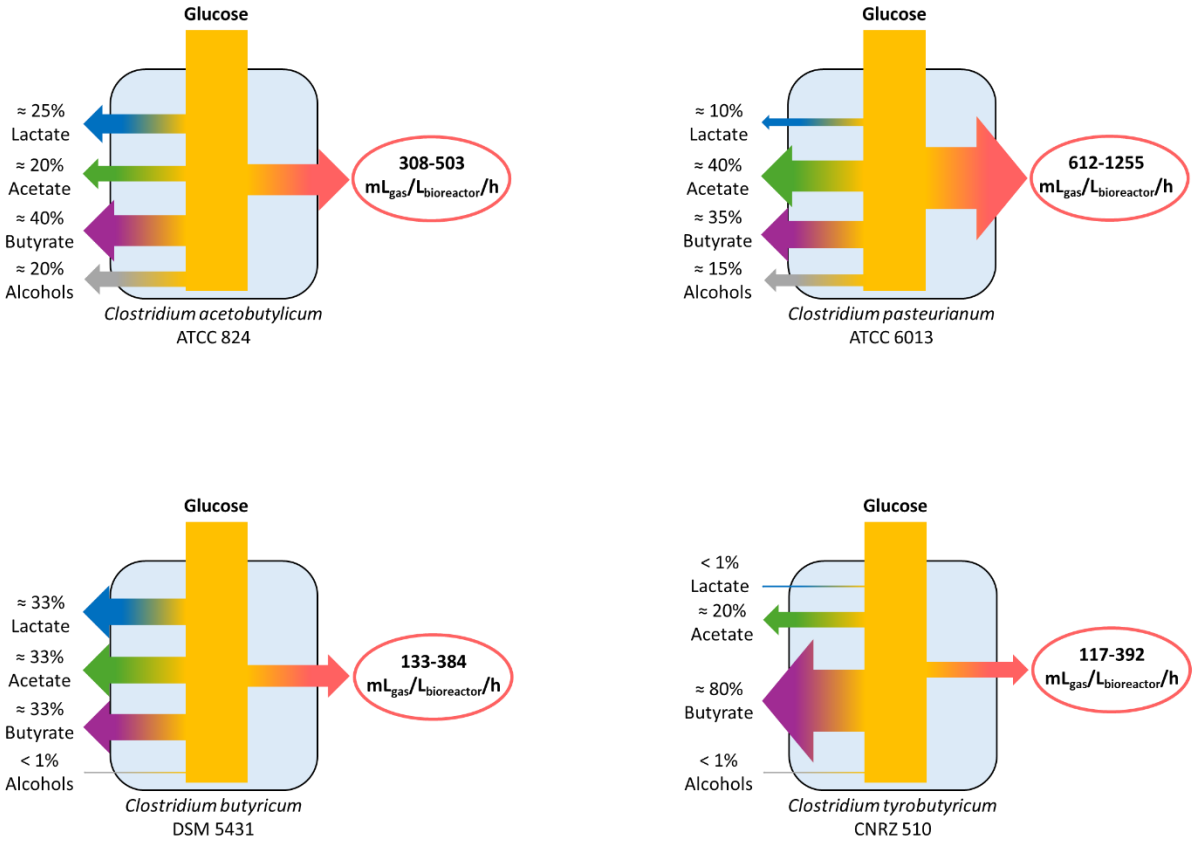


Figure 28. Distribution of metabolites production and the associated gas productivities when the maximum gas production was reported, depending on the *Clostridium* strain used in our experiments.

Conclusions

Among the four clostridial strains tested in identical discontinuous cultures, *C. pasteurianum* ATCC 6013 stood out regarding the volume production rate of hydrogen, due to a much more intense acetate production. It also had the greatest cell concentration, which is particularly interesting for high hydrogen production. However, the higher $R_{Ac/Bu}$ ratio does not always result in higher hydrogen production with the other species. When comparing in a standardized manner at the scale of the whole bioreactor, this strain depicts greater hydrogen production performances than *C. acetobutylicum* ATCC 824. These results thus question the higher interest of this strain as reported in the literature, which is only relevant when considering the specific hydrogen production. To achieve high volume production rates in the perspective of a scale-up for an industrial process, *C. pasteurianum* ATCC 6013 seems to be one among the best strains for that purpose. In addition, this strain showed favorable characteristics to intensify the H_2 production through continuous culture with the greatest specific growth rate in association with a long acidogenesis producing ATP. This type of culture could increase the hydrogen yield by maintaining

the demand for ATP for biomass synthesis and consequently by maintaining the acetate and then the H_2 production. Additional experiments research could be done with this strain to further enhance the biohydrogen production in dark fermentation processes. The potential of genome editing to inactivate the competitive pathways to that of hydrogen production could be explored.

Aknowledgements

The authors thank the French Ministry of Research for funding Ludovic Vauthier and Emma Boulanger for help in data acquisition and analyses.

References

[1] J. X. W. Hay, T. Y. Wu, J. C. Juan, and J. Md. Jahim, "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*, vol. 7, no. 3, pp. 334–352, 2013, doi: 10.1002/bbb.1403.

[2] A. K. Worku, D. W. Ayele, D. B. Deepak, A. Y. Gebreyohannes, S. D. Agegnehu, and M. L. Kolhe, "Recent Advances and Challenges of Hydrogen Production Technologies via Renewable Energy Sources," *Advanced Energy and Sustainability Research*, vol. 5, no. 5, p. 2300273, 2024, doi: 10.1002/aesr.202300273.

[3] M. Droessler and A. Leach, "Green with Envy? Hydrogen production in a carbon-constrained world," *Energy Policy*, vol. 186, p. 113982, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.enpol.2024.113982.

[4] U. Remme, "Global Hydrogen Review 2024," 2024.

[5] S. Fatima, A. Kumar, and R. K. Singh, "Biohydrogen Production: A Potential Energy Resource," no. 2395, Art. no. 2395, 2018.

[6] G. M. Teke, B. Anye Cho, C. E. Bosman, Z. Mapholi, D. Zhang, and R. W. M. Pott, "Towards industrial biological hydrogen production: a review," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 40, no. 1, p. 37, Dec. 2023, doi: 10.1007/s11274-023-03845-4.

[7] S. Liu *et al.*, "Triggering photo fermentative biohydrogen production through NiFe2O4 photo nanocatalysts with various excitation sources," *Bioresource Technology*, vol. 385, p. 129378, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.biortech.2023.129378.

[8] H. Ramzan *et al.*, "Investigating the quantum size effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in photocatalytic fermentative biohydrogen production," *Journal of Cleaner Production*, vol. 449, p. 141738, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.jclepro.2024.141738.

[9] H. Argun and F. Kargi, "Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 13, pp. 7443–7459, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.116.

[10] J. Baeyens *et al.*, "Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 131, p. 0, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.rser.2020.110023.

[11] X. Guo, E. Trably, E. E. Latrille, H. Carrère, and J.-P. Steyer, "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 35, no. 19, pp. 10660–10673, 2010, doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.03.008.

[12] C. C. Hu, A. Giannis, C.-L. Chen, W. Qi, and J.-Y. Wang, "Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 35, Art. no. 35, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.03.131.

[13] S. Hiligsmann, J. Masset, C. Hamilton, L. Beckers, and P. Thonart, "Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 4, Art. no. 4, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.094.

[14] J. Wang and Y. Yin, "Clostridium species for fermentative hydrogen production: An overview," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 46, no. 70, pp. 34599–34625, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.ijhydene.2021.08.052.

[15] P. Dürre, "Physiology and Sporulation in *Clostridium*," *Microbiol Spectr*, vol. 2, no. 4, p. 2.4.10, Aug. 2014, doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012.

[16] X. Qu, H. Zeng, Y. Gao, T. Mo, and Y. Li, "Bio-hydrogen production by dark anaerobic fermentation of organic wastewater," *Front. Chem.*, vol. 10, p. 978907, Sep. 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.978907.

[17] S. F. Lee, C. W. Forsberg, and L. N. Gibbins, "Cellulolytic Activity of Clostridium acetobutylicum," *Appl Environ Microbiol*, vol. 50, no. 2, Art. no. 2, Aug. 1985.

[18] M. Sauer, "Industrial production of acetone and butanol by fermentation-100 years later," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 363, no. 13, p. fnw134, Jul. 2016, doi: 10.1093/femsle/fnw134.

[19] İ. Ergal *et al.*, "Biohydrogen production beyond the Thauer limit by precision design of artificial microbial consortia," *Commun Biol*, vol. 3, no. 1, Art. no. 1, Aug. 2020, doi: 10.1038/s42003-020-01159-x.
[20] R. K. Thauer, K. Jungermann, and K. Decker, "Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria," *Bacteriological Reviews*, vol. 41, no. 1, Art. no. 1, Mar. 1977, doi: 10.1128/br.41.1.100-180.1977.
[21] S. Rittmann and C. Herwig, "A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production," *Microbial Cell Factories*, vol. 11, no. 1, Art. no. 1, Aug. 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-115.
[22] S. Morra, "Fantastic [FeFe]-Hydrogenases and Where to Find Them," *Front. Microbiol.*, vol. 13, p. 853626, Mar. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.853626.
[23] M. Klein, M. B. Ansorge-Schumacher, M. Fritsch, and W. Hartmeier, "Influence of hydrogenase overexpression on hydrogen production of Clostridium acetobutylicum DSM 792," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 46, no. 5, Art. no. 5, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.12.015.
[24] S. J. Sarma, S. K. Brar, E. B. Sydney, Y. Le Bihan, G. Buelna, and C. R. Soccol, "Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 8, pp. 6473–6490, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.050.
[25] P. K. Sarangi and S. Nanda, "Biohydrogen Production Through Dark Fermentation," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 43, no. 4, pp. 601–612, Apr. 2020, doi: 10.1002/ceat.201900452.
[26] F. Buendia-Kandia, E. Rondags, X. Framboisier, G. Mauviel, A. Dufour, and E. Guedon, "Diauxic growth of Clostridium acetobutylicum ATCC 824 when grown on mixtures of glucose and cellobiose," *AMB Express*, vol. 8, no. 1, p. 85, May 2018, doi: 10.1186/s13568-018-0615-2.
[27] S. Abbad-Andaloussi, J. Amine, P. Gerard, and H. Petitdemange, "Effect of glucose on glycerol metabolism by Clostridium butyricum DSM 5431," *J Appl Microbiol*, vol. 84, no. 4, pp. 515–522, May 1998, doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00374.x.
[28] F. Monot, J.-R. Martin, H. Petitdemange, and R. Gay, "Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium," *Appl Environ Microbiol*, vol. 44, no. 6, Art. no. 6, Dec. 1982, doi: 10.1128/aem.44.6.1318-1324.1982.
[29] J. Harris, R. Mulder, D. B. Kell, R. P. Walter, and J. G. Morris, "Solvent production byClostridiumpasteurianum in media of high sugar content," *Biotechnol Lett*, vol. 8, no. 12, pp. 889–892, Dec. 1986, doi: 10.1007/BF01078654.
[30] J. L. Bergere, D. L. Bars, and J. Commissaire, "La bactofugation du lait et l'élimination des spores de Clostridium tyrobutyricum," *Lait*, vol. 49, no. 488, pp. 507–519, 1969, doi: 10.1051/lait:196948820.
[31] K. Guerrero *et al.*, "Continuous biohydrogen production by a degenerated strain of Clostridium acetobutylicum ATCC 824," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 46, no. 7, Art. no. 7, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.ijhydene.2020.11.104.
[32] O. Choi, T. Kim, H. M. Woo, and Y. Um, "Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph Clostridiumpasteurianum," *Sci Rep*, vol. 4, no. 1, p. 6961, Nov. 2014, doi: 10.1038/srep06961.
[33] H. Biebl, "Fermentation of glycerol by Clostridium pasteurianum — batch and continuous culture studies," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 1, pp. 18–26, Jul. 2001, doi: 10.1038/sj.jim.7000155.
[34] E. Petitdemange, C. Dürr, S. A. Andaloussi, and G. Raval, "Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains ofClostridium butyricum," *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 15, no. 6, pp. 498–502, Dec. 1995, doi: 10.1007/BF01570021.
[35] A.- Rehman, M. Matsumura, N. Nomura, and S. Sato, "Growth and 1, 3-propanediol Production on Pre-Treated Sunflower Oil Bio-Diesel Raw Glycerol Using a Strict Anaerobe-Clostridium butyricum," *Current Research in Bacteriology*, vol. 1, no. 1, pp. 7–16, doi: 10.3923/crb.2008.7.16.

[36] V. Huchet, D. Thuault, and C. M. Bourgeois, “Modélisation des effets du pH, de l’acide lactique, du glycérol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de Clostridium tyrobutyricum en milieu de culture,” *Lait*, vol. 75, no. 6, pp. 585–593, 1995, doi: 10.1051/lait:1995645.
[37] M. Yu, Y. Zhang, I.-C. Tang, and S.-T. Yang, “Metabolic engineering of Clostridium tyrobutyricum for n-butanol production,” *Metabolic Engineering*, vol. 13, no. 4, pp. 373–382, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.ymben.2011.04.002.
[38] J. Masset *et al.*, “Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of Clostridium spp,” *Biotechnology for biofuels*, vol. 5, p. 35, May 2012, doi: 10.1186/1754-6834-5-35.
[39] Gottschalk, Gerhard. 1986. Bacterial Metabolism. 2nd ed. Springer-Verlag.
[40] L. Huang, C. W. Forsberg, and L. N. Gibbins, “Influence of External pH and Fermentation Products on *Clostridium acetobutylicum* Intracellular pH and Cellular Distribution of Fermentation Products,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 51, no. 6, pp. 1230–1234, Jun. 1986, doi: 10.1128/aem.51.6.1230-1234.1986.
[41] H. Zhang, M. A. Bruns, and B. E. Logan, “Biological hydrogen production by Clostridium acetobutylicum in an unsaturated flow reactor,” *Water Research*, vol. 40, no. 4, pp. 728–734, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.watres.2005.11.041.
[42] S.-E. Oh, Y. Zuo, H. Zhang, M. J. Guiltinan, B. E. Logan, and J. M. Regan, “Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 34, no. 23, pp. 9347–9353, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.09.084.
[43] P.-Y. Lin *et al.*, “Biological hydrogen production of the genus Clostridium: Metabolic study and mathematical model simulation,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 32, no. 12, pp. 1728–1735, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.ijhydene.2006.12.009.
[44] D. T. Jones and D. R. Woods, “Acetone-Butanol Fermentation Revisited,” *MICROBIOL. REV.*, vol. 50, 1986.
[45] Y. Zhang, L. Xiao, S. Wang, and F. Liu, “Stimulation of ferrihydrite nanorods on fermentative hydrogen production by Clostridium pasteurianum,” *Bioresource Technology*, vol. 283, pp. 308–315, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.088.
[46] I.-C. Liu, L.-M. Whang, W.-J. Ren, and P.-Y. Lin, “The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 1, pp. 439–449, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.10.045.

III.2.b. Devenir de l'acétate lors de la culture de C. tyrobutyricum CNRZ 510

Dans l'article précédent, la concentration en acétate lors de la culture de *C. tyrobutyricum* CNRZ 510, bien que relativement faible par rapport aux autres souches, montre une évolution distincte. En effet, la concentration en acétate présente une augmentation entre t = 12 h et t = 22 h (Figure 29). Ce cumul se poursuit jusqu'à atteindre 3,7 fois la valeur initiale. Ensuite, cette concentration diminue jusqu'à être inférieure à 1 mmol/L à t = 51 h. Avec les autres espèces, aucune diminution de la concentration en acétate n'est constatée, même plusieurs heures après la fin de la fermentation, ce qui indiquerait que ce métabolite n'est pas dégradé dans les conditions expérimentales appliquées. L'hypothèse ressortant de ce constat serait une reconsommation de l'acétate par *C. tyrobutyricum*, malgré le maintien de la culture en acidogénèse.

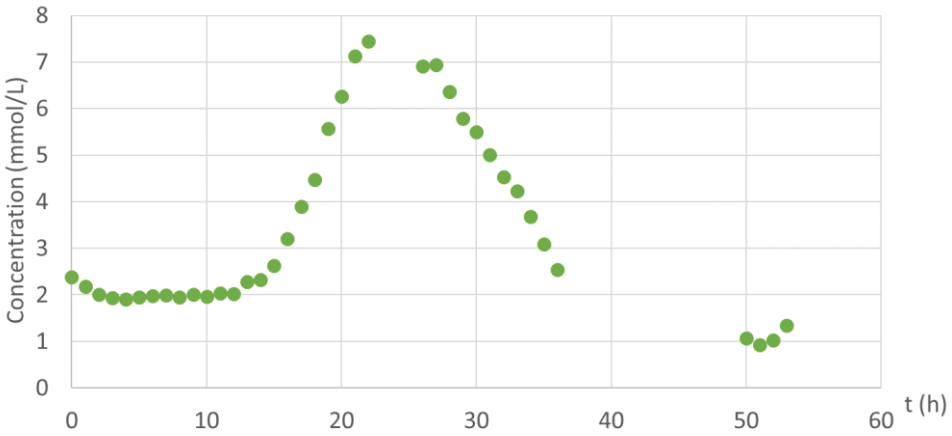


Figure 29. Évolution de la concentration en acétate lors d'une culture de *C. tyrobutyricum* CNRZ 510.

Dans la littérature, ce phénomène a été rapporté chez *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, où il a été mis en évidence que cette reconsommation est suivie d'une augmentation de la production de butyrate. C'est ainsi un autre moyen pour la bactérie de rééquilibrer la balance NADH/NAD^+, puisque la voie du butyrate est neutre électroniquement et que cette souche est incapable de produire du butanol pour compenser le déséquilibre électronique induit par la production d'acétate (Oh et al. 2019). Le phénomène a depuis été décrit plus précisément chez la souche *C. beijerinckii* Br21, ayant perdu la capacité à synthétiser des solvants. Il se traduit par une conversion de l'acétate en butyrate en deux étapes grâce à l'acétoacétyl-CoA:acyl-CoA transférase (EC 2.8.3.8, Figure 32). Cette enzyme est en effet capable de catalyser de façon réversible deux réactions :

III. Comparaison de la production de H2 en mode discontinu chez plusieurs espèces du genre Clostridium

Acétate + Acétoacétyl-CoA ⇌ Acétyl-CoA + Acétoacétate

Butyrate + Acétoacétyl-CoA ⇌ Butyryl-CoA + Acétoacetate

Par conséquent, lorsque l'acétate est consommé, il va en premier lieu réagir avec l'acétoacétyl-CoA et être converti en acétyl-CoA et acétoacétate. Cet acétyl-CoA peut alors suivre une cascade de réactions pour donner du butyryl-CoA, utilisant au passage 2 molécules de NADH (Figure 30). Ce butyryl-CoA peut alors réagir avec l'acétoacétate préalablement synthétisé afin de produire du butyrate tout en régénérant l'acétoacétyl-CoA initial (Bortolucci et al. 2023). En revanche, cette conversion de l'acétate en butyrate, en tant que telle, n'est pas associée à la formation de gaz.

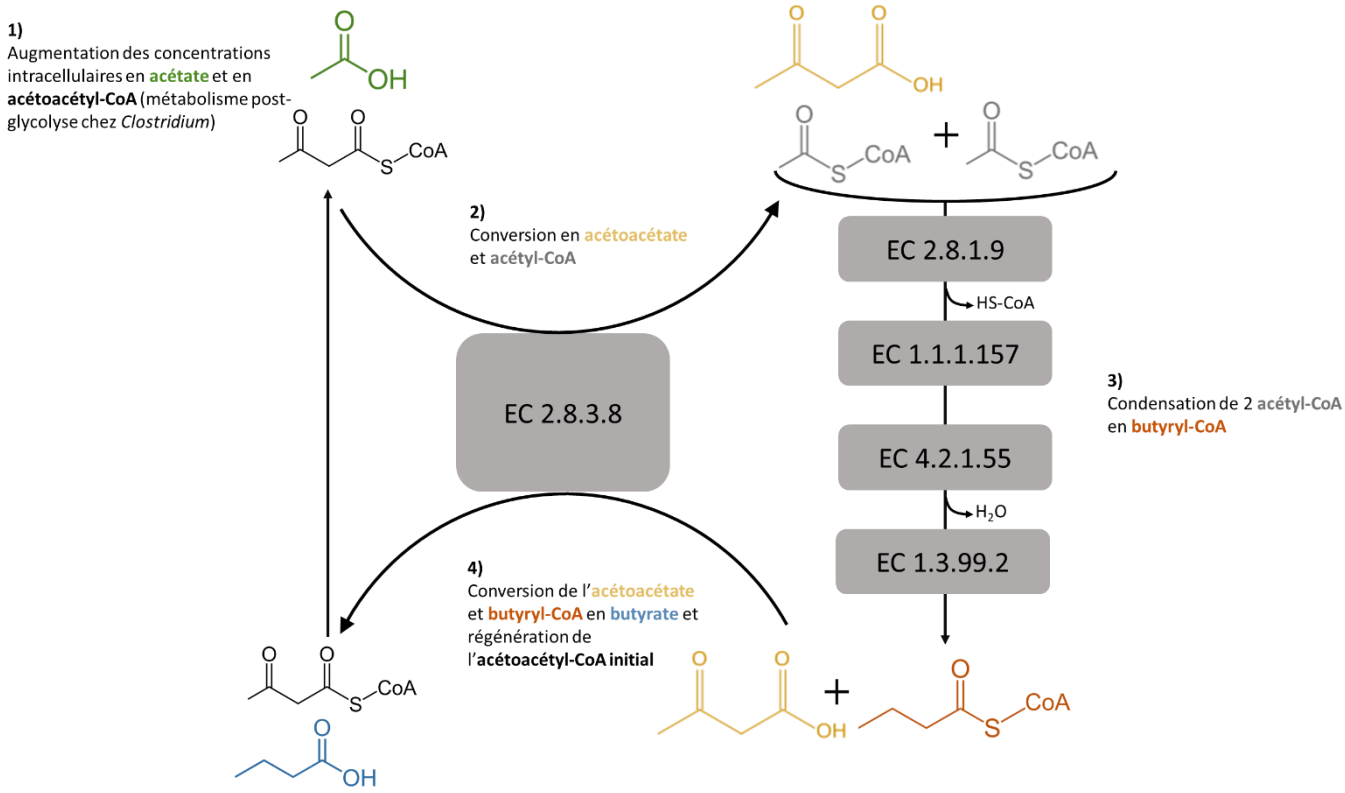


Figure 30. Voies métaboliques spécifiquement impliquées dans la conversion directe de l'acétate en butyrate décrite chez *C. beijerinckii* Br21. Enzymes : EC 2.8.3.8, acétoacétyl-CoA:acyl-CoA transférase ; EC 2.3.1.9, acétoacétyl-CoA thiolase ; EC 1.1.1.157, beta-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; EC 4.2.1.55, crotonase ; EC 1.3.99.2, butyryl-CoA déshydrogénase.

Dans le but de tester cette hypothèse pour la souche *C. tyrobutyricum* CNRZ 510, une fermentation complémentaire a été réalisée en ajoutant 5 g/L d'acétate au milieu de culture initial, en plus des 20 g/L de glucose. L'objectif de cette culture était de vérifier si la concentration en acétate pouvait baisser et résulter en une accumulation de butyrate additionnel.

III. Comparaison de la production de H2 en mode discontinu chez plusieurs espèces du genre Clostridium

Il a été observé, au cours d'une fermentation de 50 heures, une consommation de 57% de l'acétate initialement présent, en plus d'un épuisement quasi-complet du glucose (98,2% du glucose consommé). En outre, la concentration en butyrate a dépassé les 90 mmol/L (Figure 31).

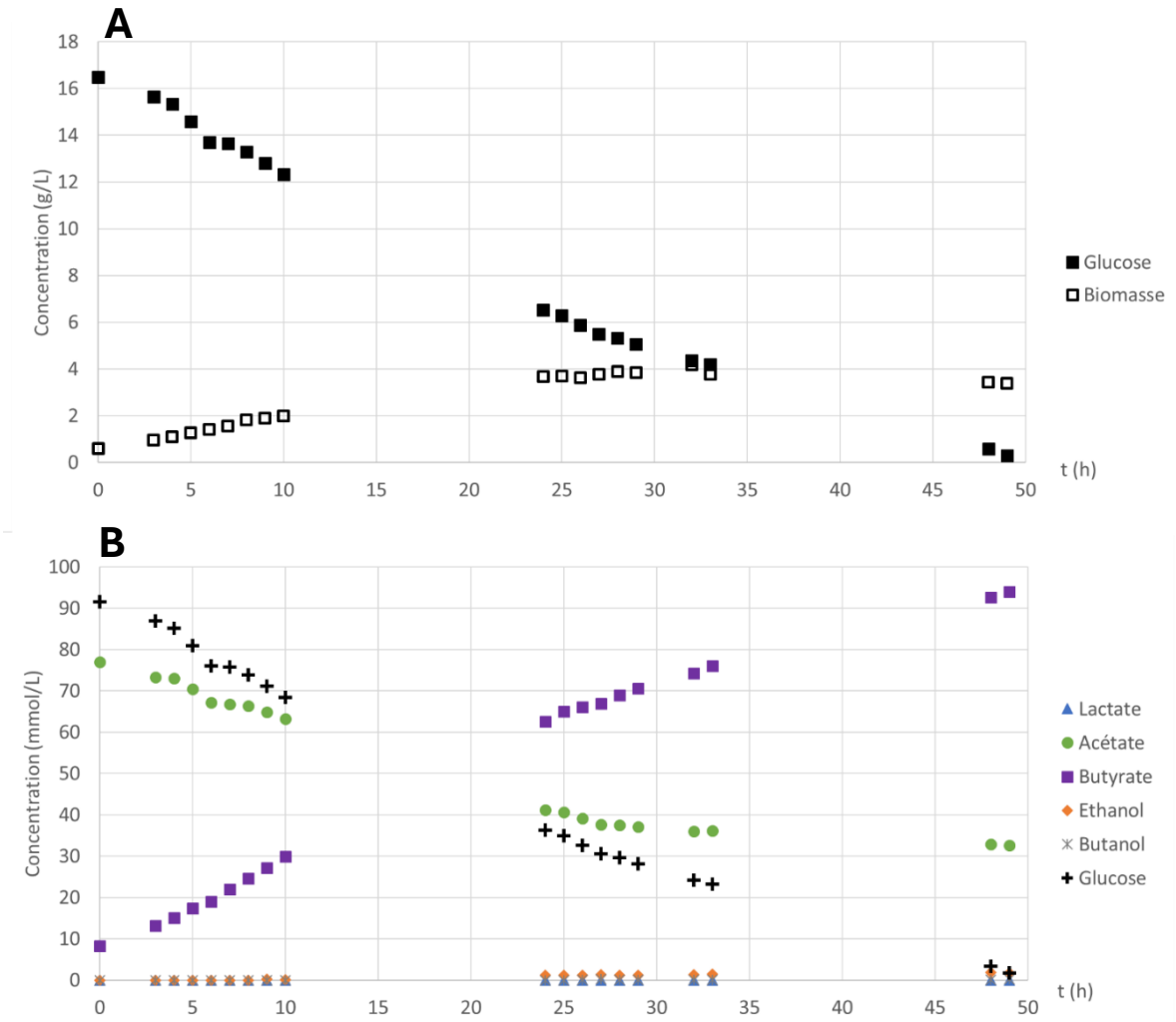


Figure 31. Évolution des concentrations en biomasse (A), métabolites (B) et en glucose (A et B) lors d'une culture de *C. tyrobutyricum* CNRZ 510 supplémentée en acétate.

Lors des permières heures de fermentation (de t = 0 h à t = 10 h), 4,17 g/L de glucose sont utilisés. Dans le même temps, 1,4 g/L de biomasse sont produits, ce qui laisse 2,77 g/L (environ 15 mmol/L) de glucose disponible pour la production de métabolites. Or, la concentration en butyrate passe de 10 à 30 mmol/L, soit une augmentation de 22 mmol/L sur cette même période de culture. Ce constat est d'autant plus marqué en considérant la période de t = 0 h à t = 33 h, durant laquelle 47 mmol/L de glucose sont consommés pour la production de métabolites, alors que 66 mmol/L de butyrate sont formés.

En conclusion, le phénomène de consommation et conversion de l'acétate en butyrate, observé chez d'autres souches de *Clostridium*, semble également être présent chez *C. tyrobutyricum* CNRZ 510. Ce constat est cohérent puisque cette souche ne possède pas d'activité de synthèse de solvants dans nos conditions de culture, et est une piètre productrice de H_2. La balance $NADH/NAD^+$ reposerait donc sur ces voies métaboliques. Néanmoins, des mesures de l'activité des enzymes impliquées dans ces réactions, à l'instar de l'étude de Bortolucci et al. de 2023, pourraient être réalisées afin de confirmer pleinement cette hypothèse.

III.3. Impact de la nature du substrat carboné et énergétique

Dans la littérature scientifique, de nombreuses expérimentations se penchent sur l'utilisation de glycérol en tant que substrat, afin de valoriser un co-produit des industries, dont la production a été estimée à 4,2 millions de tonnes en 2020 (Viana et al. 2014). Alors que le glucose possède 2 fois plus d'atomes d'hydrogène que de carbone, le glycérol est un substrat plus réduit qui possède 2,67 fois plus d'atomes d'hydrogène que de carbone. D'un point de vue purement stœchiométrique, le ratio R_{H_2/CO_2} pourrait s'avérer plus élevé en utilisant le glycérol comme substrat. La croissance et les productions de *C. pasteurianum* ATCC 6013 ont donc été étudiées en utilisant le glycérol comme substrat (Viana et al. 2014).

L'expérience a été réalisée en utilisant 20,5 g/L de glycérol comme substrat, afin d'avoir un nombre équivalent de carbone avec les expériences réalisées avec le glucose. Connaissant les voies de synthèse (Figure 7) et les équations de production des différents métabolites à partir du pyruvate qui en découlent, il est possible de calculer les productions de gaz comme suit, pour 1 mol de glycérol converti :

- en 1 mol d'acétate est associée l'émission de 3 mol de H_2 et de 1 mol de CO_2.
- en 0,5 mol de butyrate est associée l'émission de 2 mol de H_2 et de 1 mol de CO_2.
- en 1 mol de lactate est associée l'émission de 1 mol de H_2.
- en 1 mol d'éthanol est associée l'émission de 1 mol de H_2 et 1 mol de CO_2.
- en 0,5 mol de butanol est associée l'émission de 1 mol de H_2 et 1 mol de CO_2.

Les résultats de cette expérience sont visibles sur la Figure 32. Il a été rapporté un μ_{max} = 0,32 h^{-1} en phase exponentielle (calculé entre t = 1h et t = 8h). Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec une croissance sur glucose, de 0,35 ± 0,12 h^{-1}. Ensuite, la productivité de gaz s'est révélée bien plus importante, avec une productivité maximale de 2170 $mL_{gaz}/(L_{culture}/h)$, contre

866 ± 291 $mL_{gaz}/(L_{culture}/h)$. Le ratio R_{H_2/CO_2} = 1,11 mol/mol est du même ordre que celui obtenu avec le glucose, de 1,03 ± 0,13 mol/mol. Enfin, le rendement $Y_{H_2/S}$ = 1,06 mol/mol est cette fois-ci inférieur à celui obtenu avec le glucose, évalué à 1,73 ± 0,12 mol/mol, ce qui est cohérent, compte-tenu des rendements théoriques maximaux et du nombre d'atomes d'hydrogène moins élevé par molécule de glycérol.

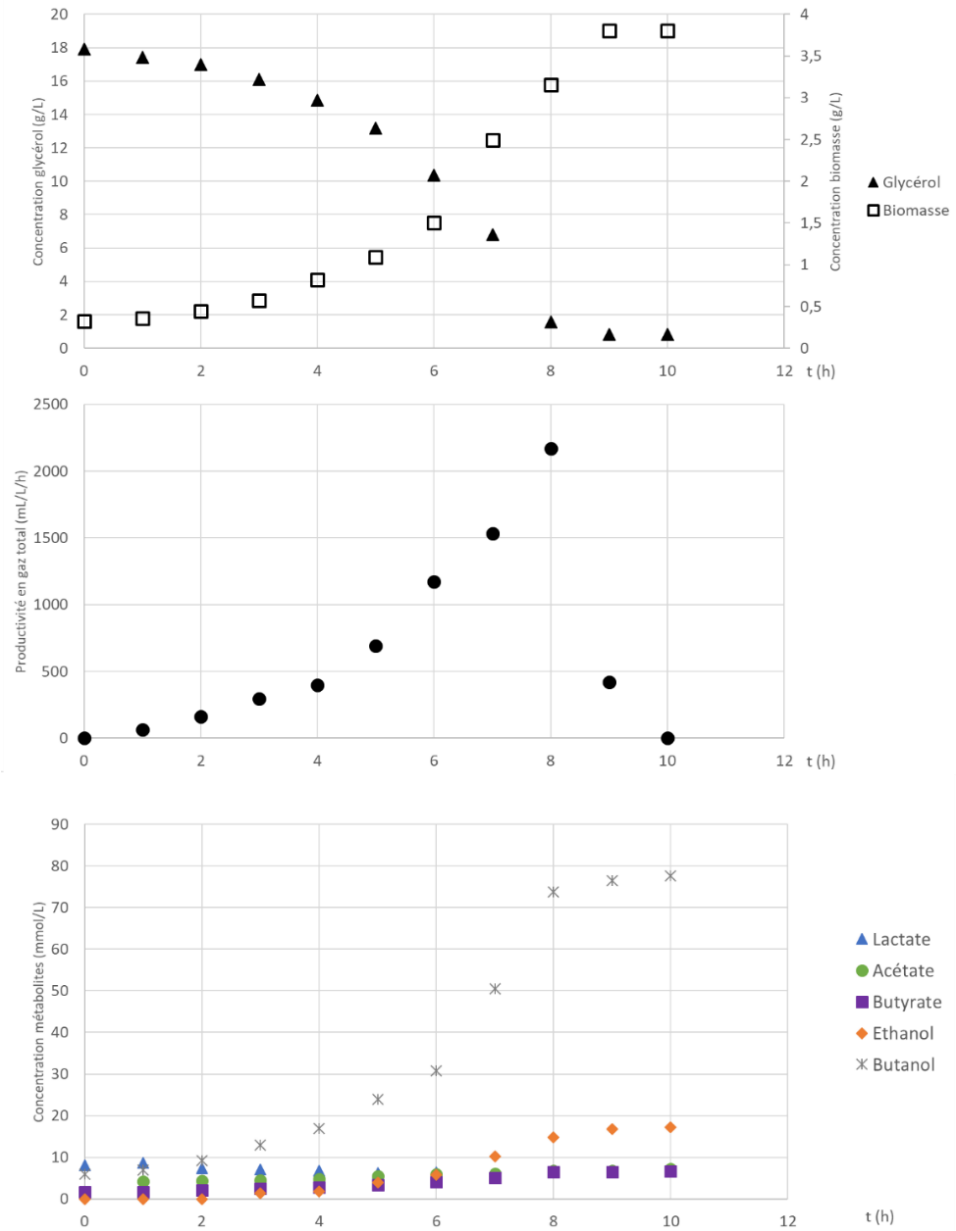


Figure 32. Croissance (□) et productions de gaz (•) et des métabolites chez *C. pasteurianum* ATCC 6013 cultivée en utilisant le glycérol comme substrat carboné et énergétique.

Ces tendances pour la production des métabolites sont fidèles à ce qui peut être trouvé dans la littérature (Biebl 2001). Lors d'une culture discontinue, en bioréacteur, de *C. pasteurianum* ATCC 6013, à pH = 6, en utilisant 50 g/L de glycérol, la concentration finale en butanol était d'environ 150 mmol/L, soit environ 50% de la concentration mesurée dans les travaux effectués au sein de cette thèse, sachant la concentration initiale en glycérol était environ deux fois moins élevée (Tableau 7). Des concentrations similaires en acétate, butyrate et éthanol ont été mesurées. Des constats semblables ont été observés lors de cultures en fioles fermées (Sarma et al. 2019). La concentration initiale en glycérol était de 60 g/L, pour une concentration finale en acétate de 38 mmol/L, en butyrate de 2 mmol/L, en lactate de 4 mmol/L, en éthanol de 32 mmol/L et enfin, en butanol d'environ 100 mmol/L. En revanche, le ratio R_{H_2/CO_2} n'était que de 0,67 mol/mol, possiblement en raison de l'inhibition de l'hydrogénase par la pression partielle en H_2 (Sarma et al. 2019). Gallardo et al. (2014) ont rapporté des concentrations finales en acides organiques plus importantes (27,7 mmol/L d'acétate et 20,8 mmol/L de butyrate) avec une concentration initiale en glycérol de 19 g/L pourtant proche de l'expérience de cette thèse. Cette différence pourrait être expliquée par le pH inital plus élevé à 6,8, ou de la différence de la composition minérale du milieu de culture.

Tableau 7. Exemples de concentrations des produits de fin de fermentation en fin de cutlures de *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 (= DSM 525) lorsque le glycérol est utilisé comme substrat.

Souche bactérienne	Concentration en glycérol (g/L)	Conditions opératoires	Concentration finale acétate (mmol/L)	Concentration finale butyrate (mmol/L)	Concentration finale lactate (mmol/L)	Concentration finale éthanol (mmol/L)	Concentration finale butanol (mmol/L)	Référence
C. pasteurianum ATCC 6013	20,5	Discontinu (bioréacteur de 1,6 L) à 37°C et pH régulé = 6,0	7,3	6,7	6,8	17,3	77,6	Cette thèse
C. pasteurianum ATCC 6013	50	Discontinu (bioréacteur de 1,0 L) à 35°C et pH régulé = 6,0	10	15	ND	20	150	(Biebl 2001)
C. pasteurianum ATCC 6013	60	Discontinu (bouteilles de 50 mL) à 37°C et pH initial = 7,0	36,1	12,1	7,2	10,1	66,4	(Sarma et al. 2019)
C. pasteurianum ATCC 6013	80	Discontinu (bioréacteur de 1,2 L) à 35°C et pH régulé à 6,0	13,3	19,3	1,1	21,7	166,2	(Groeger et al. 2017)
C. pasteurianum ATCC 6013	19 (pureté de 85%)	Discontinu (bouteilles de 200 mL) à 37°C et pH initial = 6,8	27,7	20,8	9,3	5,7	32,7	(Gallardo et al. 2014)

En observant une productivité en gaz environ deux fois plus élevée malgré des concentrations finales en acétate et butyrate 6,4 fois moins importantes, il apparaît alors que le glycérol constitue un meilleur substrat que le glucose, à concentration molaire initiale égale, pour la production de H_2. Ce constat ne s'applique en revanche qu'aux cultures discontinues. En effet, les principaux métabolites synthétisés ici sont le butanol et l'éthanol. Dans le cas d'un éventuel transfert du milieu de culture du bioréacteur dans lequel se déroule la fermentation sombre vers le second bioréacteur où se déroule la biométhanation, la présence de ces alcools pourrait se révéler problématique. En effet, des concentrations élevées en butanol sont connus pour être inhibitrices des archées méthanogènes (Wang et al. 2024).

III.4. Évaluation des méthodes d'analyse du gaz produit

En raison de contraintes matérielles, la synthèse des gaz chez les bactéries du genre *Clostridium* a été estimée dans ce chapitre à l'aide des bilans stœchiométriques des voies de synthèse des différents produits de fin de fermentation et de leurs concentrations finales. Cependant, dans le cadre de ce travail, il est apparu pertinent de comparer cette méthode avec une méthode d'analyse en ligne du gaz produit par les bactéries du genre *Clostridium* étudiées. Pour chaque souche utilisée, un essai de culture a été réalisé en analysant le gaz sortant du bioréacteur en micro chromatographie (µGC), afin de déterminer la valeur du ratio R_{H_2/CO_2} et de le comparer aux valeurs obtenues par le calcul d'après la production des métabolites.

Il apparaît alors que les mesures au µGC débouchent sur des valeurs de R_{H_2/CO_2} systématiquement supérieures par rapport à celles issues du calcul via les métabolites produits (Figure 33). Cette différence est la plus marquée pour *C. acetobutylicum* (+35%) et *C. pasteurianum* (+26%). Elle modérément marquée pour *C. butyricum* (+17%) et la plus faible chez *C. tyrobutyricum* (+7%). Toutes ces différences sont significatives au vu d'un test unilatéral de Student au risque α = 0,05.

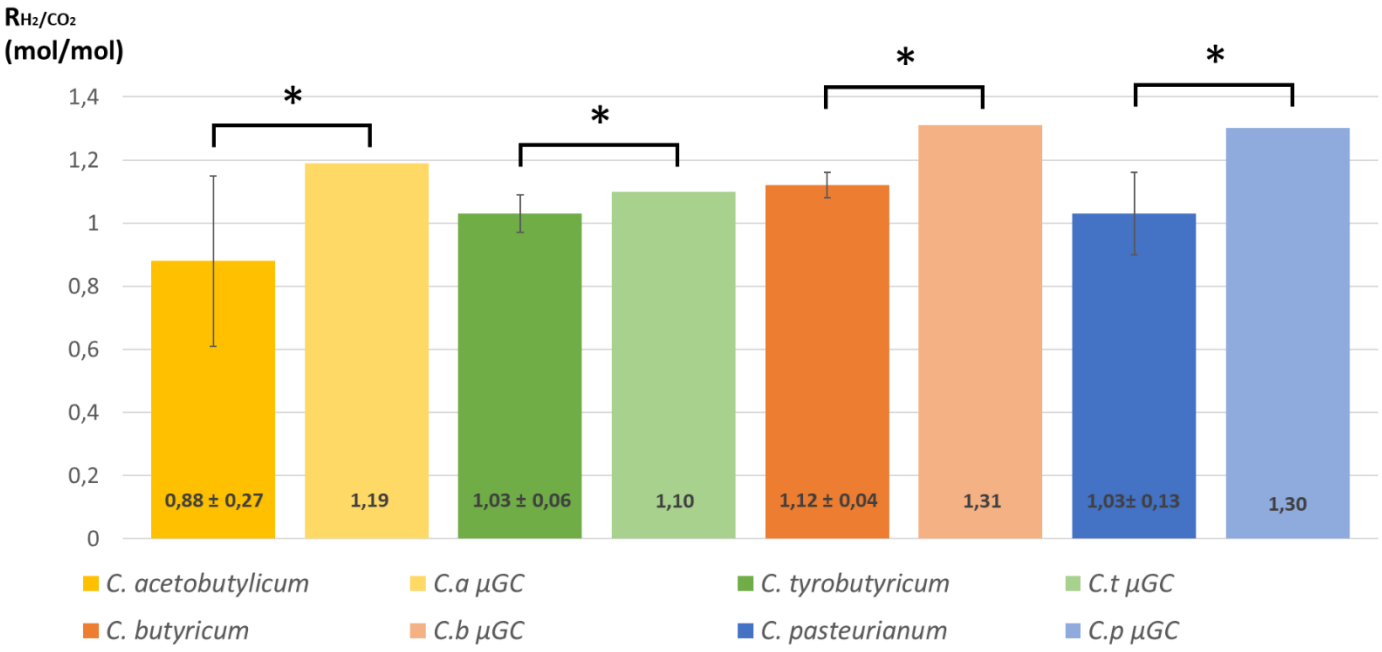


Figure 33. Valeurs du rapport R_{H_2/CO_2} selon la méthode utilisée (estimation à partir des analyses en produits de fin de fermentation par HPLC en couleur vive ou par µGC en couleur pâle).

La première hypothèse formulée pour expliquer cette différence résiderait dans la différence entre le CO_2 effectivement produit (estimé via les données des analyses par HPLC) et le CO_2 en phase gazeuse (mesuré par µGC) car la solubilisation et l'accumulation du CO_2 dans la phase liquide pourrait alors rentrer en compte.

D'après la loi de Henry (Eq. 35), il est possible d'écrire autrement $H_{CO_2}^{cp} = \frac{c_{CO_2}}{p_{CO_2}}$ avec :

$H_{CO_2}^{cp}$ la constante de solubilité de Henry pour le CO_2, d'une valeur de 3,4 x 10^{-2} mol/(L · atm) à 25°C dans l'eau.

c_{CO_2} la concentration en CO_2 dans la phase liquide (mol/L).

p_{CO_2} la pression partielle du CO_2 dans la phase gazeuse (atm).

Si l'on prend l'exemple de *C. acetobutylicum* avec un R_{H_2/CO_2} = 0,88 en moyenne, cela équivaut à une fraction molaire de CO_2 de 53,2%. Ainsi, le calcul permet d'estimer la concentration en CO_2, dans la phase liquide, avec cette souche de 18 mmol/L :

$$c_{CO_2} = (3{,}4 \times 10^{-2}) \times (0{,}532 \times 1) = 0{,}018\, mol/L = 18\, mmol/L$$

Pour un bioréacteur d'un volume de 1,6 L, cela donne une quantité de CO_2 dissous d'environ 29 mmol. Or, lors de la culture réalisée avec l'analyse des gaz par µGC, la quantité de CO_2 produit est de 296 mmol (calculée d'après les Eq.19-23, en considérant l'accumulation de 22,7 mmol d'acétate, 78,2 mmol de butyrate, 6,8 mmol d'éthanol et 55,1 mmol de butanol) pour 260 mmol de H_2. Si l'on retranche les 29 mmol dissoutes, 267 mmol de CO_2 devraient donc avoir été transférées dans la phase gazeuse. Sachant que la solubilité du H_2 est négligeable devant celle du CO_2 (respectivement calculées à 1,56 mg/L et 1471 mg/L en I.4.c, ce qui équivaut à un facteur d'environ 1000), il est possible de considérer que les 260 mmol de H_2 sont intégralement présentes dans la phase gazeuse. Dans ces conditions, le ratio R_{H_2/CO_2} au sein de la phase gazeuse uniquement peut être estimé à 0,97 mol/mol, ce qui reste donc différent du R_{H_2/CO_2} = 1,19 mol/mol obtenu par les mesures au µGC. Par conséquent, l'hypothèse de la solubilisation et de l'accumulation du CO_2 en phase liquide ne suffit pas à elle seule pour expliquer la différence entre sa quantité calculée et sa quantité mesurée au µGC. Une autre hypothèse serait que le CO_2 étant un gaz bien plus dense que le H_2 (1,87 kg/m^3 contre 0,09 kg/m^3, respectivement), il aurait tendance à stagner en surface à l'interface de la phase liquide et du ciel gazeux du bioréacteur, tandis que le H_2 pourrait s'échapper plus facilement et se retrouverait en plus forte proportion dans le gaz analysé par le µGC. En outre, la formation de mousse, comme cela est le cas dans nos cultures, a été répertoriée comme une potentielle cause du ralentissement de la vitesse

d'échappement des gaz du bioréacteur (St-Pierre Lemieux et al. 2019), ce qui pourrait également expliquer une sortie moins rapide du CO_2, au profit du H_2, d'où le R_{H_2/CO_2} plus élevé dans la mesure de la phase gazeuse par le µGC. Il est également possible de penser qu'une certaine partie des acides organiques (acétate et butyrate) produits ont été reconsommés pour la production directe de solvants, permettant ainsi de rétablir l'équilibre électronique. Les électrons ne sont ainsi pas transférés à l'hydrogénase pour la production de H_2, malgré la formation des acides.

Dans la suite de ce travail, le ratio R_{H_2/CO_2} sera évalué à l'aide des données collectées par le µGC uniquement. En effet, dans le cadre d'une utilisation ultérieure du gaz produit, ce n'est pas la quantité de CO_2 produite au total qui importe, mais bel et bien les quantités respectives de H_2 et de CO_2 en sortie, qui pourront être effectivement transférées dans un potentiel second bioréacteur.

III.5 Conclusions

Au vu des résultats présentés dans la publication pour *Journal of Biotechnology* (section III.1.a), il apparaît clairement que *C. pasteurianum* ATCC 6013 est la plus intéressante des 4 souches testées en termes de productivité volumique maximale en H_2 en utilisant le glucose comme substrat. De plus, elle présente une croissance parmi les plus rapides (+17% par rapport à *C. acetobutylicum* ATCC 824, +40% par rapport à *C. butyricum* DSM 5431, +170% par rapport à *C. tyrobutyricum* CNRZ 510), ce qui est une caractéristique particulièrement intéressante dans le cadre d'une production de H_2 en mode continu. Cela témoigne de la capacité potentielle de la bactérie à tolérer des taux de dilution plus élevés en culture continue, et donc d'intensifier l'apport en substrat, et conséquemment, la productivité en H_2. Enfin, le ratio R_{H_2/CO_2} reste très satisfaisant avec cette souche, puisque du même ordre de grandeur que les autres meilleures souches. Cette conclusion n'est pourtant pas celle qui aurait pu être imaginée en premier lieu, étant donné que la majorité des études s'intéressant à la production de H_2 utilise *C. acetobutylicum* ATCC 824, là où *C. pasteurianum* ATCC 6013 est plutôt étudiée pour la production d'alcools. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reste néanmoins le meilleur choix si l'on s'intéresse à la production spécifique de H_2, car elle produit moins de biomasse.

Ainsi, dans la suite des travaux de cette thèse, *C. pasteurianum* ATCC 6013 sera utilisée, l'objectif étant de déboucher sur une productivité maximale de H_2 en vue d'un couplage avec la biométhanation.

Concernant les méthodes de détermination de la quantité de H_2, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse sera privilégiée, car plus représentative des flux de gaz sortant du bioréacteur par rapport à l'estimation à l'aide de la production de métabolites dosés par HPLC. En effet, le CO_2 produit

peut se solubiliser ou rester en surface de la phase liquide, s'échappant alors moins vite que le H_2. Le phénomène de conversion directe de l'acétate en butyrate avec *C. tyrobutyricum* CRNZ 510 a également été mis en évidence. Pour autant, les données obtenues par estimation restent intéressantes et ne sont pas invalides, car dégagent la même tendance qu'avec le µGC.

Enfin, le glucose sera conservé comme substrat pour les expérimentations en culture continue, car ce substrat est dirigé vers les voies métaboliques les plus favorables à la production de H_2. En outre, ce substrat modèle est plus utilisé dans la littérature scientifique, et les résultats obtenus seront plus facilement comparables avec les données existantes.

IV. Optimisation de la production de biohydrogène lors de cultures continues de *C. pasteurianum* ATCC 6013

IV.1. Avant-propos et stratégie scientifique

Les objectifs de cette partie du travail de thèse sont d'optimiser, en proportions définies, la production de H_2 et de CO_2 dans un mélange gazeux, afin d'assurer l'alimentation constante d'un procédé de méthanation biologique de manière couplée. Ainsi, la culture de *C. pasteurianum* ATCC 6013 s'est révélée particulièrement adaptée pour satisfaire cet objectif. Toutefois, il est primordial de déterminer les conditions de culture permettant de maximiser la production de H_2, sachant que certains paramètres opératoires sont connus pour influencer la physiologie et la production de métabolites et de gaz par les espèces du genre *Clostridium*. C'est notamment le cas du pH, de la concentration en substrat ainsi que du taux de dilution, qui ont donc été les paramètres opératoires retenus. La température est reconnue pour avoir un effet sur la vitesse de croissance et a déjà été évaluée (Shaterzadeh and Ataei 2017). Mais les conditions optimales de température des espèces mésophiles de *Clostridium* étant situées entre 35°C et 40°C, il a donc été décidé de maintenir les cultures à 37°C et de ne pas étudier l'influence de ce paramètre. Les effets de la composition minérale du milieu de culture n'ont pas été étudiés non plus lors de cette partie du travail de thèse. Pour réaliser cette optimisation, une approche par plan d'expériences (« Design of Experiments » ou DoE) accompagné d'une représentation par surfaces de réponses a été mise en œuvre, en raison de ses capacités à dresser un modèle empirique des effets des différents facteurs pris individuellement, mais aussi des interactions entre lesdits facteurs, le tout grâce à un nombre restreint d'expériences. En effet, en raison des longues durées expérimentales des cultures continues, il était nécessaire d'avoir une approche efficace pour optimiser la production de H_2. Cette approche avec des bactéries du genre *Clostridium* a déjà été mise en place, mais seulement en culture discontinue (Van Ginkel et al. 2001; Shaterzadeh and Ataei 2017; Ergal et al. 2020; De Castro et al. 2025), mode de culture non pertinent dans le cadre d'un couplage. L'optimisation de la production de biohydrogène par des clostridies en culture continue via un plan d'expériences constitue ainsi une approche nouvelle.

Les limites du champ d'étude pour chaque facteur ont été déterminées préalablement, dans le but de s'approprier également les aspects spécifiques liés aux expériences.

IV.2. Délimitations du champ d'étude du plan d'expériences

Dans un premier temps, les paramètres centraux (pH = 6,5 ; D = 0,200 h^{-1} ; S_f = 15 g/L) ont été fixés arbitrairement, selon les valeurs moyennes trouvées dans la littérature scientifique (Harris et al. 1986; Biebl 2001; Guedon et al. 2000; Sim et al. 2024). Ensuite, chaque paramètre a été progressivement augmenté (respectivement diminué) au cours d'expériences préliminaires, et connaissant les capacités de la souche ATCC 6013 grâce aux résultats des cultures en mode discontinu (section III.2.a). La valeur limite a été fixée lorsque l'absence d'émission de gaz et/ou une très forte diminution de la concentration en biomasse, risquant de mener au lessivage complet des cellules, était constatées. Cela a été par exemple le cas à pH = 5,0 ainsi qu'à pH = 8,0 pour les valeurs de D = 0,200 h^{-1} et S_f = 15 g/L (Figure 34), ce qui a amené à fixer les bornes entre pH = 6,0 et pH = 7,0. À D = 0,400 h^{-1} pour un pH = 6,5 et S_f = 15 g/L, la concentration en biomasse a diminué, sans se stabiliser, ce qui aurait amené probablement au lessivage des cellules. Ce constat a conduit à la limite de la borne supérieure à 0,350 h^{-1} (en accord avec la valeur du μ_{max} déterminé lors des cultures discontinues). Mathématiquement, pour maintenir un écart similaire entre la valeur centrale et la borne inférieure, cette dernière a pris la valeur de D = 0,050 h^{-1}. Enfin, aucun volume de gaz ne sortait du réacteur à une concentration S_f = 5 g/L pour le plus faible taux de dilution D = 0,050 h^{-1} et à pH = 6,5, constituant ainsi la borne inférieure de S_f. Là encore, pour conserver le même écart entre la valeur centrale et la borne supérieure, une concentration maximale de 25 g/L de glucose a été fixée pour le champ d'étude.

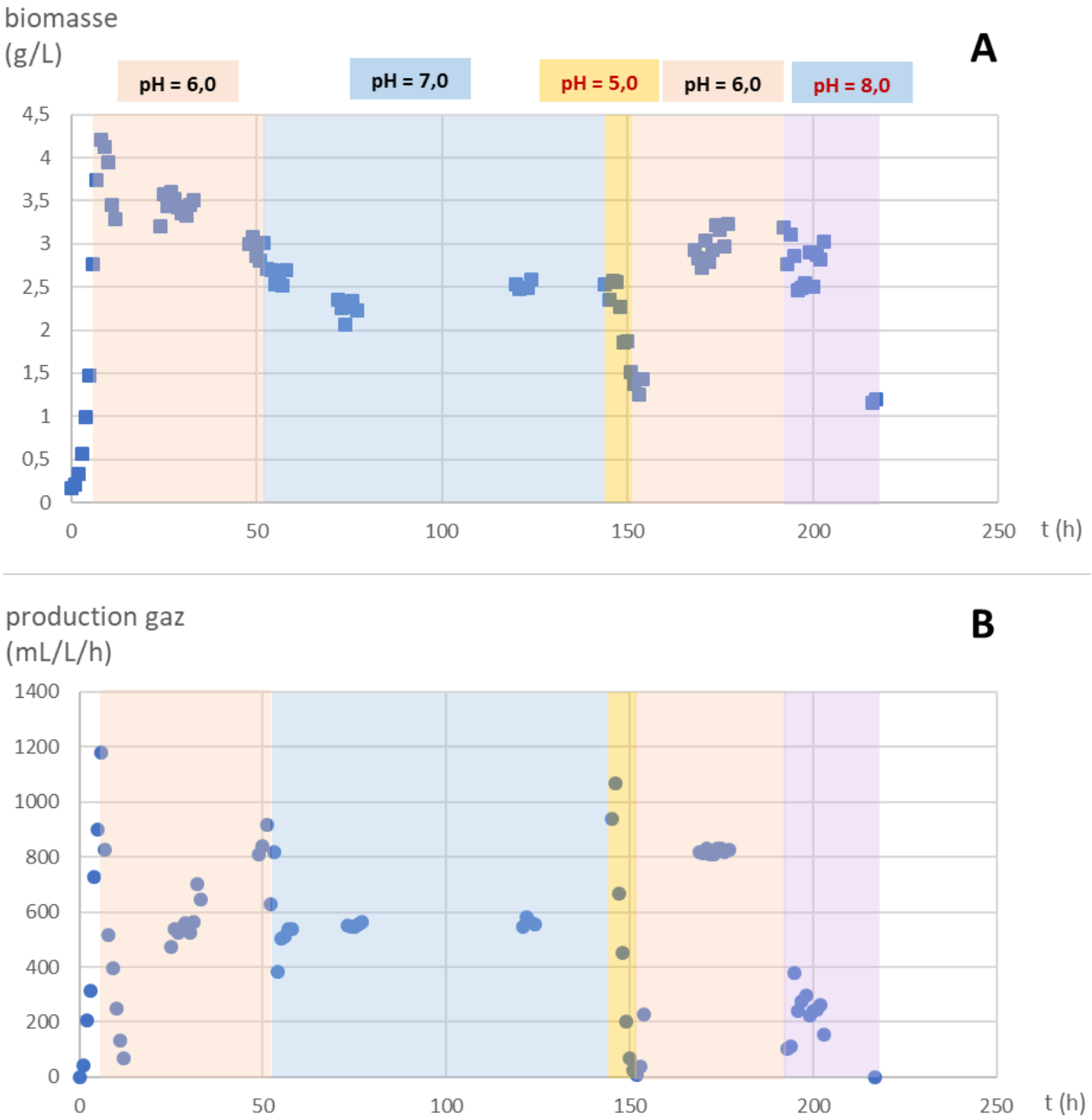


Figure 34. Concentration en biomasse (A) et production volumique totale de gaz (B) lors d'une culture continue de *C. pasteurianum* ATCC 6013 à D = 0,200 h^{-1} et S_f = 15 g/L.

IV.3. Application de la démarche d'optimisation par plan d'expériences de la production continue de H_2 par *C. pasteurianum* ATCC 6013

L'ensemble de l'étude autour de l'optimisation de la production continue de H_2 a été rédigé sous la forme d'un projet d'article qui sera soumis au journal *Frontiers in Microbiology* en janvier 2026 (numéro "*Green Biomanufacturing by Industrial Microorganisms: Precise Regulation and System Optimization*"), après acceptation du résumé en août 2025.

Optimization of continuous biohydrogen production by *Clostridium pasteurianum* using a Design of Experiments approach

Abstract

This work focuses on the biohydrogen production by the *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 strain in continuous culture. It is already known that parameters such as the pH and substrate concentration influence metabolites production, and consequently hydrogen production. Applying the use of designs of experiments (DoE) is relevant to find the optimal values of the culture parameters based on surface responses. Moreover, it enables to monitor the cultures depending on the target objectives, such as maximizing H_2 productivity, the H_2:CO_2 ratio, and/or the molar yield of H_2 on glucose. Here, this strain is found to be capable of achieving both high productivity with satisfying yields (≈ 500 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$, $R_{H_2/CO_2} > 1.7$ and $Y_{H_2/S} > 0.95$, when cultivated with pH = 7, D = 0.230 h^{-1}, and S_f = 17 g/L).

Introduction

Hydrogen in its gaseous form (H_2) is often thought of as a promising fuel to replace hydrocarbon ones. Its combustion does not emit carbon dioxide, known for its greenhouse effect (Meher Kotay and Das 2008). However, its worldwide production relies mainly on fossil resources (more than 95% in 2015), such as steam methane reforming or coal gasification, whose chemical reactions release CO_2 as a product [2], thus negating the efforts made to reduce emissions of this gas. Another approach being considered is water electrolysis using excess electricity from renewable sources (solar and wind), known as the "Power-to-gas" concept (Hay et al. 2013) (Fachal-Suárez et al. 2024). The drawback of this method is that the amount of electricity available can greatly vary depending on the season or the time of the day, making hydrogen production periodic. Microbial hydrogen-producing fermentations can be considered, because they can be run continuously to provide a constant amount of hydrogen during the process. The two main hydrogen-producing fermentations are photo-fermentation and dark fermentation. Photo-fermentation is used to convert volatile fatty acids (VFAs) into H_2, involving the energy of light. Several processes using this phenomenon have been recently described (Melitos et al. 2021; Zhang et al. 2024). Conversely, dark fermentation cultures utilize carbohydrate-rich substrates to

produce VFAs and alcohols, along with H_2 without the need for light (Hay et al. 2013) (Argun and Kargi 2011). Dark fermentation benefits from a large diversity of microorganisms capable of performing this type of fermentation (mainly from the genera *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Caldicellulosiruptor*) (Rittmann and Herwig 2012). In addition, a wide variety of substrates can be used, with different cultivation conditions, making dark fermentation an interesting way to valorize by-products from industrial activities (Sarangi and Nanda 2020).

Bacteria from the genus *Clostridium* are found to be capable of both high volume productivity and satisfying yields (Wang and Yin 2021) (Rittmann and Herwig 2012). These bacteria are indeed capable of growing on a wide variety of carbohydrate substrates, and their metabolic pathways have been widely described, as illustrated in Figure 35. When cultivated in a slightly acidic or neutral environment (pH between 5.5 and 7.5), conditions are met for an exponential growth phase, along with the production of mainly organic acids (such as acetate and butyrate) and hydrogen. As the pH decreases to approximately 4.5, growth slows down, with reduced acid production, minimal hydrogen emission, and increased solvent production (ethanol, butanol and acetone) (Grimmler et al. 2011).

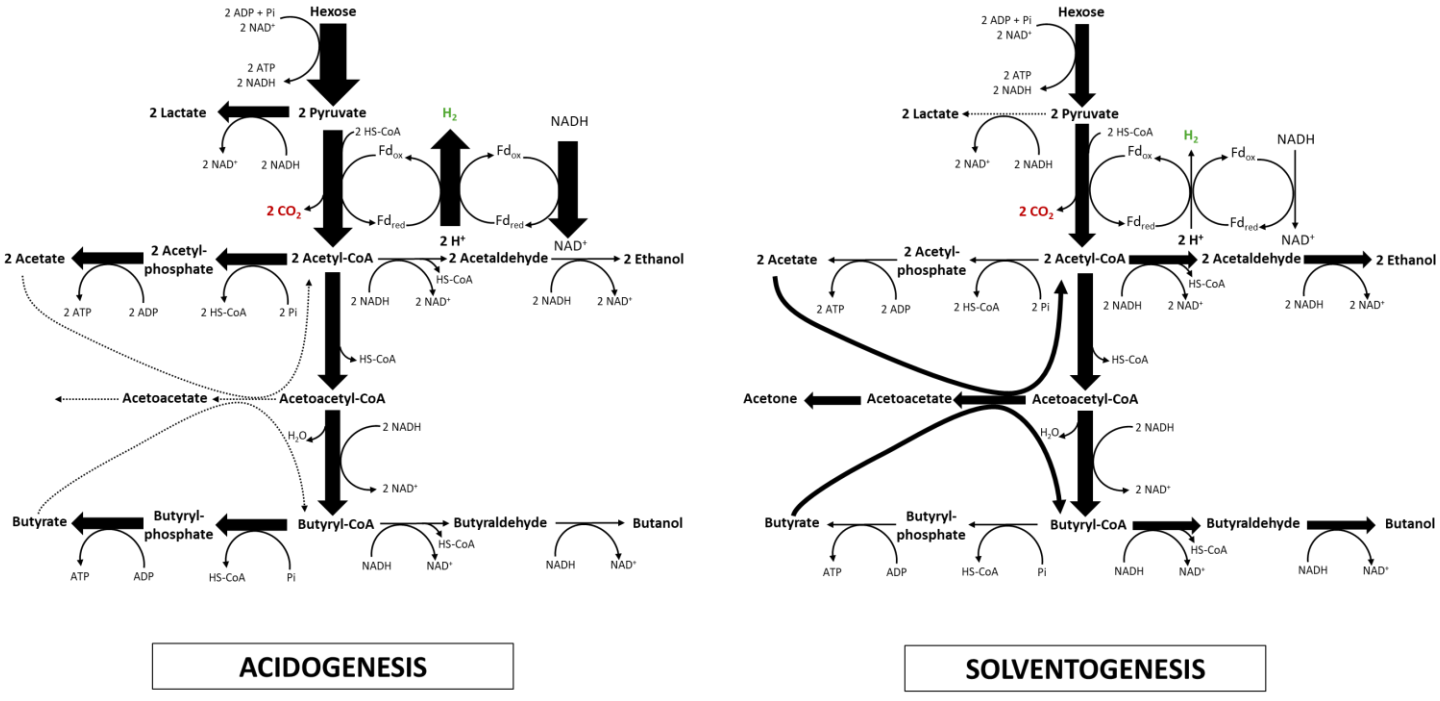


Figure 35. Metabolic pathways and representations of electronic and carbon flows of *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 depending on the fermentation phase.

Theoretically, the maximum achievable yield of hydrogen is 4 mol/mol, based on glucose consumption, and if all the substrate is catabolized through the acetate pathway, as established by Thauer et al. (Thauer et al. 1977). However, the observed yields are much lower than this value due to the use of carbon for biomass formation, and because the energy resulting from acetate production is too high to be thermodynamically feasible in high proportions, considering the entropy requirements (Thauer et al. 1977; Decker et al. 1970). Additionally, butyrate formation is the only pathway associated with a significant ATP production that is able to maintain the redox balance between NADH and NAD^+. It is thereby one of the most produced metabolites in hydrogen production cultures. However, due to its toxicity, reported above 100 mmol/L, butyrate inevitably accumulates alongside other products such as acetate, or alcohols, in the culture medium (Zheng and Yu 2005; Seo et al. 2024).

Independently to the redox balance, it is reasonable to assume that the acetate pathway will be privileged for energy production in continuous culture, as it is the most prolific pathway for ATP generation. This high energy supply enables high biomass formation to counteract the cell washout, and as a result, higher hydrogen production is expected compared to batch cultures. Continuous culture is also a way to avoid the accumulation of metabolites which may impact on bacterial performance via inhibition phenomena. Though, some reported hydrogen on substrate yield ($Y_{H_2/S}$) values are typically comprised between 1.5 and 2.5 mol/mol in batch cultures, whereas values between 0.58 and 2.8 mol/mol were reported in continuous cultures (Argun and Kargi 2011), which does not represent any major improvement for this parameter.

Among culture conditions influencing clostridial physiology, the pH, the substrate concentration and the dilution rate are known to have the strongest influence in continuous culture (Godin and Engasser 1990; Fick et al. 1985; Biebl 2001).

Some experiments relying on DoE have already been performed for hydrogen production with *Clostridium* species, but only in batch cultures. Today, there is a gap in the literature regarding optimization strategies to maximize H_2 production by *Clostridium* species in continuous culture. No article mentioning the use of DoE for this purpose has been reported to date. A possible explanation could be the fact that DoE is a relatively recent discipline, and that recent researches are mainly focused on batch fermentations (Teke et al. 2023). Approaches like DoE also have the advantage of evaluating the effects of the interaction of two or more parameters. Considering the influence of the parameters previously mentioned on metabolite productions in continuous culture, this work focused on the optimization of H_2 production in a continuous process. To do this, optimization experiments relying on DoE using 15 culture conditions have been performed, assuming the dilution rate, the pH, and the substrate concentration as variables, since they can strongly influence metabolite production.

Materials and methods

Bacterial strains and pre-cultures

The bacterial strain used was *C. pasteurianum* ATCC 6013 (= DSM 525), whose pre-culture protocol was the same as in a previous study (Vauthier et al. 2026) . Spores were stored at 6°C in collection tubes filled with Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) containing the following ingredients in 1 L of distilled water: peptone, 10 g; beef extract, 10 g; yeast extract, 3 g; dextrose, 5 g; NaCl, 5 g; soluble starch, 1 g; cysteine-HCl, 0.5 g; sodium acetate, 3 g; agar, 0.5 g; pH adjusted to 6.8.

To induce spore's germination, 1 mL of the spore-containing suspension was transferred in 9 mL of fresh RCM, previously autoclaved into Hungate tubes at 121°C for 15 minutes. They were immersed in hot water at 80°C for 15 minutes and then placed on ice for 10 minutes. The tubes were then stored at 37°C for 24 h. The content of each Hungate tube was then poured into test tubes containing 30 mL of culture medium whose composition is, for 1 L of distilled water: D-glucose, 20 g; yeast extract, 1 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 g; $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$, 1 g; $CaCl_2$, 0.15 g; KH_2PO_4, 0.5 g; K_2HPO_4, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot\ H_2O$, 10 mg; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg; biotin, 40 µg; $CaCO_3$, 3g. Each tube was capped with carded cotton. $CaCO_3$ reacts with organic acids to produce CO_2 to ensure anaerobiosis within the test tubes. Those tubes were stored at 37°C for 12 h.

Bioreactor preparation and inoculation

Bacterial cultures were performed in a 2L bioreactor (GPC, France). 0.760 L of the culture medium, contained the following elements for 1 L of distilled water, was prepared inside the tank: D-glucose, 20 g; yeast extract, 1 g; cysteine-HCl, 1 g; NH_4Cl, 1.5 g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.2 g; KCl, 0.65 g; KH_2PO_4, 0.5 g; K_2HPO_4, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 mg; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg; 4-aminobenzoic acid, 8 mg; biotin, 40 µg. Both the bioreactor and the medium were autoclaved at 115°C for 15 minutes. Temperature and time were lower than the usual procedure to avoid Maillard reaction. Before running the culture, the autoclaved medium was sparged with pure sterile N_2 to ensure anaerobic conditions. 240 mL of the previous precultures, containing bacteria in full growth state, were added as the inoculum, for a final working volume of 1L. The temperature was maintained at 37°C by hot water circulation in the bioreactor jacket. The pH was regulated using a solution of 2 M NaOH, to ensure acidogenesis, as referred in Table 8. Agitation was provided by a four-bladed Rushton propeller set at 150 rpm. These parameters were monitored by the C-BIO 1™ software (GPC, France).

Continuous fermentation in bioreactor

The feeding culture medium was the same as the bioreactor medium, except for the glucose concentration, which depends on the experiment run, as indicated in Table 8. This medium was autoclaved and sparged with sterile N_2 as well. Continuous phase began when the initial biomass concentration was above 2 g/L. The addition of feeding medium and the removal of the bioreactor medium at the same flow were facilitated by two peristaltic pumps. The steady state of the continuous culture was considered after at least 3 renewals of the bioreactor volume, when biomass and metabolites concentrations remained stable, as well as the gas productivity. For a given feeding substrate concentration, each run was randomized, and some were repeated, to verify that the results of one run were not dependent on previous culture conditions.

Design of Experiments and response surface

The influential parameters considered in this study to evaluate their influence on biohydrogen production were the pH, the dilution rate D (h^{-1}) and the feeding substrate concentration S_f (g/L). The extreme conditions where no bacterial growth could be observed were previously determined (data not shown). Then, each parameter was set at 3 different levels, according to a face centered central composite design (CCF), for a total number of 15 runs (Table 8 and Figure 36). The measured responses were the volume H_2 outlet of the bioreactor, the molar ratio of hydrogen on carbon dioxide (R_{H_2/CO_2}), the molar yield of hydrogen on the substrate ($Y_{H_2/S}$) and the residual glucose in the liquid effluent from the bioreactor. To each value of a parameter x_i was associated a centered reduced value x_i^r included between -1 and 1, used to normalize each parameter. Collected data were used and implemented into MODDE 13® software (Sartorius Data Analytics, Germany) to obtain the empirical models and the associated responses surface. The equations obtained are represented by a multiple linear regression with a quadratic model written as follows:

$$Y = a_0 + a_1 \cdot pH^r + a_2 \cdot D^r + a_3 \cdot S_f^r + a_{11} \cdot pH^2 + a_{22} \cdot D^{r\,2} + a_{33} \cdot S_f^{r2} + a_{12} \cdot pH^r \cdot D^r + a_{13} \cdot pH^r \cdot S_f^r + a_{23} \cdot D^r \cdot S_f^r$$

Where: Y is the response value for the considered setting of parameters ; a_0 is the response value at the center of the DoE field ; $\sum a_i x_i$ are the linear terms showing the main effect of each factor ; $\sum a_{ii} {x_i}^2$ are the quadratic terms showing the effect of the squared individual factors ; $\sum a_{ij} x_i x_j$ are the interaction terms showing the effect of combined individual factors. The fit method used to calculate the coefficient

was the minimization of the sum of squares of the residuals between the experimental and the model values.

Table 8. Face centered central composite design matrix. The values in parentheses corresponds to the reduced factor levels, according to the real values and the borders of the field of the experiments. The number of the experiment corresponds to the order of the performed runs. A same symbol means that the experiments were carried out during the same fermentation run.

pH (pH^r)	Dilution rate D (D^r) h^{-1}	Feeding substrate concentration S_f (S_f^r) g/L	Number of the experiment
6 (-1)	0.050 (-1)	5 (-1)	6 ¤
7 (1)	0.050 (-1)	5 (-1)	10 □
6 (-1)	0.350 (1)	5 (-1)	9 ◊
7 (1)	0.350 (1)	5 (-1)	8 ◊
6 (-1)	0.050 (-1)	25 (1)	12 *
7 (1)	0.050 (-1)	25 (1)	14 *
6 (-1)	0.350 (1)	25 (1)	15 *
7 (1)	0.350 (1)	25 (1)	13 *
6 (-1)	0.200 (0)	15 (0)	1 •
7 (1)	0.200 (0)	15 (0)	2 •
6.5 (0)	0.050 (-1)	15 (0)	5 ¤
6.5 (0)	0.350 (1)	15 (0)	4 ¤
6.5 (0)	0.200 (0)	5 (-1)	7 ◊
6.5 (0)	0.200 (0)	25 (1)	11 □
6.5 (0)	0.200 (0)	15 (0)	3 ¤

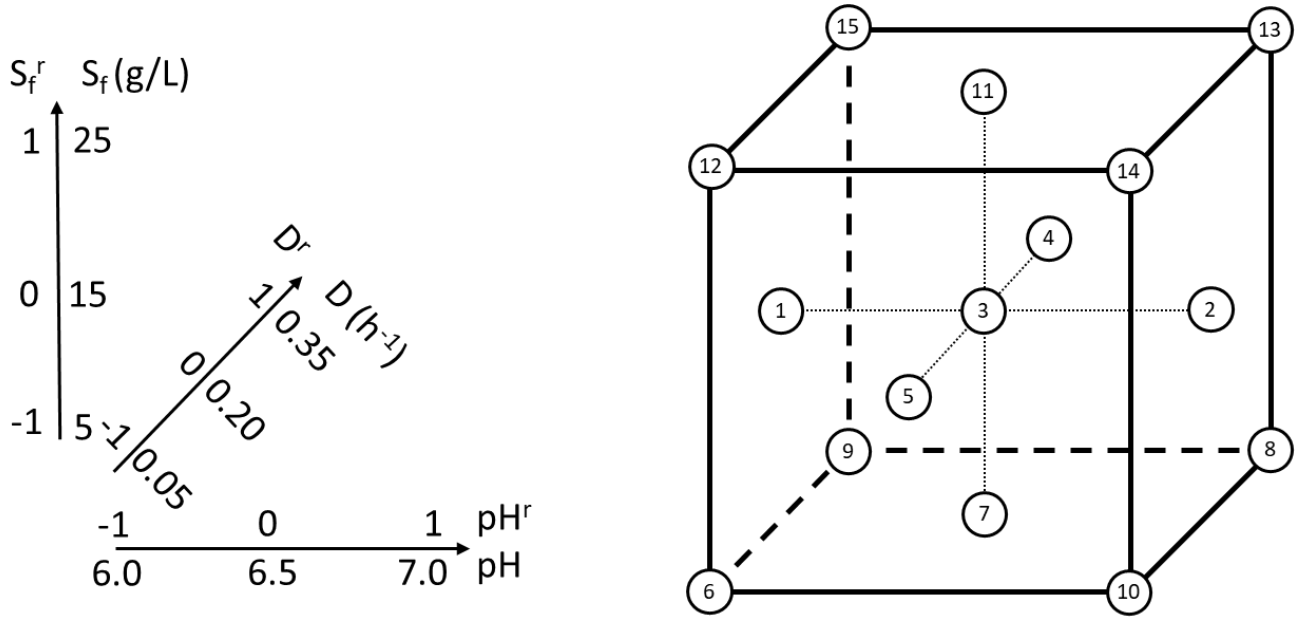


Figure 36. Cubic representation of the face centered central composite design, showing the setpoints of each parameter (real value and normalized value) and the order of runs.

Optimization method

An optimum was established when the studied responses were maximized, while the residual glucose concentration was below 0.2 g/L, which was the value considered as acceptable. A value of 0 g/L would be too restrictive and could severly impact the productivity. When multiple responses were maximized, the same weight was attributed to each one on the software, meaning that each response was considered equally important for determining the optimum.

Analytical methods

Hourly, 2 mL of the medium from the bioreactor were collected. The optical density of the samples were then measured at a wavelength of 600 nm (OD_{600}). The biomass concentration X can be related to OD_{600} by the formula: X (g/L) = OD_{600} × 0.34, as found in other works with *Clostridium* species (Groeger et al. 2017; Cotter et al. 2009). The samples were then centrifuged at 9600 x g for 1 minute to collect the supernatant, prior to metabolite analysis. The samples were analyzed with an Aminex HPX-87H (300 ×

7.8 mm) column (BioRad, USA), used to separate glucose, acetate, butyrate, lactate, acetone, ethanol and butanol. HPLC was performed at 65°C with 0.005 M H_2SO_4 as mobile phase at a flow of 0.7 mL/min. Compounds were revealed by a refractive index detector and a photodiode array detector. Preliminary calculations of the gas production can be made considering the following metabolic equations:

Acetate pathway: $C_6H_{12}O_6 + 2\ H_2O + 4\ ADP \rightarrow 2\ C_2H_4O_2 + 4\ H_2 + 2\ CO_2 + 4\ ATP$ (1)

Butyrate pathway: $C_6H_{12}O_6 + 3\ ADP \rightarrow C_4H_8O_2 + 2\ H_2 + 2\ CO_2 + 3\ ATP$ (2)

Lactate pathway: $C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_3H_6O_3 + 2\ ATP$ (3)

Ethanol pathway: $C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2 + 2\ ATP$ (4)

Butanol pathway: $C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP \rightarrow C_4H_{10}O + H_2O + 2\ CO_2 + 2\ ATP$ (5)

Acetone pathway: $C_6H_{12}O_6 + H_2O + 3\ ADP \rightarrow C_3H_6O + 4\ H_2 + 3\ CO_2 + 3\ ATP$ (6)

The volume of the whole biogas was evaluated with a gas counter “Ritter MilliGascounter®” (Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, Gemany). A volume is measured hourly to determine the biogas mean productivity. The gas composition was determined with a gas chromatograph “Micro GC Fusion®”, (Inficon, USA) placed after the gas counter. It is equipped with two modules, to measure quantitatively the composition of the whole biogas. The first module is composed of a “Rt-Molsieve 5Å, 0.25 mm-10m” column heated at 80°C for 90 seconds and a Thermal Conductivity Detector set at 70°C to detect O_2, N_2 and H_2 using argon as a carrier gas. The second module is composed of a “Rt-U-Bond, 0.25mm-12m” column set at 80°C for 25 seconds, then temperature increases to 130°C in 25 seconds and holds this value during 40 more seconds (total analysis time = 90 seconds). A TCD set at 60°C is used to measure CO_2.

Results and discussion

Setting of design of experiment for continuous culture of *C. pasteurianum*

The purpose of the DoE approach is to obtain a mathematical model able to best describe hydrogen production within the confines of the CCF and with a reasonable number of experiments. The central composite design was chosen in order to obtain experimental results for fermentation in the most extreme conditions, corresponding to the vertices of the cube in Figure 36. The borders of the three most studied influential parameters were set as wide as possible, as long as it enables bacterial growth, and without washing out the cells. Preliminary experiments were carried out to determine these borders (data not shown). Then, continuous culture of *C. pasteurianum* were carried out according to the design of experiments as indicated below.

Clostridium pasteurianum was cultivated under glucose limitation at dilution rate D (h^{-1}) ranging from 0.050 h^{-1} to 0.350 h^{-1}. 0.350 h^{-1} was the highest D value tested since a maximum growth rate (μ_{max}) of 0.35 ± 0.12 h^{-1} was calculated previously during early exponential phase of batch culture (Vauthier et al. 2025). In most cases, the residual glucose concentrations were undetectable, but four conditions reported a non-zero value, when at least one of the parameters D or S_f was set at maximum, as depicted in Table 9. The biomass also decreased at the higher dilution rate (Figure 37A). These phenomena were expected under carbon limitation, when the continuous culture reached the steady state, resulting in glucose accumulation in the culture medium (Table 9).

The repetition of the same culture conditions showed that changing the parameters during a same run has hardly any influence on the metabolites and gas production (Figures 37B and 37C).

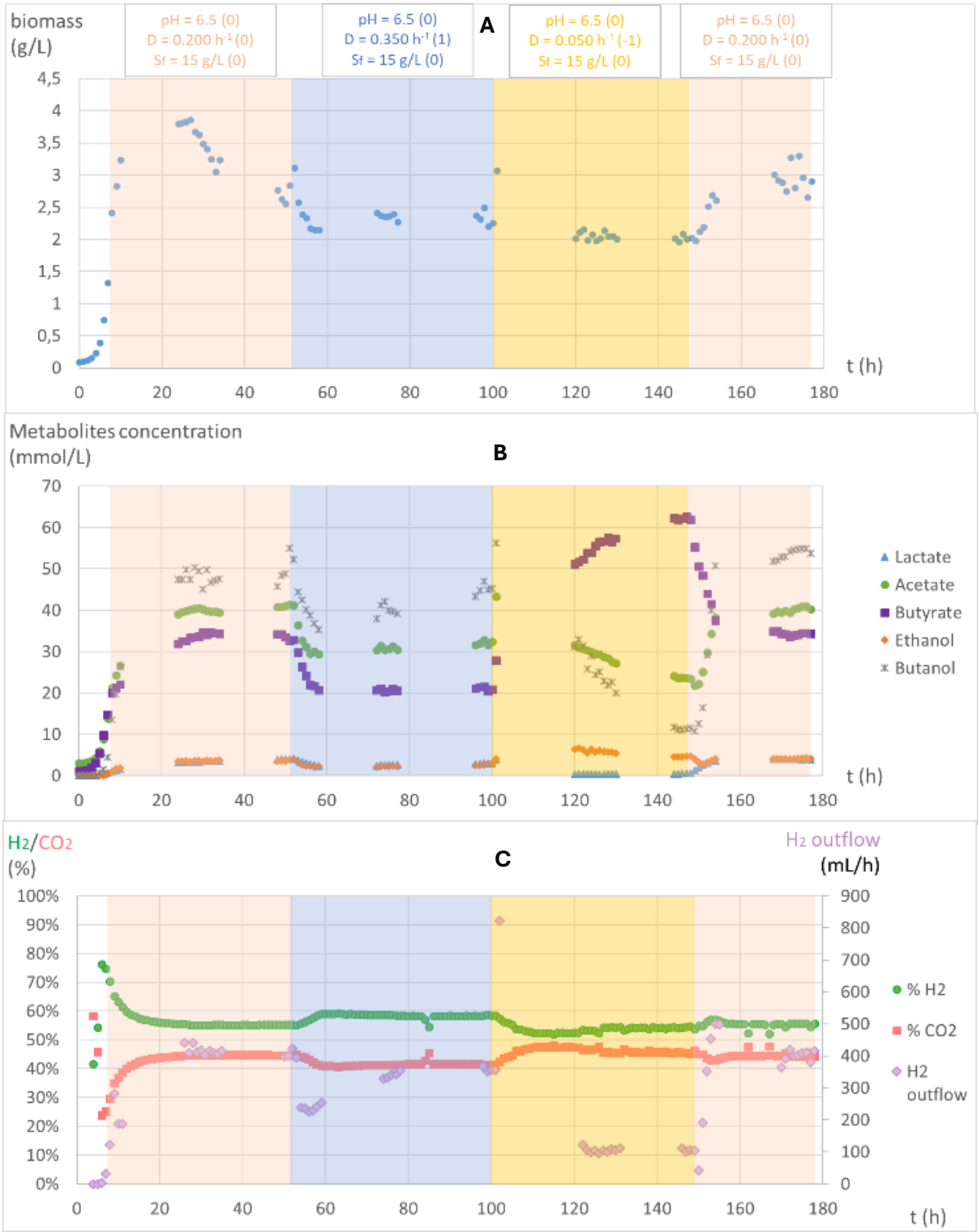


Figure 37. Monitoring of biomass (A), metabolites (B) and gas (C) productions during a typical continuous culture with *C. pasteurianum* ATCC 6013, when testing three conditions. A same condition is repeated to confirm that the previous different condition does not affect the final steady state in terms of productions.

Table 9. Calculation of carbon and electronic flows, with specific consumption and production (in meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}) and several ratios for the fermentation experiments carried out at pH = 7.0.

D (h^{-1})	**0.050**	**0.050**	**0.200**	**0.350**	**0.350**
S_f ($g·L^{-1}$)	5	25	15	5	25
$F_{glucose}$ ($mmol·L^{-1}·h^{-1}$)	1.39	6.94	16.67	9.72	48.61
Residual glucose $\bar{s}$ ($mmol·L^{-1}$)	0.00	0.00	0.00	0.00	29.98
Biomass concentration $\bar{x}$ ($g·L^{-1}$)	0.66	1.95	2.51	1.14	3.34
$Y_{X/S}$ ($g_{cell}·g_{glucose}^{-1}$)	0.13	0.08	0.17	0.23	0.13
$q_{glucose}$ ($mmol·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	2.10	3.56	6.64	8.53	11.41
$q_{acetate}$ ($meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	1.84	1.72	5.70	5.47	6.31
$q_{butyrate}$ ($meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	4.92	7.73	10.14	16.91	9.78
$q_{lactate}$ ($meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	0.06	0.12	0.80	0.68	1.72
$q_{ethanol}$ ($meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	0.36	0.34	0.39	0.00	1.28
$q_{butanol}$ ($meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	1.23	0.80	13.88	1.37	10.46
$q_{pyruvate}$ ($meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	8.40	10.72	30.90	24.44	29.56
$R_{bu/pyr}$ ($mol·mol^{-1}$)	0.29	0.36	0.17	0.35	0.17
$R_{ac/bu}$ ($mol·mol^{-1}$)	0.75	0.45	1.12	0.65	1.29
$R_{acids/solvents}$ ($mol·mol^{-1}$)	4.40	7.57	1.47	20.36	1.72
$R_{acids/pyr}$ ($mol·mol^{-1}$)	0.51	0.52	0.35	0.58	0.39
$R_{solvents/pyr}$ ($mol·mol^{-1}$)	0.12	0.07	0.24	0.03	0.22
Theo q_{H_2} ($mmol·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	4.30	5.59	10.76	13.93	11.20
Obs q_{H_2} ($mmol·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	0.0	3.5	6.1	9.7	11.3
Theo $Y_{H_2/S}$ ($mol·mol^{-1}$)	2.04	1.57	1.62	1.63	0.98
Y_{ATP} ($g_{cell}·mol_{ATP}^{-1}$)	7.89	6.15	23.09	7.68	17.42
q_{NADH} produced ($mmol·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	4.19	5.34	15.32	12.11	14.49
q_{NADH} consumed ($mmol·g_{cell}^{-1}·h^{-1}$)	4.07	5.05	19.61	10.05	17.20
q_{NADH} produced/q_{NADH} consumed	1.03	1.06	0.78	1.20	0.84

Influence of dilution rate on the evaluated responses

According to Figure 38A and 38B, both the hydrogen outflow and the ratio R_{H_2/CO_2} increased along with the increase of dilution rate. Due to the increase in the specific growth rates with the increase in the dilution rates, the ATP requirements were also higher for cell growth and division (Guerrero et al. 2021) (Dürre 2014). This can be explained by the increase in the specific glucose consumption rate with D. As a consequence, the specific production rate of acetate and butyrate increased consequently (Table 9 and Figure 39A), since both products have the most favorable pathways for ATP generation. This effect is observed in continuous cultures with *Clostridium*, regardless to the strain or the substrate used (Godin and Engasser 1990; Papanikolaou et al. 2004). These pathways are associated to the highest H_2 production as well. Therefore, as expected, it explains the higher H_2 productivity and higher R_{H_2/CO_2} observed at the highest dilution rate. The increase of R_{H_2/CO_2} along with the increase of the acetate and butyrate ratio was already reported with *C. butyricum* LMD 77-11 (van Andel et al. 1985). Interestingly, at a certain point, the butyrate pathway appeared to be overloaded, resulting in a much stronger production of butanol (Figure 39B and Table 9), and therefore a slowdown of the R_{H_2/CO_2} increase (Figure 38B).

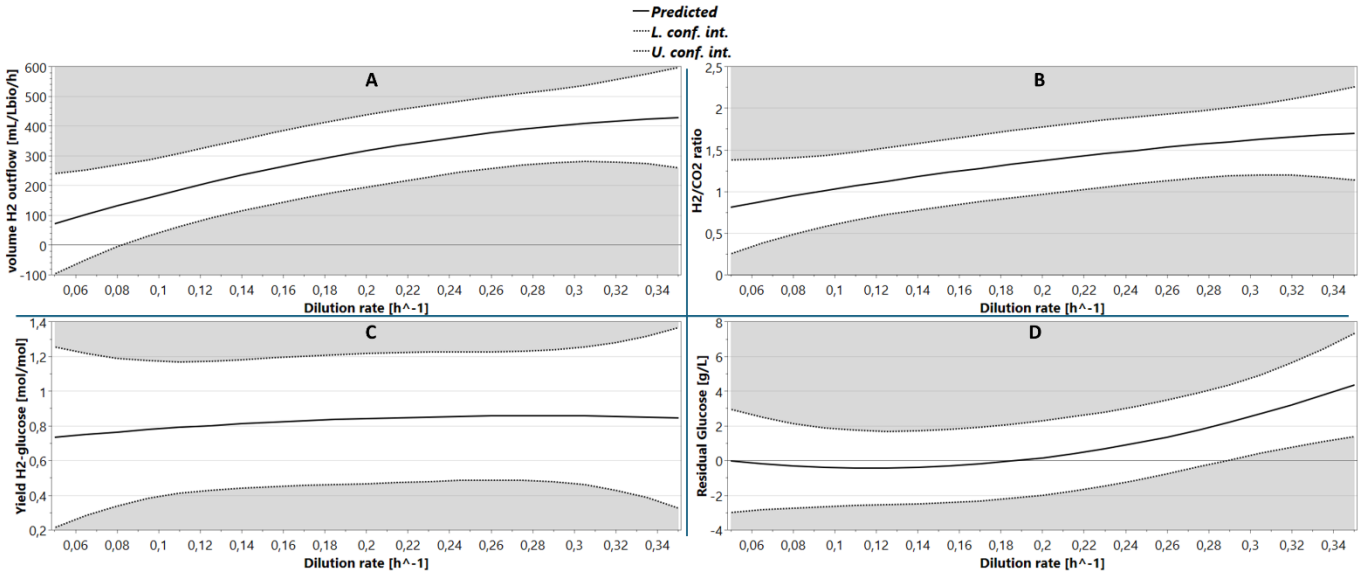


Figure 38. Effect of the dilution rate only on H_2 productivity (A), R_{H_2/CO_2} (B), $Y_{H_2/S}$ (C), and residual glucose (D), when the pH and the feeding substrate concentration are kept constant at their central value. The continuous black line depicts the evolution of the predicted mean value. The white area between the dotted lines represents the 95% confidence interval.

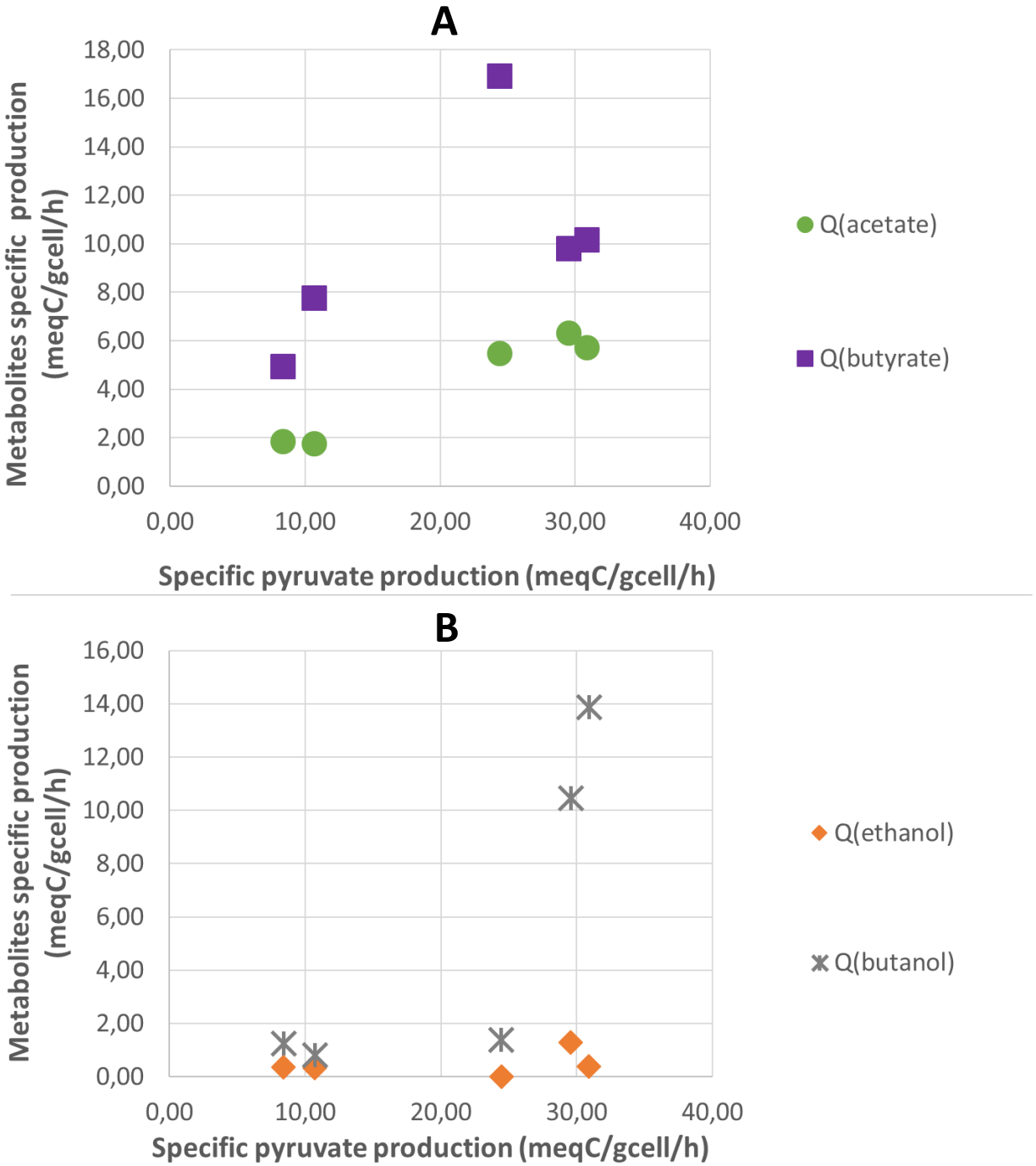


Figure 39. Specific production rates of organic acids (A) and solvents (B) of *C. pasteurianum* ATCC 6013 in continuous culture at pH = 7.0, depending on the pyruvate specific production rate.

This phenomenon also applied for the $Y_{H_2/S}$, which encountered a stagnation at 0.82 mol/mol between D = 0.180 h^{-1} and 0.350 h^{-1} according to the model (Figure 38C). It could be due to a significant use of glucose for biomass formation, instead of gas production, when working with planktonic cells, as depicted by the relationship between $q_{glucose}$ and $q_{pyruvate}$ in Figure 40. However, the increase in the dilution rate at 0.350 h^{-1} often led to a significant increase in the residual glucose concentrations (Figure 38D), which was not desirable.

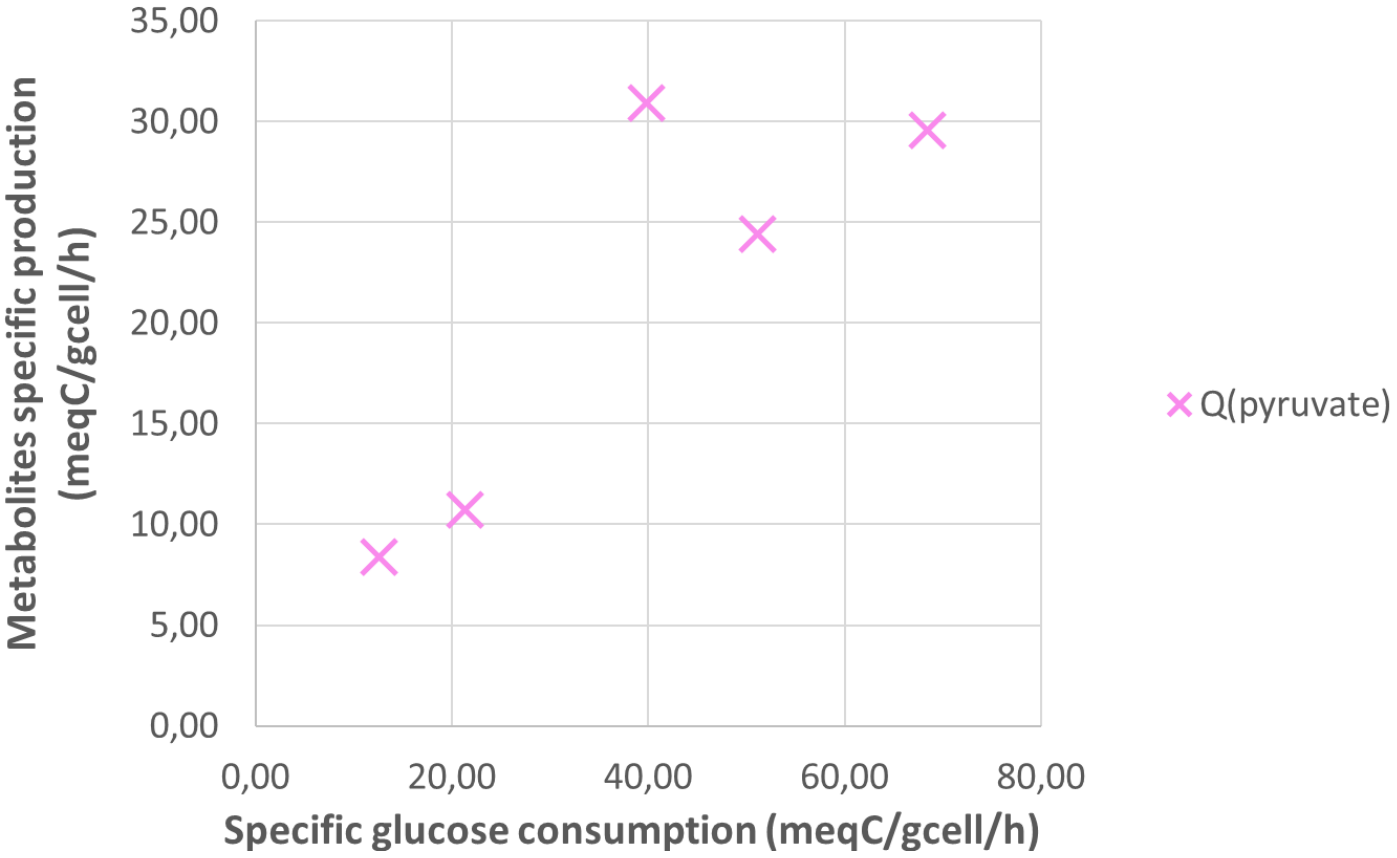


Figure 40. Specific production rate of pyruvate depending on specific glucose consumption rate at pH = 7.0.

Influence of pH on the evaluated responses

The highest hydrogen volume production rates were found at the extreme pH conditions, predicted at 400 mL/L/h and 410 mL/L/h, at pH = 6.0 and pH = 7.0 respectively. Conversely, the lowest production rate, of 310 mL/L/h was obtained close to the central value at pH = 6.5 (Figure 41A). The same trend was observed with the molar yield $Y_{H_2/S}$ (Figure 41C). The higher the pH, the higher the molar ratio R_{H_2/CO_2}, with a linear correlation (coefficient of 0.22·pH) between both (Figure 41B). This phenomenon is commonly observed with the cultures involving *Clostridium* species, regardless to the culture mode (Shaterzadeh and Ataei 2017; van Andel et al. 1985). It can be explained by the electron excess at higher pH, creating a more reducing environment, enabling the production of more acetate than butyrate, and thus H_2 (Thauer et al. 1977).

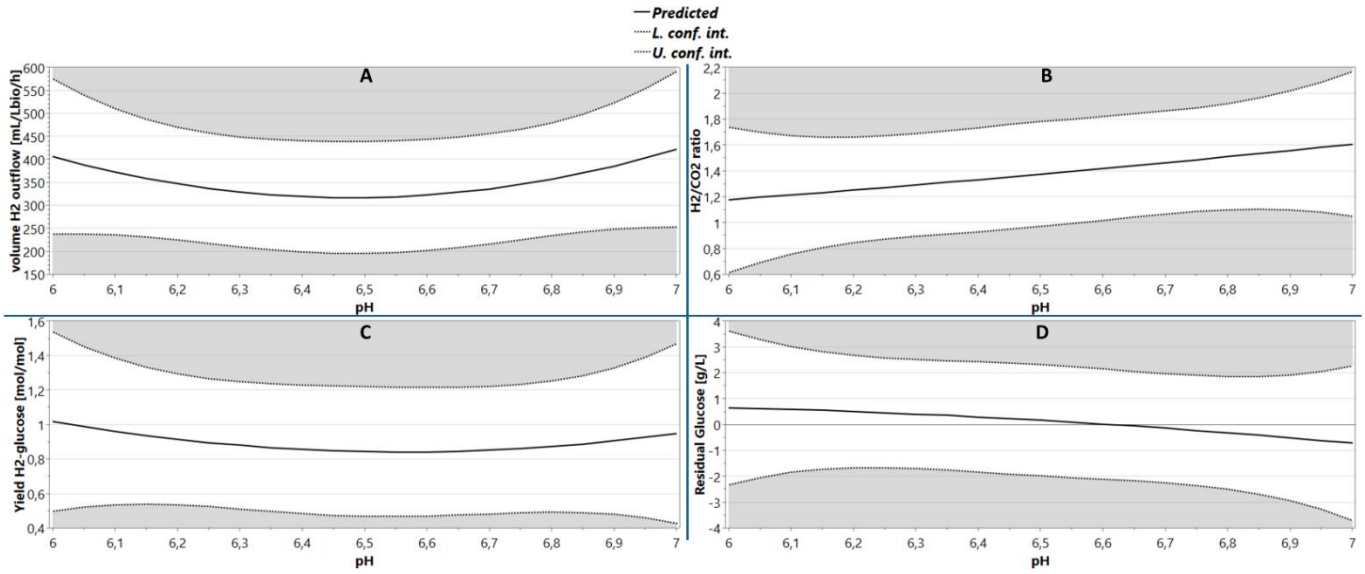


Figure 41. Effect of the pH on H_2 productivity (A), R_{H_2/CO_2} (B), $Y_{H_2/S}$ (C), and residual glucose (D), when the dilution rate and the feeding substrate concentration are kept constant at their central value. The continuous black line depicts the evolution of the predicted mean value. The white area between the dotted lines represents the 95% confidence interval.

However, the electron excess in the environment also results into a higher formation of alcohols such as ethanol and butanol (Table 9), which is not related to H_2 production. Another explanation is the lower difference between intracellular pH and extracellular pH when bacteria are cultured close to neutral conditions, where electrochemical gradients are weaker than in acidic conditions. Therefore, the ATP requirements for membrane transports are higher, leading to a more intense acetate synthesis (van Andel et al. 1985; Huang et al. 1986; Riebeling et al. 1975). On the other hand, at pH = 6.0, the higher H_2 production came with higher extracellular concentrations of acetate and butyrate and low alcohols production (Table 9), despite the low R_{H_2/CO_2} values (Figure 38), which can be observed with other *Clostridium* species (Huang et al. 1986). This may be due to the lower clostridial hydrogenase specific activity at pH = 7.0, as suggested in previous works (Adams and Mortenson 1984) (Liu et al. 2011). Interestingly, with lower pH values is associated a decrease in glucose uptake capacities, leading to approximately 0.6 g/L of residual glucose at pH = 6.0 (Figure 41D). Once again, a potential explanation relies on the difference between the intracellular pH and the extracellular pH, which is more important with lower pH of the medium (Huang et al. 1986) (Vasconcelos et al. 1994). In these conditions, organic acids released in the medium were able to go through the plasma membrane into the cell. The higher intracellular pH caused the acids to become deprotonated. This resulted in a charged molecule which was no longer able to go through the membrane, to the culture medium (Whitham et al. 2018). Consequently, the accumulation of intracellular acids was hardly compatible with the production of additional acetate and butyrate by glucose consumption, which can explain the slow-down in terms of glucose uptake in our processes at pH = 6.0.

Influence of feeding substrate concentration

As indicated in Figure 42A, when the substrate concentrations increased in the feeding medium, higher hydrogen productivities were observed. However, the increase encountered a slowdown at a point (prediction of the improvement of the H_2 productivity of 15% only, when S_f increased from 18 g/L to 25 g/L). Moreover, R_{H_2/CO_2} started to decrease when the glucose concentration reached 18 g/L, and were approximately 7% lower at 25 g/L (Figure 42B). Culture medium analyses showed that the increase in acetate and butyrate productions were less intense than the increase in ethanol and butanol productions, leading to a higher proportion of CO_2 (Figure 39). The results indicated the existence of a threshold where the acetate and butyrate pathways are overloaded (Figure 39 and Table 9). The remaining substrate

was then converted into alcohols, even though the ATP production efficiency is lower, but with the advantage to improve the redox balance, as displayed by the flows of produced and consumed NADH in Table 9. Interestingly, the lactate production rate did not show high levels, compared to the other metabolites, with only 1.72 meqC·g_{cell}^{-1}·h^{-1}, although its pathways is balanced in a redox point of view.

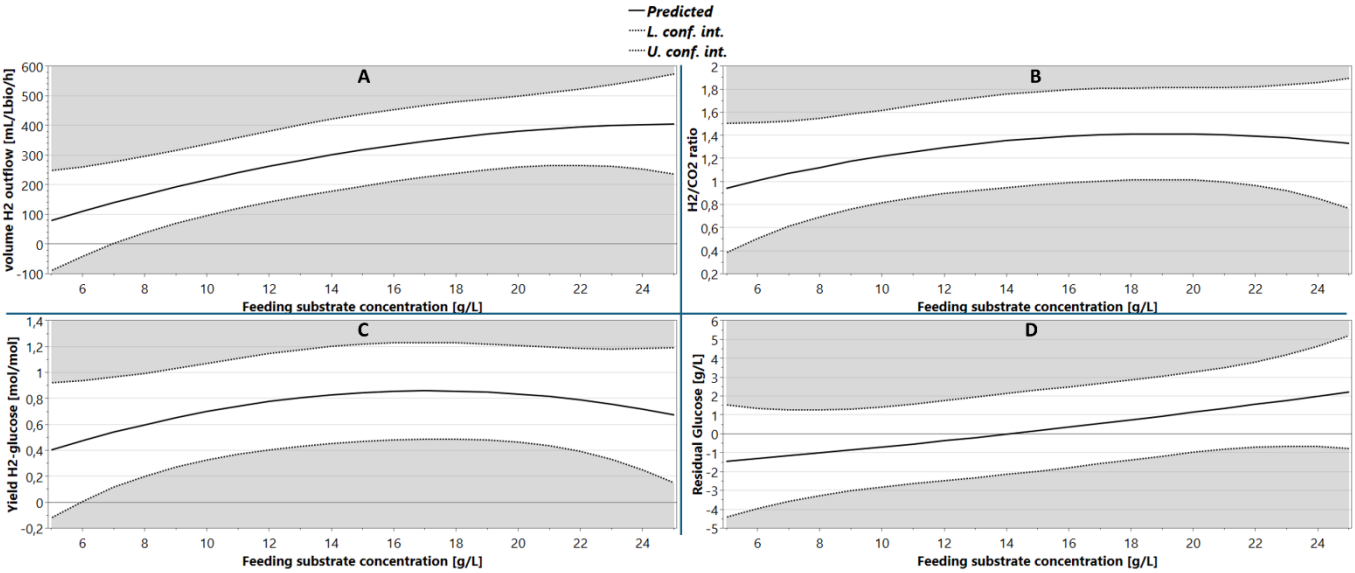


Figure 42. Effect of the feeding substrate concentration on H_2 productivity (A), R_{H_2/CO_2} (B), $Y_{H_2/S}$ (C), and residual glucose (D), when the dilution rate and the pH are kept constant at their central value. The continuous black line depicts the evolution of the predicted mean value. The white area between the dotted lines represents the 95% confidence interval.

Similar results were reported in continuous cultures, with other *Clostridium* species and other substrates, with slower acetate and butyrate productions, in favor of alcohols such as ethanol or 1,3-propanediol, when cellulose or glycerol were used as a substrate, respectively (Magnusson et al. 2009) or (Papanikolaou et al. 2004). Consequently, $Y_{H_2/S}$ follows the same trend.

Study of the interactions by modeling of dilution rate, feeding substrate concentration, and pH influence

The equations which model each response are reported in Eqs (7-10). The values of the parameters used here are the centered reduced values. This result enabled to refine the effect of the factors, by showing other trends which would have not been visible by the approach of changing one factor at a time.

H_2 volume productivity ($mL_{gas}/(L_{bioreactor} \cdot h)$)	$= 316.8 + 7.8pH^r + 178.9D^r + 162.4S_f^r + 96.8pH^{r2} - 66.2D^{r2} - 74.7S_f^{r2} + 29.1pH^r \cdot D^r + 28.3pH \cdot S_f^r + 78.6D^r \cdot S_f^r$	(7)
R_{H_2/CO_2} (mol/mol)	$= 1.37 + 0.22pH^r + 0.44D^r + 0.19S_f^r + 0.02pH^{r2} - 0.12D^{r2} - 0.24S_f^{r2} + 0.16pH^r \cdot D^r - 0.01pH^r \cdot S_f^r - 0.26D^r \cdot S_f^r$	(8)
$Y_{H_2/S}$ (mol/mol)	$= 0.84 - 0.03pH^r + 0.06D^r + 0.14S_f^r + 0.14pH^{r2} - 0.05D^{r2} - 0.31S_f^{r2} + 0.03pH^r \cdot D^r + 0.02pH^r \cdot S_f^r - 0.34D^r \cdot S_f^r$	(9)
Residual glucose (g/L)	$= 0.16 - 0.68pH^r + 2.20D^r + 1.83S_f - 0.20pH^{r2} + 2.02D^{r2} + 0.22S_f^{r2} - 0.86pH^r \cdot D^r - 0.86pH^r \cdot S_f^r + 2.19D^r \cdot S_f^r$	(10)

The interaction between D and pH had a moderate positive impact on H_2 volume productivity (coefficient of 29.1). The same trend was observed for the $pH \cdot S_f$ interaction. For the $D \cdot S_f$ interaction, the impact was much stronger (coefficient of 78.6), which was expected because the increase of D or S_f means that the substrate inflow per hour will be higher, resulting in a higher glucose consumption at the steady state, and therefore a higher H_2 production. However, the coefficients of the interactions involving D and S_f are lower than the coefficients of the effect taken alone, which put the interactions effects into perspective concerning the productivity.

Concerning the ratio R_{H_2/CO_2}, this response was moderately increased by the $pH \cdot D$ interaction. $pH \cdot S_f$ interaction did not show any strong effect on this response (coefficient of -0.01). The $D \cdot S_f$ interaction had a strong negative effect on R_{H_2/CO_2}, similar in intensity to that of D or S_f alone.

For the molar yield $Y_{H_2/S}$, no strong effect with $pH \cdot D$ and $pH \cdot S_f$ could be reported (coefficients of 0.03 and 0.02 respectively). $D \cdot S_f$ interaction also had a strong negative effect on this response, which could be expected, because increasing the inflow of substrate by both increasing D and S_f did not allow the

bacteria to properly use the acetate and butyrate pathways. Consequently, a significant portion of the substrate was used to produce alcohols, used as unloading pathways, without H_2 production. The interaction effect here is stronger than the effect of D alone.

The interactions pH·D and pH·S_f had negative effects on the concentration of residual glucose, along with the pH taken independently. Conversely, D·S_f greatly increased this response, due to the expected washout of the substrate when the concentration is high and the retention time is low. This followed the same trend as D and S_f taken individually.

Globally, D·S_f displayed the strongest interaction effects, which seems logical, because increasing both factors results in a strong increase in incoming substrate inside the bioreactor. The other interactions are sometimes negligible, meaning that pH could be considered an independent factor.

Comparison of the optimal conditions

Using optimized parameters to maximize hydrogen productivity only, more than 700 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ were found. But, in this condition, high residual glucose concentration (over 5 g/L), would be obtained. It appears more convenient to reduce the dilution rate and the feeding substrate concentration to have a better yield and a convenable productivity of approximately 500 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ (Table 10). To avoid a significant substrate waste, all determined optima followed conditions where no residual glucose (< 0.2 g/L) were predicted.

Considering a direct use of produced H_2, it would appear more interesting to use the conditions where the maximal H_2 productivity is achieved (Figure 43, mark "+", Table 10). For a process aiming to be more environmentally friendly by reducing its CO_2 emissions, maximizing R_{H_2/CO_2} is the most interesting way (Figure 43, mark "○", Table 10). Finally, when considering the economic aspects of the process, the most important parameter to optimize is $Y_{H_2/S}$, especially when the substrate shows a high cost (Figure 43, mark "▲", Table 10).

In this work, the most important parameters were the hydrogen production rate, as well as R_{H_2/CO_2}. The $Y_{H_2/S}$ was not considered as important, knowing that for an industrial process, glucose would be replaced by low-value byproducts. However, Thus, the optimal settings which satisfied these conditions, with the same weight given to the hydrogen productivity and R_{H_2/CO_2}, were **pH = 7.0, D = 0.230 h^{-1}, S_f = 17 g/L**. (Figure 43, mark "four-branched star", Table 10).

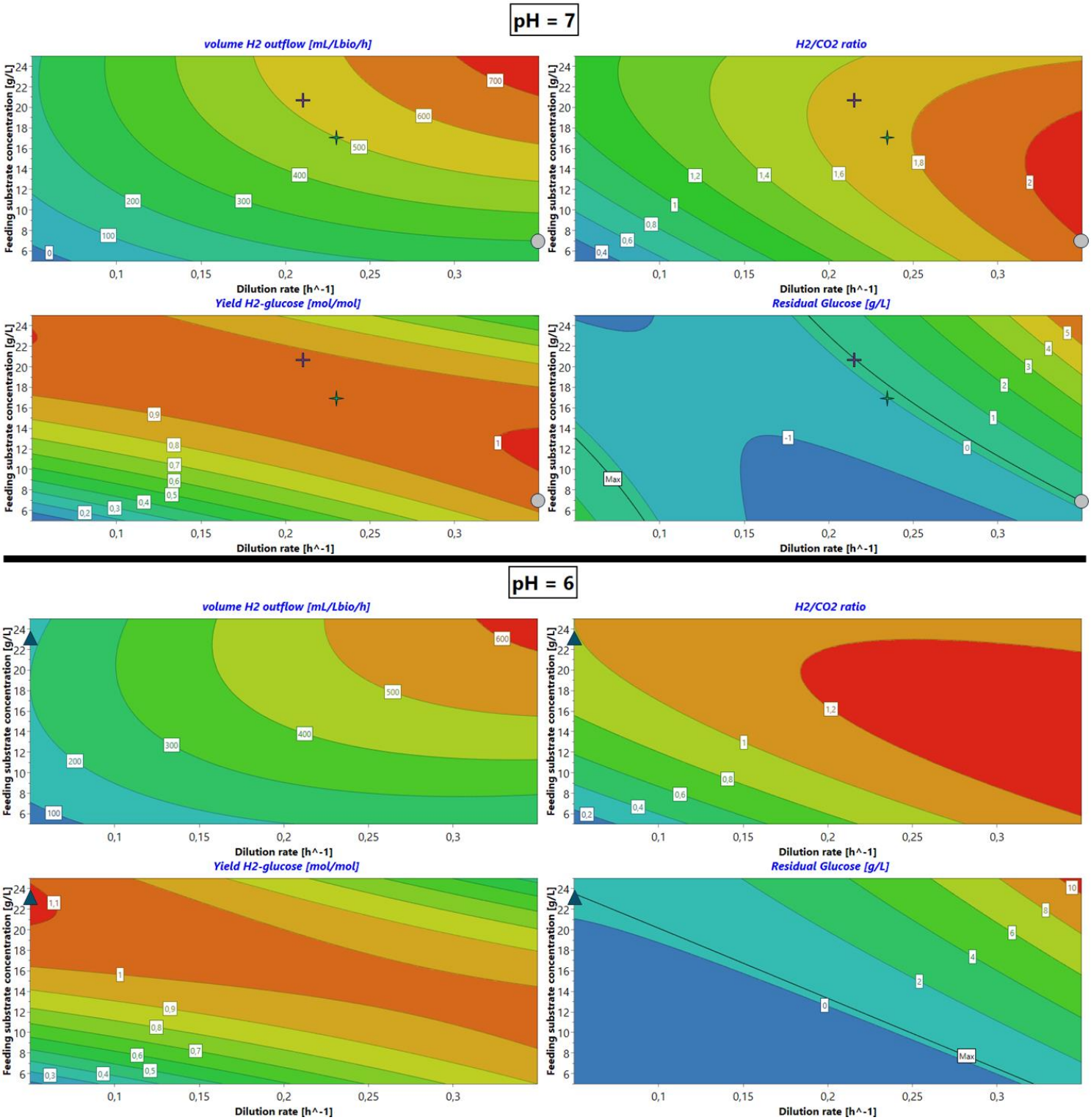


Figure 43. 2D-responses surfaces of the four evaluated parameters, as functions of pH, dilution rate and feeding substrate concentration. The optimal setpoints are chosen to have a maximal residual glucose concentration below 0.2 g/L.

Table 10. Predicted values of each response and their associated optimal factor setpoints, depending on the chosen optimized response(s). The values in parentheses correspond to the reduced factor levels.

Optimized response(s)	Optimal pH	Optimal D (h^{-1})	Optimal S_f (g/L)	H_2 volume productivity ($mL_{gas}/(L_{bioreactor} \cdot h)$)	R_{H_2/CO_2} (mol/mol)	$Y_{H_2/S}$ (mol/mol)	Residual glucose (g/L)
H_2 volume productivity	7 (1)	0.216 (0.107)	20.70 (0.57)	**532**	1.68	0.92	0.20
R_{H_2/CO_2}	7 (1)	0.350 (1)	6.85 (-0.815)	297	**1.99**	0.93	0.20
$Y_{H_2/S}$	6 (-1)	0.050 (-1)	23.00 (0.8)	186	0.99	**1.11**	0.16
H_2 volume productivity + R_{H_2/CO_2}	7 (1)	0.230 (0.2)	17.00 (0.2)	**499**	**1.74**	**0.97**	-0.08

Validation of the selected optimal conditions prediction

To ensure the accuracy of the mathematical model given by the DoE, a fermentation experiment was performed with the optimized parameter settings (pH = 7.0, D = 0.230 h^{-1}, S_f = 17 g/L). The main results are displayed in Table 11.

In this fermentation experiment, H_2 productivity at the steady state was reported at 490 mL_{H_2}/L/h, which is only 2% lower than the predicted value. The difference is stronger for the ratio R_{H_2/CO_2}, showing a value 16.5% lower. Finally, the yield $Y_{H_2/S}$ was found to be only 4% higher than the model.

Therefore, the differences between the model and the experiments are below 17%, which indicates that the model aligns with reality overall.

Table 11. Comparison between the theoretical performances of H_2 production at the optimal setpoint provided by the DoE, and the results of the fermentation experiments.

Conditions	pH	D (h^{-1})	S_f (g/L)	H_2 volume productivity ($mL_{gas}/(L_{culture} \cdot h)$)	RH_2/CO_2 (mol/mol)	YH_2/S (mol/mol)	Residual glucose (g/L)
DoE predicted optimal H_2 volume productivity + RH_2/CO_2 in continuous mode	7	0.230	17.00	499	1.74	0.97	-0.08
Verification experiment	7	0.230	17.00	490	1.45	1.01	0
Batch culture (Vauthier et al. 2026)	6	_	20.00 (initial)	Maximum of 866	1.03	1.73	0

Comparison with scientific literature

The productivity value of 500 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$ was in the same order of magnitude as with a degenerated strain of *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Guerrero et al. 2021). Concerning the ratio R_{H_2/CO_2}, the maximum achievable value is 1.99 mol/mol (Table 10). However, when maximizing both the production rate and R_{H_2/CO_2}, a predicted value of 1.74 mol/mol could still be found, which is much higher (+68%) than the value previously found when fermentations were carried out in batch mode (Table 11). This shows that the continuous mode would preferentially use the acetate and butyrate pathways, which are the high energy producing pathways to sustain the permanent growth phase. Nonetheless, values reported by Magnusson et al. were measured between 0.63 mol/mol and 0.77 mol/mol. This could possibly due to the low dilution rate of 0.04 h^{-1}, which does not use intensely the acetate and butyrate pathways (Magnusson et al. 2009). However, the maximal yield $Y_{H_2/S}$ found in this study was found to be 36% lower than the yield performed with the same strain in our previous study with batch cultures (Vauthier et al. 2025) and then the yields observed with the numerous batch studies in general (Wang and Yin 2021). This can be explained by the significant amount of substrate used by biomass synthesis instead of metabolites and gas, which is lost due to high specific growth imposed in the continuous cultures. To avoid this effect, other solutions are explored, consisting on immobilizing or recycling the biomass. Sim et al. were able to reach both remarkable productivities (≈ 3900 $mL_{H_2}/L/h$) and yield ($Y_{H_2/S}$ = 3.07 ± 0.13 mol/mol) with *C. pasteurianum* by using a membrane bioreactor. Mitchell et al. were able

to reach 1-2 L_{H_2}/L/h and yields of 2.0-3.0 $mol_{H_2}/mol_{glucose}$ by using *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 immobilized on a polyurethane matrix (Mitchell et al. 2009). Both studies show interesting results by combining high feeding substrate concentration and low dilution rates (hydraulic retention time of several hours), which enable the bacteria to consume high quantities of substrate. Here, H_2 productivities relies on the strong cell density inside of the bioreactor. This approach is different from our because H_2 productivity does not rely on the high dilution rate to conduct the carbon flow to acetate and ATP production to counter the cells washout. It would have been interesting to measure the ratio between acetate and butyrate, as well as the ratio between H_2 and CO_2 in those studies. Though, R_{H_2/CO_2} is rarely evaluated when culturing *Clostridium* in continuous mode. Nonetheless, Van Andel et al. reported a maximal value R_{H_2/CO_2} = 1.27 by carrying on a continuous culture with *C. butyricum* LMD 77-11 at pH = 6 with a dilution rate of 0.3 h^{-1} and a feeding glucose concentration of 10 g/L. This value is close to the one found in our model with *C. pasteurianum* ATCC 6013 (R_{H_2/CO_2} = 1.24), showing similarities of clostridial metabolisms.

Conclusions

This study depicts the performances of biohydrogen production by *C. pasteurianum* ATCC 6013 in continuous mode. The optimization of several parameters thanks to a Design of Experiments approach was investigated and the resulting mathematical model shows promising results, in accordance with available data on clostridial metabolism and performances found in the literature. Ideal parameters were set at pH = 7.0, D = 0.230 h^{-1}, S_f = 17 g/L and experimental fermentation to verify the optimum were carried out with satisfying results. Therefore, applying DoE to other types of cultures, such as immobilized cells or with other carbon sources as substrates would be feasible. Consequently, this approach could provide additional insights into clostridial cultivation and is subject to improvement for H_2 production. For instance, other factors such as temperature or the mineral composition of the medium can also be taken into account (Van Ginkel et al. 2001) (Shaterzadeh and Ataei 2017) (Ergal et al. 2020) (Wang and Wan 2008).

References

Adams, M W, and L E Mortenson. 1984. “The Physical and Catalytic Properties of Hydrogenase II of Clostridium Pasteurianum. A Comparison with Hydrogenase I.” *Journal of Biological Chemistry* 259 (11): 7045–55. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39835-6.

Andel, J. G. van, G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure. 1985. “Glucose Fermentation byClostridium Butyricum Grown under a Self Generated Gas Atmosphere in Chemostat Culture.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 23 (1): 21–26. https://doi.org/10.1007/BF02660113.

Argun, Hidayet, and Fikret Kargi. 2011. “Bio-Hydrogen Production by Different Operational Modes of Dark and Photo-Fermentation: An Overview.” *International Journal of Hydrogen Energy*, Hysydays, vol. 36 (13): 7443–59. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116.

Bayer, Benjamin, Gerald Striedner, and Mark Duerkop. 2020. “Hybrid Modeling and Intensified DoE: An Approach to Accelerate Upstream Process Characterization.” *Biotechnology Journal* 15 (9): 2000121. https://doi.org/10.1002/biot.202000121.

Biebl, H. 2001. “Fermentation of Glycerol by Clostridium Pasteurianum — Batch and Continuous Culture Studies.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27 (1): 18–26. https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000155.

Cotter, Jacqueline L., Mari S. Chinn, and Amy M. Grunden. 2009. “Ethanol and Acetate Production by Clostridium Ljungdahlii and Clostridium Autoethanogenum Using Resting Cells.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (3): 369–80. https://doi.org/10.1007/s00449-008-0256-y.

De Castro, Pedro Felipe Dassie Leonel, Rafael De Moraes Altafini, Jonatã Bortolucci, Jaques Florêncio, Maria Lucia Arruda Moura Campos, and Valeria Reginatto. 2025. “Exploiting 1,3-Propanediol Production by a Clostridium Beijerinckii Strain: The Role of Glycerol and Ammonium Sulfate Concentrations.” *Fermentation* 11 (4): 187. https://doi.org/10.3390/fermentation11040187.

Decker, K., K. Jungermann, and R. K. Thauer. 1970. “Energy Production in Anaerobic Organisms.” *Angewandte Chemie International Edition in English* 9 (2): 138–58. https://doi.org/10.1002/anie.197001381.

Dürre, Peter. 2014. “Physiology and Sporulation in *Clostridium*.” *Microbiology Spectrum* 2 (4): 2.4.10. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012.

Ergal, İpek, Oliver Gräf, Benedikt Hasibar, et al. 2020. “Biohydrogen Production beyond the Thauer Limit by Precision Design of Artificial Microbial Consortia.” *Communications Biology* 3 (1): 1. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01159-x.

Fachal-Suárez, Manuel, Santhana Krishnan, Sumate Chaiprapat, Daniel González, and David Gabriel. 2024. “An Overview of Biomethanation and the Use of Membrane Technologies as a Candidate to Overcome H2 Mass Transfer Limitations.” *Biotechnology Advances* 77 (December): 108465. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108465.

Fick, M., P. Pierrot, and J. M. Engasser. 1985. “Optimal Conditions for Long-Term Stability of Acetone-Butanol Production by Continuous Cultures ofClostridium Acetobutylicum.” *Biotechnology Letters* 7 (7): 503–8. https://doi.org/10.1007/BF01199869.

Godin, C., and J. M. Engasser. 1990. “Two-Stage Continuous Fermentation of Clostridium Acetobutylicum: Effects of pH and Dilution Rate.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 33 (3): 269–73. https://doi.org/10.1007/BF00164520.

Grimmler, Christina, Holger Janssen, Desireé Krauβe, et al. 2011. “Genome-Wide Gene Expression Analysis of the Switch between Acidogenesis and Solventogenesis in Continuous Cultures of Clostridium Acetobutylicum.” *Microbial Physiology* 20 (1): 1–15. https://doi.org/10.1159/000320973.

Groeger, Christin, Wei Wang, Wael Sabra, Tyll Utesch, and An-Ping Zeng. 2017. “Metabolic and Proteomic Analyses of Product Selectivity and Redox Regulation in Clostridium Pasteurianum Grown on Glycerol under Varied Iron Availability.” *Microbial Cell Factories* 16 (April): 64. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0678-9.

Guedon, Emmanuel, Mickaël Desvaux, and Henri Petitdemange. 2000. “Kinetic Analysis of Clostridium Cellulolyticum Carbohydrate Metabolism: Importance of Glucose 1-Phosphate and Glucose 6-Phosphate Branch Points for Distribution of Carbon Fluxes Inside and Outside Cells as Revealed by Steady-State Continuous Culture.” *Journal of Bacteriology* 182 (7): 2010–17.

Guerrero, Karlo, Roberto Gallardo, Iván Paredes, et al. 2021. “Continuous Biohydrogen Production by a Degenerated Strain of Clostridium Acetobutylicum ATCC 824.” *International Journal of Hydrogen Energy* 46 (7): 7. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.104.

Harris, Janet, R. Mulder, D. B. Kell, R. P. Walter, and J. G. Morris. 1986. “Solvent Production byClostridium Pasteurianum in Media of High Sugar Content.” *Biotechnology Letters* 8 (12): 889–92. https://doi.org/10.1007/BF01078654.

Hay, Jacqueline Xiao Wen, Ta Yeong Wu, Joon Ching Juan, and Jamaliah Md. Jahim. 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 (3): 334–52. https://doi.org/10.1002/bbb.1403.

Huang, Li, Cecil W. Forsberg, and L. N. Gibbins. 1986. “Influence of External pH and Fermentation Products on *Clostridium Acetobutylicum* Intracellular pH and Cellular Distribution of Fermentation Products.” *Applied and Environmental Microbiology* 51 (6): 1230–34. https://doi.org/10.1128/aem.51.6.1230-1234.1986.

Liu, I.-Chun, Liang-Ming Whang, Wei-Jie Ren, and Pei-Ying Lin. 2011. "The Effect of pH on the Production of Biohydrogen by Clostridia: Thermodynamic and Metabolic Considerations." *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (1): 439–49. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.045.

Magnusson, Lauren, Nazim Cicek, Richard Sparling, and David Levin. 2009. "Continuous Hydrogen Production during Fermentation of α-Cellulose by the Thermophillic Bacterium Clostridium Thermocellum." *Biotechnology and Bioengineering* 102 (3): 759–66. https://doi.org/10.1002/bit.22092.

Meher Kotay, Shireen, and Debabrata Das. 2008. "Biohydrogen as a Renewable Energy Resource—Prospects and Potentials." *International Journal of Hydrogen Energy*, IWHE 2006, vol. 33 (1): 258–63. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.031.

Melitos, George, Xenofon Voulkopoulos, and Anastasia Zabaniotou. 2021. "Waste to Sustainable Biohydrogen Production Via Photo-Fermentation and Biophotolysis − A Systematic Review." *Renewable Energy and Environmental Sustainability* 6: 45. https://doi.org/10.1051/rees/2021047.

Mitchell, Robert J., Ji-Seong Kim, Byung-Seung Jeon, and Byoung-In Sang. 2009. "Continuous Hydrogen and Butyric Acid Fermentation by Immobilized Clostridium Tyrobutyricum ATCC 25755: Effects of the Glucose Concentration and Hydraulic Retention Time." *Bioresource Technology* 100 (21): 5352–55. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.046.

Papanikolaou, Seraphim, Michel Fick, and George Aggelis. 2004. "The Effect of Raw Glycerol Concentration on the Production of 1,3-Propanediol by Clostridium Butyricum." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 79 (11): 1189–96. https://doi.org/10.1002/jctb.1103.

Riebeling, V., R. K. Thauer, and K. Jungermann. 1975. "The Internal-Alkaline pH Gradient, Sensitive to Uncoupler and ATPase Inhibitor, in Growing Clostridium Pasteurianum." *European Journal of Biochemistry* 55 (2): 445–53. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02181.x.

Rittmann, Simon, and Christoph Herwig. 2012. "A Comprehensive and Quantitative Review of Dark Fermentative Biohydrogen Production." *Microbial Cell Factories* 11 (1): 1. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-115.

Sarangi, Prakash K., and Sonil Nanda. 2020. "Biohydrogen Production Through Dark Fermentation." *Chemical Engineering & Technology* 43 (4): 601–12. https://doi.org/10.1002/ceat.201900452.

Seo, Hyeongmin, Sofia H. Capece, John D. Hill, Jonathan K. Otten, and Eleftherios T. Papoutsakis. 2024. "Butyrate as a Growth Factor of *Clostridium Acetobutylicum*." *Metabolic Engineering* 86 (November): 194–207. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.10.005.

Shaterzadeh, Mohammad Javad, and Seyed Ahmad Ataei. 2017. "The Effects of Temperature, Initial pH, and Glucose Concentration on Biohydrogen Production from *Clostridium*

Acetobutylicum." *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 39 (11): 1118–23. https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1297875.

Sim, Young-Bo, Do-Yeon Kim, Jeun Ko, Ju-Hyeong Jung, and Sang-Hyoun Kim. 2024. "Bioaugmentation with Clostridium Pasteurianum for High-Yield Continuous Bio-Hydrogen Production in a Dynamic Membrane Bioreactor." *Chemical Engineering Journal* 497 (October): 154709. https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.154709.

Teke, G. M., B. Anye Cho, C. E. Bosman, Z. Mapholi, D. Zhang, and R. W. M. Pott. 2023. "Towards Industrial Biological Hydrogen Production: A Review." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40 (1): 37. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03845-4.

Thauer, R K, K Jungermann, and K Decker. 1977. "Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria." *Bacteriological Reviews* 41 (1): 1. https://doi.org/10.1128/br.41.1.100-180.1977.

Van Ginkel, S., S. W. Sung, and J. J. Lay. 2001. "Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration." *Environmental Science & Technology* 35 (24): 4726–30. https://doi.org/10.1021/es001979r.

Vasconcelos, I., L. Girbal, and P. Soucaille. 1994. "Regulation of Carbon and Electron Flow in Clostridium-Acetobutylicum Grown in Chemostat Culture at Neutral Ph on Mixtures of Glucose and Glycerol." *Journal of Bacteriology* 176 (5): 1443–50. https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1443-1450.1994.

Vauthier Ludovic, Emmanuel Rondags, Céline Loubière, et al. To be published. "Rational Comparison of Biohydrogen Production Using Clostridium Species through Dark Fermentation during Anaerobic Batch Processes." *Journal of Biotechnology*. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.10.009

Von Stosch, Moritz, and Mark J. Willis. 2017. "Intensified Design of Experiments for Upstream Bioreactors." *Engineering in Life Sciences* 17 (11): 1173–84. https://doi.org/10.1002/elsc.201600037.

Wang, Jianlong, and Wei Wan. 2008. "Optimization of Fermentative Hydrogen Production Process by Response Surface Methodology." *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (23): 6976–84. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.051.

Wang, Jianlong, and Yanan Yin. 2021. "Clostridium Species for Fermentative Hydrogen Production: An Overview." *International Journal of Hydrogen Energy* 46 (70): 34599–625. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052.

Whitham, Jason M., Ji-Won Moon, Miguel Rodriguez, et al. 2018. "Clostridium Thermocellum LL1210 pH Homeostasis Mechanisms Informed by Transcriptomics and Metabolomics." *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 98. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1095-y.

Zhang, Quanguo, Youzhou Jiao, Chao He, et al. 2024. "Biological Fermentation Pilot-Scale Systems and Evaluation for Commercial Viability towards Sustainable Biohydrogen Production." *Nature Communications* 15 (1): 4539. https://doi.org/10.1038/s41467-024-48790-4.

Zheng, Xian-Jun, and Han-Qing Yu. 2005. "Inhibitory Effects of Butyrate on Biological Hydrogen Production with Mixed Anaerobic Cultures." *Journal of Environmental Management* 74 (1): 65–70. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.08.015.

IV.4. Adaptation des conditions de culture pour un couplage avec la méthanation biologique

IV.4.a. Conditions optimales issues du plan d'expériences

Dans l'article présenté, plusieurs objectifs ont été pris en compte pour optimiser les conditions de culture. Les différents scénarios dépendent notamment de la quantité de H_2 désiré, de sa vitesse de production, de son utilisation ultérieure, ou encore des coûts de fonctionnement du procédé.

Dans le cas du couplage avec la méthanation biologique, il a été choisi de maximiser à la fois la productivité volumique de H_2 sortant et le ratio R_{H_2/CO_2}, avec la même pondération. En effet, un débit important pour la méthanation est primordial si l'on souhaite une productivité volumique de CH_4 qui soit également importante. Ensuite, la méthanation biologique nécessite un apport de 4 moles de H_2 pour 1 mole de CO_2. De telles valeurs sont impossibles à atteindre avec une culture simple de clostridies puisqu'elles correspondent à la limite théorique maximale. Toutefois, cela reste intéressant de s'en approcher le plus possible afin de ne pas obtenir une fraction de CO_2 résiduel trop élevée en fin de biométhanation. Il a été choisi de ne pas optimiser le rendement $Y_{H_2/S}$, car cela revient à faire chuter le débit de H_2, et n'est pas pertinent dans le cadre de ce travail de thèse, qui vise surtout à apporter une preuve de concept de la biométhanation à partir d'un mélange de gaz d'origine biologique. Enfin, la fraction liquide en sortie de bioréacteur, contenant les produits de fermentation en solution, a vocation à être injectée dans le second bioréacteur, en raison de la capacité de certaines archées méthanogènes acétotrophes à produire du méthane additionnel à partir de l'acétate. C'est pourquoi il

a été choisi un optimum où le milieu sortant ne comporte pas de glucose résiduel, qui risquerait alors d'être assimilé dans un enchaînement de réactions de méthanisation plus globales, s'éloignant de l'objectif initial.

Néanmoins, il convenait de tester si l'optimum prédit est un optimum réel rapport à l'expérimentation. Pour ce faire, une expérience complémentaire de culture continue a été réalisée en utilisant les paramètres optimaux déterminés précédemment (voir projet d'article en IV.2). Les conditions opératoires ont ensuite été variées afin de s'assurer que l'optimum établi ne pouvait pas être dépassé. Dans un premier cas, le pH et le taux de dilution D ont été modifiés. Dans la seconde expérience, la concentration en glucose S_f de l'alimentation a été progressivement augmentée, permettant en outre de voir s'il y avait toujours une absence de glucose résiduel à l'état stabilisé de la culture continue.

IV.4.b. Sensibilité de la production de H_2 au pH et au taux de dilution autour de la condition optimale

Dans les conditions expérimentales optimales, une concentration en biomasse de 2,83 g/L a été mesurée à l'état stabilisé et donc une vitesse spécifique de consommation du glucose de 7,67 mmol/$g_{cellules}$/h. Lors de la première modification des conditions expérimentales (changements arbitraires de la valeur du pH de 7 à 6,8 et du taux de dilution de 0,230 h^{-1} à 0,180 h^{-1}, en jaune sur la Figure 44), une chute de la productivité à 297 mL_{H_2}/($L_{culture}$·h) a été observée, en raison d'un débit d'alimentation en glucose moins important (vitesse spécifique de la consommation de glucose de 6,67 mmol/$g_{cellules}$/h). Par ailleurs, un ratio R_{H_2/CO_2} = 1,30 mol/mol a également été obtenu, ce qui peut être expliqué par une vitesse spécifique de production en acétate réduite, due à la baisse de pH, comme indiqué précédemment (projet d'article en IV.2). Lors de la seconde modification (changements arbitraires de la valeur du pH de 6,8 à 6,5 et du taux de dilution de 0,180 h^{-1} à 0,290 h^{-1}, en vert sur la Figure 44), la productivité est améliorée à 556 mL_{H_2}/($L_{culture}$·h), pour un R_{H_2/CO_2} maintenu à 1,30 mol/mol. En revanche, une concentration résiduelle en glucose de 1,79 g/L a été mesurée en sortie de bioréacteur. À cette valeur du taux de dilution (0,290 h^{-1}), la vitesse spécifique de consommation en

glucose est à son maximum et entraîne probablement un débordement métabolique, comme en atteste la présence de pyruvate et de lactate dans le milieu de culture.

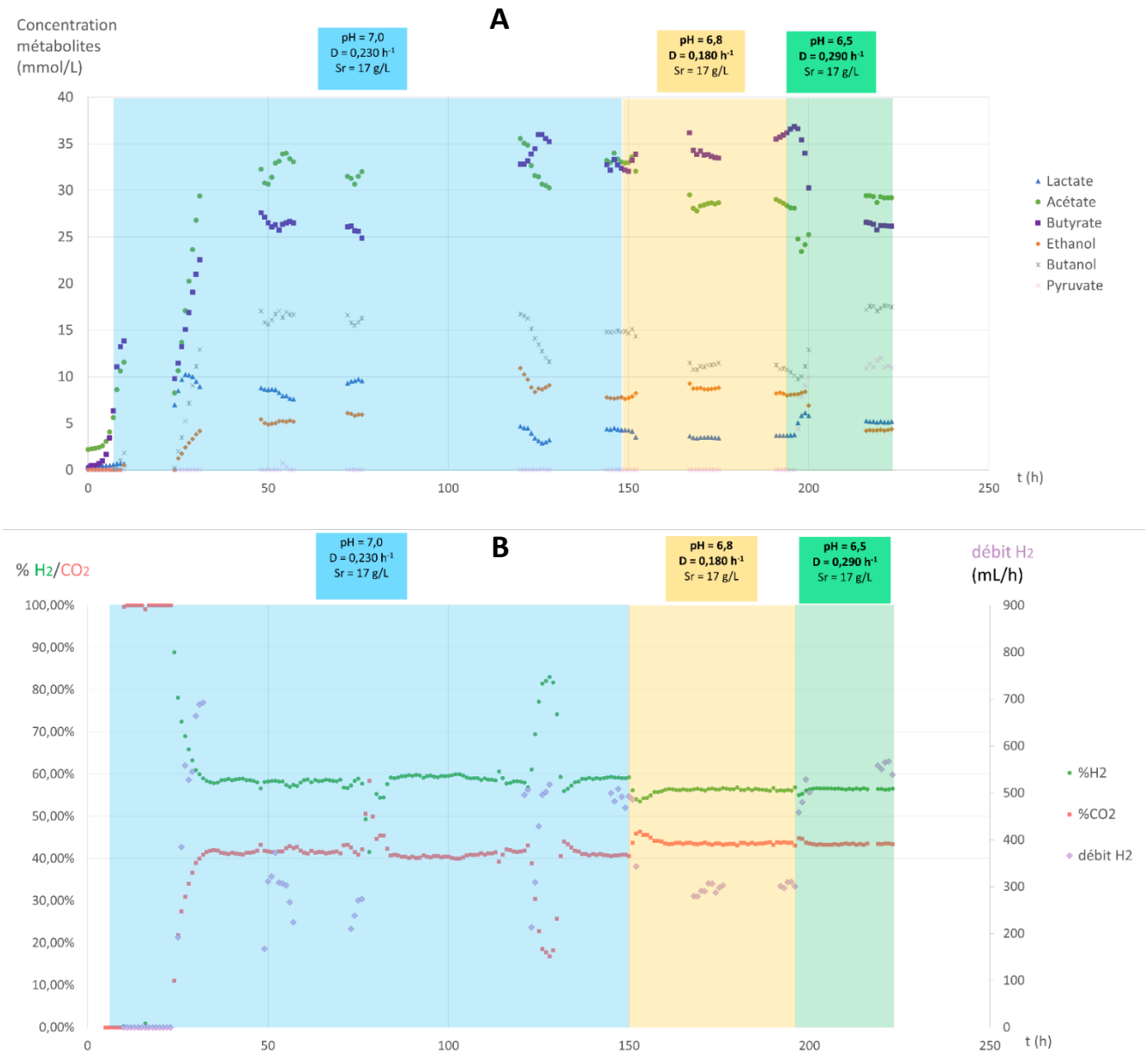


Figure 44. Concentrations en métabolites (A) et production gazeuse (B) mesurées à l'état stabilisé en chemostat, avec trois conditions de test (pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 17 g/L ; pH = 6,8 / D = 0,180 h^{-1} / S_f = 17 g/L ; pH = 6,5 / D = 0,290 h^{-1} / S_f = 17 g/L) réalisées en mode continu lors l'étude de la sensibilité de la production de H_2 au pH et au taux de dilution.

IV.4.c. Sensibilité de la production de H_2 à S_f autour de la condition optimale

Ici, l'état stabilisé a débuté avec une concentration S_f de 18 g/L, pour D = 0,230 h^{-1} et pH = 7,0, soit des conditions très proches que l'optimum testé. L'état stabilisé a été atteint plus rapidement que la première fois, au bout de seulement 24 heures (en bleu sur la Figure 45). Il est intéressant de constater que la concentration en acétate a été plus importante que pour l'optimum testé dans la culture de vérification, alors que celle en butanol l'est moins. Ainsi, le débit en H_2 était en moyenne de 627 $mL_{H_2}/(L_{vulture} \cdot h)$ soit une valeur 25,7% supérieure à celle de l'optimum. Le ratio R_{H_2/CO_2} est, quant à lui, de 1,50 mol/mol, ce qui est 14% inférieur à la valeur prédite par le modèle. En revanche, la plus grande productivité de H_2 mène également à un plus grand rendement, avec $Y_{H_2/S}$ = 1,29 mol/mol soit 33% supérieur à la valeur prédite par le modèle. 0,16 g/L de glucose résiduel a tout de même été mesuré dans ces conditions.

En augmentant la concentration en substrat à 20 g/L (en rouge sur la Figure 45), le débit en H_2 augmente, jusqu'à atteindre 693 $mL_{H_2}/(L_{culture} \cdot h)$ et le ratio R_{H_2/CO_2} = 1,52 mol/mol reste dans les mêmes ordres de grandeurs, conformément à la variation donnée par le modèle (1,74 mol/mol contre 1,73 mol/mol). En revanche, 0,50 g/L de glucose résiduel est présent dans le milieu liquide, ce qui est en-dehors du seuil d'acceptation de 0,2 g/L pour notre optimum.

En augmentant encore la concentration en substrat, à 25 g/L cette fois (en jaune sur la Figure 45). On la vitesse volumique de production d'H_2 observé est de 852 $mL_{H_2}/(L_{culture} \cdot h)$, avec un R_{H_2/CO_2} toujours d'une valeur de 1,50 mol/mol. Cependant, ces conditions expérimentales s'accompagnent d'une concentration en glucose résiduel de 0,77 g/L à l'état stabilisé du réacteur. Toutefois, cette valeur reste inférieure à la prévision du modèle affichée à 1,26 g/L.

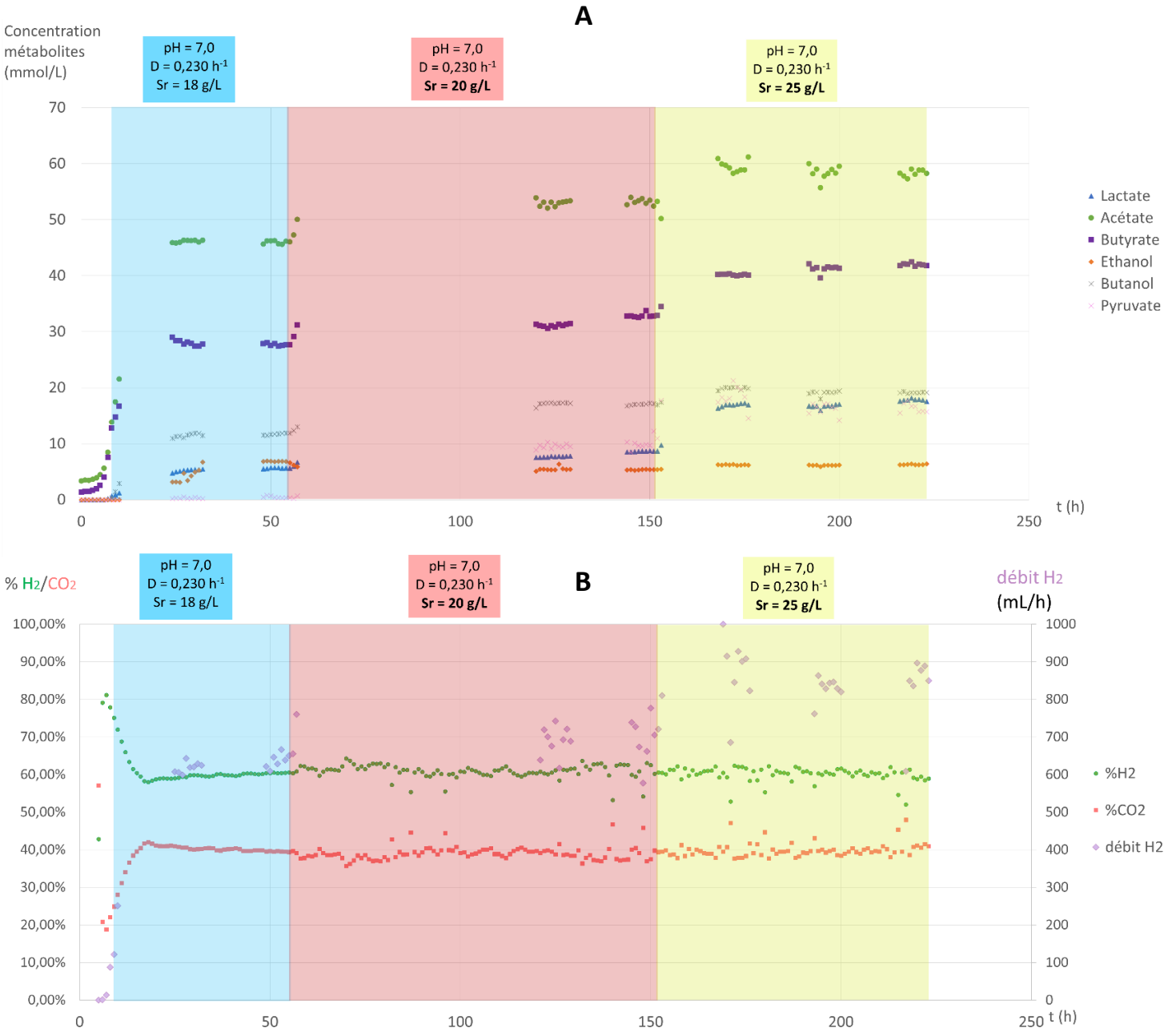


Figure 45. Concentrations en métabolites (A) et production gazeuse (B) mesurées à l'état stabilisé en chemostat, avec trois conditions de test (pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 18 g/L ; pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 20 g/L ; pH = 7,0 / D = 0,230 h^{-1} / S_f = 25 g/L) réalisées en mode continu lors l'étude de la sensibilité de la production de H_2 à S_f.

D'après l'ensemble des résultats compilés dans le Tableau 12, il apparaît que le modèle prédit par le plan d'expérience est fidèle à la réalité expérimentale, s'agissant des réponses obtenues pour le test de l'optimum (le modèle présente des écarts plus importants pour les conditions s'éloignant de ce paramétrage). En outre, les fermentations réalisées avec des paramètres différents ne présentent pas des réponses combinées meilleures que l'optimum, c'est-à-dire une productivité de H_2 et un R_{H_2/CO_2} supérieurs sans présenter de glucose résiduel.

Tableau 12. Résultats expérimentaux des cultures de vérification de l'optimum du modèle (ligne 2, en gras).

pH	D (h^{-1})	S_f (g/L)	Productivité volumique de H_2 ($mL_{gas}/(L_{culture} \cdot h)$)	R_{H_2/CO_2} (mol/mol)	Glucose résiduel (g/L)
7,0	**0,230**	**17**	**499**	**1,74**	**-0,08**
7,0	0,230	17	490	1,45	0
6,8	0,180	17	297	1,30	0
6,5	0,290	17	556	1,30	1,79
7,0	0,230	18	627	1,50	0,16
7,0	0,230	20	693	1,52	0,50
7,0	0,230	25	852	1,50	0,77

IV.4.d. Conclusions

Au cours de ce chapitre, un modèle a été établi à partir d'un plan d'expériences. Le modèle a été validé par une culture expérimentale à la condition optimale prédite, avec une erreur ne dépassant pas 17% pour le R_{H_2/CO_2}. Cet écart à la réalité est situé en-dessous de 5% pour la productivité en H_2 et le rendement $Y_{H_2/S}$ Ensuite, des expériences de fermentation avec des valeurs de paramètres différentes ont été réalisées afin de tester la sensibilité de la modélisation de la production de H_2 par *C. pasteurianum* ATCC 6013 aux facteurs évalués, et de vérifier qu'un optimum expérimental différent ne pouvait pas être trouvé. En outre, les variations observées dans les réponses lors du changement

des paramètres opératoires suivent les mêmes tendances que celles prédites par le modèle. Ainsi, l'optimum prédit semble être proche de l'optimum réel, ce qui témoigne d'une certaine robustesse du modèle et de la démarche globale des plans d'expériences appliquées à *C. pasteurianum* ATCC 6013 cultivé en mode continu pour la production de H_2. **Cet optimum, obtenu avec les valeurs de pH = 7,0, D = 0,230 h^{-1} et S_f = 17 g/L, sera donc utilisé pour les expériences suivantes de couplage de la production de biohydrogène avec la méthanation biologique**. En outre, cette stratégie d'optimisation pourra également être étendue pour différents substrats couramment utilisés, tels que le glycérol, l'amidon ou encore la cellulose. D'autres paramètres auraient pu être évalués (tels que la température ou la composition minérale du milieu de culture), de même que la répétition de certaines expériences afin d'affiner le modèle et les réponses obtenues.

V. Couplage de la culture continue de *Clostridium pasteurianum* avec la biométhanation

Pour ce chapitre final de travail de thèse, trois expérimentations de cultures couplées de complexité croissante entre la fermentation sombre anaérobie et la biométhanation ont été réalisées.

La première a consisté au transfert simple du gaz issu de la culture de *C. pasteurianum* vers le réacteur de biométhanation pour en étudier les effets et les performances atteignables. Une analyse métagénomique a été réalisée au cours de cette expérimentation afin d'identifier les populations microbiennes impliquées. La deuxième expérience a consisté en la mise en place d'une capture partielle d'une partie du CO_2 en aval de la fermentation sombre, afin d'approcher le rapport optimal de 4 moles de H_2 pour 1 mole de CO_2 et d'accroître la de CH_4 dans le biogaz final.

Enfin, au cours de la dernière expérience, une partie de la fraction liquide du bioréacteur de la fermentation sombre a été transférée dans le bioréacteur où se déroule la biométhanation afin d'évaluer ses effets potentiels sur celle-ci.

V.1. Performances du couplage de la fermentation sombre avec la biométhanation par transfert direct du H_2 et CO_2

Les objectifs de cette première expérience de couplage ont été, d'une part, de vérifier la faisabilité technique d'un couplage simple et, d'autre part, d'en évaluer les effets sur l'étage de méthanation. Pour ce faire, un premier étage est réalisé, au sein duquel a lieu la culture continue de *C. pasteurianum* ATCC 6013 avec les paramètres optimisés tels que décrits dans le chapitre précédent et un volume de fonctionnement de 1L. Le gaz produit, composé de H_2 et CO_2 est ensuite transféré dans son entièreté vers un second étage, un bioréacteur de 1,5L de milieu de culture et contenant un consortium méthanogène hydrogénotrophe. Le transfert de gaz est réalisé à l'aide d'une pompe péristaltique, (afin de compenser les pertes de charge). Aucun gaz vecteur n'a été utilisé afin d'évaluer

seulement les effets du gaz issu de la culture de *Clostridium*, sans risque d'observer un effet issu d'un autre facteur. L'injection dans le second étage est réalisée à l'aide d'un diffuseur de gaz en fond de cuve. L'expérience a duré 364h, le couplage entre les deux bioréacteurs ayant été mis en œuvre à partir de la 122ème heure. La vitesse d'agitation au sein du bioréacteur où se déroule la biométhanation a été augmentée par paliers, afin d'accroître le transfert gaz/liquide jusqu'à atteindre un état stabilisé pour chaque changement.

V.1.a. Production de gaz et croissance

Premier étage (fermentation sombre)

Le premier effet notable lors du démarrage du transfert de gaz a été l'augmentation progressive du débit total de gaz mesuré sortant du premier bioréacteur, passant de 1000 $mL_{gaz}/(L_{culture} \cdot h)$ environ, à l'état stabilisé avant le couplage, à 1890 $mL_{gaz}/(L_{culture} \cdot h)$ à l'état stabilisé après le couplage (Figure 46). Cette augmentation pourrait être due à la création d'un vide dans le ciel du premier bioréacteur. En effet, la pompe péristaltique utilisée pour le transfert de gaz présentait un débit minimal supérieur au débit de gaz produit par la fermentation sombre. Ce vide a pu entraîner une augmentation du transfert du CO_2 et du H_2 de la phase liquide vers la phase gazeuse. La diminution de la pression partielle de H_2 dans la phase liquide ainsi générée peut alors avoir engendré une meilleure efficacité de l'hydrogénase de *C. pasteurianum* ce qui est susceptible d'accroître la production de H_2 par celle-ci.

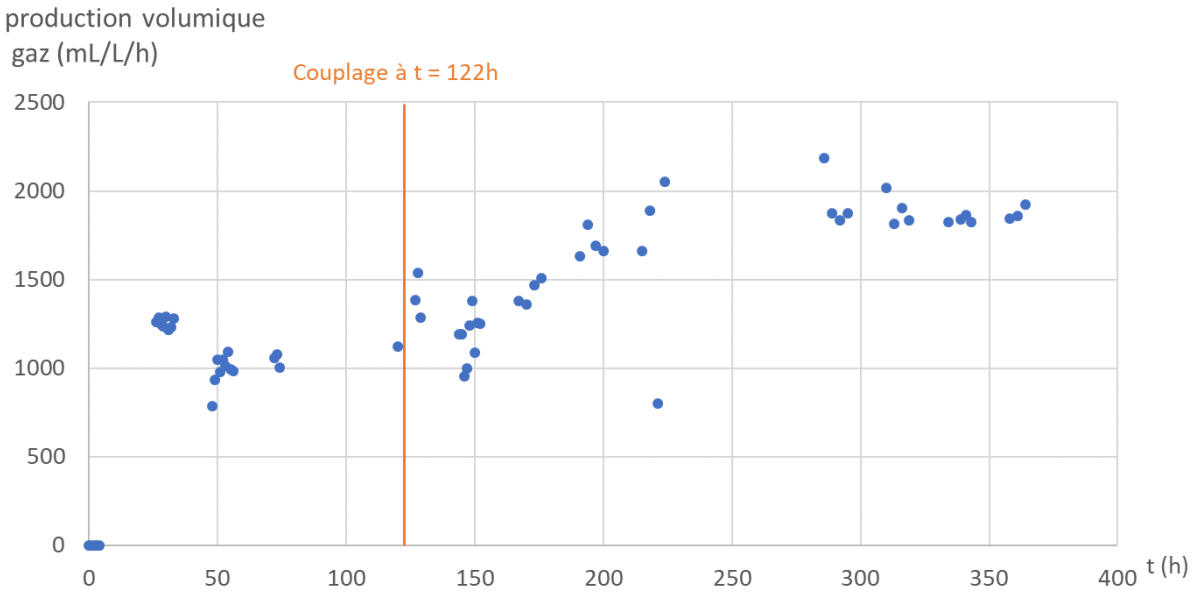


Figure 46. Mise en évidence de l'augmentation de la production volumique de gaz par *C. pasteurianum* après couplage avec le bioréacteur de méthanation.

Second étage (biométhanation)

Le gaz consommé par les archées méthanogènes est métabolisé principalement lors du cycle de Wolfe, permettant de fixer le carbone et de générer l'énergie nécessaire à la formation de biomasse. La DO_{600} initiale mesurée dans la culture du consortium méthanogène était de 0,127 tandis que la DO_{600} finale a été mesurée à 1,67, venant conforter la croissance des micro-organismes au sein de ce consortium (Figure 47A). Deux ajouts d'extraits de levure ont été réalisés à t_{190} et t_{240} (marqués par deux traits rouges sur la Figure 47). Ceux-ci ont été suivis d'une augmentation de la concentration en biomasse, témoignant de la carence du milieu de culture et de la nécessité de son renouvellement en micro-nutriments.

Chaque palier d'agitation a permis une augmentation de la proportion de CH_4 et d'une diminution du H_2 résiduel dans le biogaz final. Le système est très réactif à ce changement d'agitation, puisque l'augmentation de la production de CH_4 intervient 1 à 2 heures après l'augmentation de la vitesse d'agitation. L'atteinte d'un état stabilisé nécessite des durées différentes, qui semblent dépendre plutôt de l'évolution de la concentration en biomasse que de l'agitation. Par exemple, lors du

passage entre 250 rpm et 500 rpm, une dizaine d'heures est nécessaire à l'atteinte d'un état stabilisé, la DO_{600} passant progressivement de 0,28 à 0,40 dans le même temps. Pendant le cycle d'agitation à 750 rpm, plus de 70h de culture sont nécessaires avant l'atteinte d'un état stabilisé. L'ajout d'extrait de levure à t_{240} est notamment responsable d'un certain déséquilibre, car la concentration en biomasse n'a cessé de croître à partir de cet instant. Finalement, les passages aux agitations à 900 rpm et 1100 rpm ont présenté des améliorations de la méthanation, cependant moins marquées. La proportion de méthane augmente en effet légèrement (de 25% à 30%, puis 32%), mais le débit total de gaz étant moins important (Figure 47B), cela se traduit par un même débit de méthane (Figure 47C)

Au maximum des performances, i.e. pendant la phase d'agitation à 1100 rpm, la fraction de CH_4 a atteint 31,5%, pour un débit de 123 mL/h. Pour le H_2, la fraction restante n'était que de 3,4%, soit un débit de 14 mL/h environ, alors qu'il était situé aux alentours de 600 mL/h avant le couplage. Ainsi, la problématique de la faible solubilité du H_2 semble être surmontée par l'augmentation de l'agitation, les archées supportant de fortes contraintes de cisaillement. Concernant le CO_2, sa part dans le biogaz final est de 65,1%, ce qui est très important mais attendu, puisque sa consommation est bien plus faible que celle du H_2 (4 fois moins de moles de CO_2 sont nécessaires dans la réaction de méthanation). Son débit présente bien une réduction car d'une valeur de 258 mL/h en fin de procédé, contre 400 mL/h environ avant le couplage.

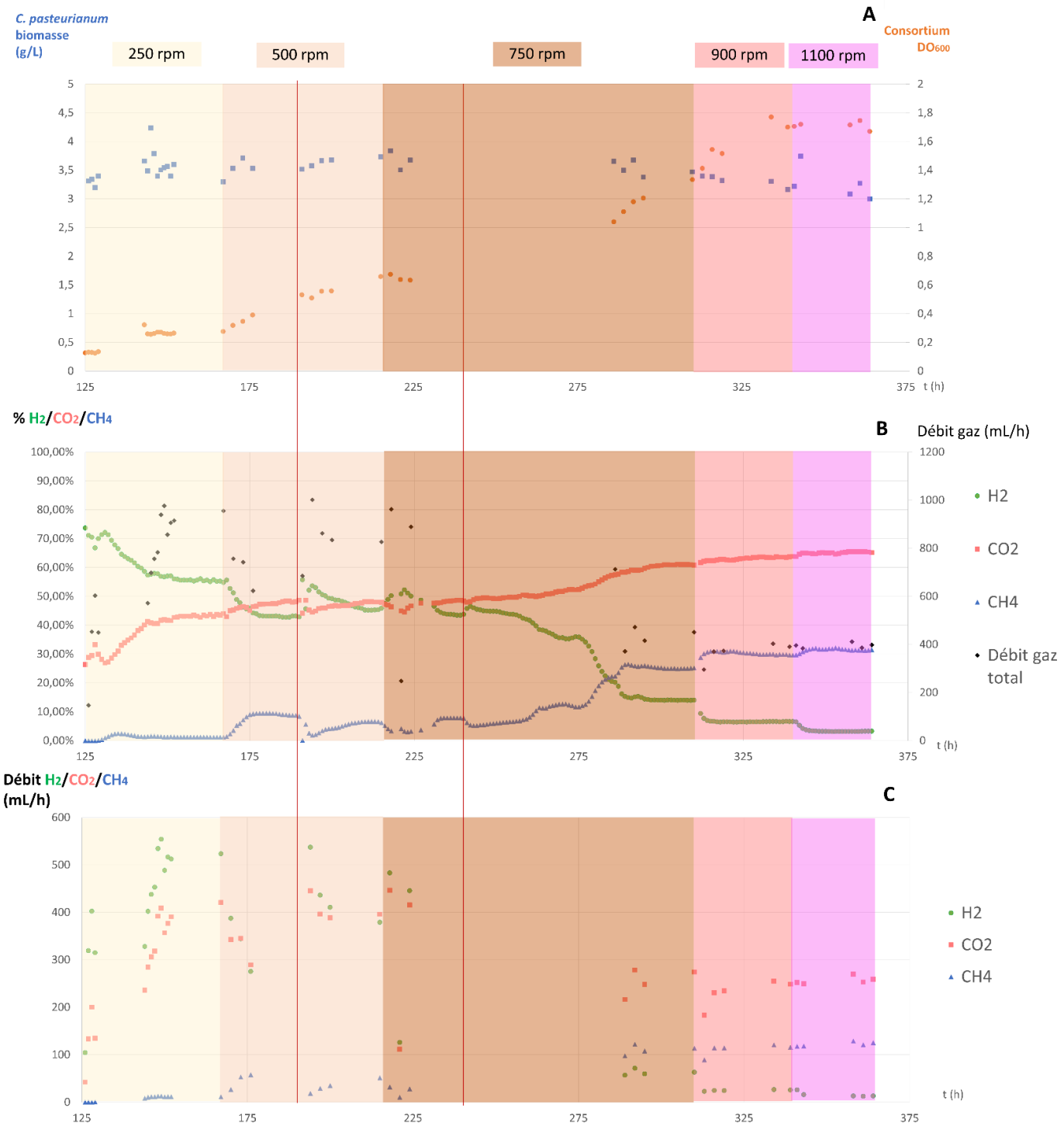


Figure 47. Évolution de la biomasse (A) dans chaque bioréacteur, des pourcentages (B) et débits (C) en CH_4, H_2 et CO_2 dans le réacteur de biométhanation suite au transfert du biogaz issu de la culture de *C. pasteurianum*. Les traits à t = 190h et t = 240h représentent les ajouts de 1 g/L d'extrait de levure.

V.1.b. Production de métabolites

Premier étage (fermentation sombre)

Au niveau du bioréacteur où se déroule la fermentation sombre, la création d'un vide a non seulement augmenté la production de gaz, mais a également entraîné la déstabilisation de la production de métabolites par rapport à la période avant le couplage (Figure 48). Les concentrations en acétate et en butyrate ont présenté des oscillations entre 45 et 55 mmol/L. Il est intéressant de remarquer que ces oscillations sont inversement corrélées, c'est-à-dire que l'augmentation de la production d'acétate a lieu lorsque celle du butyrate diminue, et inversement. En revanche, la concentration en butanol présente des oscillations, certes moins marquées, mais synchronisées avec celles de l'acétate. Ainsi, l'excès de NADH produit en association avec la voie de l'acétate est compensé par sa consommation au sein de la voie du butanol, la voie du butyrate restant neutre. Dans sa globalité, la balance NADH/NAD^+ est conservée, et il est possible de supposer des proportions en H_2 et CO_2 identiques.

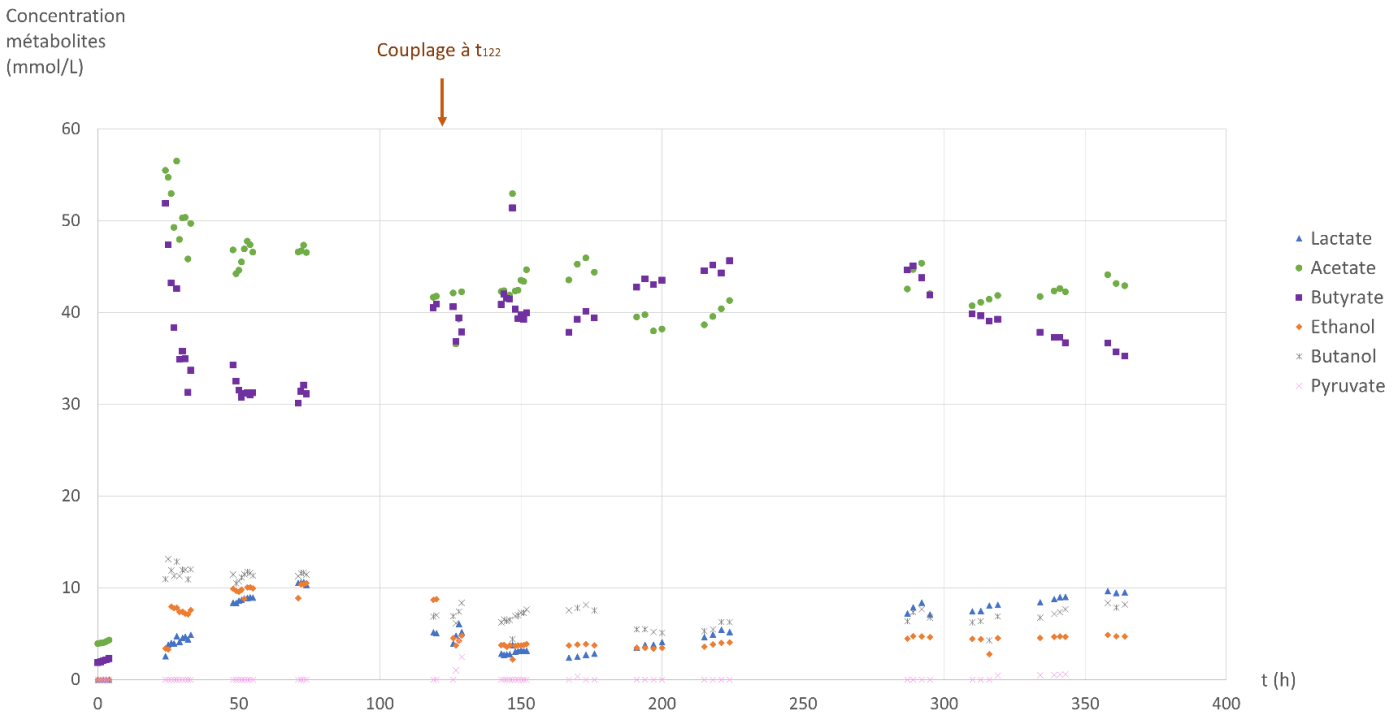


Figure 48. Évolution de la concentration des métabolites produits par *C. pasteurianum* ATCC 6013 au cours de la fermentation sombre et effet du couplage avec la biométhanation.

Ces métabolismes oscillants en culture continue sont régulièrement rapportés dans la littérature, dont les causes, bien que diverses, sont souvent relatives à une inhibition par les produits, notamment par le dihydrogène et le butanol (Johnson et Rehmann 2020; Tyszak et Rehmann 2024). Cette explication des variations du métabolisme est en adéquation avec nos observations. En effet, la création d'un vide dans le bioréacteur favoriserait l'activité de l'hydrogénase, entraînant une utilisation plus intensive de NADH, dont la concentration serait excédentaire lorsque la voie de l'acétate est privilégiée. Cette augmentation de la production d'acétate entraînerait une augmentation de la production de H_2. Mais le débit du gaz, imposé par la pompe, restant fixe, le vide serait alors moins important, augmentant la pression partielle de H_2 et donc probablement un ralentissement de l'activité de l'hydrogénase. En conséquence, la production de H_2 et donc d'acétate seraient ralenties, jusqu'à recommencer ce cycle… Une mesure des activités enzymatiques au cours de la culture serait nécessaire afin de confirmer cette hypothèse d'explication.

Second étage (biométhanation)

Lors de la biométhanation, très peu de métabolites sont produits. Seules des traces de formiate ont été détectées, ainsi que des concentrations en acétate et éthanol restant inférieures à 5 mmol/L (Figure 49). En outre, lorsque la production de méthane s'est intensifiée après 200 h, ces concentrations ont diminué, notamment pour l'acétate, jusqu'à ne plus être détectées. Ceci peut laisser supposer une première production de l'acétate par des archées acétogènes présentes au sein du consortium, cet acétate pouvant servir de substrat pour les archées acétotrophes par la suite.

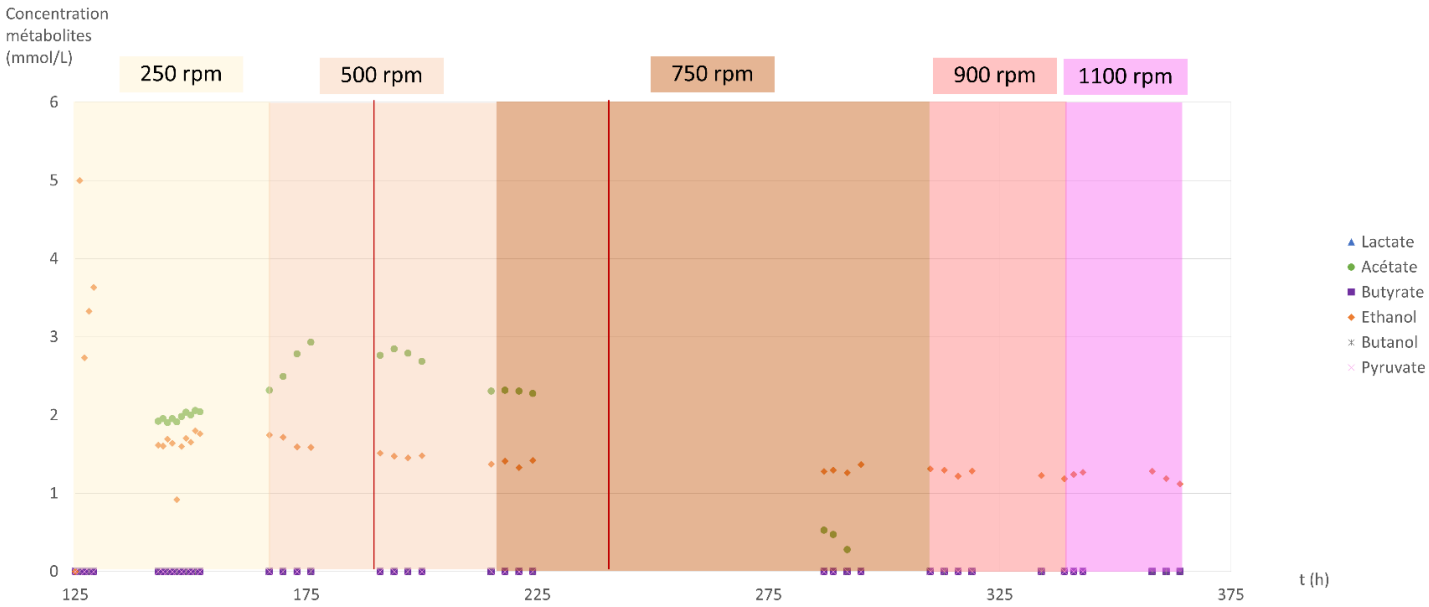


Figure 49. Évolution de la concentration en métabolites au sein de la culture du consortium méthanogène lors du transfert direct de gaz, de la fermentation sombre vers la biométhanation.

V.1.c. Effets du couplage sur les populations microbiennes du consortium méthanogène

Des analyses métagénomiques ont été réalisées afin d'établir les populations microbiennes présentes initialement dans le consortium méthanogène, puis à l'issue de l'expérience de méthanation présentée ci-dessus. Les données obtenues nous donnent des informations sur l'abondance relative des différents genres microbiens, pour les archées d'une part, et pour les bactéries d'autre part.

Évolution de la population d'archées

Seuls trois genres d'archées étaient présents initialement au sein du consortium, avec une abondance relative très majoritaire du genre *Methanothermobacter* (Figure 50), ce qui semble logique, l'origine du consortium étant un procédé de biométhanation thermophile et initialement isolé d'un

digestat de méthaniseur. Le genre *Methanobacterium* est également présent, à hauteur de presque 8%, et enfin, une infime proportion de *Methanosarcina* existe également.

À l'issue de l'expérimentation, le genre *Methanothermobacter* a donc présenté une abondance relative encore plus importante puisque ces micro-organismes sont connus pour leur capacité à réaliser la réaction de méthanation biologique en conditions thermophiles. À l'inverse, le genre *Methanobacterium* regroupe majoritairement des micro-organismes mésophiles, et ne semblent pas avoir autant de facilité de développement à 55°C. Leur population générale a peut-être augmenté (l'abondance relative ne nous donne pas cette information), mais moins fortement que pour *Methanothermobacter*. Aucune trace de *Methanosarcina* n'a été détectée suite à l'expérience de méthanation, probablement pour les mêmes raisons, ce qui laisse supposer que les conditions thermophiles empêchent la croissance des archées mésophiles.

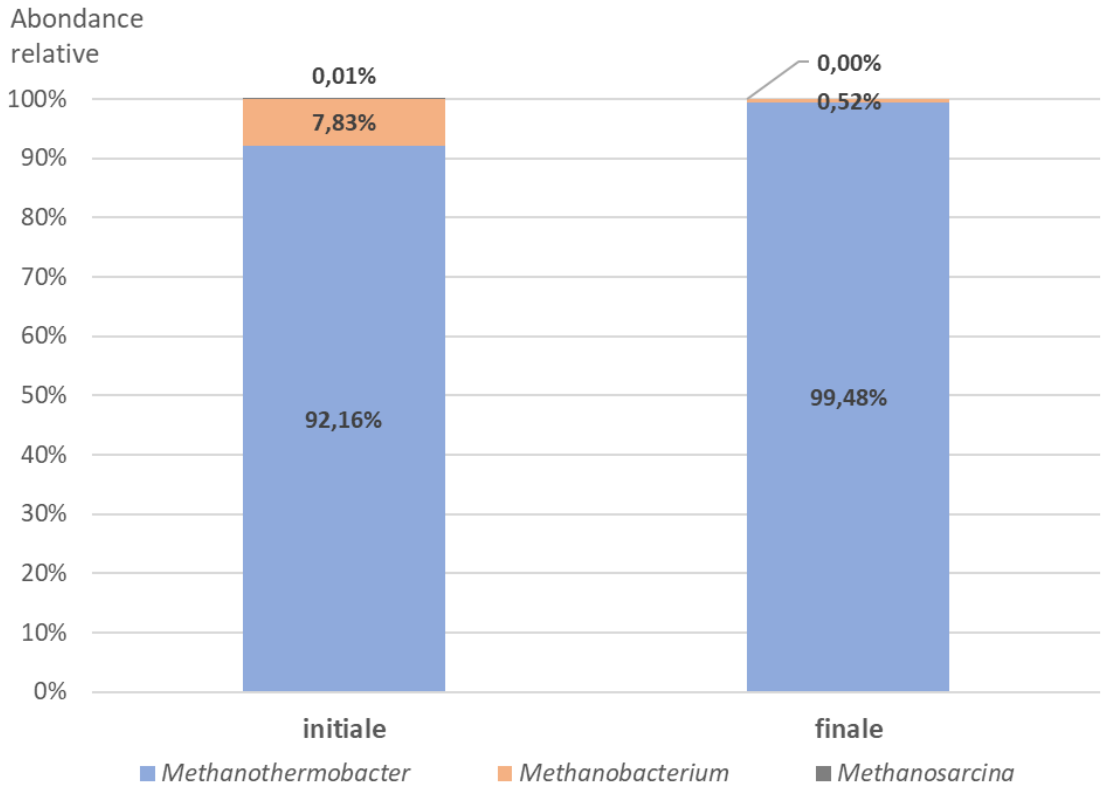


Figure 50. Abondance relative des populations d'archées au sein du consortium méthanogène au début et en fin de la culture méthanogène.

Évolution de la population de bactéries

La première remarque qui peut être faite sur la population de bactéries porte sur le plus grand nombre de genres détectés, au nombre de 34 genres bactériens dans notre cas, en prenant en compte les populations avant et après l'expérience de biométhanation. Au sein du consortium initial, les deux genres les plus abondants sont *Coprothermobacter* et *Acetomicrobium*, qui représentent respectivement 76,5% et 21,8% de l'abondance relative parmi les bactéries (Figure 51). Ces bactéries sont communément présentes au sein des méthaniseurs, et il est alors logique de les retrouver ici. Les espèces de *Coprothermobacter* sont notamment connues pour leurs propriétés protéolytiques en conditions thermophiles anaérobies, et sont retrouvées principalement dans les premières étapes de la méthanisation dans les digesteurs traitant du fumier bovin (Tandishabo et al. 2012; Gagliano et al. 2015). Quant aux espèces d'*Acetobacterium*, elles interviennent surtout lors de la phase acétogène de la méthanisation, puisque capables de convertir les glucides en acétate, CO_2 et H_2 en conditions thermophiles anaérobies (Soutschek et al. 1984; Soares et al. 2021).

Toutefois, l'abondance relative de ces deux genres a diminué à la suite de l'expérience de méthanation, avec 45,4% de *Coprothermobacter* et 6,1% d'*Acetomicrobium*, au profit d'un enrichissement chez d'autres genres bactériens. Certains ont même été détectés, alors qu'aucune trace n'était présente initialement, ce qui laisse supposer une diminution de la concentration de *Coprothermobacter* et *Acetomicrobium*, et de la concentration bactérienne en général, pour une plus forte concentration d'archées. Certaines espèces bactériennes représentent plus de 4% de la population du consortium après l'expérience, tels que les genres *Lutispora* (12,4%), *Tepidiphilus* (6,7%), *Tepidanaerobacter* (6,7%), *Pseudoclostridium* (6,2%), *Caloramator* (5,0%) et *Soehngenia* (4,7%). À l'exception de *Tepidiphilus*, il est intéressant de relever que ces genres bactériens appartiennent à la classe des *Clostridia*, ce qui est typiquement observé au sein des méthaniseurs, puisque ces bactéries contribuent à la synthèse de H_2, qui sera ensuite consommé par les archées pour la production de CH_4, mettant en évidence une synthrophie existante dans ces environnements (Ghanimeh et al. 2013). Vis-à-vis des conditions de culture appliquées, leur présence peut être expliquée par la légère concentration en carbone et azote organiques due à l'ajout d'extrait de levure dans le milieu, mais reste très certainement minoritaire par rapport aux archées méthanogènes. En revanche, la présence d'*Acetomicrobium* pourrait expliquer la légère production d'acétate au sein de ce bioréacteur, et la

présence de *Caloramator* pour la légère concentration d'éthanol (Soutschek et al. 1984; Crespo et al. 2012).

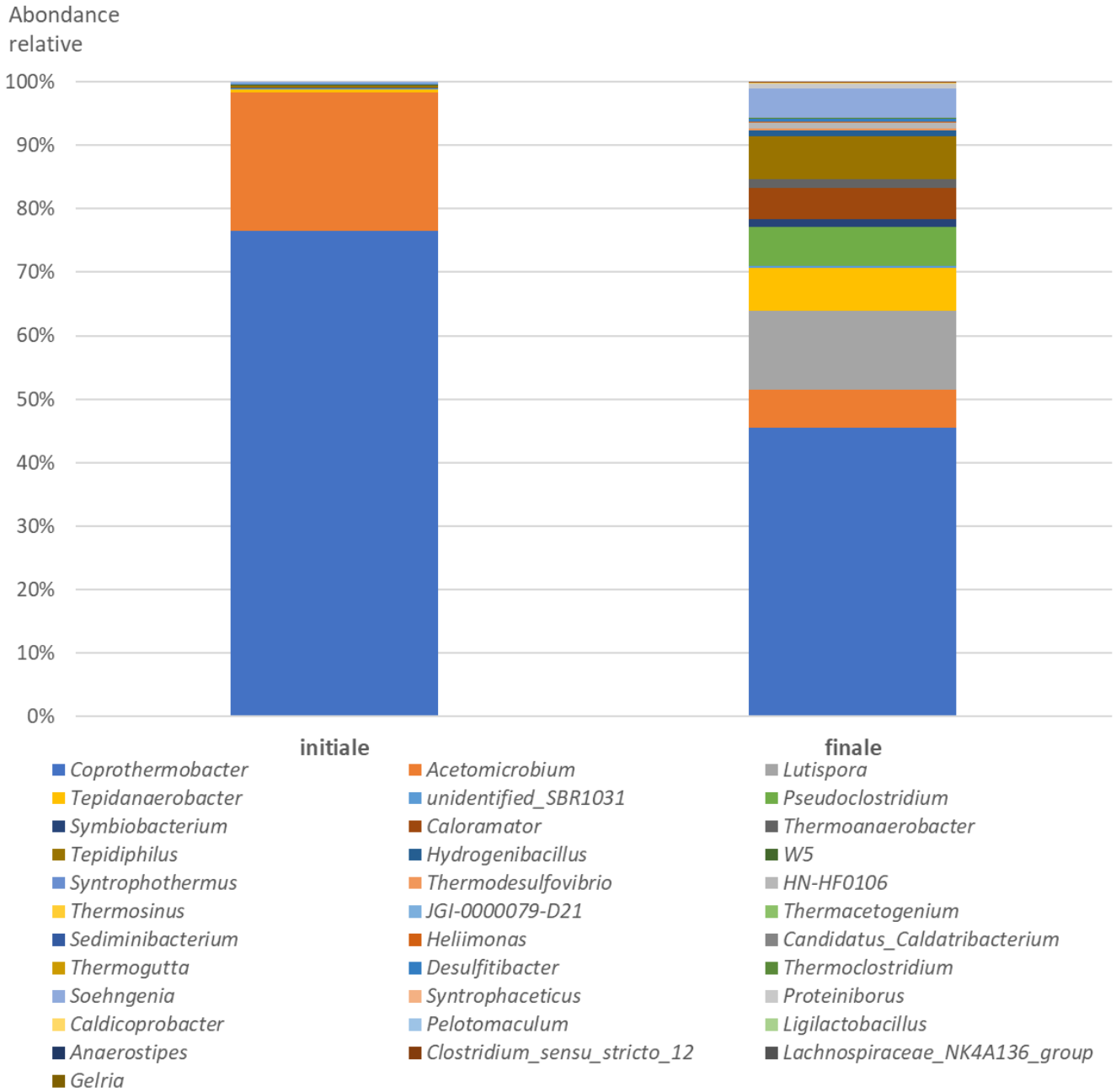


Figure 51. Abondance relative des populations de bactéries au sein du consortium méthanogène au début et à la fin de la culture méthanogène.

V.1.d. Bilan du couplage entre la fermentation sombre et la biométhanation

En négligeant les productions de métabolites au sein du consortium méthanogène, il est possible de calculer les flux de H_2 et de CO_2 utilisés pour la production de CH_4. À raison de 4 mL/h de H_2 et 1 mL/h de CO_2 par mL/h de CH_4 produit, en considérant égaux les volumes molaires de chaque gaz et en additionnant le débit résiduel sortant de H_2 et de CO_2, il est alors possible de retrouver un peu moins de 600 mL/h de H_2 pour 400 mL /h de CO_2, soit les flux de gaz produits lors de la fermentation sombre dans le premier bioréacteur. Les légères différences résideraient dans la fraction utilisée pour la formation de biomasse. Néanmoins, le ratio R_{H_2/CO_2} reste aux alentours de 1,5 mol/mol, ce qui montre qu'aucune autre réaction concurrente à la méthanation (production d'autres gaz ou de métabolites) n'a lieu lors de ce procédé.

Le procédé de couplage réalisé permet de convertir, au maximum, 0,40 $L_{H_2}/L_{culture}$/h lors de la méthanation. Ce débit est inférieur à ceux retrouvés dans la littérature scientifique pour des procédés de biométhanation où les débits entrants de H_2 ont été variés. Ainsi, un flux compris entre 0,42 $L_{H_2}/L_{culture}$/h et 1,88 $L_{H_2}/L_{culture}$/h a été reporté avec l'utilisation d'un module à membrane pour la diffusion du gaz (Díaz et al. 2015). Les taux de conversion du H_2 ont été compris entre 80% et 95 %, indépendamment du débit entrant. Un autre article présente des débits entrants entre 0,23 et 3,05 $L_{H_2}/L_{culture}$/h. Dans ce dernier cas au maximum, environ 9,2% de H_2 étaient néanmoins présents dans le biogaz final. Lorsqu'un taux de H_2 résiduel sortant était mesuré à environ 3% (similaire au nôtre), leur débit de H_2 entrant était de 1,96 $L_{H_2}/L_{culture}$/h, soit 4,9 fois supérieur au nôtre (Voelklein et al. 2019). Ainsi, les capacités de méthanation du procédé étudié dans cette thèse ne sont certainement pas poussées au maximum et laissent une marge de manœuvre considérable. Pour ce faire, il est possible d'augmenter le volume de travail du premier bioréacteur de production de H_2, ou bien de réduire le volume de celui de méthanation. En outre, il peut sembler intéressant de séparer une fraction du CO_2 du H_2 émis par le premier bioréacteur afin de se rapprocher du ratio H_2/CO_2 entrant de 4 mol/mol et d'avoir un biogaz final ne contenant pratiquement que du CH_4.

L'expérience de cette section V.1 avec cette même configuration a ensuite été répétée deux fois, mais sans présenter les mêmes performances, avec des capacités de production de méthane très réduites (proportion de CH_4 dans le biogaz final < 10%). Une explication résiderait dans les conditions de stockage du consortium méthanogène à l'issue de la première culture. Ce dernier avait été entreposé à 4°C. Or, il a été montré qu'un stockage prolongé au froid nuirait aux capacités méthanogènes des micro-organismes (Yan et al. 2020). En effet, lors de cette étude, le consortium a vu sa productivité maximale diminuer à 6,99 $mL_{CH_4}/g_{biomasse}$/jour après un stockage à 28 jours à 4°C, alors qu'elle se situait à 14,15 $mL_{CH_4}/g_{biomasse}$/jour lorsque la durée de stockage à 4°C n'était que de 7 jours. En revanche, lorsque le stockage était réalisé à 24°C, la productivité du consortium a pu atteindre 17,94 $mL_{CH_4}/g_{biomasse}$/jour même après un stockage de 84 jours. En outre, les micro-organismes stockés à 24°C pendant 14 jours présentaient ensuite un temps de latence d'environ 18 jours, alors que cette durée était de 57 jours pour le consortium stocké à 4°C pour la même durée (Yan et al. 2020). C'est pourquoi dans nos travaux, pour les expériences de méthanation réalisées ultérieurement, le consortium méthanogène a été entreposé à température ambiante.

Les conditions de stockage ont également pu influer sur la diversité des populations microbiennes au sein du consortium, bien qu'aucune étude métagénomique n'ait pu être effectuée sur les essais suivants. Néanmoins, il est possible d'affirmer que le genre *Methanothermobacter* s'avère être largement majoritaire et contributeur de la production de biométhane lors des cultures dans nos conditions expérimentales. Il pourrait être intéressant à l'avenir d'étudier plus spécifiquement les espèces idéales et les plus performantes, notamment vis-à-vis de la fixation du CO_2 pour la formation directe de biomasse. Pour l'heure, il convient de séparer le H_2 et le CO_2 issus de la fermentation sombre, si l'on souhaite se rapprocher au maximum de la stœchiométrie nécessaire à l'utilisation de toutes les molécules et de leur transformation en CH_4, afin d'avoir un biogaz final ayant une teneur en biométhane maximale.

V.3. Expérience de couplage avec capture partielle du CO_2

V.3.a. Choix de la méthode

Plusieurs méthodes existent pour la séparation et la capture du CO_2 au sein d'un mélange gazeux plus complexe. Cela est particulièrement appliqué en aval de procédés de méthanisation afin de récupérer exclusivement le CH_4, en vue d'une injection dans le réseau de gaz naturel. Une grande partie des technologies de capture repose sur la filtration membranaire à l'aide de structures nanoscopiques, ou bien sur l'adsorption sur charbon actif. Cependant, ces technologies ne présentent pas d'exclusivité totale envers le CO_2, et nécessitent des conditions de surpression non négligeables, qui ne peuvent être atteintes à notre échelle de laboratoire (Aghel et al. 2022 ; Koytsoumpa et al. 2018). Le dernier type d'approche regroupe les procédés de dissolution du CO_2 en milieu liquide (Li et al. 2013). Celle-ci peut être réalisée avec de l'eau seule, en travaillant sous pression, ou bien par l'ajout de réactifs afin d'augmenter la solubilité du CO_2, même avec de faibles pressions. C'est notamment le cas en milieux fortement alcalins, comme des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'hydroxyde de potassium, où les ions OH^- vont réagir avec le CO_2 pour former des ions carbonates et hydrogénocarbonates, fortement hydrosolubles (Maghzian et al. 2022 ; Yoo et al. 2013).

$$CO_2(g) + OH^-(aq) \rightleftharpoons HCO_3^-(aq) \quad (37)$$

$$HCO_3^-(aq) + OH^-(aq) \rightleftharpoons H_2O(l) + CO_3^{2-}(aq) \quad (38)$$

Cette méthode a l'avantage de présenter une sélectivité quasi exclusive vis-à-vis du CO_2. La seule perte éventuelle en H_2 serait alors dû à sa solubilité en milieu aqueux, qui est très faible. Ainsi, le choix de la méthode de capture du CO_2 s'est porté sur sa solubilisation en solution de NaOH. De plus, du point de vue de la valorisation des produits issus des bioprocédés, il est possible de récupérer le CO_2 sous forme de sels de carbonate, ou pur sous forme gazeuse en réacidifiant la solution. Cette dernière pourrait, alors, être utilisée pour d'autres applications du moment que la qualité du gaz récupéré est conforme

aux exigences requises (industries alimentaires, milieu hospitalier, maraîchage en serre ou injection pour la récupération du gaz naturel restant dans les poches souterraines).

V.3.b. Dispositif de capture appliqué au procédé de couplage

De précédentes expérimentations ont montré que tant qu'il y a présence d'ions OH^-, des ions CO_3^{2-} sont formés avec une très forte capacité d'absorption de la solution (Figure 552). D'après les Eq. 37 et Eq. 38, il est nécessaire d'avoir deux fois plus d'ions OH^- que de molécules de CO_2 à solubiliser (Yoo et al. 2013).

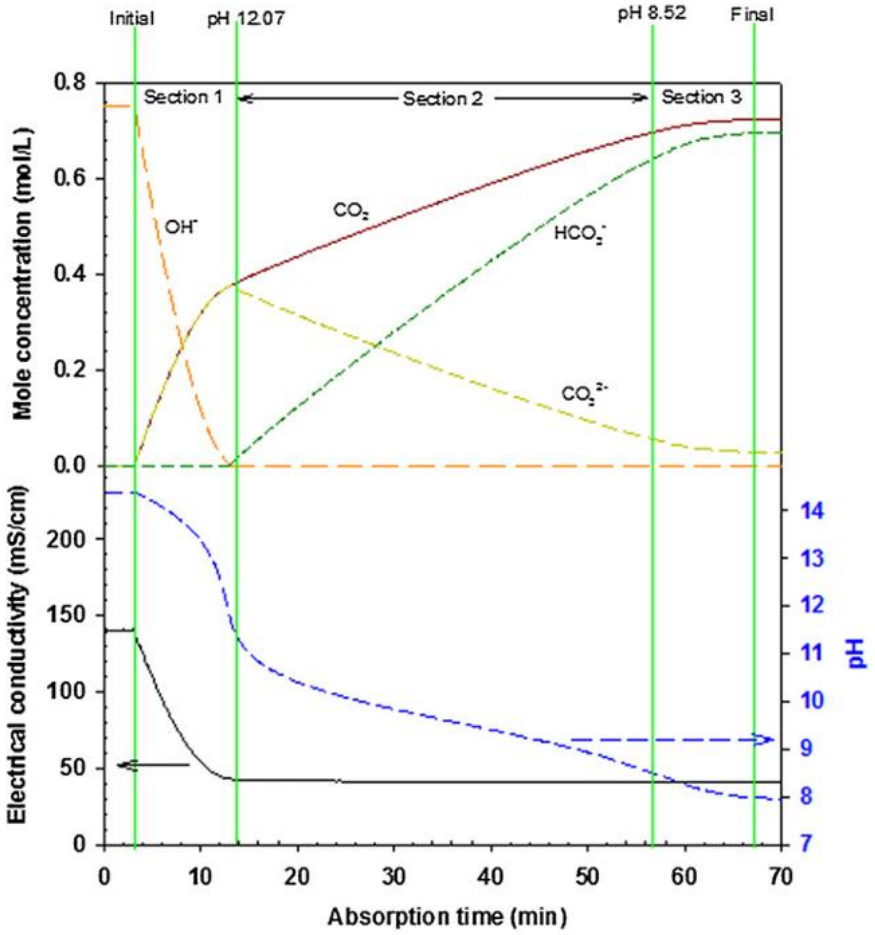


Figure 52. Variation de la capacité de capture du CO_2 et de la concentration en ions d'une solution à 3% de NaOH (tiré de Yoo et al. 2013).

Lors d'expériences préalables décrites en Figure 53, nous avons testé les capacités de capture du CO_2 provenant du premier bioréacteur, soit un débit d'environ 600 mL/h, à travers 700 mL de solution de NaOH. Deux concentrations ont été testées à 0,1 mol/L et à 1 mol/L. Dans les deux cas, les premiers taux de capture permettent d'obtenir un gaz constitué de plus de 97% de H_2 et moins de 3% de CO_2, correspondant à la première phase, puis diminue progressivement, jusqu'à l'arrêt de la solubilisation, avec un gaz constitué d'environ 58% de H_2 et 42% de CO_2, comme initialement observé. Ces valeurs ont même atteint plus de 99% de H_2 et moins de 1% de CO_2 dans le cas de la solution la plus concentrée, avant diminution. Mais la principale différence réside dans la durée de la phase de capture quasi intégrale du CO_2, qui est de moins de 2 heures pour la concentration de NaOH à 0,1 mol/L et de 14 heures pour la concentration en NaOH à 1 mol/L.

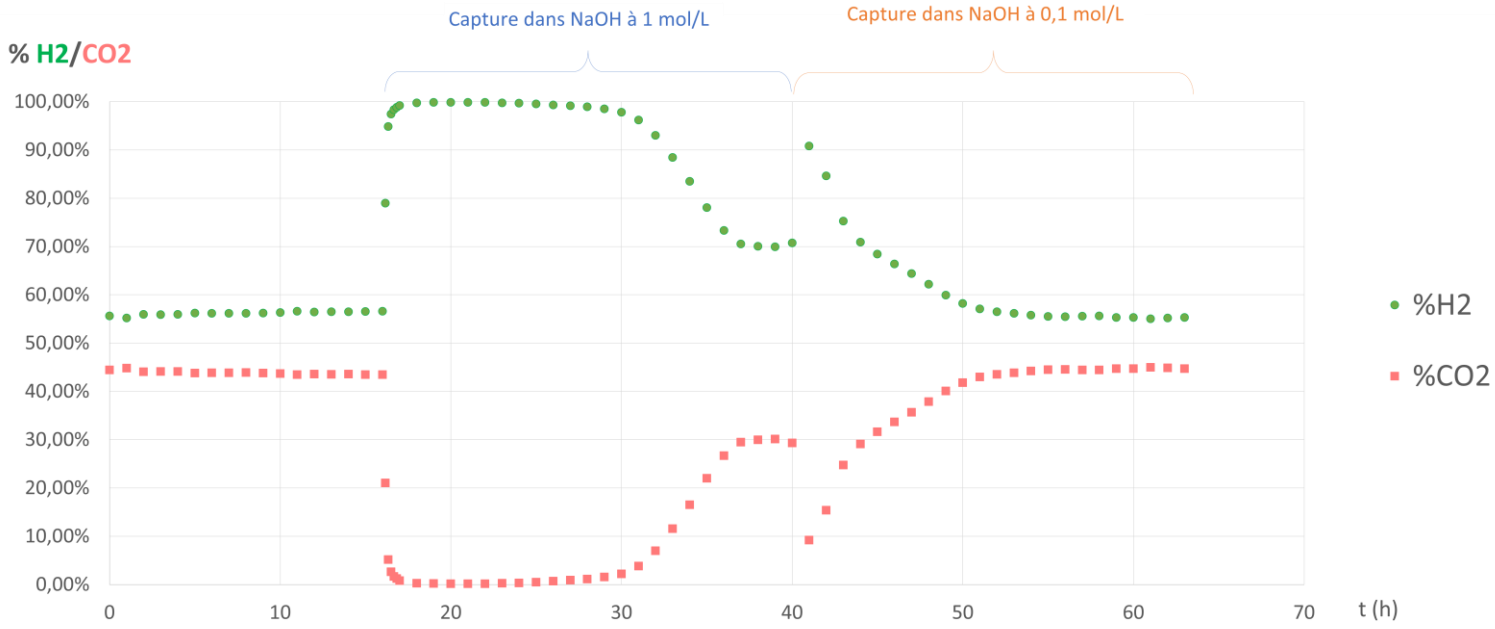


Figure 53. Variation des proportions de gaz en sortie de bioréacteur de fermentation sombre, avec différents essais de capture du CO_2 en solution d'hydroxyde de sodium.

Toutefois, dans le cas du procédé couplé étudié, il est impératif de maintenir 20% de CO_2 dans le gaz en amont de la méthanation, et de ne pas le capturer totalement. Sachant que le gaz en sortie du bioréacteur de culture de *C. pasteurianum* est constitué d'environ 60% de H_2 et de 40% de CO_2 (RH_2/CO_2 = 1,5 mol/mol), il a été imaginé de diviser le flux de gaz en deux canaux et de réaliser la capture sur

seulement l'un des deux, avant de reconstituer le mélange gazeux. Les débits ont été ajustés afin qu'ils soient équivalents juste avant la reconstitution, en tenant compte de la diminution du débit final à cause de la capture du CO_2 (Figure 54). Les proportions dans le gaz final doivent être d'approximativement 80% de H_2 et 20% de CO_2, avec un ajustement potentiel à réaliser. Cet ajustement est réalisé en provoquant une perte de charge au niveau du canal où le gaz n'est pas capturé, en diminuant le diamètre du tuyau à l'aide d'une pince de Hoffman. Ce dispositif entraîne une diminution de 25% du débit de gaz total, entre celui sortant du bioréacteur de culture de *C. pateurianum* et celui arrivant pour la biométhanation. Pour cette expérience, le volume de travail du bioréacteur où a lieu la méthanation a donc été abaissé à 1 L pour conserver un traitement identique de 0,40 $L_{H_2}/L_{culture}/h$ comme lors de la première expérience de couplage en V.1. L'agitation a été maintenue à 1100 rpm, dans la mesure où les meilleures performances ont été relevées avec cette configuration. La solution de NaOH a été préparée à une concentration de 3 mol/L, toujours avec un volume de 700 mL, ce qui représente 2,1 mol d'ions OH^- en solution, capables de solubiliser 1,05 mol de CO_2 sans perte d'efficacité. À raison d'un débit de CO_2 à capturer de 150 mL/h (40% de 375 mL/h, voir Figure 54), c'est-à-dire environ 6,22 mmol/h, il est possible de maintenir cet état durant 168 heures.

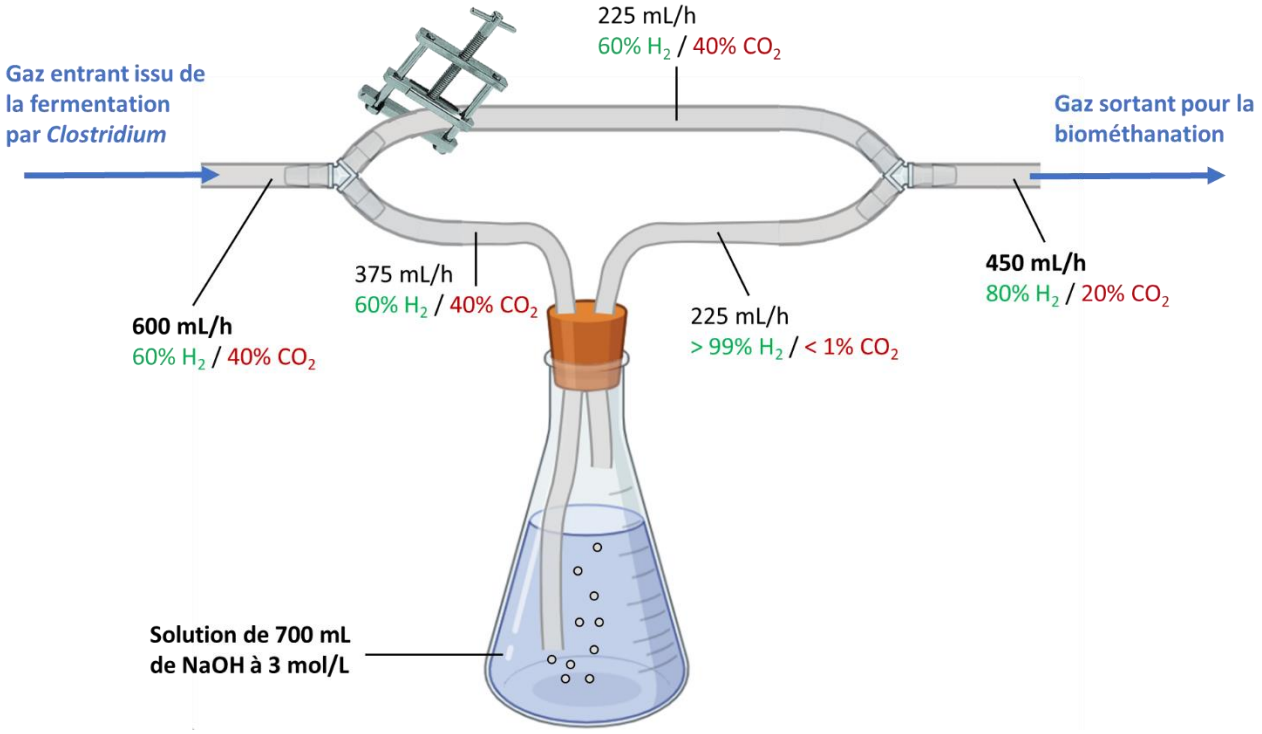


Figure 54. Dispositif expérimental de capture du CO_2 à l'aide d'une solution de NaOH à 3 mol/L, pour l'obtention d'un gaz sortant à 80% de H_2 et 20% de CO_2.

V.3.c. Performances du dispositif

Avant branchement du dispositif, les performances en termes de conversion du CO_2 ont été bien moindres que lors des premières expériences de méthanation (moins de 10% du H_2 injecté consommé, pour environ 3,6% de CH_4 dans le biogaz final).

Ensuite, le couplage des deux bioréacteurs a fait émerger plusieurs problèmes technologiques. En effet, lors de la réaction de méthanation, le nombre de moles de gaz est réduit de cinq à une mole. Ainsi, lorsque la méthanation démarre, cela engendre l'apparition d'un vide dans le réacteur de biométhanation, déréglant l'équilibre instauré au niveau des pertes de charges. Le gaz sera ainsi entraîné vers le tuyau sans capture du CO_2 de façon privilégiée. Ce phénomène est particulièrement

observable de t = 64h à t = 69h et de t = 85h à t = 91h (Figure 55). Il est possible d'augmenter les pertes de charge (réalisé de t = 69h à t = 85h et de t = 91h à t = 106h sur la Figure 55) pour contrebalancer cet effet, mais l'équilibre est difficile à retrouver au vu de la sensibilité du dispositif et nécessite un ajustement permanent, ne pouvant être réalisé avec le matériel à disposition. Les performances de méthanation ont présenté des oscillations en restant en-dessous des 10% de CH_4 dans le biogaz, supposément en raison d'une perturbation du métabolisme microbien suite aux différents changements d'alimentation en H_2 et CO2. La piste de capture du CO_2 a donc été abandonnée pour la suite des expérimentations, sans dispositif de vannes à débit ajustable avec un rétrocontrôle.

Une approche où la capture du CO_2 serait réalisée en aval de la biométhanation aurait pu être pertinente, étant donnée la faible solubilité du méthane à pression atmosphérique et à température ambiante dans les solutions alcalines.

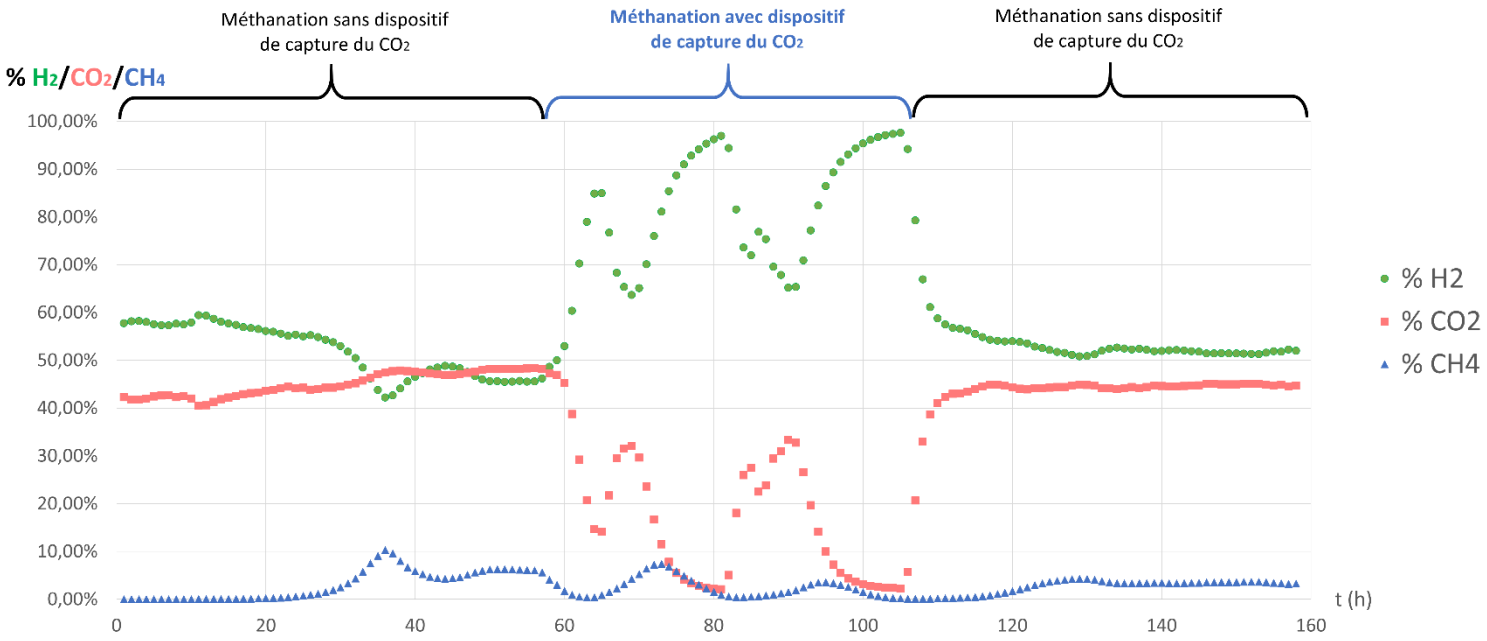


Figure 55. Proportion des gaz au sein du biogaz final issu de la biométhanation suite aux essais de capture du CO_2.

V.4. Expérience de couplage avec étude des effets du transfert de la fraction liquide issue de la culture de *C. pasteurianum*

Le dernier aspect étudié lors des cultures couplées a été l'évaluation des impacts du transfert du milieu sortant du bioréacteur de fermentation sombre, dépourvu de bactéries, vers le bioréacteur de biométhanation. En effet, sachant que certaines archées méthanogènes sont acétotrophes et que le milieu de culture après fermentation par *C. pasteurianum* est riche en acétate, il est possible que celles-ci puissent utiliser l'acétate comme substrat additionnel pour générer du méthane supplémentaire. Ceci sous condition d'avoir une présence en archées acétotrophes suffisante. Lors de cette culture, le volume de fonctionnement du bioréacteur de biométhanation a été de 1,5 L avec une agitation de 1100 rpm. Le couplage de ce réacteur avec celui de la culture continue de *C. pasteurianum* a été effectué au bout de 52 heures, après obtention un débit stabilisé de biogaz provenant du premier bioréacteur.

Au bout de 312 heures, 150 mL de milieu de culture sortant du premier bioréacteur ont été prélevés puis centrifugés à 13750 x g pendant 10 minutes. Cette fraction dépourvue du culot bactérien a été introduite dans le bioréacteur de méthanation biologique, après avoir soutiré 150 mL au sein de ce même bioréacteur, afin de conserver un volume de travail de 1,5 L. Cette étape a été réitérée à la 360ème heure d'expérimentation. Chaque ajout correspond donc à une dilution au dixième des métabolites présents dans le milieu de culture du second bioréacteur.

V.4.a. Influence sur la production de biogaz

Avant ajout de l'effluent liquide, la proportion de CH_4 au sein du biogaz présente de nombreuses variations et n'atteint un état stabilisé que sur des périodes de 20 à 30 heures, avant de chuter. La production de CH_4 est en corrélation nette avec la consommation de H_2 par les archées (Figure 54). La baisse des capacités de production de méthane et de consommation de dihydrogène peut s'expliquer par la nécessité d'une supplémentation régulière en hydrolysat (Henry et al. 2024), qui a été réalisée à raison d'un ajout de 0,5 g/L toutes les 24 heures. Ainsi, lors de cette première phase, le

taux de CH_4 se situait entre 10% et 30%, avec un maximum de 35%, pour des débits entre 50 et 100 mL/h. Il est à noter que différentes perturbations ont lieu, générant un changement dans l'équilibre obtenu les heures auparavant. Étonnamment, contrairement à la première expérience (voir V.1), une fraction de de H_2 généralement comprise entre 40% et 70% est encore présente dans le biogaz final.

Le transfert du milieu de culture issu du bioréacteur de *C. pasteurianum* (flèches orange en Figure 56) a eu un impact significatif sur la production de CH_4, portant, suite au premier ajout le taux de CH_4 à plus de 60% pendant une dizaine d'heures. Lors du second transfert, la proportion de CH_4 a été maintenue relativement constante aux alentours de 70% pendant 24 heures, pour un débit compris entre 180 et 230 mL/h (moyenne de 197 mL/h). Cela est accompagné d'une très forte consommation de H_2, ce dernier ne représentant plus que 3% à 5% du biogaz final.

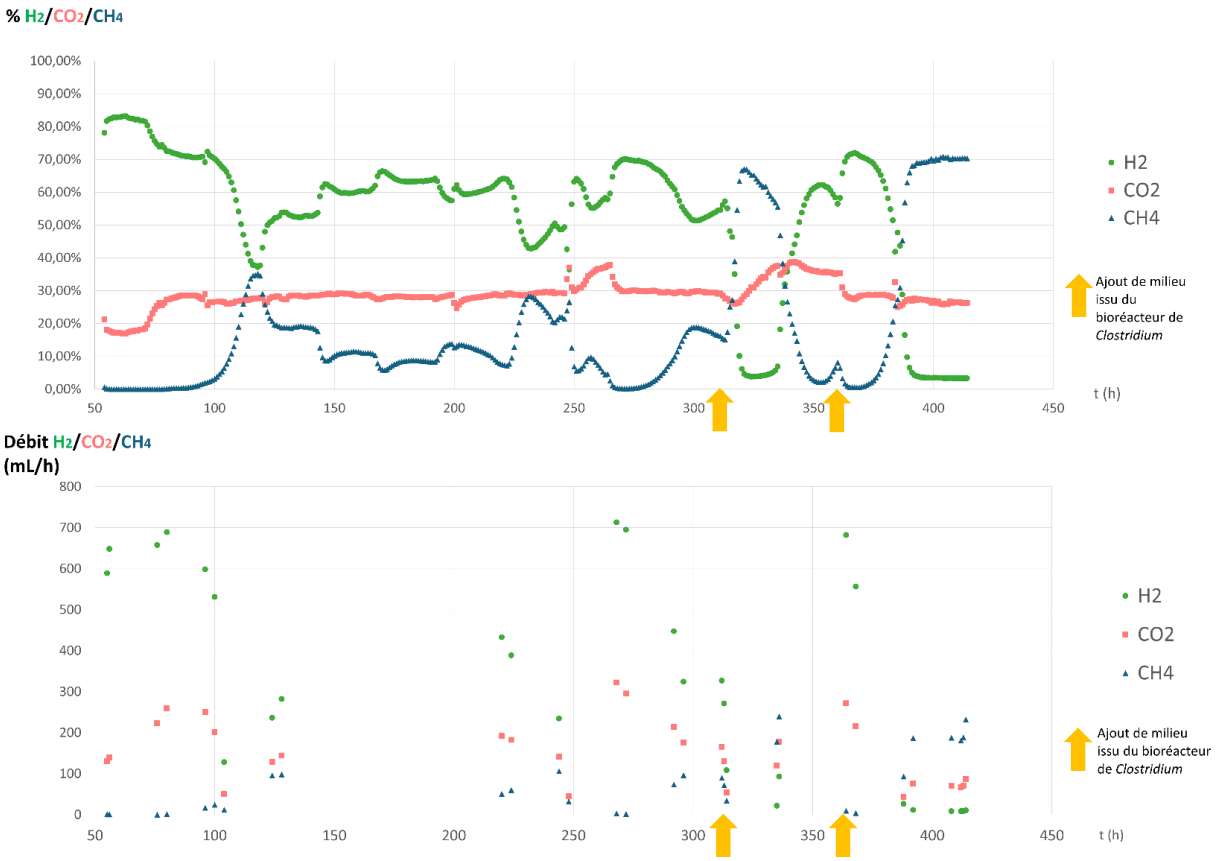


Figure 56. Variation des proportions et débits de gaz mesurés lors de la méthanation et de l'étude de l'effet de l'ajout de la fraction liquide issue du premier bioréacteur de culture de *C. pasteurianum*.

V.4.b. Évolution des concentrations en métabolites

Comme lors de la première expérience de méthanation en utilisant seulement le transfert gazeux, une légère production d'acétate (≈ 4 mmol/L) est observée avant même d'avoir transféré le milieu liquide issu de la culture de *C. pasteurianum*, laissant supposer la présence d'une production de cet acide organique par des micro-organismes acétogènes (Figure 57).

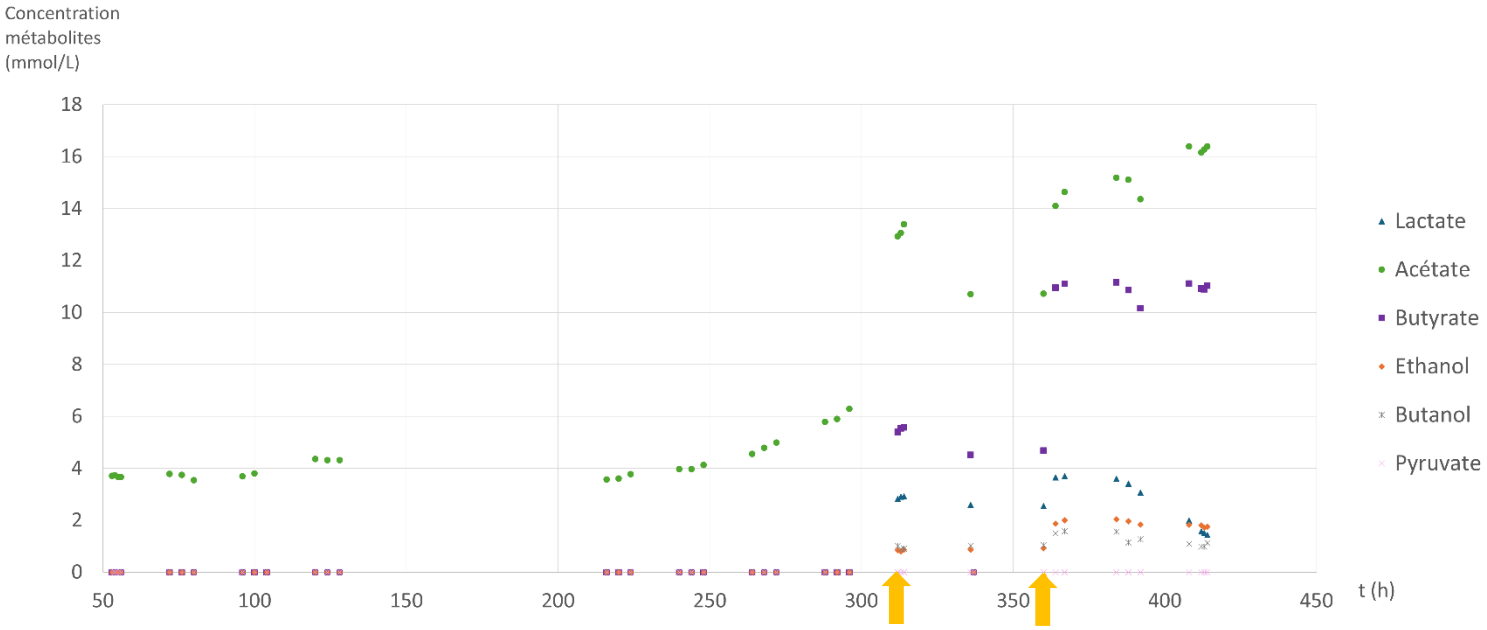


Figure 57. Concentrations en métabolites au sein de la culture du consortium méthanogène avec transfert du gaz et de l'effluent liquide issus de la culture de *C. pasteurianum*.

Après le premier transfert, entre t = 312h et t = 336h, une légère diminution de la concentration des métabolites est observée. Leur concentration ne varie pas entre t = 336h et t = 360h. Cela résulte en une diminution de 0,2 mmol/L de lactate, 2,3 mmol/L d'acétate et 0,7 mmol/L de butyrate en 24 heures (Tableau 13). Pour un volume de 1,5 L, cela se traduit par une consommation de 0,3 mmol de lactate, 3,45 mmol d'acétate et 1,05 mmol de butyrate. Il a été observé que le butyrate ainsi que le lactate pouvaient être oxydés et convertis en acétate et H_2 durant la phase acétogène de la méthanisation, notamment avec des bactéries du genre *Acetobacterium* et *Synthrophothermus* (Ziels et al. 2019; Detman et al. 2018; Sekiguchi et al. 2000).

$Conversion\ du\ lactate\ en\ acétate : 2\ C_3H_6O_3 \rightarrow 3\ C_2H_4O_2$

$Conversion\ du\ butyrate\ en\ acétate\ et\ H_2 : C_4H_8O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ C_2H_4O_2 + 2\ H_2$

En admettant que ces produits soient ensuite totalement convertis en méthane par la suite par les micro-organismes acétotrophes et hydrogénotrophes, on a alors :

$Conversion\ de\ l'acétate\ en\ méthane : C_2H_4O_2 \rightarrow CH_4 + CO_2$

$Conversion\ du\ lactate\ en\ méthane : 2\ C_3H_6O_3 \rightarrow 3\ CH_4 + 3\ CO_2$

$Conversion\ du\ butyrate\ en\ méthane : 2\ C_4H_8O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 5\ CH_4 + 3\ CO_2$

Ainsi, dans le cadre de l'expérience de biométhanation, en 24 heures, la conversion de la totalité des métabolites consommés en méthane aboutirait à la formation de 6,5 mmol, soit 145 mL de CH_4. La productivité additionnelle moyenne de CH_4 via la dégradation des métabolites serait alors d'environ 6 mL/h en plus, bien inférieure à l'augmentation de la productivité observée, de plus de 100 mL/h additionnels (Figure 56), ce qui permet d'affirmer que l'augmentation de la production de CH_4 n'est pas issue de la conversion directe des acides organiques en gaz.

Après le second transfert, à t = 360h, seul le lactate est consommé, et une augmentation de la concentration en acétate est observée, possiblement en raison de la conversion du lactate. Pourtant, une très forte augmentation de la production de méthane est conjointement observée. En définitive, la conversion directe des métabolites en méthane additionnel est un phénomène anecdotique au sein du procédé couplé. En revanche, il est possible que ces acides organiques, ainsi que d'autres nutriments et micro-éléments issus du milieu de la culture de *C. pasteurianum*, non mesurés ici, puissent stimuler la croissance et les capacités du métabolisme des archées hydrogénotrophes. Il serait alors intéressant de maintenir ce transfert, et d'évaluer quels sont les éléments ayant cet effet de l'amélioration de la production de CH_4 dans de futurs travaux.

Tableau 13. Points-clés de l'évolution de la concentration en métabolites lors du transfert du milieu de culture issu de la culture de *C. pasteurianum*.

Métabolite	Lactate	Acétate	Butyrate	Éthanol	Butanol
Concentration initiale avant ajout du milieu t_{312}	**0 mmol/L**	**6,3 mmol/L**	**0 mmol/L**	**0 mmol/L**	**0 mmol/L**
1er ajout de milieu sortant du réacteur de *Clostridium* (dilution de 1/10)	+ 1,6 mmol/L	+ 4,9 mmol/L	+ 3,1 mmol/L	+ 0,7 mmol/L	+ 0,9 mmol/L
Concentration théorique après 1er ajout de milieu	1,6 mmol/L	11,2 mmol/L	3,1 mmol/L	0,7 mmol/L	0,9 mmol/L
Concentration mesurée après 1er ajout de milieu	**2,8 mmol/L (+75%)**	**13,0 mmol/L (+16%)**	**5,4 mmol/L (+74%)**	**0,8 mmol/L (+14%)**	**1,0 mmol/L (+11%)**
Concentration avant 2nd ajout de milieu à t_{360} (et variation)	2,6 mmol/L **(-0,2 mmol/L)**	10,7 mmol/L **(-2,3 mmol/L)**	4,7 mmol/L **(-0,7 mmol/L)**	0,8 mmol/L **(=)**	1,0 mmol/L **(=)**
2nd ajout de milieu sortant du réacteur de *Clostridium* (dilution de 1/10)	+ 0,8 mmol/L	+ 2,9 mmol/L	+ 4,8 mmol/L	+ 0,8 mmol/L	+ 0,3 mmol/L
Concentration théorique après 2nd ajout de milieu	3,4 mmol/L	13,6 mmol/L	9,5 mmol/L	1,6 mmol/L	1,3 mmol/L
Concentration mesurée après 2nd ajout de milieu	**3,7 mmol/L (+9%)**	**14,1 mmol/L (+4%)**	**11,0 mmol/L (+16%)**	**1,9 mmol/L (+19%)**	**1,5 mmol/L (+15%)**
Concentration en fin de culture (et variation)	1,4 mmol/L **(-2,3 mmol/L)**	16,4 mmol/L **(+2,3 mmol/L)**	11,0 mmol/L **(=)**	1,7 mmol/L **(-0,2 mmol/L)**	1,1 mmol/L **(-0,4 mmol/L)**

V.4.c. Conclusions et perspectives d'amélioration du procédé couplé

Grâce à ces travaux, il a été montré que la preuve de concept d'un procédé de méthanation biologique était réalisable avec l'utilisation d'un mélange gazeux provenant d'une fermentation microbiologique, plutôt que de l'injection de gaz pur, sans conséquence délétère sur la viabilité du consortium méthanogène. Il est à noter que l'ajout périodique d'un hydrolysat pour les apports en micronutriments demeure essentiel pour la fonctionnalité du consortium méthanogène. À l'échelle de laboratoire, le transfert du H_2 a pu être réalisé de manière satisfaisante, tant qu'une forte agitation est maintenue (environ 3% de H_2 dans le biogaz final à 1100 rpm). Néanmoins, une quantité résiduelle de H_2 a tout de même été mesurée, et risque d'être plus importante dans le cas d'une montée en échelle, où de tels niveau d'agitation ne peuvent être maintenus. Un dimensionnement réfléchi de la cuve serait alors nécessaire, ou bien l'assurance d'une concentration suffisante en biomasse à l'inoculation ainsi que durant la période de fonctionnement.

Toutefois, bien que la preuve de concept ait été en partie établie, ce procédé reste loin d'être optimal. Une forte proportion de CO_2 reste présente dans le biogaz final, en raison de l'impossibilité de produire préalablement un gaz avec un ratio H_2/CO_2 de 4 pour 1 par simple fermentation sombre. Un dispositif de séparation des gaz spécialement prévu à cet effet serait judicieux, car permettrait l'obtention d'un biogaz essentiellement composé de méthane d'une part, et de CO_2 pur potentiellement valorisable d'autre part. En outre, la productivité de CH_4 pourrait être augmentée car les capacités de consommation de gaz ne semblent pas être maximisées, comme décrit à la section V.1.c. 0,40 $L_{H_2}/L_{culture}/h$ sont atteints, là où la littérature montre généralement des débits supérieurs à 1,0 $L_{H_2}/L_{culture}/h$ dans des procédés de méthanation biologique utilisant des gaz purs (Voelklein et al. 2019; Díaz et al. 2015; Rafrafi et al. 2021). Cela pourrait être expérimenté en adaptant le volume de fonctionnement pour la culture en fermentation sombre par rapport au volume du réacteur de biométhanation, tout en testant les capacités d'un réacteur colonne pour la partie de biométhanation, afin d'avoir un long temps de séjour du H_2 et de maximiser son transfert.

Il a également été constaté un effet bénéfique du transfert de la phase liquide de la culture continue de *C. pasteurianum* vers le bioréacteur où se déroule la biométhanation. Plusieurs expériences

complémentaires pourraient être réalisées afin de réussir à décrire plus précisément les phénomènes ayant lieu, comme un éventuel enrichissement en micro-organismes acétotrophes, ou bien si les acides organiques peuvent directement être utilisés pour la formation de biomasse additionnelle, ce qui améliorerait la production de CH_4 à l'échelle du bioréacteur. Enfin, il convient de préciser que dans nos conditions expérimentales, le rendement en CH_4 final par rapport au glucose apporté en début de procédé lors de la fermentation sombre est d'environ 0,4 mole de CH_4 par mole de glucose, ce qui est nettement inférieur au rendement du H_2 considérant le procédé non couplé.

Conclusion générale, discussion et perspectives

➢ Synthèse générale et discussion

Objectifs globaux et stratégie expérimentale du travail de thèse

Ce travail avait pour finalité première la réalisation d'un procédé robuste et performant de production de biohydrogène en vue d'un couplage avec la méthanation biologique. La littérature scientifique comporte un panel d'études sur la production microbiologique de H_2 très étendu, se penchant principalement sur la biophotolyse, la photofermentation et la fermentation sombre. Cette dernière reste néanmoins la plus étudiée, car connue depuis plus d'un siècle et ne nécessitant pas d'apport d'énergie lumineuse. Les bactéries du genre *Clostridium* sont particulièrement connues pour présenter des productivités volumiques élevées et le choix s'est donc logiquement porté sur l'étude de celles-ci. Les expériences ont été réalisées en culture pure, principalement en utilisant le glucose en tant que substrat carboné, afin de pouvoir déterminer les performances des micro-organismes et de pouvoir les comparer judicieusement avec les études existantes. Afin de réaliser une méthanation *ex-situ* dans les meilleures conditions, le transfert de gaz se doit donc d'être constant pour aboutir à un système stabilisé. La culture continue en chemostat de clostridies s'avère alors judicieuse puisqu'elle permet une émission gazeuse constante à l'état stabilisé. Les technologies de méthanation biologique présentes dans la littérature ont également été passées en revues afin d'identifier les conditions physico-chimiques utilisées et les problématiques technologiques potentielles. Il est apparu que la vaste majorité des études *ex-situ* réalise une biométhanation en injectant du H_2 et du CO_2 purs dans des proportions respectant la stœchiométrie de la réaction de biométhanation, de 4 moles de H_2 pour 1 mole de CO_2. Les aspects de couplage avec un procédé microbien de production de ces gaz afin de rentrer dans un procédé global purement biologique n'a été que très peu exploré, et aucune publication ne mentionne l'utilisation de bactéries du genre *Clostridium* pour le premier étage du procédé couplé. Il s'est alors avéré intéressant d'investiguer cet aspect, dans un but de combler le manque de connaissances scientifiques à ce sujet.

Le travail a donc pu être scindé en trois grandes démarches expérimentales et scientifiques, à savoir d'abord l'étude des paramètres les plus pertinents et de la souche de *Clostridium* la plus adaptée pour

la production de H_2, puis l'optimisation en culture continue de la production de H_2, avant d'entamer les premières expériences de couplage et l'obtention des premiers résultats en termes de production de méthane.

Choix de la souche de *Clostridium* en mode de culture discontinu

La première phase expérimentale s'est penchée sur le mode de culture discontinu et l'évaluation des performances de production de H_2 de quatre souches documentées dans la littérature scientifique, à savoir *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. pasteurianum* ATCC 6013, *C. butyricum* DSM 5431 et *C. tyrobutyricum* CNRZ 510. Cependant, les conditions de culture pouvant être recensées dans les plusieurs centaines de publications existantes rapportent des conditions de culture tout autant variées, rendant les comparaisons des capacités de chaque souche difficilement réalisables. Il a donc fallu trouver des conditions standardisées et des aspects de comparaison rationnels pour la production de H_2, chose qui a été réalisée et faisant l'objet d'une publication à paraître dans *Journal of Biotechnology*. Il en est ressorti que *C. pasteurianum* ATCC 6013 a présenté de loin les meilleurs résultats en termes de productivité maximale de gaz (> 800 $mL/L_{culture}/h$), tout en présentant une croissance parmi les plus rapides et un ratio molaire R_{H_2/CO_2} parmi les plus élevés, qui sont autant de paramètres clés pour s'assurer de hautes performances lors de la transposition en culture continue. Par conséquent, cela vient interroger la place prédominante qu'occupe *C. acetobutylicum* ATCC 824 dans les nombreuses publications sur la production de dihydrogène. Il est probable que cela vienne de l'aspect « souche de référence historique », encourageant ainsi les travaux avec elle, puisque les premières fermentations sombres industrielles au début du $XX^{ème}$ siècle ont été réalisées avec celle-ci. Néanmoins, la souche ATCC 824 présente des performances intéressantes du point de vue des productions spécifiques, et serait particulièrement adaptée pour explorer des bioprocédés avec des cellules immobilisées.

Culture continue et optimisation du procédé

La culture continue s'avère pertinente dans le cadre du couplage car présente un double-avantage. D'une part, ce mode permet la production de H_2 et de CO_2 de manière constante, ce qui est recherché pour l'injection en biométhanation. D'autre part, ce mode de culture nécessite le maintien de la croissance bactérienne, ce qui correspond à la sollicitation des voies métaboliques les plus

énergétiques et les plus prolifiques en termes de synthèse de dihydrogène. Nous avons pu établir que les paramètres les plus influents sur la production de H_2 étaient le pH, le taux de dilution et la concentration en substrat (glucose) de l'alimentation. Les effets isolés et conjugués de ces paramètres ont été déterminés à l'aide d'un plan d'expériences composite à faces centrées (CCF). Cette démarche a l'avantage d'évaluer les effets des facteurs étudiés, et notamment de leurs interactions, tout en se plaçant dans un large domaine d'étude et en minimisant le nombre d'expériences requises pour établir un modèle mathématique fiable. Dans notre cas, les réponses considérées pour le choix d'un optimum en vue d'alimenter un deuxième étage que constitue le procédé de biométhanation étaient la productivité volumique en H_2, le ratio molaire R_{H_2/CO_2}, tout en constatant moins de 0,2 g/L de glucose résiduel en sortie de bioréacteur. Les paramètres ont alors été fixés avec pH = 7,0 ; D = 0.230 h^{-1} et S_f = 17 g/L et ont permis d'aboutir à une productivité d'environ 500 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$, tout en ayant un ratio R_{H_2/CO_2} > 1,7 mol/mol, sans présence de glucose résiduel.

Mise en œuvre expérimentale du couplage de la fermentation sombre et la biométhanation

La preuve de concept de production de CH_4 par méthanation biologique *ex-situ* en conditions thermophiles, couplée avec une production préalable de H_2 et de CO_2 par fermentation sombre de *C. pasteurianum*, a pu être réalisée avec succès au cours de ce travail de thèse, chose qui n'avait pas été réalisée jusqu'alors. Les premières expériences ont pu aboutir à une productivité volumique moyenne de 133 $mL_{CH_4}/L_{culture}/h$ pendant 24h en traitant environ 400 $mL_{H_2}/L_{culture}/h$. Il a été montré, suite à une analyse métagénomique, que la vaste majorité des micro-organismes présents dans le consortium méthanogène étaient du genre *Methanothermobacter*. De plus, le milieu liquide sortant du bioréacteur de *C. pasteurianum* a eu pour effet d'augmenter temporairement la proportion et la productivité en CH_4 dans le biogaz final. Il pourra être intéressant d'approfondir l'étude de ce phénomène et ses effets sur la physiologie des archées méthanogènes. Toutefois, les aspects d'optimisation de la production de CH_4 n'ont pas pu être abordés au sein de ce travail de thèse, mais doivent bien entendu être étudiés, et comparés aux performances d'autres procédés de méthanation ou de méthanisation afin de juger de la faisabilité du procédé à plus grande échelle. Idéalement, ce genre de procédé de méthanation biologique doit pouvoir venir en complément de la méthanisation. En effet, les résultats de cette thèse ont présenté un rendement molaire $Y_{CH_4/glucose}$ = 0,4 mol/mol, ce

qui reste inférieur au rendement théorique maximal en méthanisation, où les coefficients stœchiométriques montrent que 3 moles de CH_4 et 3 moles de CO_2 peuvent être obtenues à partir d'une mole de glucose. La méthanation *ex-situ* peut, en revanche, être avantageuse lorsque le procédé amène à l'obtention d'un biogaz suffisamment riche en CH_4, sans H_2 et CO_2 résiduel, pour injection directe dans le réseau de gaz naturel.

➢ Perspectives

Bien que les objectifs globaux de cette thèse aient été remplis, plusieurs aspects peuvent encore être améliorés afin d'approfondir les connaissances sur les thématiques abordées de même que certaines observations ont ouvert la voie à de nouvelles questions scientifiques et technologiques. Certains résultats permettraient de se diriger vers la faisabilité du procédé couplé à l'échelle industrielle, pour une application concrète.

Développement du premier étage

→ Amélioration des souches et co-culture

Des approches d'ingénierie génétique en complément pourraient être pertinentes afin d'obtenir des souches plus efficaces dans la production de H_2, possédant de très hautes activités hydrogénase et produisant de faibles quantités de solvants. En particulier, il serait possible de supprimer les voies métaboliques concurrentes de l'hydrogénase, notamment celles impliquées dans le recyclage du NADH en NAD^+. Par exemple, une souche déplétée dans sa capacité à produire du lactate, de l'éthanol, du butanol voire du butyrate n'aurait que la voie de l'hydrogénase comme solution pour maintenir l'équilibre rédox. Par ailleurs, la voie de l'acétate pourvoyeuse en ATP, et qui serait préservée dans une telle souche, permettrait de favoriser la croissance (sous réserve que les conditions thermodynamiques soient favorables), obligatoire dans les procédés continus. Par ailleurs, une surexpression de l'hydrogénase native ou encore sa substitution par une autre plus processive dans le sens de la synthèse, serait également une stratégie d'ingénierie métabolique intéressante. Malgré cela, le ratio molaire entre le H_2 et le CO_2 ne serait jamais de 4:1, résultant en une quantité importante de CO_2

résiduel en sortie du bioréacteur de biométhanation. Ceci constitue le plus gros point noir subsistant du procédé couplé.

Des expériences de co-culture de clostridies avec d'autres espèces bactériennes, ou bien un étage intermédiaire utilisant des micro-organismes capables de dégrader les acides organiques en H_2 supplémentaire par photo-fermentation serait une solution potentielle, mais comportant des coûts importants en raison de la nécessité d'apporter de l'énergie sous forme lumineuse. Des études technico-économiques portant plus précisément sur les procédés couplés s'avèreraient pertinentes fin d'apporter des réponses à ces questionnements.

→ Développement et extension du modèle à d'autres substrats

L'aspect du plan d'expériences ayant porté ses fruits, il peut être intéressant d'affiner au besoin certains aspects du modèle par le moyen d'expériences complémentaires, comme l'ajout d'un plan de Box-Behnken (Annexe 1). Cela permettra de confirmer ou non si certains paramètres sont indépendants des autres et peuvent être négligés. Par conséquent, il sera possible d'éliminer des termes des équations décrivant les réponses du système, et de simplifier la description globale, sans perte de précision. Ceci permettra d'appliquer cette démarche dans le cas de l'utilisation d'un autre substrat, tel que le glycérol, afin d'utiliser des co-produits peu onéreux. L'exploitation de co-produits riches en cellulose par des espèces cellulolytiques de clostridies, telles que *Ruminiclostridium cellulolyticum*, *Clostridum phytofermentans*, ou encore *Clostridium thermocellum* pour la production de H_2 à partir de ressources difficilement valorisables en temps normal.

Concernant l'approche par plan d'expériences, le modèle empirique peut encore s'avérer plus prédictif grâce à une approche relativement nouvelle, permettant encore de réduire le nombre de cultures et donc le temps consacré aux expérimentations, tout en affinant le modèle obtenu. Il s'agit des plans d'expériences dits « intensifiés » (ou « iDoE »), se reposant sur une modélisation hybride et où les données obtenues durant les états transitoires après un changement de paramètres, avant d'atteindre l'état stabilisé du chemostat, sont également exploitées. Cette approche est notamment utilisée lors de la montée en échelle de procédés, ou utilisant des cellules avec des temps de latence avant stabilisation particulièrement longs. Dans cette démarche, les données sont traitées par un réseau de

neurones, qui va exercer un contrôle prédictif des réponses à l'aide d'équations différentielles (Von Stosch et Willis 2017; Bayer et al. 2020).

Développement du deuxième étage

→ Dimensionnement respectif des deux étages

Une piste technologique à améliorer serait le débit entrant de H_2 pour la biométhanation *ex-situ*, qui, dans ce travail de thèse, reste bien inférieur à ce qui a été réalisé dans la littérature scientifique. Un accent sur la mise au point et le dimensionnement des deux bioréacteurs pourrait constituer une piste de travail pertinente, notamment dans l'optique d'une montée en échelle du procédé couplé. Un transfert assisté par une pompe avec de meilleures performances permettrait d'utiliser un diffuseur de gaz générant de plus petites bulles, améliorant ainsi le transfert de H_2, ce qui permettrait de traiter un débit plus important. L'utilisation d'un réacteur en colonne permettrait de jouer sur le temps de séjour du H_2, et ainsi d'augmenter la quantité transférée en phase aqueuse également.

→ Captation du CO_2

Un dispositif de séparation et capture du CO_2 en sortie du réacteur de fermentation sombre paraît essentiel afin d'obtenir les proportions désirées de H_2 et de CO_2 avant l'injection pour la biométhanation dans le but pas avoir de H_2 et de CO_2 résiduels dans le biogaz. L'évaluation technico-économique d'un tel dispositif est à déterminer en fonction de l'échelle de travail considérée. Cela a pour double-avantage de présenter, *in fine,* deux gaz séparés de haute pureté : le CH_4 d'une part et le CO_2 d'autre part. Sinon, capter le CO_2 en aval du procédé global est une alternative judicieuse à envisager.

→ Transfert du milieu liquide en parallèle des gaz

Comme évoqué dans le dernier chapitre, les effets bénéfiques du transfert de la partie liquide issue de la fermentation sombre sur la production de méthane pourraient être explorés afin de les décrire avec succès, ainsi que de décrire la physiologie des archées méthanogènes lors de l'assimilation des acides organiques. Ainsi, cela permet d'ouvrir la voie à un éventuel transfert de cette phase liquide en mode continu, en utilisant un bioréacteur perfusé ou un système de filtration membranaire

tangentielle en aval du premier étage (Annexe 2). Une fraction plus importante de la matière organique injectée initialement dans le procédé serait alors dirigée vers la production de CH_4. Néanmoins, les questions du coût d'un tel dispositif est à prendre en compte pour réfléchir à un procédé économiquement viable.

Pour conclure d'une manière plus générale sur l'inscription de cette thèse dans les problématiques sociétales, il convient de préciser que ce travail a pour vocation d'apporter des éléments de réponses aux questionnements scientifiques, tels que l'exploration des souches adaptées à la production continue de H_2, la possibilité de prédire les performances de production en H_2 par un système de fermentation sombre en continu à l'aide d'un plan d'expérience, ou les capacités d'un consortium méthanogène à réaliser la biométhanation non pas avec un mélange de gaz prédéfini et contrôlé, mais avec les gaz produits préalablement par fermentation sombre. Néanmoins, ce bioprocédé de production de gaz à visée énergétique n'a pas pour vocation de remplacer des technologies plus « simples » telles que la méthanisation pour la production de méthane, ou bien l'électrolyse de l'eau pour la production de dihydrogène. Toutefois, avec un approfondissement des connaissances, cette technique pourrait aider à traiter et valoriser à moindre coût des co-produits de certaines filières. En outre, le H_2 étant utilisé pour la fabrication de plusieurs ressources essentielles (ammoniac, méthanol, acier), il peut être intéressant d'avoir un bioprocédé pouvant être « découplé » et « modulable », produisant du H_2 plutôt que du CH_4, selon les besoins. Enfin, la production de CH_4 d'origine biologique a pour vocation d'éviter l'utilisation intensive de CH_4 d'origine fossile. Mais si cette production vient à voir le jour de manière efficace il y a alors le risque non négligeable de voir apparaître un « effet rebond », où ce biogaz viendrait s'additionner à l'utilisation de gaz fossile plutôt que de le remplacer, ce qui ne contribuerait pas à la réduction des émissions de gaz à effet de serre. Ainsi, ces approches de décarbonation de la production d'énergie n'auront de sens que dans un contexte de sobriété énergétique global.

Références bibliographiques

Abbad-Andaloussi, S., J. Amine, P. Gerard, et H. Petitdemange. 1998. « Effect of Glucose on Glycerol Metabolism by Clostridium Butyricum DSM 5431 ». *Journal of Applied Microbiology* 84 (4): 515-22. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00374.x.

Abbasi, T., S. M. Tauseef, et S. A. Abbasi. 2012. « A Brief History of Anaerobic Digestion and "Biogas" ». In *Biogas Energy*, par Tasneem Abbasi, S.M. Tauseef, et S.A. Abbasi. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1040-9_2.

Adams, M. W., et L. E. Mortenson. 1984. « The Physical and Catalytic Properties of Hydrogenase II of Clostridium Pasteurianum. A Comparison with Hydrogenase I. » *Journal of Biological Chemistry* 259 (11): 7045-55. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39835-6.

Adekunle, K. F., et J. A.Okolie. 2015. « A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion ». *Advances in Bioscience and Biotechnology* 06 (03): 205-12. https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020.

Aghel, B., Sara B., et Falah A. 2022. « CO2 Capture from Biogas by Biomass-Based Adsorbents: A Review ». *Fuel* 328 (novembre): 125276. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125276.

Agneessens, L. M., L. D. M. Ottosen, N. V. Voigt, et al. 2017. « In-situ biogas upgrading with pulse H2 additions: The relevance of methanogen adaption and inorganic carbon level ». *Bioresource Technology* 233 (juin): 256-63. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.016.

Akal, D., S. Öztuna, et M. K. Büyükakın. 2020. « A Review of Hydrogen Usage in Internal Combustion Engines (Gasoline-Lpg-Diesel) from Combustion Performance Aspect ». *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (60): 35257-68. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.001.

Akkerman, I., M. Janssen, et J. Rocha. 2002. « Photobiological Hydrogen Production: Photochemical Efficiency and Bioreactor Design ». *International Journal of Hydrogen Energy*.

Allakhverdiev, S. I., V. Thavasi, V. D. Kreslavski, et al. 2010. « Photosynthetic Hydrogen Production ». *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 11 (2-3): 101-13. https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2010.07.002.

Angelidaki, I., Laura T., P. Tsapekos, et al. 2018. « Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives ». *Biotechnology Advances* 36 (2): 452-66. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.011.

Azoulay, E., et B. Marty. 1970. « Étude du système multienzymatique hydrogène lyase chez *Escherichia coli* K 12 et ses mutants chlorate-résistants ». *European Journal of Biochemistry* 13 (1): 168-73. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00914.x.

Baeyens, J., H. Zhang, J. Nie, et al. 2020. « Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 131 (juillet): 0. https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023.

Bar-On, Y. M., R. Phillips, et R. Milo. 2018. « The Biomass Distribution on Earth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (25): 6506-11. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115.

Bayer, B., G. Striedner, et M. Duerkop. 2020. « Hybrid Modeling and Intensified DoE: An Approach to Accelerate Upstream Process Characterization ». *Biotechnology Journal* 15 (9): 2000121. https://doi.org/10.1002/biot.202000121.

Benemann, J. R. 2000. « Hydrogen Production by Microalgae ». *Journal of Applied Phycology* 12: 291-300. https://doi.org/10.1023/A:1008175112704.

Bergere, J. L., D. Le Bars, et J. Commissaire. 1969. « La bactofugation du lait et l'élimination des spores de Clostridium tyrobutyricum ». *Le Lait* 49 (488): 507-19. https://doi.org/10.1051/lait:196948820.

Biebl, H. 2001. « Fermentation of glycerol by Clostridium pasteurianum — batch and continuous culture studies ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27 (1): 18-26. https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000155.

Bora, N., A. K. Singh, P. Pal, et al. 2024. « Green ammonia production: Process technologies and challenges ». *Fuel* 369 (août): 131808. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.131808.

Bortolucci, J., A. C. B. Zani, P. F. De Gouvêa, T. M. Dinamarco, et V. Reginatto. 2023. « A Non-Solventogenic Clostridium Beijerinckii Strain Lacking Acetoacetate Decarboxylase Assimilates Acetate and Accumulates Butyrate ». *Biomass and Bioenergy* 172 (mai): 106780. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106780.

Bouallagui, H., H. Lahdheb, E. Ben Romdan, B. Rachdi, et M. Hamdi. 2009. « Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition ». *Journal of Environmental Management* 90 (5): 1844-49. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.12.002.

Burkhardt, M., et G. Busch. 2013. « Methanation of hydrogen and carbon dioxide ». *Applied Energy* 111 (novembre): 74-79. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.080.

Burkhardt, M., I. Jordan, S. Heinrich, J. Behrens, A. Ziesche, et G. Busch. 2019. « Long term and demand-oriented biocatalytic synthesis of highly concentrated methane in a trickle bed

reactor ». *Applied Energy* 240 (avril): 818-26. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.02.076.

Calbry-Muzyka, A., H. Madi, F. Rüsch-Pfund, M. Gandiglio, et S.Biollaz. 2022. « Biogas Composition from Agricultural Sources and Organic Fraction of Municipal Solid Waste ». *Renewable Energy* 181 (janvier): 1000-1007. https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.09.100.

Calusinska, M., T. Happe, B. Joris, et A. Wilmotte. 2010. « The Surprising Diversity of Clostridial Hydrogenases: A Comparative Genomic Perspective ». *Microbiology* 156 (6): 6. https://doi.org/10.1099/mic.0.032771-0.

Castilla-Llorente, V., D. Muñoz-Espín, L. Villar, M. Salas, et W. J. J. Meijer. 2006. « Spo0A, the Key Transcriptional Regulator for Entrance into Sporulation, Is an Inhibitor of DNA Replication ». *The EMBO Journal* 25 (16): 3890-99. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601266.

Charubin, K., R. K. Bennett, A. G. Fast, et E. T. Papoutsakis. 2018. « Engineering Clostridium Organisms as Microbial Cell-Factories: Challenges & Opportunities ». *Metabolic Engineering*, Metabolic Engineering Host Organism Special Issue, vol. 50 (novembre): 173-91. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.012.

Chatzis, A., P. Gkotsis, et A. Zouboulis. 2024. « Biological methanation (BM): A state-of-the-art review on recent research advancements and practical implementation in full-scale BM units ». *Energy Conversion and Management* 314 (août): 118733. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.118733.

Cheng, X., et C. Liu. 2011. « Hydrogen Production via Thermophilic Fermentation of Cornstalk by Clostridium thermocellum ». *Energy & Fuels* 25 (4): 1714-20. https://doi.org/10.1021/ef2000344.

Choi, O., T. Kim, H. M. Woo, et Y. Um. 2014. « Electricity-Driven Metabolic Shift through Direct Electron Uptake by Electroactive Heterotroph Clostridiumpasteurianum ». *Scientific Reports* 4 (1): 6961. https://doi.org/10.1038/srep06961.

Constante, F. B., W. Schmidell, et V. Reginatto. 2019. « Impact of Glucose Concentration on Productivity and Yield of Hydrogen Production by the New Isolate *Clostridium Beijerinckii* Br21 ». *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 97 (5): 1092-99. https://doi.org/10.1002/cjce.23327.

Cornillot, E., R. V. Nair, E. T. Papoutsakis, et P. Soucaille. 1997. « The Genes for Butanol and Acetone Formation in Clostridium Acetobutylicum ATCC 824 Reside on a Large Plasmid Whose Loss Leads to Degeneration of the Strain ». *Journal of Bacteriology* 179 (17): 5442-47. https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5442-5447.1997.

Cotter, J. L., M. S. Chinn, et A. M. Grunden. 2009. « Ethanol and Acetate Production by Clostridium Ljungdahlii and Clostridium Autoethanogenum Using Resting Cells ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (3): 369-80. https://doi.org/10.1007/s00449-008-0256-y.

Crespo, C., T. Pozzo, E. N. Karlsson, M. T. Alvarez, et B. Mattiasson. 2012. « Caloramator boliviensis sp. nov., a thermophilic, ethanol-producing bacterium isolated from a hot spring ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (Pt_7): 1679-86. https://doi.org/10.1099/ijs.0.032664-0.

Cruz-Morales, P., C. A. Orellana, G. Moutafis, et al. 2019. « Revisiting the Evolution and Taxonomy of Clostridia, a Phylogenomic Update ». *Genome Biology and Evolution* 11 (7): 2035-44. https://doi.org/10.1093/gbe/evz096.

De Castro, P. F. D. L., R. D. M. Altafini, J. Bortolucci, J. Florêncio, M. L. A. M. Campos, et V.Reginatto. 2025. « Exploiting 1,3-Propanediol Production by a Clostridium Beijerinckii Strain: The Role of Glycerol and Ammonium Sulfate Concentrations ». *Fermentation* 11 (4): 187. https://doi.org/10.3390/fermentation11040187.

De Jonge, N., J. S. Poulsen, N. T. Vechi, M. V. W. Kofoed, et J. L. Nielsen. 2022. « Wood-Ljungdahl Pathway Utilisation during in Situ H2 Biomethanation ». *Science of The Total Environment* 806 (février): 151254. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151254.

Decker, K., K. Jungermann, et R. K. Thauer. 1970. « Energy Production in Anaerobic Organisms ». *Angewandte Chemie International Edition in English* 9 (2): 138-58. https://doi.org/10.1002/anie.197001381.

Demuez, M., L. Cournac, O. Guerrini, P. Soucaille, et L. Girbal. 2007. « Complete Activity Profile of *Clostridium Acetobutylicum* [FeFe]-Hydrogenase and Kinetic Parameters for Endogenous Redox Partners ». *FEMS Microbiology Letters* 275 (1): 113-21. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00868.x.

Detman, A., D. Mielecki, Ł. Pleśniak, et al. 2018. « Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: a piece of the anaerobic digestion puzzle ». *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 116. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1106-z.

Di Maria, F., M. Barratta, F. Bianconi, P. Placidi, et D. Passeri. 2017. « Solid anaerobic digestion batch with liquid digestate recirculation and wet anaerobic digestion of organic waste: Comparison of system performances and identification of microbial guilds ». *Waste Management* 59 (janvier): 172-80. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.039.

Díaz, I., C. Pérez, N. Alfaro, et F. Fdz-Polanco. 2015. « A feasibility study on the bioconversion of CO2 and H2 to biomethane by gas sparging through polymeric membranes ».

Bioresource Technology 185 (juin): 246-53. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.114.

Du, Y., W.Zou, K. Zhang, G. Ye, et J. Yang. 2020. « Advances and Applications of Clostridium Co-culture Systems in Biotechnology ». *Frontiers in Microbiology* 11. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.560223.

Dürre, P. 2014. « Physiology and Sporulation in *Clostridium* ». *Microbiology Spectrum* 2 (4): 2.4.10. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012.

Dürre, P., et C. Hollergschwandner. 2004. « Initiation of Endospore Formation in Clostridium Acetobutylicum ». *Anaerobe* 10 (2): 69-74. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2003.11.001.

Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, et E. Stackebrandt, éd. 2006. *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3.

Ergal, İ., O. Gräf, B. Hasibar, et al. 2020. « Biohydrogen Production beyond the Thauer Limit by Precision Design of Artificial Microbial Consortia ». *Communications Biology* 3 (1): 1. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01159-x.

Fachal-Suárez, M., S. Krishnan, S. Chaiprapat, D.González, et D. Gabriel. 2024. « An Overview of Biomethanation and the Use of Membrane Technologies as a Candidate to Overcome H2 Mass Transfer Limitations ». *Biotechnology Advances* 77 (décembre): 108465. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108465.

Fang, H. H. P., H. Zhu, et T. Zhang. 2006. « Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* ». *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (15): 2223-30. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.03.005.

Fatima, S., A. Kumar, et R. K. Singh. 2018. *Biohydrogen Production: A Potential Energy Resource*. 2395. n° 2395: 2395.

Fritsch, M., W. Hartmeier, et J. Chang. 2008. « Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fittings ». *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (22): 6549-57. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.070.

Gagliano, M.C., C.M. Braguglia, M. Petruccioli, et S. Rossetti. 2015. « Ecology and biotechnological potential of the thermophilic fermentative Coprothermobacter spp. » *FEMS Microbiology Ecology* 91 (5): fiv018. https://doi.org/10.1093/femsec/fiv018.

Galimova, T., M. Fasihi, D. Bogdanov, et Christian Breyer. 2023. « Impact of International Transportation Chains on Cost of Green E-Hydrogen: Global Cost of Hydrogen and Consequences for Germany and Finland ». *Applied Energy* 347 (octobre): 121369. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.121369.

Gallardo, R., M. Alves, et L. R. Rodrigues. 2014. « Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol ». *Biomass and Bioenergy* 71 (décembre): 134-43. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.015.

Ghanimeh, S. A., P. E. Saikaly, D. Li, et M. El-Fadel. 2013. « Population dynamics during startup of thermophilic anaerobic digesters: The mixing factor ». *Waste Management* 33 (11): 2211-18. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.06.011.

Gniese, C., P. Bombach, J. Rakoczy, et al. 2013. « Relevance of Deep-Subsurface Microbiology for Underground Gas Storage and Geothermal Energy Production ». In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2013_257.

Greenbaum, E. 1988. « Energetic Efficiency of Hydrogen Photoevolution by Algal Water Splitting ». *Biophysical Journal* 54 (2): 365-68. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(88)82968-0.

Groeger, C., W. Wang, W. Sabra, T. Utesch, et A. Zeng. 2017. « Metabolic and proteomic analyses of product selectivity and redox regulation in Clostridium pasteurianum grown on glycerol under varied iron availability ». *Microbial Cell Factories* 16 (avril): 64. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0678-9.

Guedon, E., M. Desvaux, et H. Petitdemange. 2000. « Kinetic Analysis of Clostridium cellulolyticum Carbohydrate Metabolism: Importance of Glucose 1-Phosphate and Glucose 6-Phosphate Branch Points for Distribution of Carbon Fluxes Inside and Outside Cells as Revealed by Steady-State Continuous Culture ». *Journal of Bacteriology* 182 (7): 2010-17.

Guerrero, K., R. Gallardo, I. Paredes, et al. 2021. « Continuous Biohydrogen Production by a Degenerated Strain of Clostridium Acetobutylicum ATCC 824 ». *International Journal of Hydrogen Energy* 46 (7): 7. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.104.

Guo, X., E. Trably, E. E. Latrille, H. Carrère, et Jean-Philippe Steyer. 2010. « Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review ». *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (19): 10660-73. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008.

Hallenbeck, P. 2002. « Biological Hydrogen Production; Fundamentals and Limiting Processes ». *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11-12): 1185-93. https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3.

Harris, J., R. Mulder, D. B. Kell, R. P. Walter, et J. G. Morris. 1986. « Solvent Production byClostridium Pasteurianum in Media of High Sugar Content ». *Biotechnology Letters* 8 (12): 889-92. https://doi.org/10.1007/BF01078654.

Hassan, S. H. A., et F. M. Morsy. 2015. « Feasibility of installing and maintaining anaerobiosis using *Escherichia coli* HD701 as a facultative anaerobe for hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from various carbohydrates ». *Enzyme and Microbial Technology* 81 (décembre): 56-62. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.08.002.

Hastings, J. J. H. 1971. « Development of the Fermentation Industries in Great Britain ». In *Advances in Applied Microbiology*, vol. 14. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70538-0.

Haus, S., S. Jabbari, T. Millat, et al. 2011. « A Systems Biology Approach to Investigate the Effect of pH-Induced Gene Regulation on Solvent Production by Clostridium Acetobutylicum in Continuous Culture ». *BMC Systems Biology* 5 (1): 10. https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-10.

Hay, J. X. W., T. Y. Wu, J. C. Juan, et J. M. Jahim. 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 (3): 334-52. https://doi.org/10.1002/bbb.1403.

Henry, G., S. Delaunay, et S. Pacaud. 2024. Reactor and method for ex-situ biological methanation. European Union Brevet EP4474470A1, filed 10 juin 2023, et issued 11 décembre 2024. https://patents.google.com/patent/EP4474470A1/en?q=(delaunay+henry+pacaud)&oq=delaunay+henry+pacaud+.

Heyndrickx, M., A. Vansteenbeeck, P. De Vos, et J. De Ley. 1986. « Hydrogen gas production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum* LMG 1213t1 ». *Systematic and Applied Microbiology* 8 (3): 239-44. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(86)80087-X.

Holladay, J. D., J. Hu, D. L. King, et Y. Wang. 2009. « An overview of hydrogen production technologies ». *Catalysis Today*, Hydrogen Production - Selected papers from the Hydrogen Production Symposium at the American Chemical Society 234th National Meeting & Exposition, August 19-23, 2007, Boston, MA, USA, vol. 139 (4): 244-60. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.08.039.

Hsieh, P., Y. Lai, K. Chen, et C. Hung. 2016. « Explore the possible effect of TiO2 and magnetic hematite nanoparticle addition on biohydrogen production by *Clostridium pasteurianum*

based on gene expression measurements ». *International Journal of Hydrogen Energy* 41 (46): 21685-91. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.197.

Hu, C. C., A. Giannis, C. Chen, W. Qi, et J. Wang. 2013. « Comparative Study of Biohydrogen Production by Four Dark Fermentative Bacteria ». *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (35): 35. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.131.

Huang, L., C. W. Forsberg, et L. N. Gibbins. 1986. « Influence of External pH and Fermentation Products on *Clostridium Acetobutylicum* Intracellular pH and Cellular Distribution of Fermentation Products ». *Applied and Environmental Microbiology* 51 (6): 1230-34. https://doi.org/10.1128/aem.51.6.1230-1234.1986.

Hungate, R.E. 1969. « Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes ». In *Methods in Microbiology*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70503-8.

International Energy Agency. 2024. *Global Hydrogen Review 2024*.

International Energy Agency. 2025. *Global Energy Review 2025*.

Jang, Y., J. Lee, A. Malaviya, D. Y. Seung, J. H. Cho, et S. Y. Lee. 2012. « Butanol Production from Renewable Biomass: Rediscovery of Metabolic Pathways and Metabolic Engineering ». *Biotechnology Journal* 7 (2): 186-98. https://doi.org/10.1002/biot.201100059.

Jensen, M. B., D. Strübing, N. de Jonge, et al. 2019. « Stick or leave – Pushing methanogens to biofilm formation for ex situ biomethanation ». *Bioresource Technology* 291 (novembre): 121784. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121784.

Jo, J. H., C. O. Jeon, S. Y. Lee, D. S. Lee, et J. M. Park. 2010. « Molecular Characterization and Homologous Overexpression of [FeFe]-Hydrogenase in Clostridium Tyrobutyricum JM1 ». *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (3): 3. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.102.

Jo, J. H., et W. Kim. 2016. « Carbon Material Distribution and Flux Analysis under Varying Glucose Concentrations in Hydrogen-Producing Clostridium Tyrobutyricum JM1 ». *Journal of Biotechnology* 228 (juin): 103-11. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.051.

Johnson, E., et L. Rehmann. 2020. « Self-Synchronizing Oscillatory Metabolism in Clostridium pasteurianum in Continuous Culture ». *Processes* 8 (janvier): 1-17. https://doi.org/10.3390/pr8020137.

Jones, W. J., D. P. Nagle, et W. B. Whitman. 1987. « Methanogens and the Diversity of Archaebacteria ». *Microbiological Reviews* 51 (1): 135-77. https://doi.org/10.1128/mr.51.1.135-177.1987.

Ju, D., J. Shin, H. Lee, S. Kong, J. Kim, et B. Sang. 2008. « Effects of pH conditions on the biological conversion of carbon dioxide to methane in a hollow-fiber membrane biofilm reactor (Hf–MBfR) ». *Desalination*, The Fourth Conference of Aseanian Membrane Society: Part 2, vol. 234 (1): 409-15. https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.09.111.

Junghare, M., S. Subudhi, et B. Lal. 2012. « Improvement of Hydrogen Production under Decreased Partial Pressure by Newly Isolated Alkaline Tolerant Anaerobe, Clostridium Butyricum TM-9A: Optimization of Process Parameters ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (4): 3160-68. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.043.

Karki, R., W. Chuenchart, K. C. Surendra, et al. 2021. « Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives ». *Bioresource Technology* 330 (juin): 125001. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125001.

Killeffer, D. H. 1927. « Butanol and Acetone from Corn[1] : A Description of the Fermentation Process ». *Industrial & Engineering Chemistry* 19 (1): 46-50. https://doi.org/10.1021/ie50205a013.

Kim, S. H., J. H. Hwang, H. J. Kim, et al. 2023. « Enhancement of Biohydrogen Production in Clostridium Acetobutylicum ATCC 824 by Overexpression of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene ». *Enzyme and Microbial Technology* 168 (août): 110244. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110244.

Kim, S., K. Choi, et J. Chung. 2013. « Reduction in carbon dioxide and production of methane by biological reaction in the electronics industry ». *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (8): 3488-96. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.007.

King, P. W., M. C. Posewitz, M. L. Ghirardi, et M. Seibert. 2006. « Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System ». *Journal of Bacteriology* 188 (6): 2163-72. https://doi.org/10.1128/jb.188.6.2163-2172.2006.

Klein, M., M. B. Ansorge-Schumacher, M. Fritsch, et W. Hartmeier. 2010. « Influence of Hydrogenase Overexpression on Hydrogen Production of Clostridium Acetobutylicum DSM 792 ». *Enzyme and Microbial Technology* 46 (5): 5. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.12.015.

Kougias, P. G., L. Treu, D. P. Benavente, K. Boe, S. Campanaro, et I. Angelidaki. 2017. « *Ex-situ* biogas upgrading and enhancement in different reactor systems ». *Bioresource Technology* 225 (février): 429-37. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.124.

Koytsoumpa, E. I., C. Bergins, et E. Kakaras. 2018. « The CO2 Economy: Review of CO2 Capture and Reuse Technologies ». *The Journal of Supercritical Fluids* 132 (février): 3-16. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.07.029.

Lalaurette, E., S. Thammannagowda, A. Mohagheghi, P. Maness, et B. E. Logan. 2009. « Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (15): 6201-10. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.112.

Lebranchu, A., S. Delaunay, P. Marchal, et al. 2017. « Impact of shear stress and impeller design on the production of biogas in anaerobic digesters ». *Bioresource Technology* 245 (décembre): 1139-47. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.113.

Lecker, B., L. Illi, A. Lemmer, et H. Oechsner. 2017. « Biological Hydrogen Methanation – A Review ». *Bioresource Technology* 245 (décembre): 1220-28. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.176.

Li, B., Y. Duan, D. Luebke, et B. Morreale. 2013. « Advances in CO2 Capture Technology: A Patent Review ». *Applied Energy* 102 (février): 1439-47. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.09.009.

Li, S., J. Huang, J. Mao, et al. 2019. « *In Vivo* and *in Vitro* Efficient Textile Wastewater Remediation by *Aspergillus Niger* Biosorbent ». *Nanoscale Advances* 1 (1): 168-76. https://doi.org/10.1039/c8na00132d.

Liu, J., W. Zhou, S. Fan, et al. 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 (48): 26204-12. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.102.

Liu, X., Y. Zhu, et S. Yang. 2006. « Construction and Characterization of *Ack* Deleted Mutant of *Clostridium Tyrobutyricum* for Enhanced Butyric Acid and Hydrogen Production ». *Biotechnology Progress* 22 (5): 1265-75. https://doi.org/10.1021/bp060082g.

Liu, Y., et W. B. Whitman. 2008. « *Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea* ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125 (1): 171-89. https://doi.org/10.1196/annals.1419.019.

Ljunggren, M., et G. Zacchi. 2010. « Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane ». *Bioresource Technology* 101 (20): 7780-88. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.009.

Luo, G., et I. Angelidaki. 2012. « Integrated Biogas Upgrading and Hydrogen Utilization in an Anaerobic Reactor Containing Enriched Hydrogenotrophic Methanogenic Culture ». *Biotechnology and Bioengineering* 109 (11): 2729-36. https://doi.org/10.1002/bit.24557.

Luo, G., et I. Angelidaki. 2013. « Co-Digestion of Manure and Whey for in Situ Biogas Upgrading by the Addition of H2: Process Performance and Microbial Insights ». *Applied*

Microbiology and Biotechnology 97 (3): 1373-81. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4547-5.

Luo, G., S. Johansson, K. Boe, L. Xie, Q. Zhou, et I.Angelidaki. 2012. « Simultaneous Hydrogen Utilization and in Situ Biogas Upgrading in an Anaerobic Reactor ». *Biotechnology and Bioengineering* 109 (4): 1088-94. https://doi.org/10.1002/bit.24360.

Lyu, Z., N. Shao, T. Akinyemi, et W. B. Whitman. 2018. « Methanogenesis ». *Current Biology* 28 (13): R727-32. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021.

Maeda, T., V. Sanchez-Torres, et T. K. Wood. 2007. « Enhanced Hydrogen Production from Glucose by Metabolically Engineered Escherichia Coli ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (4): 879-90. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1217-0.

Maghzian, A., A. Aslani, et R. Zahedi. 2022. « Review on the Direct Air CO2 Capture by Microalgae: Bibliographic Mapping ». *Energy Reports* 8 (novembre): 3337-49. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.02.125.

Markov, S. 1997. « Photoproduction of Hydrogen by Cyanobacteria under Partial Vacuum in Batch Culture or in a Photobioreactor ». *International Journal of Hydrogen Energy* 22 (5): 521-24. https://doi.org/10.1016/S0360-3199(96)00134-6.

Martin, M. R., J. J. Fornero, R. Stark, L. Mets, et L. T. Angenent. 2013. « A Single-Culture Bioprocess of Methanothermobacter Thermautotrophicus to Upgrade Digester Biogas by CO2-to-CH4 Conversion with H2 ». *Archaea* 2013 (1): 157529. https://doi.org/10.1155/2013/157529.

Masset, J., M. Calusinska, C. Hamilton, et al. 2012. « Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of Clostridium spp ». *Biotechnology for biofuels* 5 (mai): 35. https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-35.

McGlynn, S. E., S. S. Ruebush, A. Naumov, et al. 2007. « In Vitro Activation of [FeFe] Hydrogenase: New Insights into Hydrogenase Maturation ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12 (4): 443-47. https://doi.org/10.1007/s00775-007-0224-z.

Meegoda, J. N., B. Li, K. Patel, et L. B. Wang. 2018. « A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (10): 2224. https://doi.org/10.3390/ijerph15102224.

Megía, P. J., A. J. Vizcaíno, J. A. Calles, et A. Carrero. 2021. « Hydrogen Production Technologies: From Fossil Fuels toward Renewable Sources. A Mini Review ». *Energy & Fuels* 35 (20): 16403-15. https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c02501.

Megue Kamkeng, L., C. Loubière, O. Dufaud, P. Marchal, B. Le Creurer, et E. Olmos. 2024. « Anaerobic digester scale-down study: Particle Image Velocimetry and Computational

Fluid Dynamics scaling criteria validation ». *Chemical Engineering Science* 298 (octobre): 120299. https://doi.org/10.1016/j.ces.2024.120299.

Meher Kotay, S., et D. Das. 2008. « Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials ». *International Journal of Hydrogen Energy*, IWHE 2006, vol. 33 (1): 258-63. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.031.

Melitos, G., X. Voulkopoulos, et A. Zabaniotou. 2021. « Waste to Sustainable Biohydrogen Production Via Photo-Fermentation and Biophotolysis – A Systematic Review ». *Renewable Energy and Environmental Sustainability* 6: 45. https://doi.org/10.1051/rees/2021047.

Menia, S., I. Nouicer, Y. Bakouri, A. M'raoui, H. Tebibel, et A. Khellaf. 2019. « Production d'hydrogène par procédés biologiques ». *Oil & Gas Science and Technology – Revue d'IFP Energies nouvelles* 74: 34. https://doi.org/10.2516/ogst/2018099.

Monod, J. 1978. « LA TECHNIQUE DE CULTURE CONTINUE THÉORIE ET APPLICATIONS ». In *Selected Papers in Molecular Biology by Jacques Monod*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-460482-7.50023-3.

Morra, S. 2022. « Fantastic [FeFe]-Hydrogenases and Where to Find Them ». *Frontiers in Microbiology* 13 (mars): 853626. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.853626.

Nelson, N., et C. F. Yocum. 2006. « STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEMS I AND II ». *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 521-65. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.

Ni, M., D. Y. C. Leung, M. K. H. Leung, et K. Sumathy. 2006. « An Overview of Hydrogen Production from Biomass ». *Fuel Processing Technology* 87 (5): 461-72. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2005.11.003.

Niel, E. W. J. van, M. A. W. Budde, G. G. de Haas, F. J. van der Wal, P. A. M Claassen, et A. J. M. Stams. 2002. « Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii* ». *International Journal of Hydrogen Energy*, BIOHYDROGEN 2002, vol. 27 (11): 1391-98. https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00115-5.

Niño-Navarro, C., I. Chairez, L. Torres-Bustillos, J. Ramírez-Muñoz, E. Salgado-Manjarrez, et E.I. Garcia-Peña. 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 (33): 14630-40. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.236.

Nishimura, N., S. Kitaura, A. Mimura, et Y. Takahara. 1992. « Cultivation of thermophilic methanogen KN-15 on H2-CO2 under pressurized conditions ». *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73 (6): 477-80. https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90141-G.

Oehlenschläger, K., J. Hengsbach, M. Volkmar, et R. Ulber. 2025. « From Pre-Culture to Solvent: Current Trends in Clostridium Acetobutylicum Cultivation ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 109 (1): 47. https://doi.org/10.1007/s00253-025-13428-y.

Oh, H. J., K. Kim, K. M. Lee, et al. 2019. « Butyric acid production with high selectivity coupled with acetic acid consumption in sugar-glycerol mixture fermentation by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC25755 ». *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 75 (juillet): 44-51. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.01.047.

Oh, S., Y. Zuo, H. Zhang, M. J. Guiltinan, B. E. Logan, et J. M. Regan. 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 (23): 9347-53. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.084.

Oh, Y., S. M. Raj, G. Y. Jung, et S. Park. 2011. « Current Status of the Metabolic Engineering of Microorganisms for Biohydrogen Production ». *Bioresource Technology* 102 (18): 8357-67. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.054.

Padan, E., D. Zilberstein, et S. Schuldiner. 1981. « pH homeostasis in bacteria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 650 (2): 151-66. https://doi.org/10.1016/0304-4157(81)90004-6.

Park, J., D. Kim, J. Baik, et al. 2021. « Improvement in H2 production from *Clostridium butyricum* by co-culture with *Sporolactobacillus vineae* ». *Fuel* 285 (février): 119051. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119051.

Pasteur., L. 1880. « Sur la nature de la fermentation alcoolique (Séance du 22 février 1875.) ». *Recueil de Médecine Vétérinaire* 57 (1): 546-47. https://doi.org/10.3406/rmv.1880.4092.

Peillex, J., M. Fardeau, et J. Belaich. 1990. « Growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum* on H2CO2: High CH4 productivities in continuous culture ». *Biomass* 21 (4): 315-21. https://doi.org/10.1016/0144-4565(90)90080-4.

Pereira, F. C., L. Saujet, A. R. Tomé, et al. 2013. « The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen Clostridium Difficile ». *PLoS Genetics* 9 (10): e1003782. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003782.

Popovic, M. 2019. « Thermodynamic Properties of Microorganisms: Determination and Analysis of Enthalpy, Entropy, and Gibbs Free Energy of Biomass, Cells and Colonies of 32 Microorganism Species ». *Heliyon* 5 (6): e01950. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01950.

Prażmowski, A. 1880. « Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. » Leipzig.

Preethi, T. M. M. Usman, J. R. Banu, M. Gunasekaran, et G. Kumar. 2019. « Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview ». *Bioresource Technology Reports* 7 (septembre): 100287. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100287.

Rafrafi, Y., L. Laguillaumie, et C. Dumas. 2021. « Biological Methanation of H2 and CO2 with Mixed Cultures: Current Advances, Hurdles and Challenges ». *Waste and Biomass Valorization* 12 (10): 5259-82. https://doi.org/10.1007/s12649-020-01283-z.

Ragsdale, S. W., et E. Pierce. 2008. « Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl Pathway of CO2 Fixation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1784 (12): 1873-98. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012.

RamKumar, N., P. D. Anupama, T. Nayak, et S. Subudhi. 2021. « Scale up of biohydrogen production by a pure strain; *Clostridium butyricum TM-9A at* regulated pH under decreased partial pressure ». *Renewable Energy* 170 (juin): 1178-85. https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.01.106.

Rather, A. H., et A. K. Srivastav. 2021. *A Study on Biohydrogen Production Based on Biophotolysis from Cyanobacteria*. 25 (6).

Raynaud, C., P. Sarçabal, I. Meynial-Salles, C. Croux, and P. Soucaille. 2003. "Molecular Characterization of the 1,3-Propanediol (1,3-PD) Operon of Clostridium Butyricum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (9): 5010–15. https://doi.org/10.1073/pnas.0734105100.

Ren, J., Y. Liu, X. Zhao, et J. Cao. 2020. « Methanation of syngas from biomass gasification: An overview ». *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (7): 4223-43. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.023.

Ren, N., W. Guo, B. Liu, G. Cao, et J. Ding. 2011. « Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production ». *Current Opinion in Biotechnology*, Energy biotechnology – Environmental biotechnology, vol. 22 (3): 365-70. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.022.

Rittmann, S., et C. Herwig. 2012. « A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production ». *Microbial Cell Factories* 11 (1): 1. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-115.

Rusmanis, D., R. O'Shea, D. M. Wall, et J. D. Murphy. 2019. « Biological Hydrogen Methanation Systems ? An Overview of Design and Efficiency ». *Bioengineered* 10 (1): 604-34. https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1684607.

Saint-Amans, S., L.Girbal, J. Andrade, K. Ahrens, et P. Soucaille. 2001. « Regulation of Carbon and Electron Flow in Clostridium butyricum VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures ». *Journal of Bacteriology* 183 (5): 1748-54. https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1748-1754.2001.

Sander, R. 2023. « Compilation of Henry's Law Constants (Version 5.0.0) for Water as Solvent ». *Atmospheric Chemistry and Physics* 23 (19): 10901-2440. https://doi.org/10.5194/acp-23-10901-2023.

Sarangi, P. K., et S.Nanda. 2020. « Biohydrogen Production Through Dark Fermentation ». *Chemical Engineering & Technology* 43 (4): 601-12. https://doi.org/10.1002/ceat.201900452.

Sarma, S. J., S. K. Brar, E. B. Sydney, Y. Le Bihan, G. Buelna, et C. R. Soccol. 2012. « Microbial Hydrogen Production by Bioconversion of Crude Glycerol: A Review ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (8): 6473-90. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.050.

Sarma, S., D. Ortega, N. P. Minton, V. K. Dubey, et V. S. Moholkar. 2019. « Homologous overexpression of hydrogenase and glycerol dehydrogenase in *Clostridium pasteurianum* to enhance hydrogen production from crude glycerol ». *Bioresource Technology* 284 (juillet): 168-77. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.074.

Sauer, M. 2016. « Industrial Production of Acetone and Butanol by Fermentation-100 Years Later ». *FEMS Microbiology Letters* 363 (13): fnw134. https://doi.org/10.1093/femsle/fnw134.

Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, et H. Harada. 2000. « Syntrophothermus lipocalidus gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 (2): 771-79. https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-771.

Shaterzadeh, M. J., et S. A. Ataei. 2017a. « The Effect of Oxidizing Agents on Biohydrogen Production from *Clostridium Acetobutylicum* ». *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, septembre 19, 1-6. https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1371814.

Shaterzadeh, M. J., et S. A. Ataei. 2017b. « The Effects of Temperature, Initial pH, and Glucose Concentration on Biohydrogen Production from *Clostridium Acetobutylicum* ». *Energy*

Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects 39 (11): 1118-23. https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1297875.

Sim, Y., D.Kim, J. Ko, J. Jung, et S. Kim. 2024. « Bioaugmentation with Clostridium Pasteurianum for High-Yield Continuous Bio-Hydrogen Production in a Dynamic Membrane Bioreactor ». *Chemical Engineering Journal* 497 (octobre): 154709. https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.154709.

Singh, L., et Z. A. Wahid. 2015. « Methods for Enhancing Bio-Hydrogen Production from Biological Process: A Review ». *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 21 (janvier): 70-80. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035.

Soares, L. A., E. L. Silva, et M. B. A. Varesche. 2021. « Dissecting the role of heterogeneity and hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in metabolic pathways for biofuels production ». *Industrial Crops and Products* 160 (février): 113120. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113120.

Son, Y., J. Jeon, D. Kim, et al. 2021. « Improved Bio-Hydrogen Production by Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and FeFe Hydrogenase in Clostridium Acetobutylicum ». *International Journal of Hydrogen Energy* 46 (74): 36687-95. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.222.

Soutschek, E., J. Winter, F. Schindler, et O. Kandler. 1984. « *Acetomicrobium flavidum*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from sewage sludge, forming acetate, CO2 and H2 from Glucose ». *Systematic and Applied Microbiology* 5 (3): 377-90. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80039-9.

Spyridonidis, A., I. A. Vasiliadou, P. Stathopoulou, A. Tsiamis, G. Tsiamis, et K. Stamatelatou. 2023. « Enrichment of Microbial Consortium with Hydrogenotrophic Methanogens for Biological Biogas Upgrade to Biomethane in a Bubble Reactor under Mesophilic Conditions ». *Sustainability* 15 (21): 21. https://doi.org/10.3390/su152115247.

Sterner, M., et M. Specht. 2021. « Power-to-Gas and Power-to-X—The History and Results of Developing a New Storage Concept ». *Energies* 14 (20): 6594. https://doi.org/10.3390/en14206594.

St-Pierre Lemieux, G., D. Groleau, et P. Proulx. 2019. « Introduction on Foam and Its Impact in Bioreactors ». *Canadian Journal of Biotechnology* 3 (2): 143-57. https://doi.org/10.24870/cjb.2019-000131.

Strübing, D., B. Huber, M. Lebuhn, J. E. Drewes, et K. Koch. 2017. « High performance biological methanation in a thermophilic anaerobic trickle bed reactor ». *Bioresource Technology* 245 (décembre): 1176-83. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.088.

Swanson, K.D., M. W. Ratzloff, D. W. Mulder, et al. 2015. « [FeFe]-Hydrogenase Oxygen Inactivation Is Initiated at the H Cluster 2Fe Subcluster ». *Journal of the American Chemical Society* 137 (5): 1809-16. https://doi.org/10.1021/ja510169s.

Talapko, D., J. Talapko, I. Erić, et I. Škrlec. 2023. « Biological Hydrogen Production from Biowaste Using Dark Fermentation, Storage and Transportation ». *Energies* 16 (8): 3321. https://doi.org/10.3390/en16083321.

Tandishabo, K., K. Nakamura, K. Umetsu, et K. Takamizawa. 2012. « Distribution and role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114 (5): 518-20. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.023.

Teke, G. M., B. Anye Cho, C. E. Bosman, Z. Mapholi, D. Zhang, et R. W. M. Pott. 2023. « Towards Industrial Biological Hydrogen Production: A Review ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40 (1): 37. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03845-4.

Thauer, R. K., K. Jungermann, et K. Decker. 1977. « Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria ». *Bacteriological Reviews* 41 (1): 1. https://doi.org/10.1128/br.41.1.100-180.1977.

Thauer, R. K. 2012. « The Wolfe Cycle Comes Full Circle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (38): 15084-85. https://doi.org/10.1073/pnas.1213193109.

Tiong, Y. W., A. Yong, A. Nalaparaju, et al. 2025. « An Experimental and Multiphysics Simulations Study of *Clostridium Carboxidivorans* Sp. 624 for Acid and Alcohol Production in CO_2 /H_2 ». Prépublication, février 24. https://doi.org/10.1101/2025.02.24.639814.

Treu, L., S. Campanaro, P. G. Kougias, C. Sartori, I. Bassani, et I. Angelidaki. 2018. « Hydrogen-Fueled Microbial Pathways in Biogas Upgrading Systems Revealed by Genome-Centric Metagenomics ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mai): 1079. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01079.

Troshina, O. 2002. « Production of H2 by the Unicellular Cyanobacterium Gloeocapsa Alpicola CALU 743 during Fermentation ». *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11-12): 1283-89. https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00103-9.

Truong, D., F. Changey, E. Rondags, X. Framboisier, M. Etienne, et E. Guedon. 2024. « Evaluation of Short-Circuited Electrodes in Combination with Dark Fermentation for Promoting Biohydrogen Production Process ». *Bioelectrochemistry* 157 (juin): 108631. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108631.

Tsiklios, C., M. Hermesmann, P. Stumm, et T. E. Müller. 2025. « Comparative analysis of hydrogen *vs.* methane pipeline transport systems with integrated methane pyrolysis for low-carbon hydrogen supply ». *Applied Energy* 383 (avril): 125276. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2025.125276.

Tyszak, A., et L. Rehmann. 2024. « Metabolic Oscillation Phenomena in Clostridia Species—A Review ». *Fermentation* 10 (3): 156. https://doi.org/10.3390/fermentation10030156.

Umunnawuike, C., S. Q. Mahat, P. I. Nwaichi, B. Money, et A. Agi. 2024. « Biohydrogen production for sustainable energy transition: A bibliometric and systematic review of the reaction mechanisms, challenges, knowledge gaps and emerging trends ». *Biomass and Bioenergy* 188 (septembre): 107345. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107345.

Van Ginkel, S., S. W. Sung, et J. J. Lay. 2001. « Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration ». *Environmental Science & Technology* 35 (24): 4726-30. https://doi.org/10.1021/es001979r.

Vargas, J.V.C., A.B. Mariano, D.O. Corrêa, et J.C. Ordonez. 2014. « The Microalgae Derived Hydrogen Process in Compact Photobioreactors ». *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (18): 9588-98. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.093.

Vasconcelos, I., L. Girbal, et P. Soucaille. 1994. « Regulation of Carbon and Electron Flow in Clostridium-Acetobutylicum Grown in Chemostat Culture at Neutral Ph on Mixtures of Glucose and Glycerol ». *Journal of Bacteriology* 176 (5): 1443-50. https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1443-1450.1994.

Vauthier L., E. Rondags, C. Loubière, N. Pen, X. Framboisier, E. Guedon et S. Delaunay. To be published. "Rational Comparison of Biohydrogen Production Using Clostridium Species through Dark Fermentation during Anaerobic Batch Processes." *Journal of Biotechnology*. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.10.009

Viana, Q. M., M. B. Viana, E. A. F. Vasconcelos, S. T. Santaella, et R. C. Leitão. 2014. « Fermentative H2 Production from Residual Glycerol: A Review ». *Biotechnology Letters* 36 (7): 1381-90. https://doi.org/10.1007/s10529-014-1507-4.

Voelklein, M. A., Davis Rusmanis, et J. D. Murphy. 2019. « Biological methanation: Strategies for in-situ and ex-situ upgrading in anaerobic digestion ». *Applied Energy* 235 (février): 1061-71. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.11.006.

Vogt, C., M. Monai, G. J. Kramer, et B. M. Weckhuysen. 2019. « The Renaissance of the Sabatier Reaction and Its Applications on Earth and in Space ». *Nature Catalysis* 2 (3): 188-97. https://doi.org/10.1038/s41929-019-0244-4.

Von Stosch, M., et M. J. Willis. 2017. « Intensified Design of Experiments for Upstream Bioreactors ». *Engineering in Life Sciences* 17 (11): 1173-84. https://doi.org/10.1002/elsc.201600037.

Wagner, I. D., et J. Wiegel. 2008. « Diversity of Thermophilic Anaerobes ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125 (1): 1-43. https://doi.org/10.1196/annals.1419.029.

Wan, Y., Y. Li, D. Wang, et al. 2024. « International trade of green hydrogen, ammonia and methanol: Opportunities of China's subregions ». *Renewable Energy* 235 (novembre): 121294. https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.121294.

Wang, J., H. Wang, J. Han, et al. 2024. « Co-Production of Biobutanol and Biomethane from Distillers' Grain Waste by an Integrated Process ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 99 (1): 40-49. https://doi.org/10.1002/jctb.7509.

Wang, J., et Y. Yin. 2021. « Clostridium Species for Fermentative Hydrogen Production: An Overview ». *International Journal of Hydrogen Energy* 46 (70): 34599-625. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052.

Wang, R., W. Zong, C. Qian, Y. Wei, R. Yu, et Z. Zhou. 2011. « Isolation of *Clostridium perfringens* strain W11 and optimization of its biohydrogen production by genetic modification ». *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (19): 12159-67. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.105.

Wang, X., P. T. Monis, C. P. Saint, et B. Jin. 2009. « Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5 ». *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (2): 791-98. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.023.

Wang, X., J. Ding, W. Guo, et N. Ren. 2010. « Scale-up and optimization of biohydrogen production reactor from laboratory-scale to industrial-scale on the basis of computational fluid dynamics simulation ». *International Journal of Hydrogen Energy*, Hyceltec 2009 Conference, vol. 35 (20): 10960-66. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.060.

Wasserfallen, A., et E. Conway de Macario. 2000. « Phylogenetic Analysis of 18 Thermophilic Methanobacterium Isolates Supports the Proposals to Create a New Genus, Methanothermobacter Gen. Nov., and to Reclassify Several Isolates in Three Species »,. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Willquist, K., V. N. Nkemka, H. Svensson, et al. 2012. « Design of a novel biohythane process with high H2 and CH4 production rates ». *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (23): 17749-62. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.092.

Wu, B., et S. Chen. 2008. « CFD Simulation of non-Newtonian Fluid Flow in Anaerobic Digesters ». *Biotechnology and Bioengineering* 99 (3): 700-711. https://doi.org/10.1002/bit.21613.

Wu, H., C. Wang, P. Chen, et al. 2017. « Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4 ». *International Journal of Hydrogen Energy* 42 (10): 6547-55. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.094.

Xuan, J., L. He, W. Wen, et Y. Feng. 2023. « Hydrogenase and Nitrogenase: Key Catalysts in Biohydrogen Production ». *Molecules* 28 (3): 1392. https://doi.org/10.3390/molecules28031392.

Yan, M., I. A. Fotidis, A. Jéglot, et al. 2020. « Long-term preserved and rapidly revived methanogenic cultures: Microbial dynamics and preservation mechanisms ». *Journal of Cleaner Production* 263 (août): 121577. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121577.

Yoo, M., S. Han, et J. Wee. 2013. « Carbon Dioxide Capture Capacity of Sodium Hydroxide Aqueous Solution ». *Journal of Environmental Management* 114 (janvier): 512-19. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.061.

Yoshida, A. T. Nishimura, H. Kawaguchi, M. Inui, et H. Yukawa. 2006. « Enhanced Hydrogen Production from Glucose Using Ldh- and Frd-Inactivated Escherichiacoli Strains ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 73 (1): 67-72. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0456-9.

Zhang, E., J. Li, K. Zhang, et al. 2018. « Anaerobic digestion performance of sweet potato vine and animal manure under wet, semi-dry, and dry conditions ». *AMB Express* 8 (1): 45. https://doi.org/10.1186/s13568-018-0572-9.

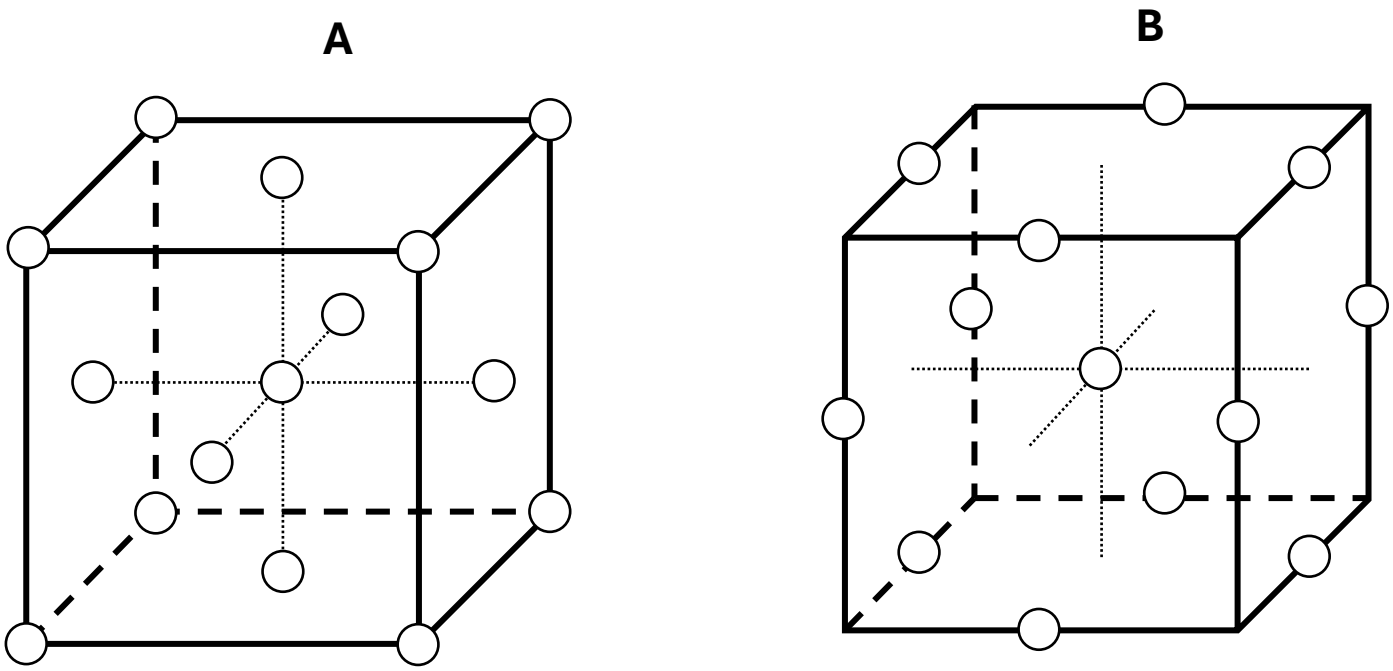
Zhang, Y., L. Xiao, S. Wang, et F. Liu. 2019. « Stimulation of Ferrihydrite Nanorods on Fermentative Hydrogen Production by Clostridium Pasteurianum ». *Bioresource Technology* 283 (juillet): 308-15. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.088.

Zhao, L., G. Cao, A. Wang, et al. 2012. « Enhanced bio-hydrogen production by immobilized *Clostridium* sp. T2 on a new biological carrier ». *International Journal of Hydrogen Energy*, 11th China Hydrogen Energy Conference, vol. 37 (1): 162-66. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.103.

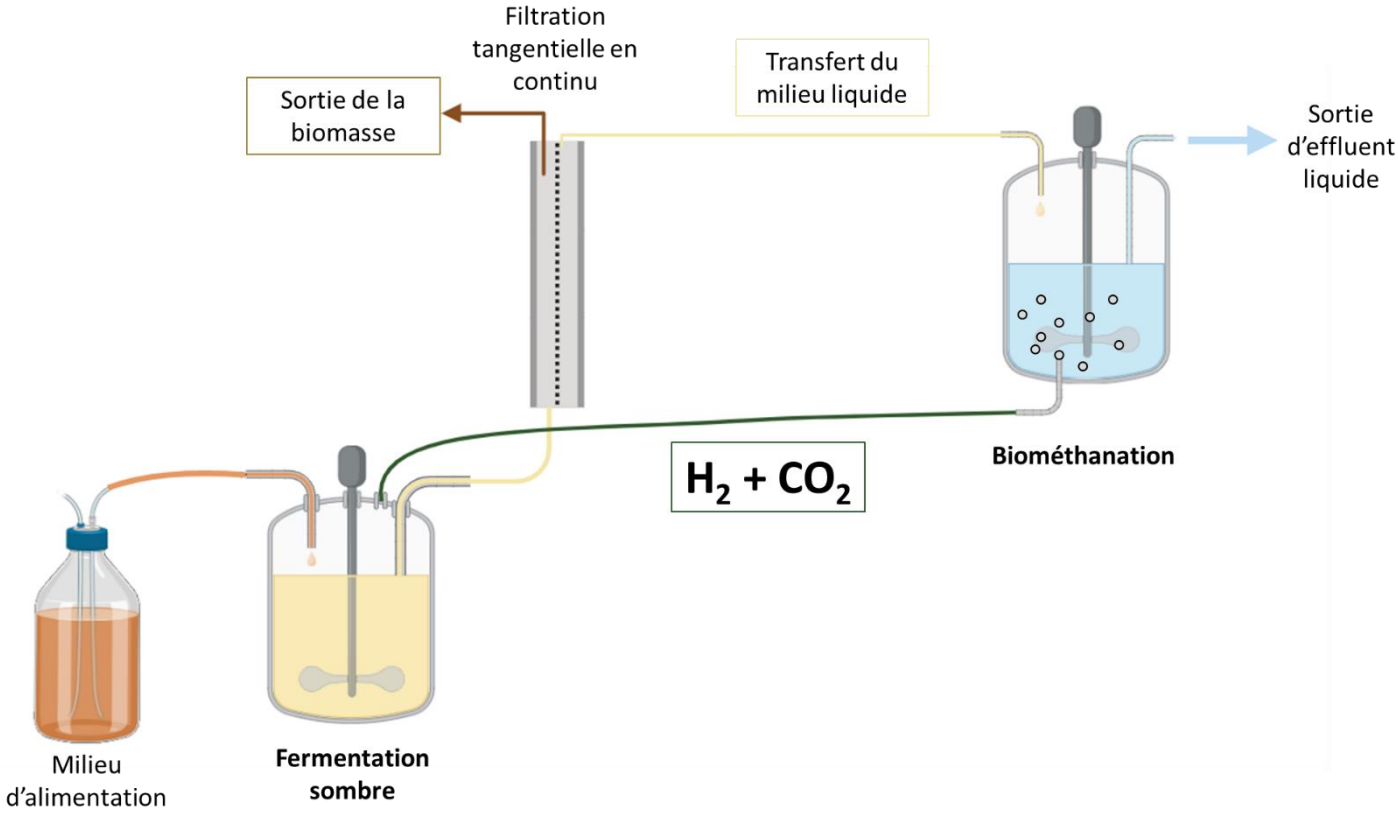
Ziels, R. M., M. K. Nobu, et D. Z. Sousa. 2019. « Elucidating Syntrophic Butyrate-Degrading Populations in Anaerobic Digesters Using Stable-Isotope-Informed Genome-Resolved Metagenomics ». *mSystems* 4 (4): 10.1128/msystems.00159-19. https://doi.org/10.1128/msystems.00159-19.

Annexes

Annexe 1 : Différences de localisation des points expérimentaux pour des domaines identiques de champ d'étude d'un plan d'expériences composite à faces centrées (A) et dans un plan de Box-Behnken (B)



Annexe 2 : Concept de couplage gazeux et liquide entre la fermentation sombre et la méthanation biologique par le moyen d'une filtration tangentielle du milieu sortant du premier bioréacteur, pour une utilisation maximale du substrat initial.



Résumé

Optimisation d'un procédé de production d'hydrogène par fermentation sombre en vue d'un couplage avec la biométhanation

Le dihydrogène (H_2) est une molécule essentielle utilisée dans de nombreuses activités industrielles. Le problème actuel réside dans sa production, majoritairement issue des ressources d'origine fossile, et donc associée à l'émission d'une quantité non négligeable de gaz à effet de serre. Des procédés de production de H_2 plus respectueux de l'environnement émergent alors, et parmi elles, la fermentation sombre réalisée par des bactéries du genre *Clostridium*. Celle-ci consiste en la conversion anaérobie de la matière organique en différents métabolites ainsi qu'un gaz riche en H_2. Cependant, le H_2 utilisé à des fins énergétiques est un gaz dont le stockage et l'acheminement sont bien plus coûteux que ceux du gaz naturel, riche en méthane (CH_4). La biométhanation est une réaction moins coûteuse en énergie que la méthanation chimique, et est catalysée par des archées méthanogènes, capables de convertir le H_2 et le CO_2 pour générer du CH_4. Ce dernier possède l'atout d'être d'origine biologique, et s'inscrit donc dans les aspects de transition énergétique. Cette thèse présente une démarche expérimentale en plusieurs étapes. Le premier volet a consisté en la sélection des paramètres de culture pertinents ainsi que d'une souche de *Clostridium* appropriée pour une haute productivité en H_2. Pour le second volet, une optimisation en culture continue de la production de H_2 par la souche sélectionnée, *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, en vue du couplage avec de la biométhanation a été établie avec une approche par un plan d'expériences composite à faces centrées. Enfin, le dernier volet a consisté en la réalisation des premières expériences de couplage des deux bioprocédés en question, où le CO_2 et le H_2 produits par fermentation sombre ont été transférés à un consortium méthanogène pour la production de CH_4. Les premières performances du procédé global ont ainsi pu être évaluées, ainsi que les effets du transfert gazeux sur la population microbienne du consortium. Ceci a pu également mettre en lumière les différentes pistes d'exploration pour l'amélioration du procédé, tels que les aspects de transfert du milieu liquide de la fermentation sombre vers le consortium pour une augmentation de la réaction de biométhanation.

Mots-clés : dihydrogène, méthane, énergie, procédés microbiens, *Clostridium*, plan d'expériences, transfert gazeux

Abstract

Optimization of a hydrogen production process through dark fermentation for coupling with biomethanation

Dihydrogen (H_2) is an essential molecule used in many industries. The current problem relies in its production, which is mostly derived from fossil ressources, and thus associated with a non-negligible greenhouse gas emissions. More environmentally friendly processes to produce H_2 are emerging. Among them, one such process is dark fermentation, which is performed by bacteria from the genus *Clostridium*. This process involves the anaerobic conversion of organic matter into various metabolites and a H_2-rich gas. However, using H_2 for energetic purposes requires the cost of compression and transportation, which is higher than that of natural gas, mostly composed of methane (CH_4). The biomethanation reaction requires less energy than the chemical methanation reaction and is catalyzed by methanogenic archaea, capable of converting H_2 and CO_2 into CH_4. In this case, it is of biological origin and can be used in the energy transition. This thesis presents an experimental strategy in several steps. The first one consisted in the selection of the relevant culture parameters and an appropriate *Clostridium* strain for high H_2 productivity. For the second step, the optimization of H_2 production from a continuous culture of the previously selected strain, *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, for coupling with biomethanation was performed using a Design of Experiments approach. This one used a face centered composite design. Finally, the last step consisted in carrying out the first experiments involving the coupling of both bioprocesses. In this process the CO_2 and the H_2 produced by dark fermentation were transferred to a methanogenic consortium for the production of CH_4. The initial stages of the whole process were evaluated, as well as the impact of gas transfer on the microbial population of the consortium. This also highlighted ways to improve this process, such as transferring the liquid phase from dark fermentation to the consortium, to enhance the biomethanation reaction.

Keywords: dihydrogen, methane, energy, microbial processes, *Clostridium*, Design of Experiments, gas transfer