



**HAL**  
open science

# Production de biohydrogène par fermentation sombre : cultures, impact des hétérogénéités spatiales et modélisation d'un bioréacteur anaérobie

Benoit Chezeau

► **To cite this version:**

Benoit Chezeau. Production de biohydrogène par fermentation sombre : cultures, impact des hétérogénéités spatiales et modélisation d'un bioréacteur anaérobie. Génie des procédés. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC098 . tel-02402287

**HAL Id: tel-02402287**

**<https://theses.hal.science/tel-02402287>**

Submitted on 10 Dec 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **ECOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGENIEUR**

Thèse présentée à l'Université Clermont Auvergne

Par

**Benoit CHEZEAU**

Pour l'obtention du grade de

**Docteur d'Université**

(Spécialité : Génie des Procédés)

Soutenue publiquement le 7 décembre 2018

---

## **Production de biohydrogène par fermentation sombre : cultures, impact des hétérogénéités spatiales et modélisation d'un bioréacteur anaérobie**

---

### **Rapporteurs :**

M. Frédéric AUGIER, Ingénieur de Recherche (HDR), IFP Energies Nouvelles Solaize

M. Renaud ESCUDIE, Directeur de Recherche, INRA Narbonne

### **Examineurs :**

Mme Nouceiba ADOUANI, Maître de Conférences, ENSIC-LRGP/Université de Lorraine

Mme Gwendoline CHRISTOPHE, Maître de Conférences, Polytech/Université Clermont Auvergne

Mme Caroline GENTRIC, Professeur des Universités, GEPEA-CRTT/Université de Nantes

M. Claude-Gilles DUSSAP, Professeur des Universités, Polytech/Université Clermont Auvergne

### **Directeurs de thèse :**

M. Christophe VIAL, Professeur des Universités, Polytech/Université Clermont Auvergne

M. Jean-Pierre FONTAINE, Professeur des Universités, Polytech/Université Clermont Auvergne

Institut Pascal, Axe Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes



# Résumé

---

A ce jour, le contexte énergétique mondial est dominé par une utilisation massive des énergies fossiles non-renouvelables et épuisables par nature. La production de biohydrogène de 2<sup>ème</sup> génération issu de déchets organiques par le procédé de fermentation sombre constitue donc une solution attractive pour diversifier le mix énergétique actuel. Dans ce cadre, l'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de la qualité du mélange sur l'efficacité de la voie fermentaire sombre. En effet, les conditions d'agitation mécanique (type d'agitateur, vitesse d'agitation) et la viscosité du digestat (fonction des intrants en cours de culture), comptent parmi les paramètres abiotiques les moins étudiés à ce jour dans ce procédé. Or, l'agitation joue un rôle clé puisqu'elle doit permettre non seulement d'homogénéiser la phase liquide riche en bactéries, en substrats organiques, en métabolites et en biogaz soluble, mais aussi de favoriser les échanges de matière liquide-bactéries et liquide-gaz. Cependant, pour atteindre la qualité de mélange requise, il faut faire face à deux contraintes : d'une part il faut maintenir un niveau acceptable de stress mécanique pour les bactéries du consortium ; d'autre part, la puissance mécanique consommée par l'agitation doit rester limitée pour assurer la viabilité économique du procédé.

Dans ce travail, les effets combinés de la viscosité du digestat et de la vitesse d'agitation des mobiles sur la production de biohydrogène dans un bioréacteur ont été étudiés dans un premier temps. Les résultats ont montré une influence significative de ces deux facteurs sur la productivité en biohydrogène qui a pu être reliée au nombre adimensionnel de Reynolds et au régime d'écoulement du digestat. Un maximum de productivité a été observé lors de la transition laminaire-turbulent. Dans un deuxième temps, des méthodes de détermination du temps de mélange (conductimétrie, décoloration chimique, Fluorescence Induite par Nappe Laser) et du transfert de matière liquide-gaz (désoxygénation/oxygénation) ont été mises en œuvre dans les mêmes conditions de viscosité et d'agitation afin de rechercher les étapes limitantes pouvant expliquer les évolutions observées lors des essais de fermentation. Les résultats ont montré que transfert interfacial et mélange ne sont limitants qu'en régime laminaire, alors que les faibles productivités en régime turbulent résultent vraisemblablement d'une interaction entre la turbulence et les agrégats bactériens. Ensuite, l'écoulement dans le bioréacteur a été modélisé par une approche de type Mécanique des Fluides Numérique (CFD) et analysé par une méthode de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV) afin de déterminer les échelles spatiales locales de la turbulence et de pouvoir les comparer à la dimension caractéristique des agrégats bactériens. Les mesures locales confirment les hypothèses émises à partir des valeurs moyennes observées. Finalement, un modèle de type ADM1 (*Anaerobic Digestion Model N°1*) standard a été modifié en prenant en compte les ions lactate et un modèle hydrodynamique de type « *cascade de cellules* » dans le but de simuler la production de biohydrogène en systèmes batch et continu. Les simulations sont en bon accord avec les résultats expérimentaux dans les deux modes de culture en supposant un réacteur parfaitement mélangé. En conclusion, l'ensemble de ce travail confirme que la viscosité du digestat et les conditions de mélange sont effectivement des paramètres essentiels à prendre en compte pour l'optimisation et l'extrapolation du procédé de fermentation sombre.

**Mots clés :** Biohydrogène, Fermentation sombre, Viscosité du digestat, Mélange dans les bioréacteurs, Hydrodynamique des fermenteurs.





# Abstract

---

The global energy trends are currently dominated by a massive use of fossil non-renewable energy sources which are progressively depleting. In this way, the production of second-generation biohydrogen production from organic wastes by the dark fermentation process offers, therefore, an attractive solution to diversify the present energy mix. Within this framework, the aim of this work is to investigate the effect of the efficiency of the mixing process on dark fermentation. The conditions of mechanical agitation (mixer type, mixing speed) and the viscosity of the digestate (which depends on the variability of influent substrate concentration) are, indeed, among the abiotic factors that have been the most disregards up to now in this bioprocess. For example, mixing plays a key role because agitation conditions must ensure on the one hand the homogenization of the liquid phase enriched in bacteria, in organic substrate, in soluble metabolites, and in soluble biogas, and in the other hand promote liquid-to-bacteria and liquid-to-gas mass transfer. However, to reach the desired degree of mixing, two constraints must be faced: firstly, an acceptable level of mechanical stress must be maintained on the microbial consortium, and secondly, mechanical power input due to mixing must comply with the economic sustainability of the process.

In this work, the combined effects of digestate viscosity and agitation conditions on the fermentative biohydrogen production in the bioreactor were studied first. Experimental results highlighted a significant effect of these factors on biohydrogen productivity which could be expressed as function of the purely hydrodynamic dimensionless Reynolds number and of the prevailing flow regime. Hydrogen production was maximized in the transition region between laminar and turbulent flow conditions. Secondly, experimental measuring methods of mixing time (conductimetric, chemical decolorization and Planar Laser Induced Fluorescence techniques) and mass transfer (dynamic deaeration/aeration) were implemented in the same conditions of viscosity and agitation conditions so as to investigate the possible limiting steps that could explain the trends observed in the mixed cultures. The results proved that mixing and liquid-gas transfer was slower than hydrogen production rate only in the laminar flow regime, while low production rate under turbulent flow conditions might stem from an interaction between turbulent eddies and bacterial aggregates. Then, the flow field in the bioreactor was simulated using a CFD (Computational Fluid Dynamics) methodology and analyzed experimentally using PIV (Particle Image Velocimetry) to determine the characteristic turbulent length scales and to compare them to the characteristic size of the bacterial aggregates. Local measurements confirmed the assumptions made from average values derived from power input data. Finally, a modified ADM1 model (Anaerobic Digestion Model N°1) was developed to simulate the biohydrogen production, accounting for lactate ions and non-ideal mixing, under batch and continuous culture conditions. Simulations fairly agree with experimental data in both modes of cultures assuming perfect mixing condition. As a conclusion, the present work as a whole confirms that digestate viscosity and mixing conditions constitute key parameters that must be considered for process optimization and for the scale-up of dark fermentation.

**Keywords: Biohydrogen; Dark fermentation; Digestate viscosity; Mixing in bioreactor; Bioreactor hydrodynamics.**



# Introduction

---

Les travaux développés dans cette thèse de doctorat visent à étudier l'effet de deux paramètres abiotiques, à savoir la viscosité du digestat et le mélange induit par agitation mécanique, sur la production de biohydrogène par voie fermentaire sombre. L'ensemble de l'étude a pu être réalisé par le biais d'un financement du Laboratoire d'Excellence (LabEx) IMobS<sup>3</sup> (*Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions*); organisme dont l'ambition principale est de développer des briques technologiques efficaces et respectueuses de l'environnement pour une mobilité innovante des personnes, des biens et des machines. Plus précisément, ce travail fait partie intégrante du défi n°3 du LabEx « *Procédés de production d'énergie pour la mobilité* ». Aussi, dans un contexte plus général, ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de la transition énergétique, dont l'un des objectifs est de décarboner les sources d'énergie liées à la mobilité tout en favorisant le développement et la production d'énergies renouvelables d'origine biosourcée. Dès lors, la production de biohydrogène par voie fermentaire sombre à partir de déchets organiques est un procédé envisageable.

L'ensemble des travaux de cette thèse de doctorat a été réalisé sous la direction des Professeurs Christophe Vial et Jean-Pierre Fontaine, au sein de l'*Institut Pascal* de Clermont-Ferrand, et plus précisément de l'axe *Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes* (GePEB) de ce laboratoire. Le travail retranscrit dans ce manuscrit comporte huit chapitres :

✓ Le **Chapitre 1** aura pour objectif de contextualiser le cadre dans lequel s'inscrit ce travail. Il importera alors de présenter le contexte et le défi énergétique mondial, avant de recentrer progressivement notre propos sur les problématiques de la mobilité et du secteur des transports en lien avec celles des biocarburants et du biohydrogène. Finalement, nous développerons les avantages et les verrous propres au procédé de fermentation sombre et nous présenterons les objectifs spécifiques de cette thèse.

✓ Le **Chapitre 2** consistera en l'étude bibliographique de ce travail qui s'est concentrée sur deux problématiques principales. Si la première partie développera les différentes voies d'amélioration du procédé de fermentation sombre ; la seconde s'intéressera davantage aux

progrès du volet modélisation/simulation de la production de biohydrogène. Cette deuxième partie sera présentée sous la forme d'un chapitre de livre publié en 2019.

✓ Le **Chapitre 3** décrira les matériels utilisés ainsi que les méthodes expérimentales et numériques exploitées au cours de cette étude.

✓ Les résultats et discussions de cette thèse seront subdivisés en quatre chapitres. Le **Chapitre 4** mettra en œuvre l'étude des effets de la viscosité du digestat et du mélange induit par agitation mécanique sur la production en biohydrogène. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article publié en 2019 au *Biochemical Engineering Journal*.

✓ Le **Chapitre 5** s'intéressera à l'analyse du transfert d'hydrogène liquide-gaz et au temps de mélange, en lien avec la production de biohydrogène dans les mêmes conditions de viscosité du digestat et de mélange que le **Chapitre 4**. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article publié en 2019 au *Chemical Engineering Journal* dans le cadre du congrès mondial CHEMREACTOR-23 (23<sup>th</sup> International Conference on Chemical Reactors) qui a eu lieu à Gand du 5 au 9 novembre 2018, et pour lequel une conférence orale a été présentée.

✓ Ensuite, le **Chapitre 6** exposera une description de l'hydrodynamique locale en lien avec les résultats biologiques lorsque l'écoulement au sein du bioréacteur est turbulent. Il illustrera les possibilités de l'utilisation d'un outil expérimental (PIV ou Vélocimétrie par Images de Particules) et d'un outil numérique (CFD ou Mécanique des Fluides Numérique). Tout comme le **Chapitre 5**, ce chapitre a été proposé sous la forme d'un article qui est en cours de soumission au *Chemical Engineering Journal* dans le cadre du congrès mondial CHEMREACTOR-23, et pour lequel une conférence orale a été présentée.

✓ Finalement, le **Chapitre 7** constituera le dernier chapitre des résultats et discussions. Il présentera le développement et le calibrage d'un modèle ADM1 modifié afin de coupler les processus physiques, physico-chimiques et biologiques intervenant pendant le procédé de fermentation sombre. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'une publication en cours de soumission à l'*International Journal of Hydrogen Energy*.

✓ Le **Chapitre 8** clôturera ce manuscrit. Il résumera les principales conclusions de ces travaux ainsi que les perspectives qui s'y attachent.

# Table des matières

---

Résumé.....	3
Abstract .....	5
Introduction.....	7
Liste des Figures .....	17
Liste des Tableaux .....	21
<b>Chapitre 1 : Contexte et objectifs</b> .....	<b>23</b>
1.1 Contexte énergétique mondial et défis à venir.....	25
1.1.1 Liens entre l’Homme et l’énergie .....	25
1.1.2 Empreinte de l’Homme sur sa planète .....	27
1.1.3 Réchauffement climatique et notion de transition énergétique .....	29
1.1.4 Le secteur des transports : un gros consommateur d’énergie et émetteur de GES.....	31
1.1.5 Les biocarburants .....	34
1.1.6 Le biogaz et l’hydrogène .....	36
1.1.6.1 Principaux modes de production d’hydrogène .....	37
1.1.6.1.1 Hydrogène non-renouvelable.....	37
1.1.6.1.2 Hydrogène renouvelable biosourcé et non biosourcé .....	38
1.1.6.2 Coûts de production d’hydrogène en fonction du procédé .....	41
1.1.6.3 Principaux modes de consommation d’hydrogène .....	41
1.1.6.3.1 Consommation pour l’industrie .....	42
1.1.6.3.2 Consommation pour la mobilité.....	42
1.1.6.4 La filière hydrogène pour la mobilité en France.....	43
1.1.7 Production de biohydrogène par voie fermentaire sombre : grands principes et problématiques associées .....	44
1.2 Objectifs spécifiques de ce travail de doctorat .....	48
1.3 Références bibliographiques.....	52
<b>Chapitre 2 : Etude bibliographique</b> .....	<b>55</b>
2.1 Différentes voies d’amélioration du procédé de fermentation sombre .....	57
2.1.1 Source et sélection des microorganismes producteurs de biohydrogène .....	57
2.1.1.1 Les cultures pures .....	57
2.1.1.2 Les co-cultures.....	58
2.1.1.3 Les cultures mixtes .....	59
2.1.2 Les substrats organiques utilisés pour la production de biohydrogène .....	60
2.1.2.1 Les substrats simples .....	60

2.1.2.2	Les substrats complexes .....	60
2.1.2.3	Viscosité du digestat.....	62
2.1.3	Composition du milieu de culture .....	64
2.1.3.1	Les Macroéléments.....	64
2.1.3.2	Les Microéléments .....	64
2.1.4	La température .....	65
2.1.5	Le pH .....	66
2.1.6	La pression partielle en hydrogène (pH <sub>2</sub> ).....	67
2.1.7	Inhibition de la production en biohydrogène par les métabolites formés au cours de la réaction.....	72
2.1.8	Conduite des cultures et conception des bioréacteurs.....	73
2.1.8.1	Mode de conduite des cultures en bioréacteurs .....	73
2.1.8.1.1	Les cultures batch .....	73
2.1.8.1.2	Les cultures fed-batch.....	74
2.1.8.1.3	Les cultures semi-continues.....	74
2.1.8.1.4	Les cultures continues.....	74
2.1.8.2	Conception et design des bioréacteurs.....	75
2.1.8.2.1	Les systèmes à biomasse libre .....	75
2.1.8.2.2	Les systèmes à biomasse fixée.....	76
2.1.8.3	Système de mélange des bioréacteurs.....	77
2.1.8.3.1	Agitation mécanique .....	78
2.1.8.3.2	Agitation pneumatique.....	78
2.1.8.3.3	Agitation hydraulique .....	79
2.1.8.4	Evaluation de l'efficacité du mélange .....	79
2.1.9	Références bibliographiques .....	81
2.2	Modeling and simulation of the biohydrogen production processes .....	87
2.2.1	Introduction.....	88
2.2.2	Fundamental aspects of biohydrogen production processes .....	89
2.2.3	Black-box empirical and statistical bioreactor models .....	97
2.2.3.1	Modified Gompertz equation.....	97
2.2.3.2	Modified logistic model .....	98
2.2.3.3	Statistical models.....	99
2.2.3.3.1	Models deriving from the “Design of Experiments” (DOE) methodology.....	100
2.2.3.3.2	Principal component analysis (PCA) and partial least square regression (PLS).....	106
2.2.3.3.3	Artificial neural network (ANN) and genetic algorithm (GA).....	107
2.2.4	Semi-empirical unstructured models .....	110
2.2.4.1	Growth kinetics .....	111

2.2.4.2	Substrate uptake rate.....	114
2.2.4.3	Methods to account pH and temperature inhibitions .....	114
2.2.4.4	Product formation .....	117
2.2.4.5	Focus on ADM1 and derived models .....	118
2.2.5	Structured kinetic models .....	121
2.2.6	Distributed models and integrated bioreactors models .....	123
2.2.6.1	Non-ideal and compartmental models .....	123
2.2.6.2	Models based on Computational Fluid Dynamics (CFD).....	125
2.2.7	Conclusions and perspectives .....	127
2.2.8	References.....	133
<b>Chapitre 3 : Matériels et méthodes.....</b>		<b>141</b>
3.1	Plateforme expérimentale de la fermentation sombre.....	144
3.1.1	Description du bioréacteur, de son instrumentation et du système de commande et régulation .....	144
3.1.2	Les expérimentations de la fermentation sombre.....	145
3.1.2.1	Préparation des cultures.....	145
3.1.2.1.1	Consortium microbien .....	145
3.1.2.1.2	Composition des milieux de pré-culture et de culture .....	147
3.1.2.1.3	Préparation des milieux de pré-culture et de culture.....	147
3.1.2.1.4	Préparation de l'inoculum.....	147
3.1.2.1.5	Cultures en système batch.....	148
3.1.2.1.6	Cultures en système continu .....	148
3.1.2.2	Analyses des échantillons en cours de culture .....	149
3.1.2.2.1	Analyses de la phase gazeuse .....	149
3.1.2.2.2	Analyses de la phase liquide (digestat) .....	150
3.1.2.3	Calculs utilisés pour déterminer l'efficacité de la fermentation sombre.....	150
3.1.3	Maquette froide de la cuve agitée et de ses mobiles d'agitation .....	152
3.1.3.1	Configuration de référence du système d'agitation et d'injection .....	154
3.1.3.2	Configurations alternatives du système d'agitation et d'injection.....	154
3.2	Etude de l'effet de la viscosité du digestat et de la vitesse d'agitation des mobiles lors du procédé de fermentation sombre .....	156
3.2.1	Conditions de culture .....	156
3.2.2	Caractérisation rhéologique des fluides .....	157
3.2.3	Caractérisation de la tension de surface des fluides .....	158
3.2.4	Caractérisation de la taille moyenne des agrégats bactériens.....	158
3.2.5	Analyse du plan factoriel complet .....	158
3.2.6	Evaluation du stress mécanique et hydrodynamique .....	159



3.3	Etude expérimentale de l'hydrodynamique et du mélange .....	162
3.3.1	Etude du transfert de matière liquide-gaz par mesure du coefficient de transfert volumétrique $kLa$ ....	163
3.3.1.1	Principe de la technique de désoxygénation/oxygénation .....	163
3.3.1.2	Equipement disponible et conduite opératoire.....	166
3.3.2	Etude du mélange dans la cuve : détermination du temps de mélange .....	167
3.3.2.1	Mise en œuvre de la technique conductimétrique .....	167
3.3.2.1.1	Principe de la technique conductimétrique .....	167
3.3.2.1.2	Equipement disponible et conduite opératoire.....	168
3.3.2.2	Mise en œuvre de la technique de décoloration chimique .....	170
3.3.2.2.1	Principe de la technique de décoloration chimique.....	170
3.3.2.2.2	Equipement disponible et conduite opératoire.....	171
3.3.2.2.3	Traitement des images de la technique de décoloration chimique .....	173
3.3.2.3	Mise en œuvre de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser (PLIF) .....	175
3.3.2.3.1	Principe de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser .....	175
3.3.2.3.2	Equipement disponible et conduite opératoire.....	176
3.3.2.3.3	Traitement des images de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser .....	178
3.3.3	Etude de l'hydrodynamique locale dans la cuve agitée par la technique de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV) .....	180
3.3.3.1	Principe de la technique de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV) .....	180
3.3.3.2	Equipement disponible et conduite opératoire.....	182
3.3.3.2.1	PIV classique .....	183
3.3.3.2.2	PIV résolue en temps .....	184
3.3.3.3	Traitement des images de la technique de Vélocimétrie par Images de Particules.....	185
3.3.3.4	Caractérisation de la composante turbulente de l'écoulement.....	186
3.3.3.4.1	Distribution de l'énergie cinétique turbulente $k$ .....	187
3.3.3.4.2	Distribution de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente $\varepsilon$ .....	188
3.3.3.4.3	Contraintes mécaniques au sein de l'écoulement turbulent .....	190
3.4	Outils de modélisation/simulation .....	190
3.4.1	Etude de la modélisation et de la simulation de la production de biohydrogène par le modèle ADM1 .....	190
3.4.1.1	Principe du modèle ADM1 .....	191
3.4.1.2	Modifications du modèle ADM1 .....	192
3.4.1.3	Calibration du modèle .....	194
3.4.1.4	Mise en œuvre du réacteur en cascade pour les cultures en mode continu .....	195
3.4.2	Etude de la modélisation et de la simulation de l'écoulement turbulent par CFD .....	196

3.4.2.1	Principe et démarche de la CFD .....	196
3.4.2.2	Mise en œuvre pratique .....	198
3.4.2.2.1	Géométrie .....	198
3.4.2.2.2	Maillage .....	198
3.4.2.2.3	Référentiel tournant : approche MRF .....	199
3.4.2.2.4	Conditions initiales, aux limites et hypothèses de modélisation .....	199
3.4.2.2.5	Modélisation de la turbulence .....	200
3.5	Références bibliographiques.....	203
<b>Chapitre 4 : Effets de la viscosité du digestat et du mélange sur la production en biohydrogène .....</b>		<b>207</b>
4.1	Introduction .....	210
4.2	Methods .....	212
4.2.1	Culture preparation .....	212
4.2.1.1	Microbial consortium .....	212
4.2.1.2	Culture medium .....	213
4.2.1.3	Inoculum preparation.....	213
4.2.1.4	Start-up and batch experiments .....	214
4.2.1.5	Power draw measurements .....	215
4.2.2	Analytical methods .....	216
4.2.2.1	Chemical analysis in the liquid phase.....	216
4.2.2.2	Gas flow rate and chemical analysis of biogas .....	217
4.2.2.3	Rheological and surface tension measurements .....	217
4.2.2.4	Characteristic size of bacterial aggregates.....	218
4.2.3	Statistical analysis.....	218
4.3	Results .....	218
4.4	Discussion.....	222
4.4.1	Effect of power input on hydrogen production potential .....	222
4.4.2	Effect of Reynolds number on hydrogen production potential .....	225
4.4.3	Effect of eddy size on hydrogen production potential .....	228
4.5	Conclusions .....	230
4.6	References .....	232
<b>Chapitre 5 : Transfert de matière et temps de mélange en lien avec la production de biohydrogène .....</b>		<b>237</b>
5.1	Introduction .....	240
5.2	Materials and methods.....	243
5.2.1	Stirred reactor geometry and design .....	243
5.2.2	Operating conditions.....	245
5.2.3	Measurements of the mixing time.....	246

5.2.3.1	Conductimetric method .....	247
5.2.3.2	Chemical decolorization method .....	247
5.2.3.3	Planar Laser Induced Fluorescence method (PLIF).....	248
5.2.4	Measurements of the volumetric mass transfer coefficient .....	249
5.3	Results and discussion .....	250
5.3.1	Mixing time analysis and influence of the measuring method .....	251
5.3.2	Influence of injection position and impeller clearance on mixing time .....	254
5.3.3	Analysis of liquid-to-gas mass transfer.....	261
5.3.4	Relationship between hydrogen production, liquid-to-gas mass transfer and mixing.....	264
5.4	Conclusions .....	269
5.5	References .....	271
<b>Chapitre 6</b>	<b>: Caractérisation des composantes turbulentes de l'écoulement .....</b>	<b>275</b>
6.1	Introduction .....	278
6.2	Materials and methods.....	281
6.2.1	Stirred tank bioreactor.....	281
6.2.2	PIV measurements .....	283
6.2.3	Computational simulations .....	285
6.2.4	Hydromechanical stress through turbulent flow .....	286
6.3	Results and discussion .....	287
6.3.1	Assessment of the numerical and optical methods.....	287
6.3.1.1	Validation of PIV measurements.....	287
6.3.1.2	CFD simulations .....	290
6.3.2	Analysis of the flow field.....	294
6.3.2.1	Flow macrostructures .....	294
6.3.2.2	Turbulent properties of the flow .....	298
6.3.3	Bacterial aggregates exposure to potentially damaging regions under turbulent conditions .....	302
6.4	Conclusions .....	305
6.5	References .....	308
<b>Chapitre 7</b>	<b>: Développement d'un modèle ADM1 modifié .....</b>	<b>315</b>
7.1	Introduction .....	318
7.2	Materials and methods.....	321
7.2.1	Culture preparation .....	321
7.2.1.1	Microorganisms.....	321
7.2.1.2	Medium culture .....	321
7.2.1.3	Inoculum preparation.....	322
7.2.1.4	Start-up and bioreactor culture .....	322

7.2.2	Analytical methods .....	323
7.2.2.1	Gas flow rate and chemical analysis of biogas .....	323
7.2.2.2	Chemical analyses of the liquid phase .....	323
7.2.3	Model description .....	324
7.2.3.1	Structure of the model .....	324
7.2.3.2	Lactate and ethanol formation .....	325
7.2.3.3	Lactate fermentation .....	325
7.2.4	Model calibration .....	326
7.2.5	Model validation .....	326
7.2.6	Mixing model based on tank-in-series .....	327
7.3	Results and discussion .....	328
7.3.1	Model calibration .....	328
7.3.1.1	Sugar consumption .....	330
7.3.1.2	Lactate fermentation .....	331
7.3.2	Model validation .....	331
7.3.3	Continuous culture .....	333
7.3.3.1	Performances of the continuous culture .....	334
7.3.3.1.1	Hydrogen production .....	334
7.3.3.1.2	Metabolite production .....	334
7.3.3.2	Simulation of continuous digester using the perfect mixing assumption .....	336
7.3.3.3	Simulation of continuous digester using the non-ideal mixing assumption .....	337
7.4	Conclusions .....	339
7.5	References .....	342
<b>Chapitre 8 : Conclusions générales et perspectives .....</b>		<b>347</b>



# Liste des Figures

---

<b>Figure 1.1.</b> Production mondiale des énergies primaires (AIE, Agence Internationale de l’Energie, 2017).....	26
<b>Figure 1.2.</b> Production mondiale des énergies primaires en 1973 (gauche) et 2015 (droite) (AIE, Agence Internationale de l’Energie, 2017).....	27
<b>Figure 1.3.</b> Evolution de la température moyenne en surface : 1986-2005 (gauche) et projection 2081-2100 (droite) (GIEC, Groupe d’Experts Intergouvernemental sur l’Evolution du Climat, 2014).....	28
<b>Figure 1.4.</b> Principaux déplacements de population pour raisons climatiques en 2017 (IDMC, International Displacement Monitoring Centre, 2018).....	29
<b>Figure 1.5.</b> Principales dates des actions de lutte contre le réchauffement climatique (Réseau Action Climat France, 2015).....	30
<b>Figure 1.6.</b> Différents secteurs de consommation de l’énergie primaire dans le monde en 2014 (AIE, Agence Internationale de l’Energie, 2017).....	32
<b>Figure 1.7.</b> Répartitions des gaz à effet de serre (gauche) et leur origine dans le monde en 2010 (droite) (GIEC, Groupe d’Experts Intergouvernemental sur l’Evolution du Climat, 2014).....	32
<b>Figure 1.8.</b> Emissions de CO <sub>2</sub> du « puits à la roue » selon le type de véhicule (IFPEN, Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles, 2010).....	34
<b>Figure 1.9.</b> Répartition des substrats utilisés pour la production d’hydrogène dans le monde (gauche) et en France (droite) en 2015 (d’après les chiffres de Durville <i>et al.</i> , 2015).....	38
<b>Figure 1.10.</b> Estimation du coût de production d’hydrogène en fonction de différents procédés (d’après les chiffres de Durville <i>et al.</i> , 2015; Romagnoli <i>et al.</i> , 2011).....	41
<b>Figure 1.11.</b> Répartition par secteur d’activité de la consommation d’hydrogène dans le monde en 2015 (d’après les chiffres de Durville <i>et al.</i> , 2015).....	42
<b>Figure 1.12.</b> Voies métaboliques générales de dégradation de la matière organique sous conditions anaérobies : les voies de production d’hydrogène sont indiquées en gras, alors que les voies consommatrices ou à bilan hydrogène neutre sont indiquées en pointillées (Trably <i>et al.</i> , 2018).....	46
<b>Figure 1.13.</b> Principaux paramètres : conception du bioréacteur, paramètres biotiques et abiotiques, à optimiser pour le procédé de fermentation sombre.....	47
<b>Figure 1.14.</b> Intégration de la fermentation sombre dans une approche « bioraffinerie » (Venkata Mohan <i>et al.</i> , 2011).....	48
<b>Figure 2.1.</b> Viscosité apparente de différents digestats en fonction du cisaillement.....	63
<b>Figure 2.2.</b> Schéma représentatif du biogaz produit en solution par la bactérie et de son transfert vers la phase gazeuse.....	69
<b>Figure 2.3.</b> Différents bioréacteurs alimentés en continu. (a) CSTR, (b) AFBR, (c) UASB, (d) UASB sans recirculation.....	77
<b>Figure 2.4.</b> Schematic representation of the multiphase and multiscale properties of bioreactors in the biohydrogen production processes.....	90
<b>Figure 2.5.</b> Example of metabolic pathways of hydrogen production from glucose in dark fermentation (adapted from Batstone <i>et al.</i> , 2002) and in photofermentation (adapted from Hallenbeck and Benemann, 2002).....	92
<b>Figure 2.6.</b> Examples of non-ideal bioreactor models.....	96
<b>Figure 2.7.</b> Comparison of Gompertz (Equation 2.14) and logistic (Equation 2.16) equations using $H_{max} = R_{max} = 1$ and $\lambda = 1.5$ .....	99
<b>Figure 2.8.</b> Typical response surface plots obtained for fermentative hydrogen production from glucose using BBD expressed in coded variables between -1 and +1 for [Fe <sup>2+</sup> ] and [Mg <sup>2+</sup> ] (plots built using the data reported by Guo <i>et al.</i> , 2009).....	105

<b>Figure 2.9.</b> General multilayer structure of an artificial neural network .....	108
<b>Figure 2.10.</b> Comparison of the Monod, Haldane-Andrews and Han-Levenspiel equations ( $KS = KI = 1$ , $S_{max} = 5$ , $m = 3$ , $n = 2$ ) .....	113
<b>Figure 2.11.</b> Comparison between the Arrhenius and the Ratkowsky model for modeling the effect of temperature. ....	116
<b>Figure 2.12.</b> Structure of the standard ADM1 model (adapted from Batstone <i>et al.</i> , 2002).....	119
<b>Figure 2.13.</b> Example of compartmental model (a). Example of velocity field extracted from CFD computations in the stirred tank bioreactor of Trad <i>et al.</i> (2017) (b).....	124
<b>Figure 3.1.</b> Représentation schématique de l'ensemble de l'installation : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Unité de contrôle digitale ; (3) Sondes de température, pH, redox ; (4) Entrée base ; (5) Axe d'agitation ; (6) Sparger ; (7) Condenseur ; (8) Canne de prélèvement ; (9) Pompe péristaltique ; (10) Solution de base KOH 5N ; (11) Système d'acquisition. ....	144
<b>Figure 3.2.</b> Configuration de référence : caractéristiques géométriques de la cuve agitée et des mobiles d'agitation. ....	153
<b>Figure 3.3.</b> Configurations alternatives 1 (a), 2 (b) et 3 (c). ....	155
<b>Figure 3.4.</b> Nombre adimensionnel de puissance $Np$ obtenu dans la littérature et modèle obtenu. ....	161
<b>Figure 3.5.</b> Schéma du banc expérimental de la technique de désoxygénation/oxygénation : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Sonde de température ; (3) Cryostat à circulation ; (4) Moteur ; (5) Sparger et fritté inox ; (6) Microsonde ; (7) Support et micromanipulateur ; (8) Oxymètre ; (9) Système d'acquisition (a) ; Photographies du montage (b). ....	164
<b>Figure 3.6.</b> Exemple de courbe de réponse du signal électrique relevé par la microsonde pour un cycle de désoxygénation/oxygénation. ....	165
<b>Figure 3.7.</b> Photographie des bulles dans la cuve (a) ; Exemple de résultat de la distribution du diamètre des bulles (b).....	167
<b>Figure 3.8.</b> Schéma du banc expérimental de la technique conductimétrique : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Sonde de température ; (3) Cryostat à circulation ; (4) Moteur ; (5) Sonde conductimétrique ; (6) Support et micromanipulateur ; (7) Conductimètre ; (8) Système d'acquisition (a) ; Photographies du montage (b).....	168
<b>Figure 3.9.</b> Exemple d'évolution de la concentration normalisée en NaCl. ....	170
<b>Figure 3.10.</b> Schéma du banc expérimental de la technique de décoloration chimique : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Sonde de température ; (3) Cryostat à circulation ; (4) Moteur ; (5) Aquarium ; (6) Appareil photographique ; (7) Panneaux LED (a) ; Photographies du montage (b). ....	171
<b>Figure 3.11.</b> Masque appliqué à la cuve (à gauche) ; Pixels mélangés ou non dans la zone de travail (à droite).....	173
<b>Figure 3.12.</b> Exemple de courbe de décoloration. ....	174
<b>Figure 3.13.</b> Schéma du banc expérimental de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser : (1) Cuve agitée à simple enveloppe ; (2) Moteur ; (3) Aquarium ; (4) Caméra ; (5) Laser + Filtre (a) ; Zone balayée par le laser (b) ; Photographies du montage (c). ....	176
<b>Figure 3.14.</b> Masque appliqué aux images (a) ; Visualisation de l'image avant injection (b) ; Visualisation de l'image après mélange (c). ....	178
<b>Figure 3.15.</b> Exemple de $CoV$ normalisé en fonction du temps (a) ; Courbe caractéristique du mélange (b). ....	180
<b>Figure 3.16.</b> Schéma du banc expérimental de la technique de Vélocimétrie par Images de Particules : (1) Cuve agitée à simple enveloppe ; (2) Moteur ; (3) Aquarium ; (4) Caméra ; (5) Laser (a) ; Zone balayée par le laser (b) ; Photographies du montage (c).....	182
<b>Figure 3.17.</b> Particules de traceurs S-HGS (a) ; Fluideensemencé par les particules de traceur exposés au laser (b). ....	183
<b>Figure 3.18.</b> Zones filmées par PIV classique (a) ; Zone filmée par PIV résolue en temps (b). ....	185
<b>Figure 3.19.</b> Structure du modèle ADM1 standard (adapté de Batstone <i>et al.</i> , 2002).....	192
<b>Figure 3.20.</b> Structure du modèle ADM1 modifié.....	193
<b>Figure 3.21.</b> Schéma de principe du réacteur en cascade. ....	196
<b>Figure 3.22.</b> Géométries du système de référence.....	198

<b>Figure 3.23.</b> Maillage selon x (a), y (b) et z (c).....	199
<b>Figure 4.1.</b> Geometry of the stirred tank. ....	216
<b>Figure 4.2.</b> Comparison of the evolution of hydrogen production potential as a function of rotation speed: in water (0% PAG) (a); in a viscous medium (30% PAG) (b).....	219
<b>Figure 4.3.</b> Pareto charts showing the standardized effects and their sign (+ or -) from the largest to the smallest effect on hydrogen production potential (a); the vertical line discriminates the predictors with a significant effect from insignificant factors. The influence of the main effects is also plotted on hydrogen production potential (b). .	222
<b>Figure 4.4.</b> Power number data from the literature and from torque measurements versus Reynolds number with a model derived from spline interpolation. ....	224
<b>Figure 4.5.</b> Experimental hydrogen production potential versus power input.....	225
<b>Figure 4.6.</b> Experimental hydrogen production potential versus Reynolds number.....	226
<b>Figure 4.7.</b> Final values of butyric and acetic acid content in the digestate versus Reynolds number.....	227
<b>Figure 4.8.</b> Experimental hydrogen production potential versus Kolmogorov length scale.....	229
<b>Figure 4.9.</b> Size distribution of biomass aggregates in the digestate (typical example with $N = 120$ rpm and $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$ Pa.s). ....	230
<b>Figure 5.1.</b> Sketch of the impeller design of the reference configuration (a) and the alternative configurations 1 (b), 2 (c) and 3 (d).....	245
<b>Figure 5.2.</b> Flow structure obtained under laminar flow at $Re = 33$ ( $N = 40$ rpm and $\mu = 6.1 \cdot 10^{-2}$ Pa.s) after 60 s mixing with the chemical decolorization (a) and PLIF methods (b), respectively; under turbulent flow at $Re = 1.1 \cdot 10^4$ ( $N = 200$ rpm and $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$ Pa.s) after 2 s of mixing with the chemical decolorization (c) and PLIF methods (d), respectively. ....	252
<b>Figure 5.3.</b> Experimental mixing time versus Reynolds number using the conductimetric (a), chemical decolorization (b) and PLIF methods (c). Error bars are based on triplicate experiments. ....	253
<b>Figure 5.4.</b> Mixing pattern obtained under laminar flow at $Re = 33$ ( $N = 40$ rpm and $\mu = 6.1 \cdot 10^{-2}$ Pa.s) for the reference configuration (a) and the alternative configurations 1 (b) and 2 (c). ....	255
<b>Figure 5.5.</b> Comparison of experimental mixing time between configuration 1 and the reference design, and between configuration 3 and 2 (a); comparison of experimental mixing time between configuration 2 and the reference design, and between configuration 3 and 1 (b). Error bars are based on triplicate experiments.....	256
<b>Figure 5.6.</b> Dimensionless mixing time $Ntm$ versus $Re$ (a) $Re \cdot Np_{13}$ plot versus $1/Fo$ (b) for the four configurations. Error bars are based on triplicate experiments. ....	260
<b>Figure 5.7.</b> Fitted bubble size distribution with different medium viscosity ( $N = 120$ rpm).....	261
<b>Figure 5.8.</b> Experimental volumetric mass transfer coefficient versus $Re$ (a) and volumetric power input (b). Error bars are based on triplicate experiments.....	263
<b>Figure 5.9.</b> Experimental hydrogen production potential versus $Re$ (a), and experimental volumetric mass transfer coefficient and mixing time versus $Re$ (b). Error bars are based on triplicate experiments. ....	266
<b>Figure 5.10.</b> Damköhler number evolution versus Reynolds number. Error bars are based on triplicate experiments .....	268
<b>Figure 6.1.</b> Geometry of the stirred tank and vertical planes observed by the camera in 2D-PIV measurements; regions 1 and 2 with classical PIV, and region 3 with TR-PIV.....	282
<b>Figure 6.2.</b> Comparison between classical PIV and TR-PIV data, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the $r - z$ plane: 2D velocity magnitude at two rotation speeds for the viscous fluid (5% PAG) (a); turbulent kinetic energy $k$ at two rotation speeds for the viscous fluid (5% PAG) (b); turbulent dissipation rate $\varepsilon$ at three rotation speeds for water (0% PAG) (c). ....	288
<b>Figure 6.3.</b> Comparison of statistical convergence between classical PIV (a) and TR-PIV data (b) based on the mean radial $ur$ and axial $uz$ mean velocity and on the turbulent terms of the stress tensor $u'r$ , $u'z$ , and $u'ru'z$ . ....	289
<b>Figure 6.4.</b> Comparison between the kinetic energy contribution of periodic motion (a) and of the purely turbulent kinetic energy (b) ( $m^2/s^2$ ) from TR-PIV data in the $r - z$ plane ( $N = 200$ rpm and $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$ Pa.s). ....	290



**Figure 6.5.** Comparison of the predicted 2D velocity magnitude, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane: as a function of grid size using Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  model ( $N = 40$  rpm and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s) (a); as a function of  $k - \varepsilon$  model variant ( $N = 40$  rpm,  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s, grid size = 500,000 cells) (b). ..... 291

**Figure 6.6.** Comparison between CFD data, classical PIV and TR-PIV data, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane for  $N = 120$  rpm: 2D velocity magnitude (a: 0% PAG; b: 5% PAG); turbulent kinetic energy  $k$  (c: 0% PAG; d: 5% PAG); turbulent dissipation rate  $\varepsilon$  (e: 0% PAG; f: 5% PAG). ..... 293

**Figure 6.7.** Comparison of the 2D normalized velocity magnitude contours between CFD (a, c, e) and classical PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f). 295

**Figure 6.8.** Comparison of 2D normalized velocity radial profiles in the  $r - z$  plane: at mid-height of the top impeller for time-average TR-PIV data (a); at mid-height of the top impeller at fixed angle between paddle and baffle for CFD data (b). ..... 296

**Figure 6.9.** Comparison of the axial profiles of normalized 2D velocity magnitude in the  $r - z$  plane ( $r = 3$  cm;  $r/R = 0.46$ ) from classical PIV data, TR-PIV data and CFD data for  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ ,  $4.0 \cdot 10^3$  and  $1.1 \cdot 10^4$ . ..... 297

**Figure 6.10.** Comparison of the normalized turbulent kinetic energy  $k$  contours between CFD (a, c, e) and TR-PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f). 299

**Figure 6.11.** Comparison between CFD and TR-PIV data, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane: normalized turbulent kinetic energy  $k$  (a);  $\log_{10}$  of normalized turbulent dissipation rate  $\varepsilon$  (b) for  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ ,  $4.0 \cdot 10^3$  and  $1.1 \cdot 10^4$ . ..... 300

**Figure 6.12.** Comparison of the  $\log_{10}$  normalized turbulent dissipation rate  $\varepsilon$  contours between CFD (a, c, e) and TR-PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f). ..... 301

**Figure 6.13.** Comparison of the  $\lambda KDb$  contours between CFD (a, c, e) and TR-PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f). ..... 303

**Figure 6.14.** Evolution of hydrogen production potential ( $\bullet$ ) as a function of  $\lambda K$  and the volume fraction where  $\lambda K < Db$  (size is in  $\mu\text{m}$ ). ..... 304

**Figure 7.1.** Schematic of a single perfectly-mixed tank digester and of a tank-in-series digester.  $q$  flow ( $\text{m}^3/\text{d}$ ),  $V$  volume ( $\text{m}^3$ ),  $S_{\text{stream},i}$  concentration of soluble components ( $\text{kg COD}/\text{m}^3$ ),  $X_{\text{stream},i}$  concentration of microorganism components ( $\text{kg COD}/\text{m}^3$ );  $i$  is the component index. ..... 328

**Figure 7.2.** Comparison of experimental data used for calibration with the simulations: batch test at  $64 \text{ kg COD}/\text{m}^3$  of glucose for glucose (a), acetate (b), butyrate (c), propionate (d), ethanol (e), lactate (f),  $\text{H}_2$  flow rate (g). ..... 329

**Figure 7.3.** Comparison of experimental data used for calibration with the simulations: batch test at  $32 \text{ kg COD}/\text{m}^3$  of glucose for glucose (a), acetate (b), butyrate (c), propionate (d), ethanol (e), lactate (f),  $\text{H}_2$  flow rate (g). ..... 332

**Figure 7.4.** Experimental data and simulations ( $N_{\text{bac}} = 1, 2, 3$  and  $4$ , respectively) from continuous cultures at HRT of  $4, 8$  and  $12$  h, respectively, for glucose (a), acetate (b), butyrate (c), propionate (d), ethanol (e), lactate (f),  $\text{H}_2$  flow rate (g). ..... 335

**Figure 7.5.** Illustration of the chemical decolorization experiments to determine the mixing time in the digester at  $N = 120$  rpm and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa/s. ..... 337

# Liste des Tableaux

---

<b>Tableau 1.1.</b> Différents procédés de production d'hydrogène.....	37
<b>Tableau 2.1.</b> Différents substrats complexes utilisés pendant le procédé de fermentation sombre. ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor), CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), STR (Stirred Tank Reactor), VS (Volatile Solids).....	62
<b>Tableau 2.2.</b> Différentes méthodes de réduction de la pression partielle en hydrogène. CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), DCO (Demande Chimique en oxygène), GSMBR (Gas Separation Membrane Bioreactor), UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), VS (Volatile Solids).....	71
<b>Tableau 2.3.</b> Métabolites solubles formés au cours du procédé et leur concentration inhibitrice. CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor).....	73
<b>Tableau 2.4.</b> Type d'agitation et leur effet sur les plusieurs paramètres du procédé de fermentation anaérobie (d'après Trad <i>et al.</i> , 2016). AFBR (Anaerobic Fluidized Bed Reactor), AnMBR (Anaerobic Membrane BioReactor), ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor), CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), EGSB (Expanded Granular Sludge Blanket), STR (Stirred Tank Reactor), UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket).....	79
<b>Table 2.5.</b> Typical studies using full factorial design for optimization of biohydrogen production processes.....	101
<b>Table 2.6.</b> Typical studies using Plackett-Burman designs for screening and optimization of biohydrogen production processes.....	102
<b>Table 2.7.</b> Typical studies using the Taguchi method for screening and optimization of biohydrogen production processes.....	103
<b>Table 2.8.</b> Typical studies using RSM for optimization of biohydrogen production processes.....	105
<b>Table 2.9.</b> Typical studies using ANN for optimization of biohydrogen production processes.....	108
<b>Table 2.10.</b> Typical studies based on MFA describing biohydrogen production processes.....	122
<b>Table 2.11.</b> Pros and cons of the modeling and simulation strategies of biohydrogen production processes.....	129
<b>Tableau 3.1.</b> Composition des solutions minérales utilisées dans le milieu de culture.....	146
<b>Tableau 3.2.</b> Composition du milieu de culture.....	146
<b>Tableau 3.3.</b> Caractéristiques des cultures en système continu.....	148
<b>Tableau 3.4.</b> Variables mesurées au cours des cultures.....	151
<b>Tableau 3.5.</b> Calculs utilisés pour déterminer l'efficacité du procédé.....	151
<b>Tableau 3.6.</b> Caractéristiques géométriques de la cuve et des mobiles d'agitation.....	153
<b>Tableau 3.7.</b> Configurations de référence et alternatives du système d'agitation et d'injection.....	155
<b>Tableau 3.8.</b> Cuves, configurations de référence et alternatives du système d'agitation et d'injection en fonction des expérimentations menées.....	156
<b>Tableau 3.9.</b> Design du plan factoriel complet.....	157
<b>Tableau 3.10.</b> Viscosité dynamique et tension de surface à 35°C des solutions aqueuses Newtoniennes d'Hemkarox HV45.....	158
<b>Tableau 3.11.</b> Résumé du nombre adimensionnel de puissance $N_p$ obtenu dans la littérature.....	160
<b>Table 4.1.</b> Dynamic viscosity and surface tension as a function of the percentage of PAG in the medium.....	214
<b>Table 4.2.</b> Hydrogen production potential and yield, and kinetic parameters (latency, cultivation time and glucose consumption rate) derived from the experimental design.....	220
<b>Table 4.3.</b> Final butyric and acetic acid concentrations in the digestate as a function of viscosity and rotation speed.....	221
<b>Table 4.4.</b> Summary of the power number data from the literature.....	223
<b>Table 5.1.</b> Advantages and limitations of the conductimetric, chemical decolorization and PLIF methods (adapted from Ascanio, 2015).....	242
<b>Table 5.2.</b> Dynamic viscosity of the solution as a function of the percentage of polyalkylene glycol.....	246

<b>Table 5.3.</b> Comparison of mixing time data from several techniques with the reference configuration.....	251
<b>Table 5.4.</b> Characteristic time scales and dimensionless parameters derived from this work.....	265
<b>Table 6.1.</b> Experimental conditions (viscosity, rotation speed), <i>Re</i> number, and measured power input from Chezeau and Vial (2019) .....	283
<b>Table 6.2.</b> Tangential $\theta$ , radial R, and axial Z number of cells in the grid .....	290
<b>Table 6.3.</b> Volume fraction of the stirred tank in which $\lambda_k/D_b < 1$ in the five turbulent flow conditions of this work from CFD simulations.....	305
<b>Table 7.1.</b> Peterson matrix after implementation of lactate and ethanol into ADM1 .....	324
<b>Table 7.2.</b> Stoichiometric and kinetic parameter values from glucose fermentation, lactate production and fermentation, and ethanol production processes .....	330
<b>Table 7.3.</b> Concentration of soluble and microorganism components at the beginning of different HRT depending to the number of tank-in-series.....	338

# **Chapitre 1 : Contexte et objectifs**

---

## Préambule

---

Le présent chapitre a pour but de contextualiser ce travail dans le cadre du défi énergétique mondial, avant de se focaliser sur ses objectifs spécifiques. Pour se faire, nous résumerons à titre liminaire le lien fort entre le développement de l'humanité et la consommation mondiale en énergie, avant de recentrer notre propos sur les problématiques propres au secteur des transports dans le cadre de la transition énergétique par l'intermédiaire des biocarburants et du biohydrogène produit *via* le procédé de fermentation sombre. Enfin, nous conclurons ce chapitre en détaillant les objectifs qui ont motivé ces travaux.

## 1.1 Contexte énergétique mondial et défis à venir

### 1.1.1 Liens entre l'Homme et l'énergie

L'accès à l'énergie est indispensable pour combler nos principaux besoins fondamentaux par le biais de l'alimentation, du logement, des transports, des loisirs et des communications. Partout, l'Homme consomme de l'énergie pour adapter ses besoins au monde dans lequel il vit. L'énergie joue également un rôle majeur dans l'histoire de l'humanité ; le développement ainsi que l'évolution de notre espèce sont intimement liés à ceux de l'accès aux ressources énergétiques et à leur mise en œuvre. L'histoire de l'énergie commence il y a 500 000 ans avec la maîtrise du feu par l'*Homo erectus* qui permit d'utiliser le bois en tant que première *énergie primaire*. Si aujourd'hui l'évocation de la domestication du feu semble éloignée des problématiques énergétiques actuelles, il s'agit de l'une des découvertes technologiques et culturelles les plus importantes qui a contribué à l'évolution humaine en couvrant le besoin fondamental de conservation des aliments. Notre évolution a connu un deuxième essor pendant la révolution néolithique qui est caractérisée par la transition des communautés de chasseurs-cueilleurs vers l'agriculture et la sédentarisation, ce qui s'est traduit par l'utilisation de l'énergie sous diverses formes : énergie humaine, animale, éolienne, hydraulique et surtout celle du bois-biomasse qui a perduré jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle. Les grandes révolutions énergétiques qui ont conduit au développement des sociétés industrielles et qui sont aujourd'hui la base de notre civilisation, reposent sur l'utilisation des énergies fossiles carbonées à plus forte densité énergétique. La révolution industrielle à la moitié du XVIII<sup>ème</sup> siècle a été marquée par le début du règne du charbon et la multiplication par trois de la consommation énergétique mondiale. Ensuite, la période des Trente Glorieuses, qui désigne la période de forte croissance économique et d'amélioration des conditions de vie qu'a connu la majorité des pays développés après la seconde guerre mondiale, s'est traduite par un usage industriel du pétrole et le recours dans une moindre mesure au gaz naturel et à l'hydroélectricité. Cela provoquant à nouveau un triplement de la consommation énergétique alors que dans un même temps la population mondiale a moins que doublé (*Figure 1.1*).

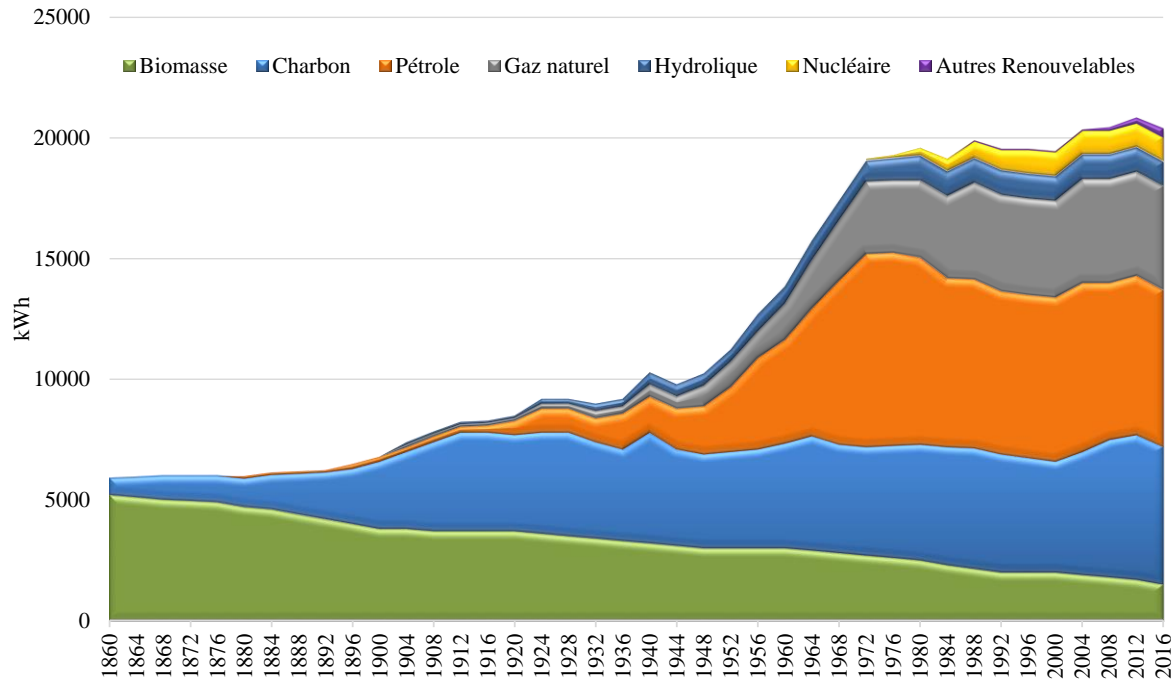


Figure 1.1. Production mondiale des énergies primaires (AIE, Agence Internationale de l'Energie, 2017).

L'histoire de l'humanité et son évolution sont caractérisées par une augmentation de la consommation et des besoins en énergies par habitant. L'ensemble des ressources utilisables s'est diversifié. Cependant, selon les derniers chiffres de l'Agence Internationale de l'Energie (AIE) parus en 2017, le mix énergétique est encore à ce jour dominé à près de 80% par les énergies fossiles carbonées (Figure 1.2). Même si depuis la fin des Trente Glorieuses en 1973 et jusqu'à 2015, notre dépendance au pétrole a diminué de près de 15%, force est de constater que cela s'est fait majoritairement à l'échelle mondiale au profit du charbon (+ 3,6%), du gaz naturel (+ 5,6%) et du nucléaire (+ 4,0%), lequel repose sur la fission d'uranium ou de thorium qui sont des minerais non-renouvelables. Pour toutes ces ressources énergétiques se posent des questions sur la pérennité à moyen terme des réserves, mais également sur la volatilité de leurs prix qui sont des résultantes multifactorielles de la croissance démographique, de l'arrivée sur le marché des nouveaux consommateurs (les économies émergentes), de la raréfaction des ressources faciles d'accès et de la prise en compte récente du coût environnemental des émissions des gaz à effet de serre (GES), de leurs conséquences sur la santé et du coût économique du traitement de ces émissions.

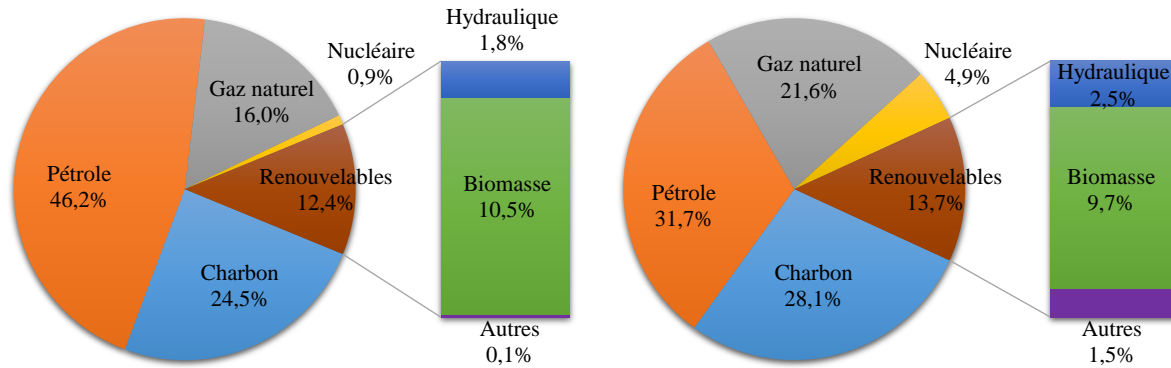


Figure 1.2. Production mondiale des énergies primaires en 1973 (gauche) et 2015 (droite) (AIE, Agence Internationale de l’Energie, 2017).

### 1.1.2 Empreinte de l’Homme sur sa planète

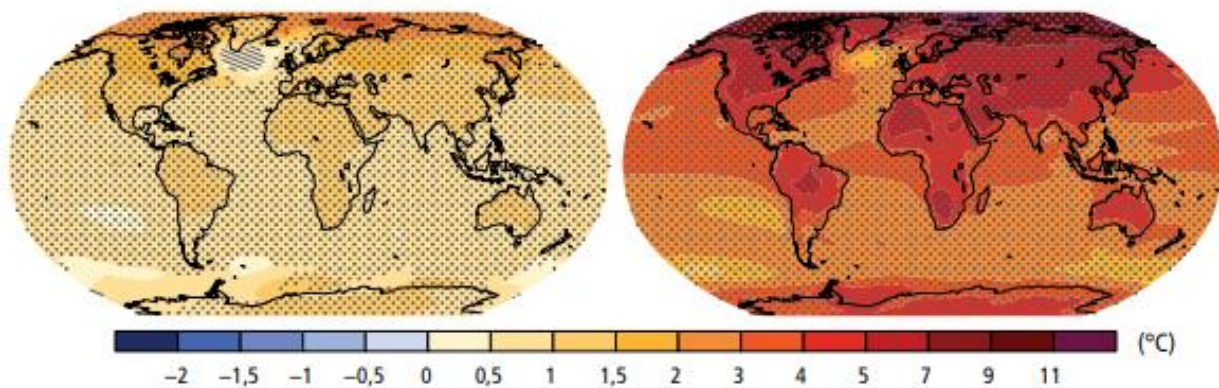
A ce jour, chacun peut constater l’impact des activités humaines sur notre planète Terre. La production et l’utilisation des énergies fossiles non-renouvelables provoquent à l’échelle locale et mondiale des changements climatiques et environnementaux importants. Bien que ces modifications soient la résultante de nombreux facteurs démographiques, technologiques et socio-économiques et de leur variabilité, l’empreinte de l’Homme sur sa planète est souvent reliée aux émissions anthropiques de GES dont les principaux sont le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), le méthane (CH<sub>4</sub>), les gaz fluorés (PFC, HFC, SF<sub>6</sub>) et le protoxyde d’azote (N<sub>2</sub>O).

De façon sommaire, l’équilibre climatique de la Terre est déterminé par l’énergie qu’elle reçoit du soleil sous forme de rayonnement solaire et l’énergie qu’elle émet dans l’espace sous forme de rayonnement infrarouge. Or, cet équilibre est modifié dès lors que certains GES émis par l’Homme augmentent l’absorption par l’atmosphère du rayonnement infrarouge et donc l’effet de serre. Depuis la révolution industrielle, on estime à près de 40% l’augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> dans l’atmosphère terrestre ; ceci s’expliquant par l’intensification des activités humaines et de l’utilisation des ressources fossiles, mais aussi par la diminution de la couverture forestière des terres émergées (Bréon et Luneau, 2018). En effet, on attribue souvent aux forêts le nom de « poumon de la planète », de par leur rôle capital dans la fixation du CO<sub>2</sub> par photosynthèse. Celles-ci stockent dans leur biomasse et dans le sol près de 40% du carbone terrestre souterrain et 80% du carbone atmosphérique avec pour finalité le rejet d’oxygène. Le processus de déforestation au profit de l’extension des terres agricoles, des espaces urbains et des zones d’extraction des matières premières (pétrole, gaz naturel, minerais, etc.) contribue de façon



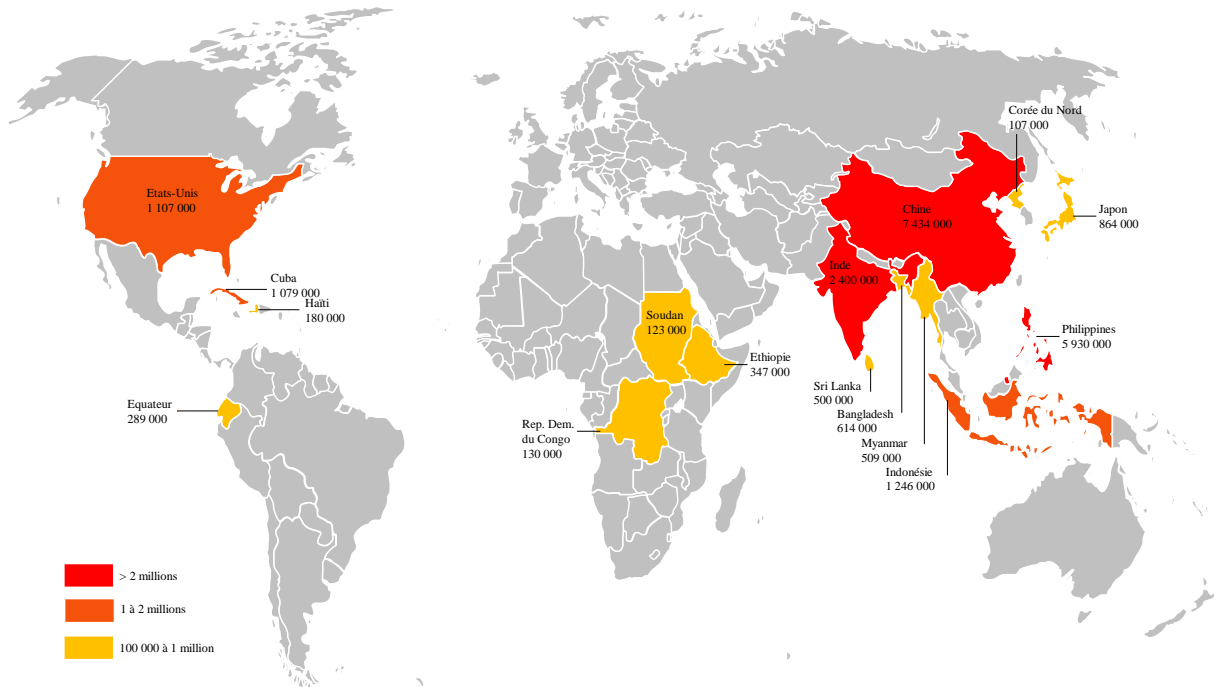
majeure aux dérèglements climatiques et environnementaux. L’empreinte humaine sur le climat se vérifie aujourd’hui par :

- ✓ Une hausse générale des températures sur l’ensemble du globe (**Figure 1.3**) ;
- ✓ Un fort recul de la masse des calottes glaciaires, une réduction des glaciers de la majorité des massifs montagneux mondiaux et du manteau neigeux de l’hémisphère nord ;
- ✓ Une montée du niveau des océans et des mers ;
- ✓ Une multiplication des événements météorologiques extrêmes (canicules, sécheresses et précipitations, tempêtes, cyclones, *etc.*).



**Figure 1.3.** Evolution de la température moyenne en surface : 1986-2005 (gauche) et projection 2081-2100 (droite) (GIEC, Groupe d’Experts Intergouvernemental sur l’Evolution du Climat, 2014).

Enfin, si l’Homme avait besoin de plus de preuves quant à son rôle dans l’évolution du climat, il appert également de véritables bouleversements de la biodiversité terrestre et marine. Les changements climatiques accentuent les contraintes anthropiques sur une multitude d’espèces et affectent leurs différents rythmes de vie, de croissance, de reproduction et de répartition. La responsabilité de l’Homme dans le réchauffement climatique est donc manifeste. En 1985, dans un rapport des *Nations Unies pour l’Environnement* (PNUE), apparaît pour la première fois le terme de « *réfugié climatique* » ou « *réfugié environnemental* ». L’Homme est directement touché par le réchauffement climatique et ses conséquences. Des populations fuient leurs habitats à la suite d’évènements climatiques extrêmes, ou en raison des dégradations que subissent leurs territoires et écosystèmes (**Figure 1.4**).



**Figure 1.4.** Principaux déplacements de population pour raisons climatiques en 2017 (IDMC, International Displacement Monitoring Centre, 2018).

En conclusion, l'essentiel de la consommation mondiale d'énergie est assuré par les énergies fossiles carbonées qui sont épuisables par nature et dont le renouvellement naturel est si lent en proportion de notre consommation qu'elles constituent des *énergies de stock*. De fait, ces dernières devront progressivement et nécessairement laisser la place aux *énergies de flux* dites renouvelables dans le cadre de ce qui est couramment dénommé la **transition énergétique**.

### 1.1.3 Réchauffement climatique et notion de transition énergétique

Grâce à trente ans de travaux scientifiques transdisciplinaires et internationaux, nous disposons à présent d'une analyse précise du changement climatique, rendue possible par l'intermédiaire du *Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC)*. Désormais, on constate une véritable prise de conscience institutionnelle du réchauffement climatique, sous l'influence notamment de la société civile par le biais des associations environnementales (*World Wide Fund For Nature, Greenpeace, etc.*), des scientifiques (GIEC) et des gouvernements par l'intermédiaire de l'*Organisation des Nations Unies* (Sommet de la Terre et Conférences des Parties) (**Figure 1.5**).

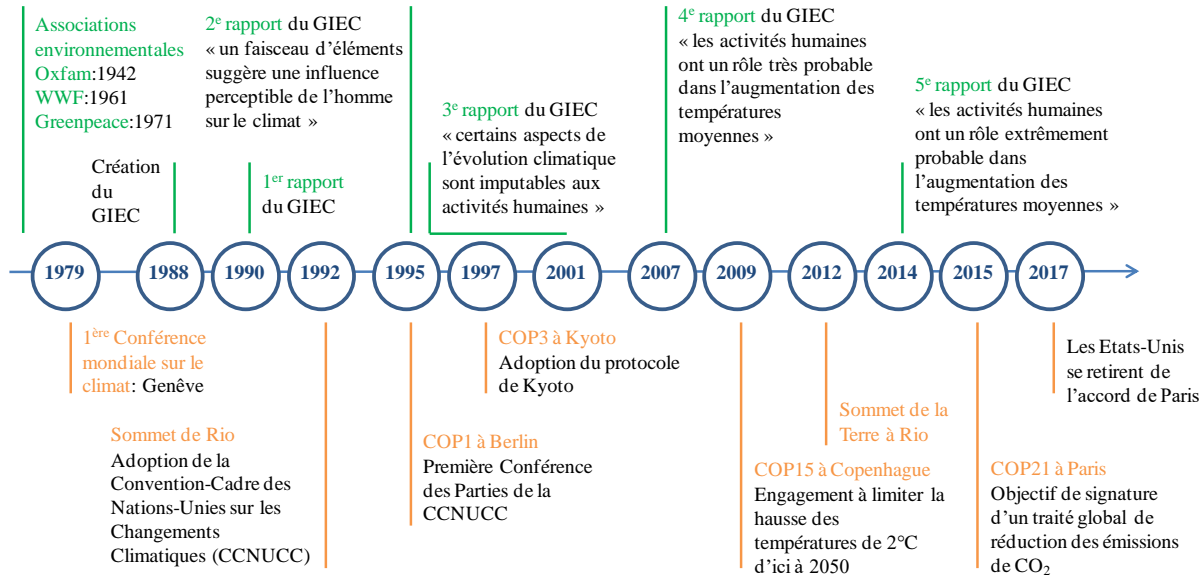


Figure 1.5. Principales dates des actions de lutte contre le réchauffement climatique (Réseau Action Climat France, 2015).

En témoignage l'accord de Paris (COP 21), signé par 195 Etats le 12 décembre 2015, après quatre ans d'intenses négociations. Au vu des constats scientifiques et à travers cet accord, les pays signataires se sont engagés à contenir le réchauffement climatique de 1,5°C à 2°C d'ici à 2050 (Organisation des Nations Unies, convention cadre sur les changements climatiques, 2015). Dans cette optique, chaque Etat a pour objectif de réduire les émissions de GES et doit déployer des champs d'actions à partir de 2020. Les Conférences des Parties suivantes, COP 22 de Marrakech (2016) et COP 23 de Bonn (2017), ont prolongé cette ambition, notamment par l'entrée de l'Afrique dans la lutte contre le réchauffement climatique ou encore par l'engagement de plusieurs pays à sortir du charbon à l'échéance 2030. Toutefois, la cohésion de la communauté internationale en faveur de la lutte contre le réchauffement climatique reste fragile, fragilité mise en exergue notamment par la sortie des Etats-Unis, alors deuxième plus gros émetteur mondial de GES derrière la Chine, des accords de Paris 2015 (sous l'impulsion de la récente élection du président américain Donald Trump). Cet épisode pointe du doigt les difficultés de la gouvernance mondiale sur la question du climat, bien qu'immédiatement après cette sortie, la majorité des pays aient réaffirmé leur volonté de poursuivre leurs efforts de réduction d'émissions de GES.

#### 1.1.4 Le secteur des transports : un gros consommateur d'énergie et émetteur de GES

Il convient de poser le postulat suivant : le secteur des transports est un pilier essentiel de l'activité économique de tous les pays. Par définition, lorsqu'on parle de transport, on fait appel au déplacement d'objets, de marchandises ou d'individus d'un endroit à un autre. Toutefois, il est nécessaire d'aller au-delà de cette définition et de faire la distinction entre modes de transport (transport routier, maritime, aviation, ferroviaire) et moyens de transport (marche à pied, automobile, train, bateau, avion, *etc.*). Ce faisant, on peut constater au niveau mondial, en 2014, que le secteur des transports est indéniablement l'un des plus énergivores (**Figure 1.6**) ; on estime en effet qu'il représente près de 28% de la consommation d'énergie. De plus, le transport dépend encore à plus de 92% des produits pétroliers, on parle alors du « *tout pétrole* » et de « *pétrole dépendance* ». En France, la répartition de la consommation d'énergie par secteur est différente, avec 42% pour le tertiaire et résidentiel, 25% pour l'industrie, 3% pour l'agriculture mais toujours près de 30% pour le secteur des transports (Ministère de l'Environnement, de l'énergie et de la mer, chiffres clés de l'énergie en 2016, publié en 2017). Certains modes de transport tentent de s'éloigner de ce modèle ; à titre d'exemple, le secteur ferroviaire diminue sa dépendance au pétrole à 71% grâce à l'électrification d'une partie de son réseau. A l'inverse, les modes de transport de l'aviation et du maritime font figures de mauvais élèves avec une dépendance au pétrole de l'ordre de 100%. En somme, le transport routier reste le mode de transport le plus énergivore avec 81% de la part des énergies consommées par le secteur des transports (Ministère de l'Environnement, de l'énergie et de la mer, chiffres clés du transport en 2017, publié en 2017).

Tous ces chiffres deviennent problématiques lorsqu'on sait que le secteur des transports est responsable à lui seul d'environ 15% des émissions mondiales de GES (**Figure 1.7**). Pour agir sur le cas particulier du secteur des transports et réduire sa dépendance au pétrole tout en diminuant les émissions de GES pour se diriger vers un transport durable, plusieurs axes d'actions s'imposent :

- ✓ Transporter moins en réduisant les volumes de trafic (*sobriété*) ;
- ✓ Transporter mieux en favorisant les modes de transport moins consommateurs et moins polluants (*efficacité*) ;
- ✓ Développer de nouveaux carburants et outils de motorisation.

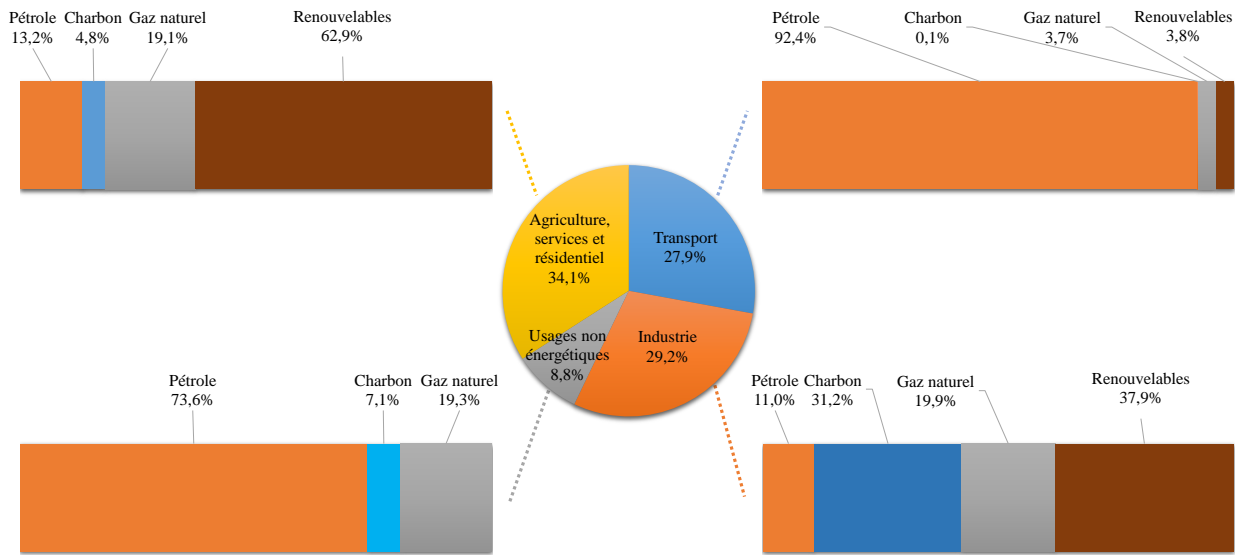


Figure 1.6. Différents secteurs de consommation de l'énergie primaire dans le monde en 2014 (AIE, Agence Internationale de l'Energie, 2017).

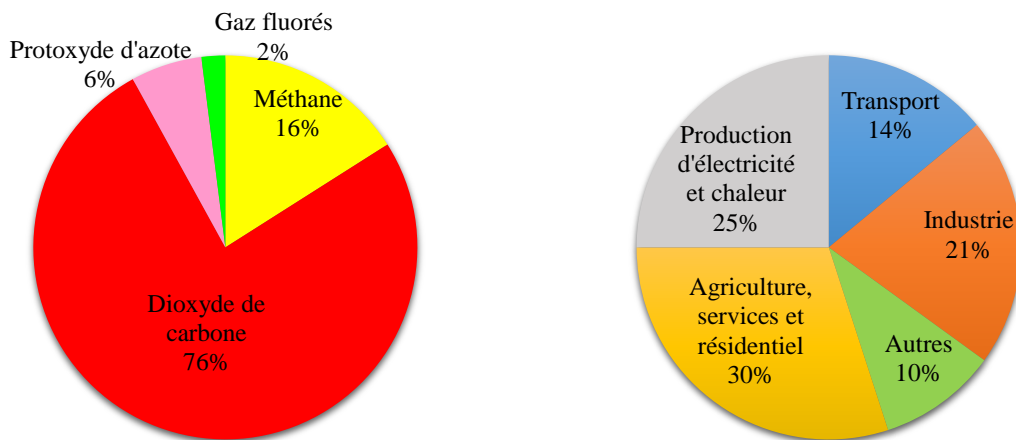


Figure 1.7. Répartitions des gaz à effet de serre (gauche) et leur origine dans le monde en 2010 (droite) (GIEC, Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat, 2014).

Concernant le dernier volet cité, plusieurs objectifs peuvent être définis :

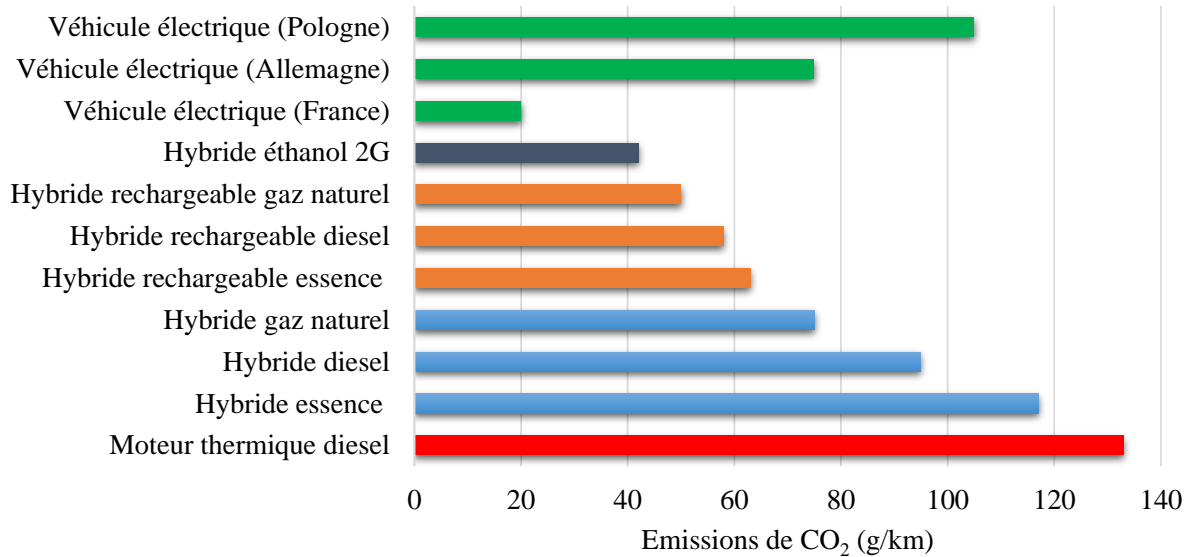
✓ Pour ce qui est de la motorisation, il s'agit de développer et de déployer sur le marché, des véhicules munis de moteurs hybrides et électriques. L'hybridation des véhicules met en œuvre le couplage entre plusieurs types d'énergies embarquées, qu'elles soient d'origines renouvelables ou non-renouvelables. Les premiers véhicules hybrides classiques, munis d'un moteur thermique principal et d'un moteur électrique secondaire, sont apparus à la fin des années 1990 et ont été commercialisés par le constructeur japonais Toyota. Ils ont connu un succès modéré, car leur prix

restait relativement élevé par rapport aux modèles 100% thermique et la capacité des batteries était relativement faible, lesquelles ne permettaient de rouler en mode 100% électrique que pendant une durée limitée d'une dizaine de kilomètres à une vitesse ne dépassant pas les 50 km/h. Le développement plus récent des véhicules hybrides rechargeables par le même constructeur a permis d'améliorer ces défauts ; on note en effet une plus grande capacité d'autonomie et une meilleure utilisation des batteries. En conséquence, les ventes de ces véhicules ne cessent d'augmenter et elles concurrencent sérieusement celles des véhicules 100% électrique à l'échelle mondiale. Les véhicules hybrides rechargeables ont en effet plusieurs atouts qui pointent les limitations techniques des véhicules 100% électriques, tels que la durée de vie des batteries et leur recyclage en fin de vie toujours sujets à controverse.

✓ Pour les carburants, les objectifs sont de développer et de diversifier l'usage des différents types de biocarburants de première, deuxième et troisième génération. Il s'agit de carburants sous formes liquides, solides ou gazeuses, produits à partir de matériaux organiques non fossiles provenant de la biomasse, utilisés à des fins de valorisation énergétique dans les transports. En soit, les biocarburants existent depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle et la première génération est déjà utilisée au stade industriel sous forme d'additifs dans la formulation du gazole et de l'essence destinés aux transports. Dans l'Union Européenne, les différentes directives sur la promotion des biocarburants en 2003 (2003/30/CE) et des énergies renouvelables en 2009 (2009/28/CE) fixent divers objectifs contraignants pour les Etats membres. Ces normes visent à augmenter la part de marché des biocarburants sur le marché des carburants destinés aux transports à hauteur de 10% d'ici à 2020. Aujourd'hui, en France, une fraction de biocarburant peut être incorporée dans des proportions allant jusqu'à 7% dans le gazole, voire 30% pour certaines flottes captives de véhicules. De même, du biocarburant à hauteur de 5% (SP95 et SP98), voire de 10% (SP95-E10), peut entrer dans la composition de l'essence.

Finalement, le développement de nouveaux carburants et outils de motorisation conduit directement à augmenter la flotte de véhicules « propres » en circulation, qui émettent peu ou pas de GES et de particules fines « du réservoir à la roue » (« from tank to wheel »). Il ne faut cependant pas perdre de vue que cette supposée propreté des véhicules n'est pas forcément la même pour les différentes énergies produites. C'est pourquoi il est primordial de prendre en compte les émissions de GES des véhicules « du puits à la roue » (« from well to wheel »). Les

émissions de GES peuvent alors être comparées pour différents types de carburants et de motorisations. Les résultats d'émissions de CO<sub>2</sub> sont alors très variables selon le type de véhicule emprunté, mais aussi étonnamment, selon la zone géographique où le véhicule est en circulation (**Figure 1.8**). Ceci est vérifiable avec les véhicules électriques, dont les émissions de CO<sub>2</sub> sont en moyenne de 75 g/km en Allemagne et de 105 g/km en Pologne. De tels résultats s'expliquent par des différences de mode de production de l'énergie électrique selon les pays.



**Figure 1.8.** Emissions de CO<sub>2</sub> du « puits à la roue » selon le type de véhicule (IFPEN, Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles, 2010).

### 1.1.5 Les biocarburants

On distingue aujourd'hui trois générations de biocarburants, classées selon l'origine de la biomasse utilisée et les procédés de transformation associés.

✓ La première génération (1G) correspond aux biocarburants produits à partir de cultures agricoles destinées traditionnellement à l'alimentation humaine ou animale. Il s'agit du bioéthanol pour la substitution de l'essence, produit par distillation de la canne à sucre, de la betterave sucrière et de diverses céréales (maïs, blé, *etc.*) ; ainsi que du diester pour la substitution du diesel, produit par estérification d'huiles végétales tels que le colza, le tournesol, le soja ou l'huile de palme. La première génération de biocarburant a atteint la maturité industrielle ; cependant, sa production est sujette à controverse. Dans un contexte alimentaire mondial disparate selon les régions, il est difficile d'un point de vue éthique de continuer à encourager la



production de biocarburants de première génération, car les ressources proviennent pour l'essentiel de cultures destinées à l'alimentation et leur culture est en concurrence avec l'agriculture vivrière, soit directement, soit par l'occupation des sols. A cet effet, la directive (2015/1513) de l'Union Européenne fixe un plafond d'incorporation de 7% pour les biocarburants de première génération.

✓ La deuxième génération (2G) regroupe les biocarburants produits par voie biochimique ou thermochimique à partir de biomasses lignocellulosiques que sont les déchets et résidus agricoles et forestiers. Contrairement à la 1G, la deuxième génération n'entre pas en concurrence directe avec les cultures vivrières, et les ressources utilisées ne doivent pas entraver le fonctionnement professionnel de la filière bois. La voie biochimique est destinée à la production d'éthanol de deuxième génération. Elle permet dans un premier temps de séparer les différents constituants de la biomasse lignocellulosique (cellulose, hémicellulose et lignine). Ensuite la cellulose est hydrolysée en hexoses et ces derniers sont fermentés en éthanol. La voie thermochimique permet de transformer la biomasse lignocellulosique en syngaz (mélange de monoxyde de carbone et de dihydrogène) *via* un procédé de gazéification. Par la suite, ce syngaz peut être utilisé pour produire du carburant de synthèse (procédé Fischer-Tropsch), du méthane (méthanation), de l'hydrogène ou d'autres molécules organiques. Ainsi, la seconde génération de biocarburant est en phase de développement et la directive (2015/1513) fixe un objectif indicatif d'incorporation de 0,5% d'ici à 2020, ce qui peut constituer un frein à leur développement et donc à la baisse de leur coût.

✓ La troisième génération (3G) correspond à la culture de la biomasse algale, capable de produire et de stocker des quantités importantes de lipides. L'utilisation de cette biomasse aquatique présente l'avantage de ne mobiliser aucune surface agricole et certaines microalgues peuvent se développer de manière autotrophe. La troisième génération de biocarburant n'a pas encore dépassé le stade de la recherche, mais différents laboratoires multiplient les études afin d'évaluer le potentiel des microalgues à synthétiser des sucres, des huiles et de l'hydrogène.

Au cœur de la *transition énergétique* actuelle, avec pour objectifs principaux de diversifier le mix énergétique tout en réduisant les émissions de GES dans le secteur des transports, les biocarburants sont des substituts viables, la 1<sup>ère</sup> génération étant implantée de façon durable sur le marché de l'énergie.



### 1.1.6 Le biogaz et l'hydrogène

Le biogaz (mélange gazeux de CH<sub>4</sub> et de CO<sub>2</sub>) et l'hydrogène sont des alternatives émergentes souvent considérées comme des énergies prometteuses dans le cadre de la *transition énergétique*. Cependant, leur utilisation actuelle dans le secteur des transports reste faible. Concernant le biogaz produit par la fermentation de matières organiques en conditions anaérobies *via* le procédé de méthanisation, il peut être purifié en biométhane et utilisé comme biocarburant (BioGNV) dans un moteur thermique à combustion interne pour les véhicules GNV (gaz naturel véhicule), en substitution au gaz naturel fossile. Aujourd'hui, il alimente des flottes captives de véhicules (véhicules d'entreprise, de tourisme et des autobus) et quelques véhicules individuels. Toutefois, l'utilisation principale du biogaz en France reste essentiellement la production d'électricité par combustion.

Pour ce qui est de l'hydrogène, il peut être utilisé directement ou en mélange hythane (mélange gazeux de CH<sub>4</sub> et de H<sub>2</sub>) en tant que carburant dans un moteur thermique à combustion interne, ou dans une pile à combustible pour l'alimentation des véhicules électriques. Néanmoins, l'hydrogène est rarement utilisé comme carburant et est plus souvent considéré comme un excellent vecteur énergétique, ou bien, comme une des voies possibles de stockage de l'électricité. L'hydrogène fait depuis longtemps figure de possible énergie « *de demain* », notamment de par son fort pouvoir calorifique par unité de masse (120 MJ/kg) en comparaison au méthane (50 MJ/kg). Au début des années 2010, l'économiste Jeremy Rifkin (2013) s'était même positionné pour prédire que l'hydrogène provoquerait une « *troisième révolution industrielle* ». En revanche, il est rarement rapporté que l'hydrogène n'est pas un bon combustible par unité de volume (12 J/cm<sup>3</sup>) en raison de sa faible densité, alors que celle du méthane est de 33 J/cm<sup>3</sup> (Agator *et al.*, 2008). Toutefois, la maturité de l'ensemble de la filière hydrogène, permettant son acheminement depuis son lieu de production jusqu'à son lieu de consommation, n'est pas encore suffisante. Pour commencer, les difficultés inhérentes à son stockage sont importantes d'un point de vue réglementaire et technologique ; l'hydrogène est un gaz très volatil et son stockage sous forme comprimé pose des problèmes majeurs en termes de sécurité. Les transports ainsi que les infrastructures dédiées à la distribution de l'hydrogène sont rares. Enfin, plusieurs procédés de production d'hydrogène existent, mais ils ne répondent que partiellement aux problématiques de la *transition énergétique*.

### 1.1.6.1 Principaux modes de production d'hydrogène

Selon le procédé de production utilisé, on peut classer l'hydrogène d'origine non-renouvelable, renouvelable non biosourcé ou biosourcé (*Tableau 1.1*).

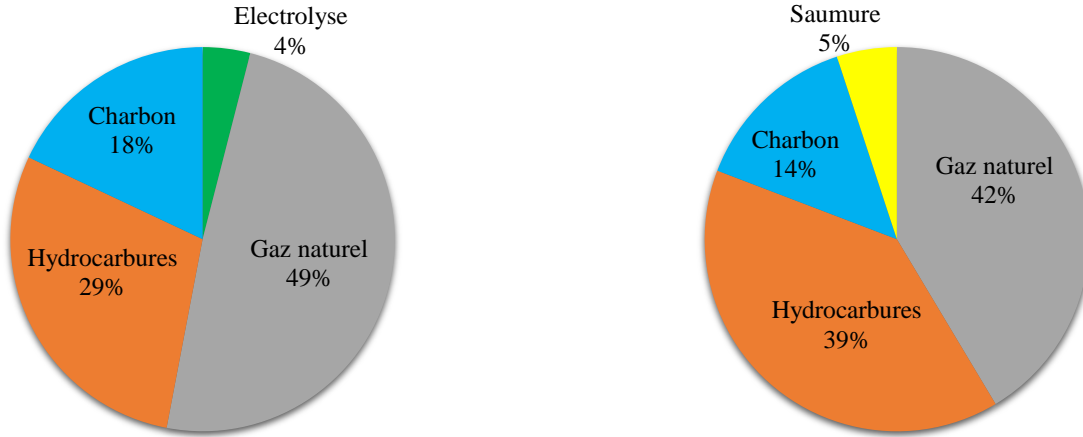
*Tableau 1.1. Différents procédés de production d'hydrogène.*

Hydrogène non-renouvelable	Hydrogène renouvelable non biosourcé	Hydrogène renouvelable biosourcé
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaporeformage du gaz naturel</li> <li>• Gazéification du charbon</li> <li>• Electrolyse de l'eau (électricité primaire)</li> <li>• Electrolyse chlore-soude (électricité primaire)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electrolyse de l'eau (électricité renouvelable)</li> <li>• Thermolyse solaire de l'eau</li> <li>• Photo-catalyse solaire de l'eau</li> <li>• Photo-électro-catalyse solaire de l'eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaporeformage de matières renouvelables</li> <li>• Gazéification de la biomasse</li> <li>• Biophotolyse</li> <li>• Photofermentation</li> <li>• Electrolyse microbienne</li> <li>• Fermentation sombre</li> </ul>

#### 1.1.6.1.1 Hydrogène non-renouvelable

Dans le monde, la production annuelle en hydrogène est aujourd'hui de 55 à 60 Mt (Beeker, 2014). Actuellement, 96% de l'hydrogène produit au niveau mondial est issu de ressources fossiles, ce qui est problématique. En effet, la quasi-totalité de la production d'hydrogène est issu du gaz naturel (49%), des hydrocarbures (29%) et du charbon (18%). Le principe de la production repose sur la formation d'un gaz de synthèse, principalement constitué d'hydrogène et de monoxyde de carbone par le biais de trois techniques : le vaporeformage, l'oxydation partielle et le reformage autotherme. Enfin, l'électrolyse de l'eau (électrolyse alcaline, électrolyse à membrane acide et électrolyse à haute température), qui consiste à décomposer la molécule d'eau en hydrogène et oxygène sous l'effet d'un courant électrique, ne représente que 4% de la production en hydrogène à l'échelle mondiale (*Figure 1.9*).

En France, la quantité totale d'hydrogène produit est d'environ 1 Mt. L'hydrogène coproduit représente 58% de la production. Ainsi, l'hydrogène est produit dans des unités de reformage catalytique de raffineries de pétrole (39%) ou de charbon (14%), mais aussi par le procédé d'électrolyse chlore-soude (5%). Le vaporeformage du gaz naturel représente près de 42% de l'hydrogène produit en France alors que le procédé d'électrolyse de l'eau est presque inexistant (< 1%) (*Figure 1.9*).



**Figure 1.9.** Répartition des substrats utilisés pour la production d'hydrogène dans le monde (gauche) et en France (droite) en 2015 (d'après les chiffres de Durville et al., 2015).

#### 1.1.6.1.2 Hydrogène renouvelable biosourcé et non biosourcé

Parallèlement à l'hydrogène non-renouvelable, l'hydrogène renouvelable biosourcé et non biosourcé regroupe plusieurs atouts en adéquation avec le cahier des charges de la **transition énergétique** : sa production est basée sur des procédés indépendants des énergies fossiles. De plus, sa production est soutenable d'un point de vue environnemental et il peut être utilisé à des fins énergétiques sous forme directe ou sous forme de vecteur.

Les voies de production de l'hydrogène renouvelable non biosourcé ne reposent pas sur l'utilisation de biomasse. Il s'agit de l'électrolyse de l'eau à partir d'électricité renouvelable, de la thermolyse, photo-catalyse, ou photo-électro-catalyse solaire de l'eau. A l'heure actuelle, aucune de ces technologies n'est mature (Ngô, 2016).

L'hydrogène renouvelable biosourcé, obtenu à partir de biomasse de manière directe ou indirecte, peut être produit selon plusieurs voies. Génériquement, l'hydrogène produit par des microorganismes à partir de sources renouvelables comme la biomasse, les eaux usées ou les déchets organiques est appelé « *biohydrogène* ». Parmi les procédés de production on compte :

✓ **Le vaporeformage de matières renouvelables.** Il s'agit d'utiliser le procédé classique afin de l'adapter à des matières premières telles que le biogaz, le bioéthanol et les huiles de pyrolyse (Czernik et al., 2007).

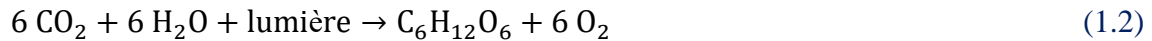
✓ **La gazéification de la biomasse.** Elle est réalisée pour purifier l'hydrogène du syngaz par différents procédés, comme l'adsorption (Shayan *et al.*, 2018).

✓ **La biophotolyse.** Elle est réalisée par des microorganismes photo-autotrophes qui utilisent à la fois leur système photosynthétique et l'énergie lumineuse pour, *in fine*, dissocier les molécules d'eau en atomes d'hydrogène et d'oxygène. C'est donc *a priori* une voie de production biologique d'hydrogène intéressante, car elle nécessite comme substrat uniquement de l'eau et de la lumière. On distingue aujourd'hui deux mécanismes de production : *la biophotolyse directe* et *la biophotolyse indirecte*.

*La biophotolyse directe* est caractérisée par la conversion des molécules d'eau en hydrogène et en oxygène sous l'action d'algues vertes telles que *Chlamydomonas* sp. (Chow *et al.*, 2018), *Anabaena* sp. (Vargas *et al.*, 2018). L'apport de lumière est nécessaire à la réaction, en raison de l'énergie libre positive de photolyse de l'eau, car elle permet l'excitation des électrons de l'eau qui sont transportés par la chaîne photosynthétique des algues vers les protons, pour former de l'hydrogène moléculaire.

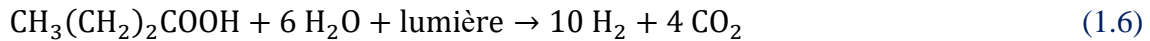
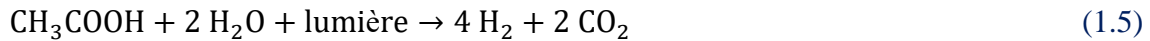
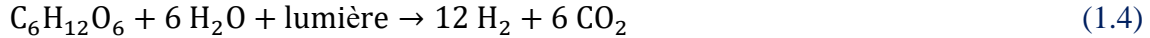


*La biophotolyse indirecte* est réalisée par l'action de cyanobactéries ou de microalgues. En présence de lumière, ces microorganismes couplent indirectement la photosynthèse (accumulation de sucres comme réserve énergétique) et la production d'hydrogène (rétablissement des pools redox au sein du microorganisme) (Nagarajan *et al.*, 2017). Les réactions mises en œuvre sont les suivantes :



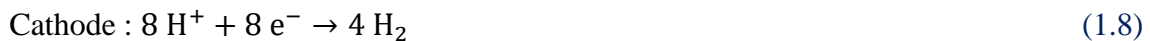
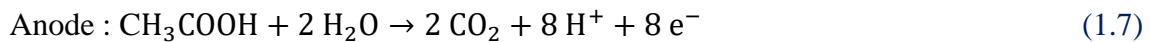
Les microorganismes photosynthétiques réalisant la biophotolyse sont intéressants car ils permettent de produire de l'hydrogène à partir d'un composé universel et de faible coût : l'eau. Néanmoins, l'inhibition de la production d'hydrogène par l'oxygène alors que ce dernier est nécessaire au développement des microorganismes, est un problème majeur pour l'utilisation de cette voie biologique. De plus, les productivités en hydrogène de ces microorganismes restent faibles, de l'ordre de quelques  $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{milieu de culture}}/\text{h}$  (Nagarajan *et al.*, 2017).

✓ **La photofermentation.** C'est un processus biologique qui associe la consommation hétérotrophe d'une source organique à la photosynthèse pour réaliser la croissance de la cellule. La photosynthèse est réalisée par des microorganismes photo-hétérotrophes tels que les bactéries pourpres *Rhodospseudomonas* sp. Dans des conditions de culture anaérobies, ces microorganismes consomment les sucres (**Equation 1.4**) ou acides organiques (**Equations 1.5** et **1.6**) et les convertissent en hydrogène et CO<sub>2</sub> selon les réactions suivantes (Laurinavichene *et al.*, 2018):



De manière générale, les taux de production d'hydrogène sont plus importants par photofermentation en comparaison aux procédés de biophotolyse. De plus, la combinaison de ce procédé avec la fermentation sombre est fréquemment envisagée dans la littérature, afin d'augmenter les taux de production en hydrogène (Seifert *et al.*, 2018)

✓ **L'électrolyse microbienne.** Elle permet de produire de l'hydrogène par électrolyse d'une source organique. Elle consiste en une cathode qui assure la production d'hydrogène par la réduction électrochimique des molécules d'eau, associée à une bioanode qui oxyde les substrats organiques en CO<sub>2</sub> (Trably *et al.*, 2018). L'oxydation de la matière organique est rendue possible grâce au développement d'un biofilm microbien électroactif sur l'anode qui joue alors le rôle d'électro-catalyseur. A partir d'acétate, les réactions mises en œuvre sont les suivantes :



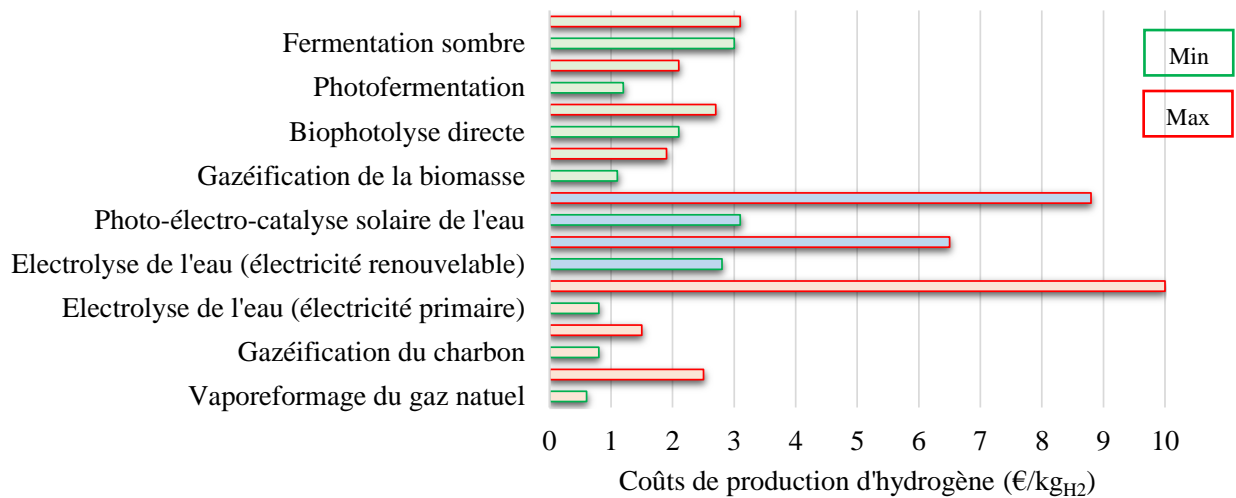
Cette voie est actuellement la moins mature car elle fait face à des limitations technologiques importantes (choix des matériaux constitutifs des anodes et des cathodes, architecture de la cellule, *etc.*) (Trably *et al.*, 2018).

✓ **La fermentation sombre.** Elle consiste à dégrader un substrat organique par le biais de bactéries anaérobies. Au cours du procédé, un biogaz (mélange gazeux de H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>) ainsi que différents métabolites solubles dans le milieu de culture sont produits (Trably *et al.*, 2018). La

fermentation sombre étant le procédé étudié au cours de ces travaux, son fonctionnement et les problématiques associées à son utilisation seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

### 1.1.6.2 Coûts de production d'hydrogène en fonction du procédé

Les coûts de production d'hydrogène sont très variables selon les procédés utilisés (**Figure 1.10**). Typiquement les coûts de production les plus faibles sont issus des techniques les plus répandues ayant atteintes le stade de maturité industrielle. Il s'agit du vaporeformage, du reformage autotherme mais également de la gazéification de la biomasse ; avec des coûts de production variant entre 0,7 et 3,1 €/kgH<sub>2</sub> selon les sources et pays. Concernant l'électrolyse de l'eau, qui est également un procédé industrialisé, les coûts de production peuvent varier entre 0,8 et 10,0 €/kgH<sub>2</sub> selon les hypothèses (coût et taille des électrolyseurs, prix de l'électricité, *etc.*). Pour ce qui est du reste des procédés relatés précédemment, les prix de production actuelle, ne sont pas assez intéressants actuellement pour leur industrialisation (Durville *et al.*, 2015).



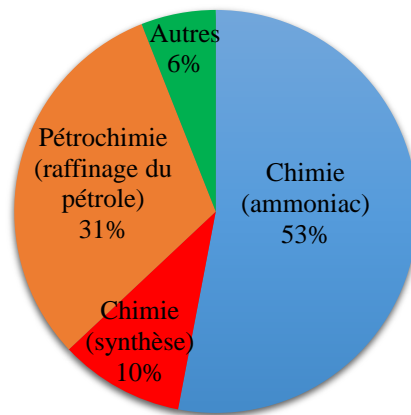
**Figure 1.10.** Estimation du coût de production d'hydrogène en fonction de différents procédés (d'après les chiffres de Durville *et al.*, 2015; Romagnoli *et al.*, 2011)

### 1.1.6.3 Principaux modes de consommation d'hydrogène

L'hydrogène est aujourd'hui largement utilisé mais son usage est relativement méconnu car il concerne majoritairement le domaine industriel. Actuellement, la consommation mondiale d'hydrogène varie de 55 à 60 Mt, ce qui représente moins de 2% de la consommation globale en énergie (Durville *et al.*, 2015).

#### 1.1.6.3.1 Consommation pour l'industrie

Comme énoncé précédemment, l'hydrogène est avant tout utilisé dans l'industrie. Ainsi, à l'échelle mondiale, il est utilisé dans l'industrie chimique pour la production d'ammoniac (53%) et la synthèse de composés chimiques (10%), dans l'industrie pétrochimique pour le raffinage du carburant (31%), et 6% est consommé de façon diffuse dans l'industrie agroalimentaire, électronique, aérospatiale (**Figure 1.11**). Malgré des besoins différents selon les pays, les utilisations de l'hydrogène par les industries chimiques et pétrochimiques sont toujours majoritaires.



**Figure 1.11.** Répartition par secteur d'activité de la consommation d'hydrogène dans le monde en 2015 (d'après les chiffres de Durville et al., 2015).

#### 1.1.6.3.2 Consommation pour la mobilité

L'usage de l'hydrogène pour la mobilité est encore rare. Cependant, tout cela est possible techniquement, sur la base des piles à combustible qui sont capables de produire de l'électricité suivant le principe inverse de l'électrolyse. Ainsi, différentes flottes de véhicules à hydrogène s'inscrivant dans une conception évolutive de la mobilité (moins carbonée et plus diversifiée), sont déployées depuis quelques années :

✓ **Les véhicules grand public.** Le constructeur automobile Toyota a lancé en 2015 le véhicule *Mirai*, alors première voiture fonctionnant à l'hydrogène destinée au grand public. Les constructeurs Hyundai-Kia avec le véhicule *Nexo* et Honda avec le véhicule *Clarity* ont prévu de lancer ces deux modèles au cours de l'année 2018. Enfin, en juin 2018, le constructeur allemand Audi, filiale de Volkswagen, et le coréen Hyundai-Kia ont annoncé un partenariat technologique

pour le développement des piles à combustible pour la propulsion de voitures électriques à partir d'hydrogène.

✓ **Les taxis.** En France, la flotte de taxis parisiens *Hype* est composée uniquement de taxis fonctionnant à l'hydrogène. Elle compte à ce jour près de 75 véhicules et vise les 600 véhicules d'ici à 2020.

✓ **Les bus.** En Europe certaines municipalités ont commencé à déployer des bus à hydrogène depuis le début des années 1990. En France, à Pau, une première flotte de bus verra le jour en 2019.

✓ **Les avions et navires.** Les avions et navires fonctionnant à l'hydrogène sont encore au stade du prototype et de la recherche. On peut citer l'avion *HY4* mis au point par des chercheurs allemands en 2016. Enfin, la bateau *Energy Observer* est parti en mars 2018 pour un tour du monde de 6 ans.

✓ **Les chariots élévateurs.** Depuis 2014, le gazier Air liquide fournit une station d'hydrogène à la plateforme logistique de l'enseigne IKEA de Saint-Quentin-Fallavier. Depuis le groupe Carrefour ainsi que plusieurs entreprises ont mis en place plusieurs dizaines de chariots élévateurs à hydrogène. Plusieurs milliers sont déjà utilisés au Canada et aux Etats-Unis.

#### 1.1.6.4 La filière hydrogène pour la mobilité en France

De nombreux projets reposant sur l'utilisation de l'hydrogène font régulièrement surface depuis une dizaine d'année. Les regains d'attention envers l'hydrogène sont généralement suscités par les nombreuses crises pétrolières, mais aussi pour lutter contre le réchauffement climatique. Son utilisation en France dans le cadre de la **transition énergétique** est faible, mais de grands acteurs nationaux comme Air Liquide, Areva, ENGIE, ou des start-ups comme McPhy cherchent à se positionner. De même, récemment, les pouvoirs publics ont présenté des champs d'action avec des objectifs précis pour le développement de la filière hydrogène en France. Ainsi, le 1<sup>er</sup> juin 2018, l'ancien ministre de la Transition écologique et solidaire Nicolas Hulot a présenté un plan comprenant 14 actions pour le déploiement de l'hydrogène pour la **transition énergétique**. Ce plan prévoit de consacrer 100 millions d'euros par an pour accompagner la



production d'hydrogène, le stockage électrique et les applications dans le secteur des transports. Il s'agit avant tout de faire de la France un leader mondial de la technologie hydrogène.

✓ Concernant le premier axe du plan, il vise à créer une filière de production d'hydrogène décarbonée pour remplacer les procédés de vaporeformage du gaz naturel et de gazéification du charbon.

✓ Le deuxième axe du plan prévoit de diversifier le réseau d'électrolyseur pour le stockage de l'électricité, ainsi que d'établir des conditions techniques et économiques acceptables d'injection d'hydrogène dans les réseaux de gaz.

✓ Le dernier volet vise à privilégier le déploiement « *d'écosystèmes territoriaux de mobilité hydrogène* ». L'objectif est donc d'atteindre 5000 véhicules utilitaires légers et 200 véhicules lourds en circulation d'ici 2023. A cet horizon, une centaine de stations à hydrogène devront être installées sur le territoire. Ces chiffres devront être de 20000 à 50000 véhicules utilitaires légers, 800 à 2000 véhicules lourds et 400 à 1000 stations à hydrogène pour 2028. Ce volet prévoit également de substituer une partie du réseau ferroviaire français par des trains roulant à l'hydrogène.

Enfin, à l'échelle locale, en 2018, la Région Auvergne-Rhône-Alpes a remporté l'appel à projet européen *Blending call 2017* pour le projet « *Zero Emission Valley* ». La région ambitionne de devenir le premier territoire à hydrogène en France et en Europe. Le programme a pour objectif d'accélérer le déploiement de 1000 véhicules à pile à combustible, de 20 stations à hydrogène et de 15 électrolyseurs dans toute la région.

#### 1.1.7 Production de biohydrogène par voie fermentaire sombre : grands principes et problématiques associées

La production de biohydrogène par le procédé de fermentation sombre est une voie alternative de production attrayante. En effet, au même titre que le procédé de méthanisation, elle permet de valoriser des déchets organiques (résidus agricoles, déchets alimentaires, *etc.*) à des fins énergétiques. Conformément à la *loi relative à la transition énergétique pour la croissance verte* votée en mai 2015 par le gouvernement français, l'Etat appelle à valoriser la production d'énergies issues de la valorisation des déchets lorsqu'ils ne sont pas recyclables. Dès lors, la

production de biohydrogène par voie fermentaire sombre est en parfaite adéquation avec cette approche « *valorisation des déchets* ».

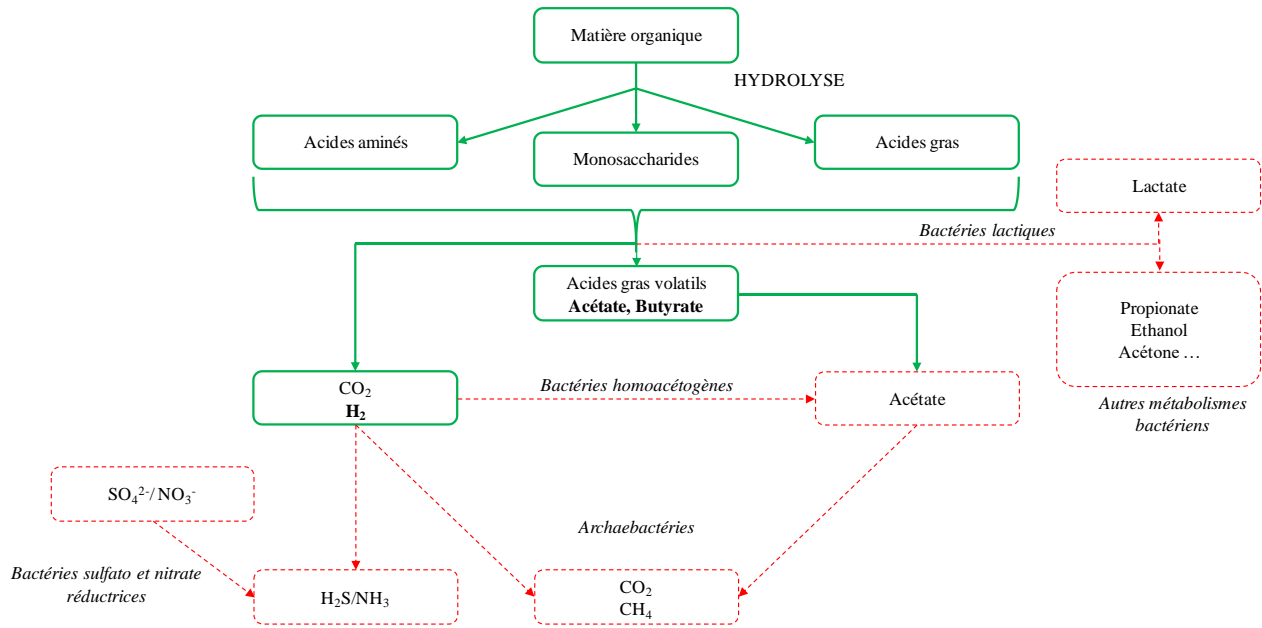
Dans le procédé de fermentation sombre (**Figure 1.12**), des substrats organiques sont décomposés par des microorganismes producteurs d'hydrogène réalisant la fermentation anaérobie en l'absence de source lumineuse. Ainsi, la fermentation sombre peut être conduite par des bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies strictes, permettant par un ensemble de réactions biochimiques de produire de l'hydrogène moléculaire (H<sub>2</sub>) à partir d'une très grande variété de substrats. De manière générale, la production biologique d'hydrogène est le résultat de l'activité d'enzymes capables de réduire les ions H<sup>+</sup> libres dans le milieu de culture en H<sub>2</sub>. On peut donc distinguer deux étapes biochimiques successives menant à la production de biohydrogène lors de la fermentation sombre : il s'agit de l'hydrolyse et de l'acidogénèse (Trably *et al.*, 2018).

✓ **L'hydrolyse** est la première phase du procédé de fermentation sombre, au cours de laquelle la biomasse est décomposée et les macromolécules complexes (polysaccharides, protéines et lipides) sont solubilisées en monomères plus simples (monosaccharides, acides aminés et acides gras) sous l'action d'enzymes extracellulaires sécrétées par des bactéries anaérobies strictes ou anaérobies facultatives. Cette étape peut être limitante si la biomasse n'est pas hydrolysable ; ainsi différents prétraitements peuvent être utilisés.

✓ **L'acidogénèse ou fermentation acidogénique** correspond à la phase au cours de laquelle les produits d'hydrolyse sont métabolisés et transformés en sous-produits métaboliques tels que des acides organiques (propionate, butyrate, lactate, *etc.*), des alcools (éthanol, méthanol, *etc.*) et le biogaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et impuretés) par les bactéries.

Parmi les multiples voies métaboliques possibles qui peuvent conduire à une grande variété de sous-produits, les deux principales voies produisant de l'hydrogène à partir de substrats carbonés sont la voie « *acétate* » et la voie « *butyrate* » (Bundhoo et Mohee, 2016).

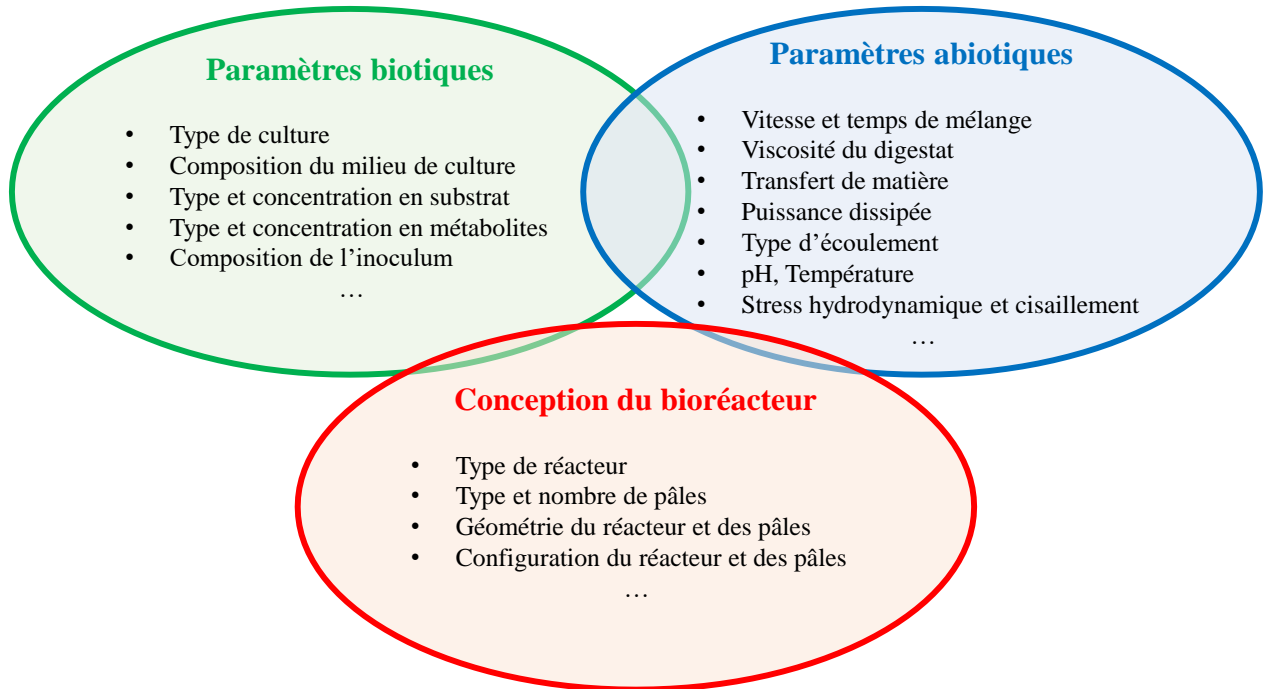




**Figure 1.12.** Voies métaboliques générales de dégradation de la matière organique sous conditions anaérobies : les voies de production d'hydrogène sont indiquées en gras, alors que les voies consommatrices ou à bilan hydrogène neutre sont indiquées en pointillées (Trably et al., 2018).

Lorsque la voie « *acétate* » est favorisée, les rendements stœchiométriques maximaux sont de 4 mol de H<sub>2</sub> par mol d'hexose, alors que les rendements stœchiométriques maximaux sont de 2 mol de H<sub>2</sub> par mol d'hexose avec la voie « *butyrate* » (Ghimire et al., 2015). Cependant, en présence de cultures mixtes, les résultats expérimentaux de la littérature révèlent des rendements de conversions inférieurs à ceux attendus théoriquement ; ceci résulte du fait que la dégradation des substrats organiques peut suivre d'autres voies métaboliques formant du propionate, du formate ou de l'éthanol, sans la production d'H<sub>2</sub> (Hawkes et al., 2007) (**Figure 1.12**).

La production d'hydrogène d'origine biosourcé par le procédé de fermentation sombre semble *a priori* simple à mettre en œuvre. Cependant, l'optimisation du procédé afin d'obtenir de meilleurs rendements et volumes en H<sub>2</sub> est fonction de plusieurs familles de paramètres : choix et dimensionnement du bioréacteur, définition des paramètres biotiques et des paramètres abiotiques (Trad et al., 2016), comme résumé dans la **Figure 1.13**.



**Figure 1.13.** Principaux paramètres : conception du bioréacteur, paramètres biotiques et abiotiques, à optimiser pour le procédé de fermentation sombre.

En définitive, le procédé de fermentation sombre, si l'on ne s'intéresse qu'au biohydrogène produit, ne permet d'aboutir qu'à une conversion partielle de la matière organique. On estime en effet qu'au maximum 5% de la DCO (Demande Chimique en Oxygène) d'un substrat organique sera converti en H<sub>2</sub> (sur la base du rendement maximum théorique de la voie acétate, soit 4 mol de H<sub>2</sub> par mol d'hexose). Dès lors, une majeure partie de l'énergie de la matière première se retrouvera dans le digestat liquide formé au cours du procédé sous forme d'acides organiques et d'alcools. L'intérêt de la fermentation sombre et sa viabilité économique résident alors à la fois dans la production d'H<sub>2</sub>, mais également dans la valorisation des sous-produits métaboliques de fermentation. L'attractivité et le futur du procédé pour se différencier de l'hydrogène d'origine fossile ne peuvent être explorés qu'en intégrant la fermentation sombre au sein d'une approche « bioraffinerie » (**Figure 1.14**), par exemple en valorisant le digestat sous forme d'hydrogène (photofermentation, électrolyse microbienne), de méthane (méthanisation) de molécules à hautes valeurs ajoutées par transformation biologique (biolipides, éthanol, bioplastiques PHA/PHB), ou par extraction des acides organiques (Trably *et al.*, 2018).

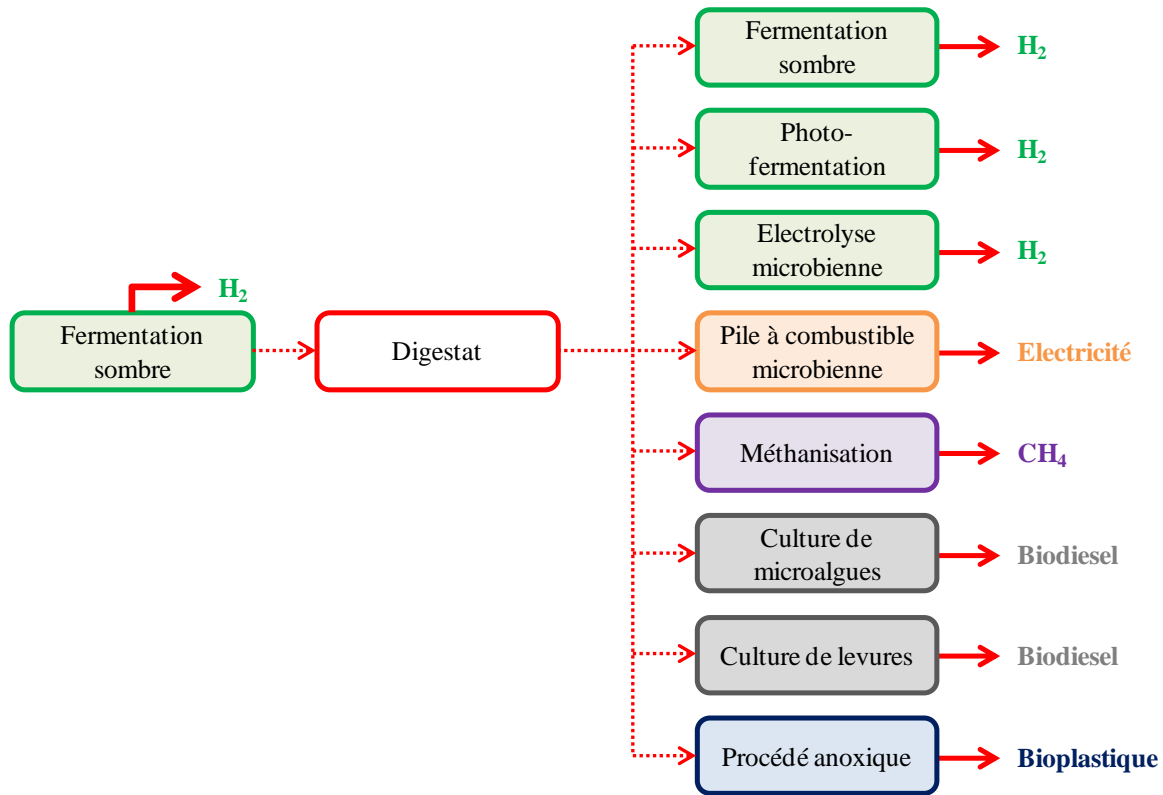


Figure 1.14. Intégration de la fermentation sombre dans une approche « bioraffinerie » (Venkata Mohan et al., 2011).

## 1.2 Objectifs spécifiques de ce travail de doctorat

L'organisme financeur de cette thèse de doctorat, le Laboratoire d'Excellence (LabEx) IMobS<sup>3</sup> (*Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions*), a pour ambition de développer des briques technologiques efficaces et respectueuses de l'environnement pour une mobilité innovante des personnes, des biens et des machines. Pour se faire, l'un des défis du LabEx est de développer des procédés de production d'énergie pour la mobilité en s'inscrivant dans le contexte du défi énergétique actuel. Ainsi, depuis 2012, la thématique de la production de biohydrogène par le procédé de fermentation sombre a été traitée dans le cadre du LabEx au sein de l'*Institut Pascal* de Clermont-Ferrand et plus particulièrement de l'axe *Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes* (GePEB) de ce laboratoire. Cela a donné lieu à deux travaux de thèse, soutenus respectivement en 2016 et 2018 par Zaineb Trad et Alexandre Noblecourt.

La thèse de Zaineb Trad (2016) avait pour principal objectif de développer un concept de bioréacteur anaérobie à membrane immergée à boucle externe (BAMIE) en se focalisant sur l'influence des paramètres abiotiques du système (configurations des agitateurs, vitesse

d'agitation, *etc.*) sur le temps de mélange, le transfert de matière liquide-gaz et la puissance consommée, *via* la caractérisation expérimentale et numérique de l'hydrodynamique locale et du mélange. Concernant les travaux d'Alexandre Noblecourt (2018), les ambitions étaient d'utiliser le concept du BAMIE en conditions réelles de culture, pour produire du biohydrogène et des molécules d'intérêt industriel à partir de coproduits végétaux et de soupes de déconditionnement. Ainsi, il devait caractériser expérimentalement l'influence des paramètres biotiques du système (composition du milieu de culture, type de substrat, concentrations en acides organiques, consortium microbien, *etc.*) sur le rendement et la production en biohydrogène.

Si ces travaux de thèse ont apporté de réelles avancées, tant pour la mise en place du procédé de fermentation sombre au niveau du laboratoire que pour la compréhension de l'influence des paramètres biotiques et abiotiques sur son efficacité, un manque d'information subsiste sur les effets conjugués de ces deux groupes de paramètres. De surcroît, alors que les principaux travaux publiés dans la littérature s'intéressent à l'influence des facteurs biotiques ; ceux faisant état de l'effet des facteurs abiotiques restent encore rares, ce qui souligne un véritable manque de compréhension à l'heure actuelle sur ce procédé.

Le procédé de fermentation sombre a pour vocation principale de valoriser des déchets organiques, potentiellement à des fins énergétiques. La production de biohydrogène à partir de résidus agricoles et de déchets alimentaires se déroule dans la plupart des cas dans des bioréacteurs à cuve agitée. Ces déchets organiques, pour leur grande majorité, sont assimilés à des milieux Newtoniens ou non-Newtoniens de viscosités très variables. La viscosité du digestat est un facteur important à prendre en compte, d'autant plus que ce paramètre peut varier au cours du temps, notamment pour des causes de saisonnalité, d'origine et de variation de composition des intrants organiques. L'optimisation du procédé, dans le but de favoriser les réactions biochimiques en lien avec la production de biohydrogène, nécessite des conditions de mélange permettant des transferts de nutriments aux microorganismes suffisants. Dès lors, le choix des conditions de fonctionnement du bioréacteur (mobiles et vitesse d'agitation) et leurs effets sur le mélange du digestat impliquent une bonne connaissance de l'hydrodynamique et des transferts de matière, y compris le transfert de matière liquide-gaz du biogaz. Ces objectifs doivent être atteints tout en limitant la consommation énergétique liée à l'agitation mécanique afin de maintenir la viabilité économique du procédé. En effet, une contrainte opératoire majeure,

rarement prise en compte dans les travaux de la littérature, réside dans le fait que la consommation d'énergie requise pour l'agitation du milieu ne doit pas excéder une valeur qui pourrait impacter son bilan énergétique par une surconsommation d'énergie électrique. A l'heure actuelle, s'il n'existe pas de règles établies pour la fermentation sombre, la recommandation américaine pour la soutenabilité du procédé de méthanisation est que la consommation électrique pour l'agitation ne dépasse pas  $8 \text{ W/m}^3$  (Lindmark *et al.*, 2014). Ces nombreuses contraintes de fonctionnement et leurs impacts sur les productivités et les rendements en  $\text{H}_2$ , n'ont pas été étudiées en détail jusqu'à présent.

C'est dans ce contexte précis que cette thèse de doctorat a pour finalité d'étudier l'influence des facteurs abiotiques du procédé (**viscosité du digestat et conditions d'agitation**) en lien avec son efficacité en conditions réelles de cultures. Ceci, dans le but d'améliorer les connaissances propres à la fermentation sombre et de faire progresser les méthodes d'optimisation de son fonctionnement. A cet effet, nous nous sommes intéressés aux influences conjuguées de plusieurs milieux visqueux Newtoniens monophasiques et des conditions d'agitations sur les productivités et les rendements en biohydrogène (« *approche biologique* »). Ensuite, nous avons caractérisé les résultats biologiques obtenus, par l'étude du transfert de matière et de l'hydrodynamique dans le bioréacteur (« *approche dynamique des fluides* »).

✓ *Via « l'approche biologique »* : nous avons étudié expérimentalement l'effet des facteurs abiotiques retenus, sur les volumes et rendements en biohydrogène, les concentrations en substrat et en métabolites dans le digestat, et les cinétiques de réaction. Il importe en effet, de déterminer des stratégies qui permettront de transposer les effets conjugués de la viscosité du digestat de culture et des conditions d'agitations sur les résultats expérimentaux obtenus. Ceci en évaluant les effets :

- ✓ De la puissance mécanique dissipée par les mobiles d'agitation ;
- ✓ De la nature du régime d'écoulement du fluide (laminaire, transition et turbulent) ;
- ✓ De la taille des agrégats tourbillonnaires de l'écoulement turbulent.

✓ *Via « l'approche dynamique des fluides »* : dans les mêmes conditions opératoires que les fermentations sombres, dans le bioréacteur, nous avons caractérisé expérimentalement le mélange et l'hydrodynamique locale par l'analyse :

- ✓ Du transfert de matière liquide-gaz par la méthode de désoxygénation/oxygénation ;
- ✓ Du temps de mélange par le biais des techniques conductimétriques, de décoloration chimique et de Fluorescence Induite par Nappe Laser (PLIF) ;
- ✓ Des vitesses et des composantes turbulentes de l'écoulement dans la cuve agitée par les techniques de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV) et de Mécanique des Fluides Numérique (CFD).

Finalement, nous avons développé un modèle de type « *grey box* », le modèle ADM1 (*Anaerobic Digestion Model N°1*). Ceci afin de coupler un modèle bio-cinétique semi-empirique à des réactions biochimiques, en lien avec le transfert de matière et les équilibres biochimiques au sein du bioréacteur.

## Nomenclature

<i>AIE</i>	Agence Internationale de l'Energie
<i>BAMIE</i>	Bioréacteur à Membrane Immersée Externe
<i>CFD</i>	Mécanique des Fluides Numérique
<i>COP</i>	Conférence des Parties
<i>DCO</i>	Demande Chimique en Oxygène
<i>GES</i>	Gaz à Effet de Serre
<i>GIEC</i>	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
<i>GNV</i>	Gaz Naturel Véhicule
<i>IDMC</i>	<i>International Displacement Monitoring Centre</i>
<i>IFPEN</i>	Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles
<i>PIV</i>	Vélocimétrie par Images de Particules
<i>PLIF</i>	Fluorescence Induite par Nappe Laser
<i>PNUE</i>	Nations Unies pour l'Environnement
<i>1G</i>	Première Génération de biocarburant



2G	Deuxième Génération de biocarburant
3G	Troisième Génération de biocarburant

### 1.3 Références bibliographiques

- J.M. Agator, J. Chéron, C. Ngô, G. Trap (2008). Hydrogène : Energie de demain ? Editor: Omniscience. France. (*En français*).
- E. Beeker (2014). Y a-t-il une place pour l'hydrogène dans la transition énergétique ? Note d'analyse, France stratégie (*En français*).  
(<http://www.strategie.gouv.fr/sites/strategie.gouv.fr/files/atoms/files/201-08-06na-fs-hydrogene-hd.pdf>).
- F.M. Bréon, G. Luneau (2018). Face aux défis du réchauffement. *In Atlas du Climat* (2<sup>nd</sup> edition). Editor: Autrement. France. (*En français*).
- M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 6713-6733.
- S. Czernik, R. Evans, R. French (2007). Hydrogen from biomass-production by steam reforming of biomass pyrolysis oil. *Catalysis today*. 129, 265-268.
- J.L. Durville, J.C. Gazeau, J.M. Nataf, J. Cueugnet, B. Legait (2015). Filière hydrogène : Energie. Rapport au Ministère de l'Ecologie, du développement durable et de l'énergie, et Ministère de l'économie, de l'industrie et du numérique. (*En français*).  
(<https://www.actu-environnement.com/media/pdf/news-26748-rapport-cgedd-cgeiet-hydrogene.pdf>).
- A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. 144, 73-95.
- Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (2014). Changements climatiques 2014. (*En français*).  
([https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR\\_AR5\\_FINAL\\_full\\_fr.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_fr.pdf)).
- F.R. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D.L. Hawkes (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress, *International Journal of Hydrogen Energy*. 32, 172-184.
- Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles (2010). Du moteur thermique au véhicule électrique : Quels enjeux pour la recherche ? (*En français*).  
([https://www.sauvonsleclimat.org/images/articles/pdf\\_files/vp\\_2011/UNGERER\\_Philippe\\_IFP.pdf](https://www.sauvonsleclimat.org/images/articles/pdf_files/vp_2011/UNGERER_Philippe_IFP.pdf)).
- Internal Displacement Monitoring Centre (2018). Global report on internal displacement 2018.  
(<http://www.internal-displacement.org/global-report/grid2018/downloads/2018-GRID.pdf>).
- International Energy Agency (2017). Key world energy statistics.  
(<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2017.pdf>).
- T. Laurinavichene, D. Tekucheva, K. Laurinavichius, A. Tsygankov (2018). Utilization of distillery wastewater for hydrogen production in one-stage and two-stage processes involving photofermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 110, 1-7.

- J. Lindmark, E. Thorin, R. Bel Fdhila, E. Dahlquist (2014). Effect of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40, 1030-1047.
- Ministère de l'Environnement, de l'énergie et de la mer en charge des relations internationales sur le climat (2017). Chiffres clés de l'énergie, Edition 2016. (*En français*). ([http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/user\\_upload/Datalab-13-CC-de\\_l-energie-edition-2016-fevrier2017.pdf](http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/user_upload/Datalab-13-CC-de_l-energie-edition-2016-fevrier2017.pdf)).
- Ministère de l'Environnement, de l'énergie et de la mer en charge des relations internationales sur le climat (2017). Chiffres clés du transport, Edition 2017. (*En français*). ([http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits\\_editoriaux/Publications/Datalab/2017/datalab-11-cc-du-transport-edition-2017-fevrier2017-c.pdf](http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits_editoriaux/Publications/Datalab/2017/datalab-11-cc-du-transport-edition-2017-fevrier2017-c.pdf)).
- D. Nagarajan, D.J. Lee, A. Kondo, J.S. Chang (2017). Recent insights into biohydrogen production by microalgae: From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresource Technology*. 227, 373-387.
- C. Ngô (2016). On a tous besoin d'énergie. Amazon Media EU. (*En français*).
- A. Noblecourt (2018). Etude sur l'effet de l'accumulation d'acides gras volatils au cours d'un procédé de production d'hydrogène par voie biologique anaérobie, mise au point et utilisation d'un bioréacteur à membrane immergée. Université Clermont Auvergne. Thèse. (*En français*).
- Organisation des Nations Unies (2015). Convention cadre sur les changements climatiques, 21<sup>ème</sup> Conférence des Parties. (*En français*). (<https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/fre/109f.pdf>).
- Réseau Action Climat France (2015). Kit pédagogique sur les changements climatiques. (*En français*). (<https://reseauactionclimat.org/wp-content/uploads/2017/04/Kit-pe%CC%81dagogique-sur-les-changements-climatiques.pdf>).
- J. Rifkin (2013). La troisième révolution industrielle : Comment le pouvoir latéral va transformer l'énergie, l'économie et le monde. Editor: Actes Sud. France. (*En français*).
- F. Romagnoli, D. Blumberga, I. Pilicka (2011). Life cycle assessment of biohydrogen production in photosynthetic processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36, 7866-7871.
- K. Seifert, R. Zagrodnik, M. Stodolny, M. Laniecki (2018). Biohydrogen production from chewing gum manufacturing residue in a two-step process of dark fermentation and photofermentation. *Renewable Energy*. 122, 526-532.
- E. Shayan, V. Zare, I. Mirzaee (2018). Hydrogen production from biomass gasification; a theoretical comparison of using different gasification agents. *Energy Conversion and Management*. 159, 30-41.
- K.Y. Show, Y. Yan, M. Ling, G. Ye, T. Li, D.J. Lee (2018). Hydrogen production from algal biomass: Advances, challenges and prospects. *Bioresource Technology*. 257, 290-300.
- E. Trably, G. Christophe, E. Latrille, C. Larroche (2018). Production de bio hydrogène : Voie fermentaire sombre. Techniques de l'Ingénieur. BIO3351 v2. Editor: Lavoisier. France. (*En français*).
- Z. Trad (2016). Analyse expérimentale et simulation numérique pour l'extrapolation d'un bioréacteur dédié à la production de biohydrogène de deuxième génération : Caractérisation de l'hydrodynamique locale et du mélange. Université Blaise Pascal et Université d'Auvergne. Thèse. (*En français*).
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable Energy*. 98, 264-282.

- S.R. Vargas, P.V. Dos Santos, M. Zaiat, M. Do Carmo Calijuri (2018). Optimization of biomass and hydrogen production by *Anabaena* sp. (UTEX 1448) in nitrogen-deprived cultures. *Biomass and Bioenergy*. 111, 70-76.
- S. Venkata Mohan, G. Mohanakrishna, S. Srikanth (2011). Biohydrogen production from industrial effluents. *In Biofuels (1<sup>st</sup> edition): Alternative Feedstocks and Conversion Processes (chapter 22)*. Editor: A. Pandey, C. Larroche, S.C. Ricke, C.G. Dussap, E. Gnansounou. Academic Press, Elsevier. Oxford, UK.

## **Chapitre 2 : Etude bibliographique**

---

## Préambule

---

L'optimisation des performances du procédé de fermentation sombre est fonction du choix et du dimensionnement du bioréacteur (type de réacteur, mode de mélange, géométrie, *etc.*) ainsi que de la définition des paramètres biotiques et abiotiques. A cet effet, l'utilisation des modèles mathématiques est devenue primordiale pour intégrer, analyser et examiner une grande quantité d'informations provenant des processus microbiologiques, physiques, et chimiques couplés intervenant dans le procédé de fermentation sombre. Différents modèles mathématiques peuvent être utilisés afin de tester des hypothèses scientifiques, de définir des expériences plus pertinentes, de prédire les performances et d'optimiser le procédé.

Dans cette optique d'optimisation du procédé de fermentation sombre et au vu du grand nombre de modèles mathématiques existant pour la modélisation de la production de biohydrogène, nous avons décidé de centrer notre étude bibliographique sur deux axes principaux :

✓ Le premier axe de l'étude (**section 2.1**) s'intéressera à l'influence des principaux paramètres biotiques et abiotiques sur la production en biohydrogène par voie fermentaire sombre. Il s'agira de répertorier les principaux microorganismes producteurs d'hydrogène, les différents substrats organiques utilisés, mais aussi de définir les conditions opératoires favorables ou non à la production de biohydrogène (pH, température, *etc.*). Enfin, les différents types de bioréacteur et les méthodes d'agitation utilisés pour la conduite du procédé de fermentation sombre seront également présentés en vue de son amélioration.

✓ Le deuxième axe (**section 2.2**) sera dédié aux récents progrès de la modélisation/simulation de la production de biohydrogène, ceci afin de répertorier les différents modèles pouvant être utilisés pour optimiser le procédé ou prédire son efficacité. Ce second axe de notre analyse de l'état de l'art correspondra au chapitre 19 du livre « *Biomass, Biofuels and Biochemicals: Biohydrogen, second edition* » publié par Elsevier dont les éditeurs sont A. Pandey, S. Venkata Mohan, J.S. Chang, P. Hallenbeck et C. Larroche.

## 2.1 Différentes voies d'amélioration du procédé de fermentation sombre

### 2.1.1 Source et sélection des microorganismes producteurs de biohydrogène

Il est possible de produire du biohydrogène par fermentation sombre à partir de trois types d'inoculum :

- ✓ **Les cultures pures** avec une seule espèce bactérienne, dont certaines peuvent être génériquement modifiées ;
- ✓ **Les co-cultures** ou consortiums artificiels avec au moins deux espèces bactériennes ;
- ✓ **Les cultures mixtes** avec l'utilisation d'un consortium microbien d'origine naturelle qui nécessite très souvent un prétraitement physique, chimique ou thermique afin d'éliminer les microorganismes consommateurs d'hydrogène.

#### 2.1.1.1 Les cultures pures

La production de biohydrogène par des cultures pures consiste à utiliser une seule espèce microbienne qui est capable de dégrader et de consommer un substrat organique pour produire du biohydrogène *via* différentes voies de fermentation (voies acétate, butyrate, formate, lactate, *etc.*). Les microorganismes utilisés peuvent être anaérobies strictes (*Clostridium* sp., *Ruminococcus* sp.) ou anaérobies facultatifs (*Escherichia coli* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp.), mésophiles (25-40°C), thermophiles (40-80°C) ou hyperthermophiles (> 80°C) selon la plage de température à laquelle leur développement est optimal (Sinha et Pandey, 2011).

Elsharnouby *et al.* (2013) ont dénombré près de seize espèces bactériennes utilisées en culture pure pour la production de biohydrogène. Parmi ces espèces, les souches thermophiles et hyperthermophiles montrent les meilleures performances en termes de rendements en biohydrogène. Ainsi, Ivanova *et al.* (2009) obtiennent des rendements de 3,8 mol H<sub>2</sub>/mol hexose avec la souche *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, et d'Ippolito *et al.* (2010) des rendements de 3,9 mol H<sub>2</sub>/mol hexose avec la souche *Thermotoga neapolitana*, soit des rendements proches du rendement maximal théorique en biohydrogène de 4 mol H<sub>2</sub>/mol hexose. Cependant, les productivités en biohydrogène de ces espèces sont souvent très faibles, entre 25 et 400 mL H<sub>2</sub>/L/h

(Elsharnouby *et al.*, 2013) et la mise en œuvre du procédé nécessite une dépense énergétique plus importante que pour les procédés mésophiles.

En parallèle de ces travaux et avec l'essor des biotechnologies, des études se sont concentrées sur le développement de souches génétiquement modifiées afin d'augmenter la production de biohydrogène. A cet effet, deux stratégies principales apparaissent intéressantes pour augmenter le flux des voies métaboliques d'intérêt. La première stratégie consiste à réaliser un « *knock-out* » des voies compétitrices du potentiel redox (NADH Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduite) de la bactérie (Trably *et al.*, 2018). La seconde repose sur la modification génétique des hydrogénases 1, 2, 3 et 4 afin de les rendre plus performantes (Trchounian *et al.*, 2017, Petrosyan *et al.*, 2018).

De manière générale, les rendements et les productivités en biohydrogène obtenus par le biais de cultures pures sont très variables. Les performances dépendent fortement du substrat à dégrader, des conditions de culture et de la souche bactérienne utilisée. Il est à noter que l'utilisation de souches anaérobies strictes nécessite une absence totale d'oxygène dans le milieu de culture pour le fonctionnement du procédé. Finalement, l'inconvénient majeur des fermentations en cultures pures réside dans la nécessité de maintenir des conditions axéniques pour éviter les contaminations par d'autres microorganismes en cours d'inoculation et de culture.

### 2.1.1.2 Les co-cultures

La production de biohydrogène par des co-cultures revient à utiliser au minimum deux espèces microbiennes afin de contrôler l'association de métabolismes d'intérêt, l'objectif étant qu'un mécanisme de symbiose s'installe entre les espèces pour améliorer la production de biohydrogène. Ainsi, Islam *et al.* (2017) ont démontré que les performances de production de biohydrogène à partir de tiges de sorgho étaient meilleures en utilisant une co-culture de *Clostridium thermocellum* et *Clostridium thermosaccharolyticum* plutôt qu'en utilisant les souches seules. Les interactions entre plusieurs espèces microbiennes peuvent également permettre de dégrader une plus large gamme de substrats organiques. A cet effet, Zhang *et al.* (2016) ont associé deux souches de *Clostridium cellulolyticum* et de *Citrobacter amalonaticus*. La souche *Clostridium cellulolyticum* a permis d'hydrolyser la cellulose des tiges de maïs en glucose et xylose, et la souche *Citrobacter amalonaticus* a fermenté les monosaccharides pour

produire du biohydrogène. Enfin, des espèces bactériennes peuvent être associées pour consommer des produits toxiques ou indésirables pour l'une des bactéries tels que l'oxygène résiduel et les acides gras volatils (AGVs) (Cabrol *et al.*, 2017).

L'utilisation de co-cultures pour le procédé de fermentation sombre est intéressante car elle permet de piloter et de contrôler le procédé plus aisément que pour les cultures mixtes. En effet, il est possible d'orienter le métabolisme bactérien en connaissant les espèces bactériennes constitutives de l'inoculum. Cependant, tout comme les cultures pures, la mise en œuvre du procédé nécessite de ne pas contaminer le milieu de culture par une autre souche.

### 2.1.1.3 Les cultures mixtes

Les cultures mixtes sont très utilisées et la majorité sont issues de procédés de méthanisation, de boues anaérobies de stations d'épuration des eaux usées, mais aussi des déchets municipaux, des effluents d'élevage, des sols, des sédiments marins ou de toute forme de lixiviats (Trably *et al.*, 2018). Les cultures mixtes contiennent ainsi une forte concentration en organismes méthanogènes, bactéries sulfato-réductrices et homoacétogènes. Il devient donc nécessaire de procéder à un prétraitement avant d'utiliser le consortium afin d'éliminer les souches consommatrices d'hydrogène et de sélectionner les souches productrices d'hydrogène. Les différents prétraitements exploités sont souvent basés sur la faculté de *Clostridium* sp. à sporuler (Wang et Yin, 2017) et incluent :

- ✓ **Les prétraitements physiques** : à la chaleur (Wang *et al.*, 2018), aux ultrasons (Elbeshbishy *et al.*, 2010), aux ultraviolets (Wang *et al.*, 2012) et à l'aération (Song *et al.*, 2012) ;
- ✓ **Les prétraitements chimiques** : acides, basiques ou par l'utilisation de réactifs ayant une action spécifique sur les *Archaea* méthanogènes tels que le 2-bromoéthanesulfonate et le 2,4-pteridinedione (Wang et Yin, 2017).

Néanmoins, malgré l'utilisation d'un prétraitement, il importe de maintenir au cours du procédé des conditions de pH, de température ou d'alimentation du milieu favorisant le développement des bactéries productrices d'hydrogène au détriment des bactéries consommatrices d'hydrogène.



Contrairement aux cultures pures et co-cultures, les cultures mixtes ont l'avantage d'être peu sensibles aux contaminations et peuvent dégrader une large gamme de substrats organiques. Néanmoins, la présence d'un nombre important d'espèces bactériennes rend la compréhension des réactions métaboliques en cours de culture difficile, et la majorité des travaux sur les cultures mixtes rapportent de moins bon rendement de production en biohydrogène par rapport aux cultures pures et co-cultures (Ghimire *et al.*, 2015).

La sélection de l'inoculum est importante lorsqu'il s'agit de mener le procédé de fermentation sombre car elle permet d'améliorer les performances de ce dernier. Cependant, ce choix doit tenir compte du substrat organique utilisé pour la production de biohydrogène.

### 2.1.2 Les substrats organiques utilisés pour la production de biohydrogène

Les substrats organiques jouent un rôle important dans les rendements ainsi que les productions en biohydrogène, mais aussi dans l'économie du procédé de fermentation sombre. Ceci dépend principalement du contenu en glucide du substrat, de la biodisponibilité et du taux de biodégradation de la matière organique. De manière générale, les substrats employés sont des substrats simples tels que les monosaccharides et disaccharides ou des substrats complexes tels que les déchets agricoles et alimentaires.

#### 2.1.2.1 Les substrats simples

Les substrats simples monomériques et dimériques les plus utilisés dans la littérature sont le glucose et le saccharose. Plusieurs autres sucres ont également été étudiés tels que le maltose, le xylose et le lactose (Ghimire *et al.*, 2015, Elbeshbishy *et al.*, 2017). Les études qui utilisent les substrats simples sont principalement conduites afin de déterminer rapidement les performances du procédé. Cependant, dans un souci énergétique et environnemental, la production de biohydrogène par le procédé de fermentation sombre exige de se servir des substrats issus de ressources renouvelables.

#### 2.1.2.2 Les substrats complexes

Les substrats complexes sont principalement constitués de biodéchets. Dès lors, ce sont des substrats très intéressants pour la pérennité du procédé de fermentation sombre car ils

constituent un volume important à fort potentiel énergétique. Les biodéchets comprennent (**Tableau 2.1**) :

- ✓ **Les déchets agricoles et forestiers** : sous-produits de cultures (plantes ligneuses et herbacées) et de transformation du bois (Guo *et al.*, 2010) ;
- ✓ **Les déchets d'élevage fermier** : fumier et lisier (Martin *et al.*, 2017) ;
- ✓ **Les fractions organiques des déchets municipaux** : déchets verts, huiles alimentaires, eaux usées, *etc.* (Kim *et al.*, 2013) ;
- ✓ **Les déchets alimentaires** (Jarunglumert *et al.*, 2018) ;
- ✓ **Les déchets agroindustriels** : sopes de déconditionnement, *etc.* (Urbaniec et Bakker, 2015).

La majorité de ces substrats organiques nécessitent une étape de prétraitement en amont du procédé pour améliorer la biodisponibilité du substrat (hydrolyse, broyage, prétraitement chimique, utilisation d'enzymes et de champignons, *etc.*). En effet, les souches bactériennes utilisées auront la possibilité de dégrader le substrat seulement si elles disposent du complexe enzymatique adéquat. A titre d'exemple, certaines souches de *Clostridium butyricum* et *Clostridium acetobutylicum* produisent des amylases qui sont capables de dégrader l'amidon contenu dans plusieurs déchets agricoles (blé, maïs, sorgho, *etc.*) (Zagrodnik et Laniecki, 2017). De même, des souches de *Clostridium cellulolyticum* et *Clostridium cellulovorans* produisent des cellulases capables de dégrader des composés lignocellulosiques (Zhang *et al.*, 2016). Cependant, le bon fonctionnement de la dégradation de ces substrats repose sur l'application d'une température à laquelle l'activité de ces enzymes est maximale. Or, la température optimale de production du biohydrogène n'est pas toujours la même que la température optimale de l'enzyme, auquel cas une étape d'hydrolyse enzymatique préalable à la fermentation sombre sera envisagée (Sun *et al.*, 2009).

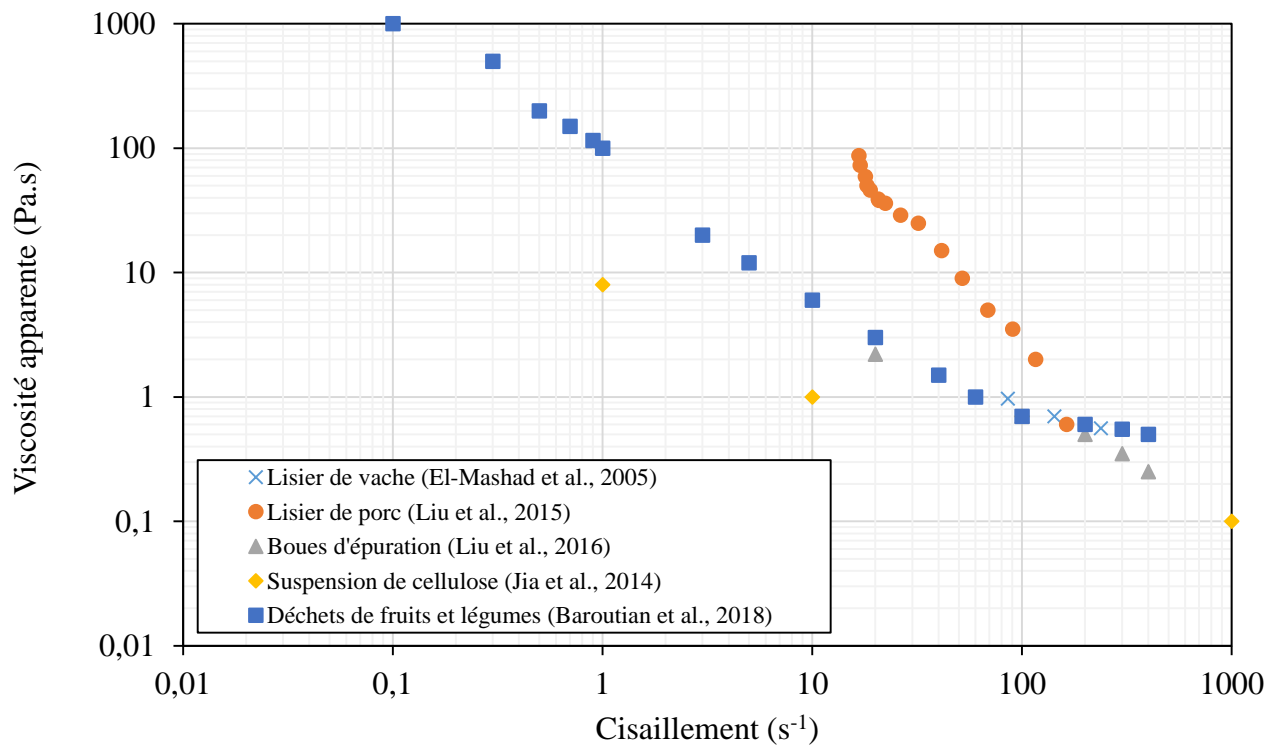
**Tableau 2.1.** Différents substrats complexes utilisés pendant le procédé de fermentation sombre. ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor), CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), STR (Stirred Tank Reactor), VS (Volatile Solids).

Substrat organique	Inoculum	Réacteur/mode	Rendement	Productivité	Référence(s)
Paille de blé	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	-/batch	3,8 mol <sub>H2</sub> /mol <sub>glucose</sub>	44,7 L <sub>H2</sub> /kg <sub>biomasse</sub>	Ivanova <i>et al.</i> , 2009
Boues d'épuration	Culture mixte	STR/batch	1,4 · 10 <sup>-2</sup> L <sub>H2</sub> /g VS	5,0 L <sub>H2</sub> /L/j	Kim <i>et al.</i> , 2013
Déchets de cafétéria	Culture mixte	ASBR/continu	1,0 · 10 <sup>-1</sup> L <sub>H2</sub> /g DCO	8,0 L <sub>H2</sub> /L/j	Moreno-Andrade <i>et al.</i> , 2015
Ensilage de maïs	Culture mixte	CSTR/semi-continu	5,3 · 10 <sup>-2</sup> L <sub>H2</sub> /g VS	-	Martin <i>et al.</i> , 2017
Soupe de déconditionnement	Culture mixte	STR/batch	0,4 mol <sub>H2</sub> /mol <sub>lactate</sub>	5,4 L <sub>H2</sub> /L/j	Noblecourt <i>et al.</i> , 2018

### 2.1.2.3 Viscosité du digestat

La viscosité du digestat est rarement prise en compte lors du procédé de fermentation sombre alors qu'elle constitue un des paramètres clé du procédé de digestion anaérobie (Eshtiaghi *et al.*, 2016). En effet, le spectre de substrats complexes à valoriser pour la production de biohydrogène est très différent selon leur nature (solide ou liquide), leur type (lisier, déchets alimentaires, déchets agroindustriels, *etc.*) et leur composition. De plus, pour des systèmes alimentés en continu, la viscosité du digestat peut varier au cours du temps pour des causes de saisonnalité, d'origine et de variation de composition des intrants organiques. La mesure de viscosité de ces déchets organiques permet de déterminer leur comportement rhéologique, et ces derniers sont alors assimilés à des milieux Newtoniens ou non-Newtoniens avec des gammes de viscosités très variables (**Figure 2.1**). Par exemple, Ruggeri et Tommasi (2012) ont rencontré des difficultés à mélanger un digestat non-Newtonien issu de déchets de fruits et de végétaux. Le digestat peut également être composé d'une partie solide et d'une partie liquide qui, en fonction des conditions de mélange, va subir des séparations de phase. Trad *et al.* (2015a) ont ainsi, quant à eux, déterminé une valeur minimale d'agitation mécanique de 200 trs/min pour la suspension homogène de pailles de 2 mm de longueur en milieu liquide. L'homogénéisation du digestat tout au long du procédé est souvent considérée comme nécessaire pour minimiser les gradients locaux de pH dans le milieu, favoriser les échanges de métabolites, les transferts de matière liquide-liquide et liquide-gaz, la diffusivité enzymatique et l'accessibilité des bactéries au substrat. Ainsi, à vitesse d'agitation mécanique constante, Lindmark *et al.* (2014) ont émis l'hypothèse qu'une augmentation de la viscosité pouvait altérer le développement des bactéries de l'inoculum ; ceci

en raison d'un cisaillement plus important appliqué aux microorganismes, mais aussi à cause d'une diminution des vitesses de transfert de matière liquide-gaz et entre nutriments-bactéries. Un moyen d'éviter ces limitations serait d'augmenter la vitesse d'agitation mécanique des mobiles à un degré acceptable, tant sur le plan de la soutenabilité économique du procédé qu'au niveau du cisaillement induit par l'agitation.



**Figure 2.1.** Viscosité apparente de différents digestats en fonction du cisaillement.

Basé sur leur biodisponibilité, le potentiel de production en hydrogène ou BHP (*Biological Hydrogen Potential*) varie d'un substrat à un autre et cela est également lié au métabolisme microbien. Aussi, selon la viscosité et la nature du substrat, il est important de déterminer les conditions d'agitation (type et nombre d'agitateurs) et de mélange qui doivent être choisies pour homogénéiser le milieu de culture. Finalement, outre la source de carbone qui est biodisponible dans les substrats organiques, l'apport de sources d'azote, de phosphore et d'oligoéléments dans le milieu de culture est nécessaire à la croissance bactérienne et donc à la production de biohydrogène.

### 2.1.3 Composition du milieu de culture

Pour leur croissance et la production de biohydrogène, les organismes microbiens ont besoin d'une source de carbone apportée par les substrats organiques, mais d'autres composés doivent être présents dans le milieu de culture.

#### 2.1.3.1 Les Macroéléments

L'azote est requis dans le milieu de culture pour permettre la réplication cellulaire, la maintenance, le métabolisme et la production des enzymes des bactéries productrices d'hydrogène. Il peut être apporté sous forme organique (protéines, peptides, et acides aminés libres), mais aussi sous la forme d'ammoniac minéral. Les concentrations en carbone et en azote sont intimement liées, on parle alors de ratio carbone/azote (C/N). Ainsi, en fonction du substrat et de l'inoculum utilisé, les ratios C/N optimaux relevés dans la littérature sont très disparates, et peuvent varier de 20 (Argun et Onaran, 2017) à 200 (Carosia *et al.*, 2017).

Le phosphore est également un macroélément essentiel car il est au centre du métabolisme énergétique de toutes les bactéries. Au même titre que l'azote, on parle de ratio carbone/phosphore (C/P) pour définir les valeurs optimales à apporter au milieu de culture. A nouveau, les données de la littérature sont différentes selon le substrat et l'inoculum employé, et les ratios peuvent aller de 130 (Hawkes *et al.*, 2002) à 1000 (Argun *et al.*, 2008).

Outre l'importance des sources d'azote et de phosphore dans le milieu de culture, les oligoéléments tels que les éléments métalliques doivent être ajoutés à faible concentration dans le milieu pour remplir leur rôle de cofacteur enzymatique.

#### 2.1.3.2 Les Microéléments

Le fer est un élément important car il s'agit d'un constituant essentiel du site actif des hydrogénases et des ferrédoxines. L'absence de cet oligoélément provoque une inactivation des enzymes et donc de la production de biohydrogène. A l'inverse, une trop forte concentration en fer dans le milieu de culture peut également inhiber la production de biomasse. La concentration inhibitrice varie selon les travaux et elle est par exemple de 20 mg/L chez Nath *et al.* (2006) et de 600 mg/L chez Zhang *et al.* (2005). Les concentrations en fer peuvent également induire de moins bonnes performances du procédé de manière indirecte, en modifiant les voies métaboliques

de dégradation du substrat organique vers la production de lactate, d'éthanol ou de propionate (Elbeshbishy *et al.*, 2017)

D'autres microéléments ont un rôle important sous forme de trace, notamment dans le processus de transport d'électrons (calcium, cobalt, magnésium, nickel, sodium, zinc, *etc.*).

La composition du milieu de culture est un paramètre fondamental à prendre en compte pour la production de biohydrogène. Cependant, les performances du procédé dépendent également des conditions physicochimiques (température et pH) de fermentation.

#### 2.1.4 La température

La température est un des facteurs clé du procédé de fermentation sombre car elle doit favoriser la croissance des microorganismes constitutifs de l'inoculum et assurer la conversion du substrat organique en biohydrogène. Les procédés mésophiles sont utilisés dans la majorité des travaux portant sur la production de biohydrogène, car ces températures permettent d'envisager des procédés moins énergivores et donc économiquement viables. Dans ce sens, Lin et Chang (2004) rapportent l'utilisation du procédé à température ambiante, mais les performances de production en biohydrogène sont assez faibles (46,3 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/J entre 24 et 28°C). *A contrario*, les procédés thermophiles et hyperthermophiles permettent de limiter la prolifération des microorganismes consommateurs d'hydrogènes et peuvent atteindre de meilleurs rendements que les procédés mésophiles (Dessi *et al.*, 2018) ; mais l'énergie nécessaire pour chauffer et maintenir la température au sein du bioréacteur est conséquente.

Le choix du procédé peut être fonction du substrat organique à dégrader. Ainsi, les procédés thermophiles sont favorisés lorsque des substrats complexes tels que les déchets agricoles et forestiers sont utilisés. En effet, les températures vont améliorer le taux d'hydrolyse du substrat qui peut être l'étape limitante du procédé et augmenter sa biodisponibilité. A l'inverse, les procédés mésophiles sont privilégiés lorsque le composé est facilement biodégradable.

Dans la littérature, différentes études ont également montré que la température pouvait affecter les voies métaboliques et changer la composition des sous-produits de l'acidogénèse en culture mixte. Par exemple, Valdez-Vasquez *et al.* (2005) ont rapporté une production en

biohydrogène plus importante dans des conditions de température thermophiles en comparaison aux conditions de température mésophiles. Dans ce cas-là, la voie acétate est favorisée aux températures thermophiles, alors que la voie butyrate est favorisée aux températures mésophiles.

La température est un paramètre important du procédé de fermentation sombre. Elle a une véritable influence sur les voies métaboliques empruntées pendant le procédé. Malgré la connaissance des effets de la température sur les populations microbiennes, aucune température optimale pour la fermentation sombre ne peut être donnée, en raison de la complexité des substrats organiques possibles et des conditions variables de fonctionnement du procédé.

### 2.1.5 Le pH

Le pH est avec la température un des paramètres clé du procédé de fermentation sombre. En effet, le pH opérationnel a un effet important sur le processus enzymatique des microorganismes, car les enzymes sont actives dans une gamme de pH spécifique dans laquelle elles exercent leur activité maximale. Par exemple, le pH optimal des hydrogénases se situe entre 6,0 et 6,5 (Tsygankov *et al.*, 2007). La gamme de pH optimale pour la production de biohydrogène varie considérablement selon les données de la littérature. En effet, le pH optimum peut varier de 4 à 9 lorsque le substrat organique utilisé est le saccharose (Ghimire *et al.*, 2015). Ces différences peuvent s'expliquer par les différences de source de l'inoculum, des méthodes d'enrichissement de l'inoculum, du substrat et de la charge organique utilisée.

Un pH opérationnel inférieur à 6,0 peut permettre de limiter la croissance des organismes méthanogènes en culture mixte au profit des bactéries productrices d'hydrogène dans des conditions de température mésophiles et thermophiles. En effet, les archées hydrogénotrophes se développent préférentiellement dans des conditions de pH neutre ou légèrement basique (Dessi *et al.*, 2018). Ainsi, le contrôle combiné du pH et de la température lors du procédé de fermentation sombre joue un rôle essentiel dans les performances de production en biohydrogène en minimisant l'activité des organismes consommateurs de biohydrogène. Toutefois, un pH acide peut affecter l'activité des hydrogénases, dès lors un compromis doit être défini.

Le pH permet également d'améliorer les performances du procédé par le contrôle des voies métaboliques empruntées pendant la fermentation, ce qui modifie la gamme des sous-

produits obtenus. Il apparaît que la voie acétate est favorisée à un pH de 6,5, alors que la voie butyrate est privilégiée à un pH inférieur à 6,0 (Trably *et al.*, 2018).

Au cours du procédé de fermentation sombre, des acides organiques s'accumulent dans le milieu de culture ce qui nécessite une régulation continue du pH par le biais de solutions basiques pendant la fermentation. En effet, la production d'acides gras volatils engendre une acidification du milieu de culture. Cette baisse de pH est défavorable à la synthèse de biohydrogène et peut conduire au passage de l'acidogénèse vers la solvantogénèse et la production de solvants tels que l'acétone, le butanol et l'éthanol à des pH inférieurs à 5,2 (Noblecourt *et al.*, 2017). Pour diminuer cette acidification du milieu et éviter la régulation du pH au cours de cultures batch, plusieurs stratégies ont été développées. La première consiste à démarrer le procédé à un pH élevé ou à employer des réactifs qui peuvent avoir un effet tampon comme le phosphate (Xu *et al.*, 2016). La seconde repose sur la mise en œuvre de membranes de séparation liquide/liquide qui vont permettre de filtrer le milieu de culture riche en acides organiques, tout en conservant la biomasse productrice d'hydrogène dans le bioréacteur (Trad *et al.*, 2015b, Noblecourt *et al.*, 2017). Enfin, Mota *et al.* (2018) ont dernièrement démontré qu'il était possible de conduire le procédé de fermentation sombre en continu sur plus de 150 jours à des pH inférieurs à 3,0. Même si les productivités en biohydrogène répertoriées dans cette étude sont encore faibles (100 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/L/h) en comparaison à d'autres études utilisant le saccharose comme substrat organique ; mais l'absence de nécessité d'ajout de solution alcaline au cours de la fermentation constitue une réelle avancée, tant sur le plan économique que fonctionnel du procédé.

Finalement, de la même manière qu'avec la température, il importe de déterminer le pH optimal de culture en fonction du type de microorganisme rencontré dans l'inoculum et du substrat organique à dégrader. Malgré cela, les produits formés au cours de la fermentation vont également avoir un effet significatif sur les performances du procédé.

#### 2.1.6 La pression partielle en hydrogène (pH<sub>2</sub>)

La pression partielle en hydrogène au sein d'un bioréacteur peut avoir une influence sur le processus de fermentation et donc sur la production en biohydrogène. Génériquement, la pression partielle maximale en gaz produit est définie selon la loi de Henry qui correspond à l'équilibre thermodynamique. Ainsi, à équilibre gaz-liquide, la relation entre la concentration d'un gaz en



phase gazeuse (ou sa pression partielle  $P_G$ ) et sa concentration sous forme dissoute ( $C_i$ ) qui caractérise la solubilité du gaz dans le liquide est décrite par l'intermédiaire de la loi de Henry, en faisant intervenir la constante de Henry  $He$  qui ne dépend que de la température à composition de milieu fixée :

$$C_i = He \cdot P_G \quad (2.1)$$

En principe, les réactions de conversion du biohydrogène sont impactées négativement pour des valeurs de pression partielle en hydrogène  $P_G$  supérieures à 60 Pa d'hydrogène dissous à l'équilibre (Trably *et al.*, 2018).

Pendant la fermentation d'un substrat organique, le biohydrogène est produit sous forme dissoute dans le milieu de culture. Cependant, il est très peu soluble (environ 1,4 mg/L dans l'eau à la température de 35°C et à pression atmosphérique en H<sub>2</sub> pur) et aura tendance à être transféré de la phase liquide vers la phase gazeuse plus ou moins rapidement selon les conditions de mélange (Zhang *et al.*, 2013). La vitesse de transfert du gaz ( $Q$ ) depuis la phase liquide vers la phase gazeuse est donnée par l'expression (**Figure 2.2**) :

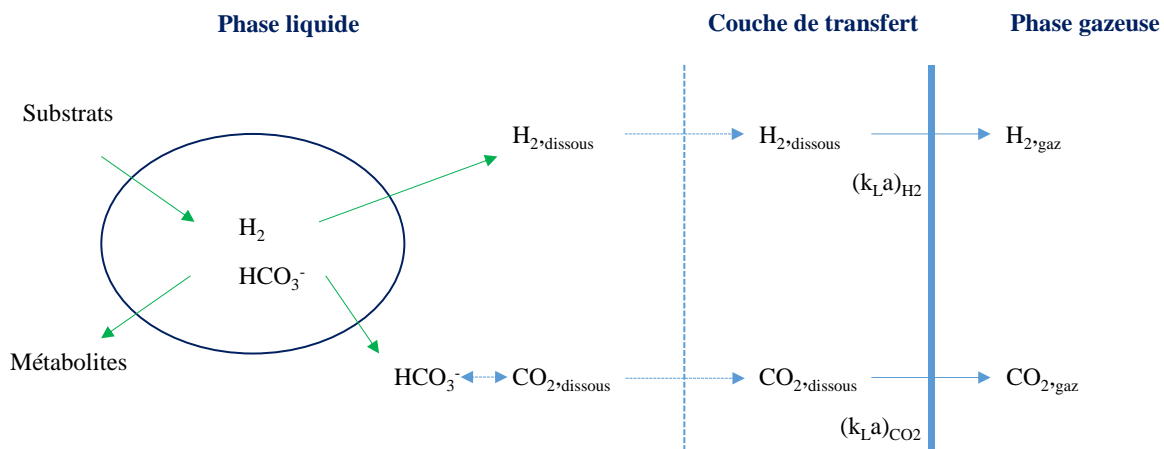
$$Q = k_L a \cdot (C_G - He \cdot P_G) \quad (2.2)$$

où  $k_L a$  est le coefficient volumétrique de transfert de matière du côté liquide qui est fonction des conditions d'agitation,  $P_G$  est la pression partielle en hydrogène dans le gaz et  $C_G$  la concentration en gaz dissous dans le liquide. Le contrôle de la concentration en hydrogène dissous est donc un point critique à surveiller lors du procédé de fermentation sombre. En effet, la valeur maximale de la vitesse de transfert est en théorie  $k_L a \cdot C_i$  où  $C_i$  est la solubilité de l'hydrogène définie précédemment. En pratique, il a été observé une sursaturation en biohydrogène qui intervient en général dans le milieu de culture lorsque l'activité biologique de l'inoculum est maximale et que la vitesse de production de H<sub>2</sub> est supérieure à la vitesse maximale de transfert gaz-liquide. L'augmentation de la concentration en biohydrogène dans la phase liquide due au métabolisme bactérien peut être responsable de la réduction de la productivité en biohydrogène, mais aussi de changements métaboliques pendant la fermentation vers les réactions de solvantogénèse avec une accumulation d'acétone, de butanol et d'éthanol, ainsi que de lactate dans le milieu de culture (Trably *et al.*, 2018). Une forte concentration en biohydrogène dissous peut également

thermodynamiquement empêcher l'oxydation des acides gras à longues chaînes en AGV et biohydrogène (Dong *et al.*, 2009).

Afin de favoriser le transfert de matière, il convient également de maximiser le gradient  $(C_G - H_e \cdot P_G)$ , donc de diminuer  $P_G$ . En effet, il est connu que la pression partielle en hydrogène peut thermodynamiquement empêcher les réactions productrices de biohydrogène et modifier les voies métaboliques utilisées par les bactéries. Ainsi, la conversion de la coenzyme NADH en hydrogène par les hydrogénases est défavorisée (Chong *et al.*, 2009). Aussi, si la concentration en biohydrogène augmente de manière critique dans la phase liquide, l'oxydation de la ferredoxine devient thermodynamiquement moins favorable et la réduction de la ferredoxine engendre l'oxydation de l'hydrogène en protons libres dans le milieu de culture (Ghimire *et al.*, 2015). Cela revient à dire que la fermentation sombre ne peut pas être opérée sous pression.

Finalement, au regard des données de la littérature, il ressort que le procédé de fermentation sombre peut être inhibé par son propre produit. La production de biohydrogène dissous dans le milieu doit donc être opérée sous pression atmosphérique et être accompagnée d'un transfert liquide-gaz suffisant et assez rapide afin de limiter des niveaux trop importants de pression partielle en hydrogène.



**Figure 2.2.** Schéma représentatif du biogaz produit en solution par la bactérie et de son transfert vers la phase gazeuse.

En premier lieu, il est donc primordial d'étudier le transfert d'hydrogène lors de la mise en place du procédé en déterminant le  $(k_L a)_{H_2}$ . Ce dernier peut être mesurée par une méthode d'oxygénation/désoxygénation, où le  $(k_L a)_{H_2}$  est déterminé par des mesures de  $(k_L a)_{O_2}$  en utilisant le modèle de Higbie (Trad *et al.*, 2017), mais aussi par l'intermédiaire de bilans gazeux (Zhang *et al.*, 2013). Ensuite, il faut utiliser des techniques efficaces pour augmenter le coefficient volumétrique de transfert de matière  $(k_L a)$  (Mandal *et al.*, 2006). Ce paramètre dépend de la surface spécifique à l'interface liquide-gaz et des conditions de mélange de la phase liquide. A ce jour, plusieurs méthodes ont été employées pour réduire la pression partielle en hydrogène dans le milieu (**Tableau 2.2**) :

✓ **La pression réduite.** Cette technique consiste à diminuer la pression partielle en hydrogène de la phase liquide par le biais de la pression totale au moyen d'un contrôleur de pression monté au niveau du ciel gazeux du bioréacteur (Lee *et al.*, 2012). Ce système permet de travailler à pression réduite et d'améliorer les rendements en biohydrogène (Mandal *et al.*, 2006, Liu et Wang, 2017), ainsi que la biodégradation des substrats organiques complexes (Kisielewska *et al.*, 2015). Cependant, l'implémentation de cette technologie est peu fréquente. En effet, son utilisation engendre des risques d'entrée en oxygène dans le bioréacteur en cas de fuite. Une autre méthode consiste à augmenter la taille du ciel gazeux du bioréacteur, mais cela s'applique seulement aux tests en bouteille où le système est fermé (Junghare *et al.*, 2012).

✓ **L'injection d'un gaz inerte ou « flushing ».** Le « flushing » est une méthode qui repose sur l'injection d'un gaz inerte dans le bioréacteur de façon continue ou discontinue. Les gaz les plus couramment utilisés sont l'azote, l'argon et le dioxyde de carbone (Beckers *et al.*, 2015). Cette technique permet de diminuer la pression partielle en hydrogène de la phase liquide par dilution du biogaz produit. En effet, la pression partielle étant régie par un équilibre entre la phase liquide et la phase gazeuse, l'injection d'un gaz inerte va diminuer la quantité de biohydrogène de la phase gazeuse et va favoriser le transfert du biohydrogène dissous vers la phase gazeuse pour atteindre un état d'équilibre. D'autres auteurs emploient des membranes de séparation  $H_2/CO_2$  afin de réinjecter le dioxyde de carbone produit dans le bioréacteur. Cette technologie est efficace et améliore la production en biohydrogène (Bakonyi *et al.*, 2017) mais la réinjection de  $CO_2$  dans la phase liquide du bioréacteur a pour conséquence d'acidifier le milieu de culture par la formation d'acide carbonique. Le « flushing » améliore les performances du

procédé de fermentation sombre (Nguyen *et al.*, 2010). En revanche, le biohydrogène produit au cours de la culture est fortement dilué dans le gaz inerte, ce qui complique davantage l'étape de purification du procédé.

✓ **L'agitation mécanique.** L'augmentation de l'agitation mécanique s'applique uniquement pour les bioréacteurs à cuve agitée. Cette technique couramment employée, permet d'accroître les échanges à l'interface liquide-gaz et donc d'accélérer les transferts en hydrogène vers la phase gazeuse. Tout comme les deux méthodes décrites précédemment, l'augmentation de l'agitation mécanique à un certain niveau permet d'améliorer les performances de production en biohydrogène (Clark *et al.*, 2012). En revanche, des niveaux d'agitation mécanique importants peuvent avoir un effet négatif sur l'étape d'hydrolyse des substrats organiques complexes (Lo *et al.*, 2008), sur le développement des bactéries du consortium et sur la soutenabilité économique du procédé (Lindmark *et al.*, 2014).

**Tableau 2.2.** Différentes méthodes de réduction de la pression partielle en hydrogène. CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), DCO (Demande Chimique en oxygène), GSMBR (Gas Separation Membrane Bioreactor), UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), VS (Volatile Solids).

Méthode	Substrat organique	Inoculum	Réacteur/mode	Rendement ou productivité maximum	Amélioration (%)	Référence(s)
Pression réduite	Glucose	<i>Enterobacter cloacae</i> DM-11	Flacon agité/ <i>batch</i>	3,89 mol <sub>H2</sub> /mol <sub>glucose</sub>	+ 105	Mandal <i>et al.</i> , 2006
	Perméat de lactosérum	Culture mixte	UASB/ <i>continu</i>	4,6 mol <sub>H2</sub> /kg DCO	+ 30	Kisielewska <i>et al.</i> , 2015
Volume du ciel gazeux	Glucose	<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A	Flacon agité/ <i>batch</i>	3,1 mol <sub>H2</sub> /mol <sub>glucose</sub>	+ 16	Junghare <i>et al.</i> , 2012
	Glucose	Culture mixte	CSTR/ <i>continu</i>	1,43 mol <sub>H2</sub> /mol <sub>glucose</sub>	+ 68	Mizuno <i>et al.</i> , 2010
« Flushing »	Glucose et xylose	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM-4359	Flacon agité/ <i>batch</i>	3,24 mol <sub>H2</sub> /mol <sub>glucose</sub>	+ 78	Nguyen <i>et al.</i> , 2010
Membrane de séparation	Glucose	Culture mixte	GSMBR/ <i>continu</i>	9,2 L <sub>H2</sub> /L/j	+ 32	Bakonyi <i>et al.</i> , 2017
Agitation	Poudre de lait	Culture mixte	Bouteille agitée/ <i>batch</i>	1,2 · 10 <sup>-1</sup> L <sub>H2</sub> /g VS	+ 39	Clark <i>et al.</i> , 2012

En cas de faible transfert de gaz depuis la phase liquide vers la phase gazeuse, la pression partielle en hydrogène peut atteindre des niveaux critiques, contribuant à la potentielle inhibition de la production de biohydrogène. De manière similaire, les métabolites solubles formés pendant la fermentation sombre peuvent inhiber la réaction.

### 2.1.7 Inhibition de la production en biohydrogène par les métabolites formés au cours de la réaction

Les acides gras volatils que sont l'acétate, le butyrate et le propionate peuvent s'avérer toxique pour le métabolisme des bactéries productrices d'hydrogène lorsque leur concentration dans le milieu de culture dépasse un certain niveau. Les concentrations inhibitrices en AGV sont très variables selon l'espèce microbienne retrouvée et l'état de dissociation des acides organiques qui est fonction du pH du milieu de culture (**Tableau 2.3**).

L'inhibition de la production de biohydrogène par les AGVs fait intervenir différents mécanismes d'inhibition qui dépendent du pH du milieu de culture et de l'état de dissociation des acides organiques en fonction de leur pKa. Les pKa de l'acétate, du butyrate et du propionate sont respectivement de 4,76, 4,82 et 4,87 à 25°C. La forme dissociée des AGVs est quasiment la seule présente lorsque le pH du milieu est supérieur à  $pK_a + 1$ . Dans ces conditions, les AGVs ne peuvent pas pénétrer de façon passive dans les cellules bactériennes et la pression osmotique du milieu de culture va augmenter jusqu'à causer la lyse des parois bactériennes. En revanche, quand les AGVs sont sous la forme indissociée, ils sont capables de pénétrer de manière passive à l'intérieur du cytoplasme des bactéries où ils vont pouvoir se dissocier en raison d'un pH intracellulaire supérieur au pKa. Cette dissociation aboutit à l'accumulation d'ions  $H^+$  et à la diminution du pH intracellulaire des bactéries ; l'activité métabolique des bactéries est donc modifiée et ce mécanisme peut également conduire à la lyse cellulaire (Bundhoo et Mohee, 2016).

Pour désamorcer l'effet inhibiteur des AGVs, la production de solvant *via* la solvantogénèse a été rapportée comme étant un mécanisme de détoxification de la cellule bactérienne. Cependant, la production de butanol et d'éthanol peut également avoir un effet négatif sur la croissance cellulaire et la production de biohydrogène (Ciranna *et al.*, 2014).

Enfin, le lactate formé au cours de la réaction peut dans certains cas inhiber la production de biohydrogène (van Niel *et al.*, 2002). *A contrario*, il entre dans la composition des soupes de déconditionnement de déchets alimentaires utilisées par Noblecourt *et al.* (2018) et est alors le principal substrat organique fermenté en biohydrogène, ce qui démontre l'importance de la composition du consortium bactérien en cultures mixtes.

**Tableau 2.3.** Métabolites solubles formés au cours du procédé et leur concentration inhibitrice. CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor).

Inhibiteur	[inhibitrice]	Substrat organique	Inoculum	Réacteur/mode	Référence(s)
<b>Acétate</b>	6 mM	Glucose	Culture mixte	CSTR/ <i>continu</i>	van Ginkel et Logan, 2005
	5 g/L	Saccharose	Culture mixte	CSTR/ <i>batch</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008b
<b>Butyrate</b>	13 mM	Glucose	Culture mixte	CSTR/ <i>continu</i>	van Ginkel et Logan, 2005
	16 g/L	Glucose	Culture mixte	Flacon agité/ <i>batch</i>	Zheng et Yu, 2005
<b>Propionate</b>	10 mM	Glucose	Culture mixte	Flacon agité/ <i>batch</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008a
	2,36 g/L	Eaux usées	Culture mixte	CSTR/ <i>continu</i>	Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014
<b>Ethanol</b>	10 mM	Glucose	Culture mixte	Flacon agité/ <i>batch</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008a
	154 mM	Glucose	<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	Flacon agité/ <i>batch</i>	Tang <i>et al.</i> , 2012
<b>Lactate</b>	184 mM	Saccharose	<i>Clostridium saccharolyticus</i> DSM-8903	CSTR/ <i>batch</i>	van Niel <i>et al.</i> , 2002

### 2.1.8 Conduite des cultures et conception des bioréacteurs

Les différents bioréacteurs utilisés pour étudier la production de biohydrogène par le procédé de fermentation sombre peuvent être classés selon les conditions d'enrichissement bactérien et hydrodynamiques qui leurs sont appliquées. Ainsi, on distingue en général les bioréacteurs à biomasse libre (agitation mécanique) des bioréacteurs à biomasse fixée (agitation hydraulique). On différencie également les bioréacteurs selon le mode de conduite de culture par rapport à la phase liquide qui est mené pendant le procédé de fermentation sombre, à savoir les cultures batch (fermées), fed-batch, semi-continues ou continues.

#### 2.1.8.1 Mode de conduite des cultures en bioréacteurs

##### 2.1.8.1.1 Les cultures batch

La majorité des travaux relatés dans la littérature sont réalisés en culture batch afin de déterminer le potentiel de production en hydrogène de différents substrats organiques (Venkata Mohan *et al.*, 2012). Ce mode de culture est caractérisé par l'absence d'alimentation en substrats organiques et de sortie en métabolites solubles pendant la fermentation. A cet effet, le volume de culture reste constant tout au long de la conduite du procédé, excepté la situation selon laquelle le pH est régulé par ajout de solutions acides ou alcalines. En règle générale, les cultures batch sont

favorisées lorsqu'il s'agit de tester de nombreuses conditions opératoires en peu de temps. Elles permettent ainsi d'avoir des informations sur les conditions de culture optimales conduisant au BHP le plus important.

### 2.1.8.1.2 Les cultures fed-batch

Les cultures fed-batch consistent à alimenter le milieu de culture en substrats organiques de manière séquentielle sans aucune étape de soutirage de ce dernier tout au long du procédé (Ngo *et al.*, 2011). L'ajout de substrat permet de maintenir la production de biohydrogène ; cependant, cela peut engendrer une production conséquente d'acides gras volatils et donc inhiber les bactéries productrices d'hydrogène.

### 2.1.8.1.3 Les cultures semi-continues

Les cultures semi-continues sont conduites pour ajouter ponctuellement des étapes d'ajout de milieu de culture frais et de soutirage du milieu appauvri en substrat (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013). Cela permet entre autres de poursuivre la production de biohydrogène en s'affranchissant de l'appauvrissement irrémédiable en substrat organique du milieu de culture, mais aussi de retirer une partie des métabolites solubles inhibiteurs (AGVs, solvants, *etc.*) et de maintenir un volume de culture constant ou quasi-constant. C'est aussi un mode d'alimentation qui permet d'étudier certains paramètres pour le lancement de cultures continues. En effet, le volume et la fréquence des étapes de retrait ou d'ajout du milieu de culture permettent d'étudier l'effet du temps de séjour hydraulique (TSH), qui représente le temps moyen pendant lequel un élément du fluide va séjourner dans le bioréacteur. Le TSH est donc un paramètre essentiel des cultures continues.

### 2.1.8.1.4 Les cultures continues

Les cultures continues sont utilisées dans l'optique de faire évoluer le procédé à une plus grande échelle. En effet, ce mode d'alimentation permet d'augmenter les capacités de traitement tout en s'affranchissant des étapes de retrait et d'ajout rencontrées en cultures semi-continues. Ainsi, au cours d'une culture continue, le bioréacteur est alimenté et soutiré en milieu de culture et en substrat à un débit constant, dans le but de maintenir le même volume de culture tout au long de la fermentation. Pendant la conduite du procédé, il importe de trouver un TSH adéquat

pour permettre la croissance et le développement des bactéries (Bakonyi *et al.*, 2017). Effectivement, si le TSH est inférieur au taux de croissance des microorganismes, le phénomène de lessivage du bioréacteur va apparaître par effet de dilution et le bioréacteur ne sera plus colonisé. Dès lors, le choix du TSH doit se faire en fonction de la composition en bactéries de l'inoculum mais aussi de la charge organique appliquée (substrats et/ou métabolites solubles).

#### 2.1.8.2 Conception et design des bioréacteurs

##### 2.1.8.2.1 Les systèmes à biomasse libre

Le modèle le plus fréquent dans la littérature est dénommé CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) (**Figure 2.3a**). Il s'agit d'un bioréacteur agité et alimenté en continu, ce qui permet notamment de coupler les phases liquide et solide du digestat. Par opposition au mode d'alimentation continu, les bioréacteurs agités utilisés en système batch sont appelés STR (*Stirred Tank Reactor*). Dans les deux cas, l'hypothèse de mélange idéal (instantané dans la totalité du volume) est la règle.

Il existe également des bioréacteurs agités de manière séquentielle. Ce sont les ASBR (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*) qui permettent de concentrer la biomasse dans la phase liquide lorsque l'agitation est arrêtée. En effet, la sédimentation des microorganismes et des substrats organiques permet d'extraire une partie de la phase liquide qui est riche en métabolites solubles (AGVs, solvants), mais aussi d'améliorer les rendements de conversion en biohydrogène. L'utilisation des bioréacteurs ASBR peut s'avérer intéressante lorsqu'il s'agit de dégrader des substrats complexes tels que les déchets agricoles et forestiers (Kumar *et al.*, 2017). Dans cette même optique de concentration de la biomasse afin d'améliorer les performances de production en biohydrogène, des réacteurs à membrane ou AnMBR (*Anaerobic Membrane BioReactor*) peuvent être utilisés. L'application d'une technologie membranaire de séparation liquide/liquide couplée au bioréacteur, permet de conserver les bactéries productrices d'hydrogène du milieu de culture tout en extrayant simultanément certains métabolites tels que les AGVs (Trad *et al.*, 2015b). On distingue usuellement trois configurations membranaires liquide/liquide pour le procédé de fermentation sombre :

- ✓ Les bioréacteurs à membrane immergée interne ;
- ✓ Les bioréacteurs à membrane immergée externe ;



- ✓ Les bioréacteurs à membrane externe (non-immersée).

L'inconvénient majeur de ces configurations membranaires réside dans le développement possible d'un biofilm microbien en surface des pores, ce qui va colmater la membrane. Le colmatage des membranes peut être évité en réalisant des *flush* de gaz inerte ou en inversant le flux de soutirage de la membrane (Trad *et al.*, 2015b).

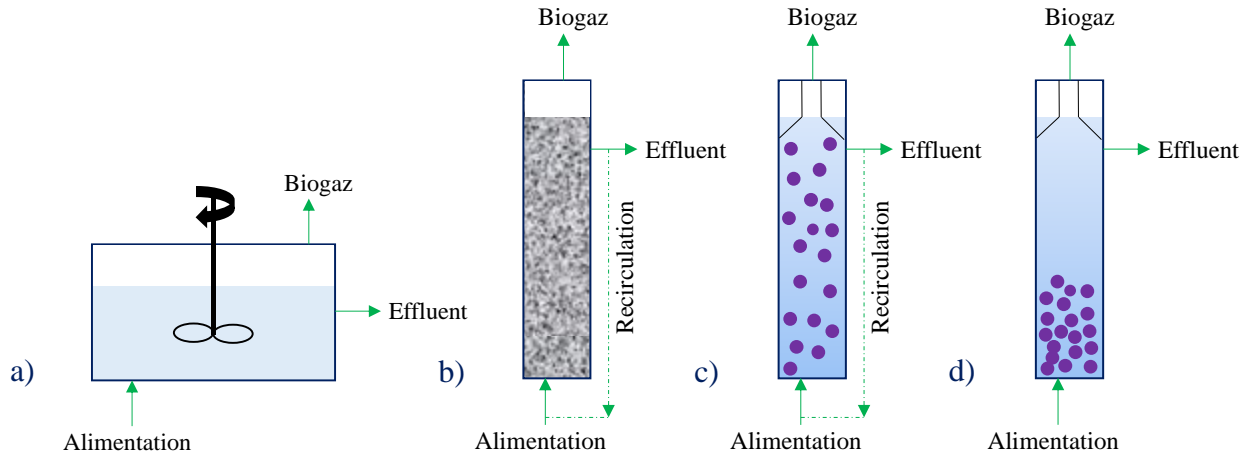
De manière générale, les bioréacteurs à biomasse libre sont simples d'utilisation, mais les capacités de traitement et les performances de production peuvent être limitées par les risques de lessivage de la biomasse au cours des procédés alimentés en continu. Par opposition, les bioréacteurs à biomasse fixée sont plus élaborés et difficiles à mettre en œuvre, mais ils permettent de maximiser les capacités de traitement grâce au découplage des temps de séjour des phases liquide et solide.

### 2.1.8.2.2 Les systèmes à biomasse fixée

Plusieurs stratégies ont été étudiées afin de concentrer la biomasse bactérienne dans le bioréacteur et, de ce fait, découpler le temps de rétention hydraulique et le temps de rétention de la biomasse. La première réside dans l'utilisation des réacteurs AnMBR décrits précédemment. La seconde consiste en l'application de trois types de bioréacteurs.

Les bioréacteurs à boues granulaires issues de la méthanisation ou UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) permettent par leur conception, de séparer les trois phases solide, liquide et gazeuse par l'intermédiaire d'un flux liquide ascendant (**Figures 2.3c** et **2.3d**). Ces bioréacteurs présentent l'avantage de pouvoir résister à des taux de charge organique et hydraulique élevés, offrant ainsi la possibilité de dégrader des substrats organiques complexes et difficilement hydrolysables (Jha *et al.*, 2017). Cependant, malgré le prétraitement préalable des boues granulaires issues du procédé de digestion anaérobie, les volumes morts au sein du bioréacteur peuvent conduire à une reprise de la méthanogénèse. A cet effet, et pour limiter les hétérogénéités locales liées à l'utilisation de boues granulaires, les bioréacteurs à lit expansé de boues granulaires ou EGSB (*Expanded Granular Sludge Blanket*) dont la vitesse ascendante de flux liquide est plus importante que pour les bioréacteurs UASB, ont été développés (Trably *et al.*, 2018). Enfin, le dernier type de bioréacteur à biomasse fixée est le bioréacteur à lit fluidisé ou AFBR (*Anaerobic Fluidized Bed Reactor*) (**Figure 2.3b**). Il repose sur l'immobilisation de la

biomasse productrice d'hydrogène sur un support externe pour créer un biofilm microbien. Ainsi, plusieurs auteurs ont immobilisé la biomasse à l'aide de billes d'argile, d'alginate, de morceaux de pneus broyés ou de granules de charbon actif (Munoz-Paez *et al.*, 2013).



**Figure 2.3.** Différents bioréacteurs alimentés en continu. (a) CSTR, (b) AFBR, (c) UASB, (d) UASB sans recirculation.

### 2.1.8.3 Système de mélange des bioréacteurs

Le mélange est une opération unitaire très importante dans tous les procédés biologiques. Cependant, son étude dans le cadre de la fermentation sombre est rare alors qu'il peut influencer les performances et les réactions biologiques de manière significative (Trad *et al.*, 2016). Le mélange au sein d'un bioréacteur doit assurer :

- ✓ La distribution homogène des bactéries dans l'ensemble du volume du bioréacteur ;
- ✓ L'uniformité et l'homogénéité des substrats organiques, des nutriments et des métabolites solubles ;
- ✓ La réduction des gradients de température et de pH ;
- ✓ La désorption du biogaz produit ( $H_2$  et  $CO_2$ ).

Afin de répondre à ces quatre critères, le mélange peut être assuré *via* une agitation mécanique, pneumatique, ou hydraulique.

### 2.1.8.3.1 Agitation mécanique

Le mélange induit par agitation mécanique est le plus couramment mis en œuvre lors du procédé de fermentation sombre, que ce soit à l'échelle du laboratoire ou à l'échelle industrielle. Ce système d'agitation implique l'utilisation d'une ou plusieurs turbines et hélices de tailles et de configurations variées (Trad *et al.*, 2016). De même, le système d'agitation est généralement coaxial, mais des systèmes inclinés ou excentriques peuvent être appliqués. Des systèmes à agitation latérale sont même utilisés pour la méthanisation.

De manière générale, une meilleure homogénéisation du milieu de culture, de meilleurs transferts de chaleur et de matière liquide-liquide et liquide-gaz sont obtenus en augmentant la vitesse d'agitation des mobiles. Toutefois, l'augmentation de la vitesse d'agitation implique une consommation énergétique plus importante pour alimenter le moteur électrique, ce qui peut être problématique pour la soutenabilité économique du procédé. Même si à l'heure actuelle aucune limite n'est établie concernant la viabilité de la fermentation sombre, les recommandations émises pour la soutenabilité du procédé de digestion anaérobie impliquent que la puissance dissipée par unité de volume ( $P/V$ ) de l'agitation ne dépasse pas  $8 \text{ W/m}^3$  (Lindmark *et al.*, 2014). Aussi, des niveaux importants d'agitation vont augmenter les contraintes de cisaillement au sein du bioréacteur. Cela peut avoir pour conséquence de perturber les associations syntrophiques entre microorganismes, mais également de désintégrer les agrégats microbiens (Hoffmann *et al.*, 2007, Lindmark *et al.*, 2014). A l'inverse, des conditions d'agitation à vitesse réduite ont permis de former des agrégats chez certaines souches de *Clostridium* sp., permettant ainsi de retenir plus facilement la biomasse dans les cultures continues en bioréacteur (Beckers, 2013)

### 2.1.8.3.2 Agitation pneumatique

L'agitation pneumatique est réalisée suite à la circulation d'un gaz inerte ou la recirculation du biogaz produit, à la base du bioréacteur. Le flux ascendant de gaz peut être appliqué de façon discontinue ou continue. Ce mode de mélange présente le double avantage de réduire le cisaillement au sein du bioréacteur et de diminuer la consommation énergétique nécessaire à l'usage de cette technologie en comparaison à l'agitation mécanique (Trad *et al.*, 2016). En revanche, le mélange des digestats à viscosité apparente importante ou à contenu en matières solides élevé, sera inefficace par le biais de l'agitation pneumatique.

2.1.8.3.3 Agitation hydraulique

La dernière alternative à l’agitation mécanique ou pneumatique est l’agitation hydraulique. Elle peut être induite par l’alimentation du milieu de culture et du substrat au cours de culture continue. Mais l’agitation hydraulique peut également être réalisée par la recirculation externe de ce même milieu de culture à l’aide d’une pompe, qui va permettre d’activer la circulation de la phase liquide du haut du bioréacteur vers la base de ce dernier.

Finalement, l’ensemble des modes d’agitation présentent des avantages et inconvénients différents en fonction du procédé utilisé (**Tableau 2.4**).

**Tableau 2.4.** Type d’agitation et leur effet sur les plusieurs paramètres du procédé de fermentation anaérobie (d’après Trad et al., 2016). AFBR (Anaerobic Fluidized Bed Reactor), AnMBR (Anaerobic Membrane BioReactor), ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor), CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), EGSB (Expanded Granular Sludge Blanket), STR (Stirred Tank Reactor), UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket).

Paramètre(s)	Agitation mécanique	Agitation hydraulique	Agitation pneumatique
Fluide visqueux/non-Newtonien	++	+	---
Forte concentration en solide	++	+	---
Solide de haute taille	+	+	---
Faible consommation énergétique	-	+	++
Faible cisaillement	-	+	++
Faible temps de mélange	+++	+	-
Bon transfert de matière	+++	+	-
Type de bioréacteur	STR, CSTR, ASBR, AnMBR	AFBR, UASB, EGSB	Réacteur airlift

2.1.8.4 Evaluation de l’efficacité du mélange

En règle générale, le coefficient volumétrique de transfert de matière  $k_L a$  décrit dans la **section 2.1.6** et le temps de mélange  $t_m$  sont utilisés pour évaluer l’efficacité du mélange du procédé de fermentation sombre. Le temps de mélange représente le temps nécessaire pour mélanger et homogénéiser une certaine quantité de traceur. Le  $t_m$  peut être déterminé par le biais de différentes techniques telles que la conductimétrie, la décoloration chimique et la PLIF (Fluorescence Induite par Nappe Laser) (Ascanio, 2015). Enfin, l’efficacité du mélange peut également être étudiée par le biais de la description de l’hydrodynamique locale au sein du

bioréacteur. Auquel cas, des techniques expérimentales telle que la PIV (Vélocimétrie par Images de Particules), ou numériques telle que la CFD (Mécanique des Fluides Numérique) peuvent être employées (Trad *et al.*, 2016).

## **Nomenclature**

### *Liste des symbols*

<i>He</i>	Constante de Henry (mol/m <sup>3</sup> /Pa)
<i>k<sub>L</sub>a</i>	Coefficient volumétrique de transfert de matière (h <sup>-1</sup> )
<i>P/V</i>	Puissance dissipée par unité de volume (W/m <sup>3</sup> )
<i>t<sub>m</sub></i>	Temps de mélange (h)

### *Abréviations*

<i>AGVs</i>	Acides Gras Volatils
<i>AFBR</i>	<i>Anaerobic Fluidized Bed Reactor</i>
<i>AnMBR</i>	<i>Anaerobic Membrane BioReactor</i>
<i>ASBR</i>	<i>Anaerobic Sequencing Batch Reactor</i>
<i>BHP</i>	<i>Biological Hydrogen Potential</i>
<i>C/N</i>	Rapport Carbone/Azote
<i>C/P</i>	Rapport Carbone/Phosphore
<i>CFD</i>	Mécanique des Fluides Numérique
<i>CSTR</i>	<i>Continuous Stirred Tank Reactor</i>
<i>DCO</i>	Demande Chimique en Oxygène
<i>EGSB</i>	<i>Expanded Granular Sludge Blanket</i>
<i>GSMBR</i>	<i>Gas Separation Membrane Bioreactor</i>
<i>NADH</i>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduite
<i>PIV</i>	Vélocimétrie par Images de Particules
<i>PLIF</i>	Fluorescence Induite par Nappe Laser
<i>STR</i>	<i>Stirred Tank Reactor</i>

<i>TSH</i>	Temps de Séjour Hydraulique
<i>UASB</i>	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
<i>VS</i>	<i>Volatile Solids</i>

### 2.1.9 Références bibliographiques

- H. Argun, F. Kargi, I.K. Kapdan, R. Oztekin (2008). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1813-1819.
- H. Argun, G. Onaran (2017). Effects of N/C, P/C, and Fe/C ratios on dark fermentative hydrogen gas production from waste paper towel hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 14990-150001.
- G. Ascanio (2015). Mixing time in stirred vessels: A review of experimental techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 23, 1065-1076.
- P. Bakonyi, G. Buitron, I. Valdez-Vazquez, N. Nemestothy, K. Bélafi-Bako (2017). A novel gas separation integrated membrane bioreactor to evaluate the impact of self-generated biogas recycling on continuous hydrogen fermentation. *Applied Energy*. 190, 813-823.
- S. Baroutian, M.T. Munir, J. Sun, N. Eshtiaghi, B.R. Young (2018). Rheological characterization of biologically treated and non-treated putrescible food waste. *Waste Management*. 71, 494-501.
- L. Beckers (2013). La production de biohydrogène par fermentation anaérobie : Voies d'optimisation et d'application du bioprocédé. Université de Liège. Belgique. Thèse. (*In french*).
- L. Beckers, J. Masset, C. Hamilton, F. Delvigne, D. Toye, M. Crine, P. Thonart, S. Hilgsmann (2015). Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochemical Engineering Journal*. 98, 18-28.
- M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 6713-6733.
- L. Cabrol, A. Marone, E. Tapia-Venegas, J.P. Steyer, G. Ruiz-Filippi, E. Trably (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*. 41, 158-181.
- M.F. Carosia, C.M. dos Reis, I.K. Sakamoto, M.B.A. Varesche, E.L. Silva (2017). Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 9600-9610.
- M.L. Chong, V. Sabaratnam, Y. Shirai, M.A. Hassan (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 3277-3287.
- A. Ciranna, R. Ferrari, V. Santala, M. Karp (2014). Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 6391-6401.
- I.C. Clark, R.H. Zhang, S.K. Upadhyaya (2012). The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production *via* anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37,11504-11513.

- G. d'Ippolito, L. Dipasquale, F.M. Vella, I. Romano, A. Gambacorta, A. Cutignano, A. Fontana (2010). Hydrogen metabolism in the extreme thermophile *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 2290-2295.
- P. Dessi, E. Porca, N.R. Waters, A.M. Lakaniemi, G. Collins, P.N.L. Lens (2018). Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidised bed reactors: Biohydrogen production and active microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 5473-5485.
- L. Dong, Y. Zhenhong, S. Yongming, K. Xiaoying, Z. Yu (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 812-820.
- E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H.S. Lee (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 79, 656-668.
- E. Elbeshbishy, H. Hafez, G. Nakhla (2010). Enhancement of biohydrogen producing using ultrasonication. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 6184-6193.
- H.M. El-Mashad, W.K.P. van Loon, G. Zeeman, G.P.A. Bot (2005). Rheological properties of dairy cattle manure. *Bioresource Technology*. 96, 531-535.
- O. Elsharnouby, H. Hafez, G. Nakhla, M.H. El Naggar (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 4945-4966.
- C. Escamilla-Alvarado, T. Ponce-Noyola, E. Rios-Leal, H.M. Poggi-Varaldo (2013). A multivariable evaluation of biohydrogen production by solid substrate fermentation of organic municipal wastes in semi-continuous and batch operation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 12527-12538.
- N. Eshtiaghi, F. Markis, D. Zain, K.H. Mai (2016). Predicting the apparent viscosity and yield stress of digested and secondary sludge mixtures. *Water Research*. 95, 159-164.
- A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. 144, 73-95.
- X.M. Guo, E. Trably, E. Latrille, H. Carrère, J.P. Steyer (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 10660-10673.
- F.R. Hawkes, R. Dinsdale, D.L. Hawkes, I. Hussy (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1339-1347.
- R.A. Hoffmann, M.L. Garcia, M. Veskivar, K. Karim, M.H. Al-Dahhan, L.T. Angenent (2007). Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. *Biotechnology and Bioengineering*. 100, 38-48.
- M.D.S. Islam, C. Zhang, K.Y. Sui, C. Guo, C.Z. Liu (2017). Coproduction of hydrogen and volatile fatty acid via thermophilic fermentation of sweet sorghum stalk from co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 830-837.
- G. Ivanova, G. Rakhely, K.L. Kovacs (2009). Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 3659-3670.
- T. Jarunglumlert, C. Prommuak, N. Putmai, P. Pavasant (2018). Scaling-up bio-hydrogen production from food waste: Feasibilities and challenges. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 634-648.



- P. Jha, E.B. Gueguim Kana, S. Schmidt (2017). Can artificial neural network and response surface methodology reliably predict hydrogen production and COD removal in an UASB bioreactor? *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 18875-18883.
- X. Jia, Y. Chen, C. Shi, Y. Ye, M. Abid, S. Jabbar, P. Wang, X. Zeng, T. Wu (2014). Rheological properties of an amorphous cellulose suspension. *Food Hydrocolloids*. 39, 27-33.
- M. Junghare, S. Subudhi, 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, 3160-3168.
- S. Kim, K. Choi, J.O. Kim, J. Chung (2013). Biological hydrogen production by anaerobic digestion of food waste and sewage sludge treated using various pretreatment technologies. *Biodegradation*. 24, 753-764.
- M. Kisielewska, M. Debowski, M. Zielinski (2015). Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38, 1925-1933.
- G. Kumar, P. Sivagurunathan, B. Sen, A. Mudhoo, G. Davila-Vasquez, G. Wang, S.H. Kim (2017). Research and development perspectives of lignocellulose-based biohydrogen production. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 119, 225-238.
- K.S. Lee, T.S. Tseng, Y.W. Liu, Y.D. Hsiao (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15556-15562.
- C.Y. Lin, R.C. Chang (2004). Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29, 715-720.
- J. Lindmark, E. Thorin, R. Bel Fdhila, E. Dahlquist (2014). Effect of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40, 1030-1047.
- G.J. Liu, Y. Liu, Z.Y. Wang, Y.H. Lei, Z.A. Chen, L.W. Deng (2015). The effects of temperature, organic matter and time-dependency on rheological properties of dry anaerobic digested swine manure. *Waste Management*. 38, 449-454.
- J. Liu, D. Yu, J. Zhang, M. Yang, Y. Wang, Y. Wei, J. Tong (2016). Rheological properties of sewage sludge during enhanced anaerobic digestion with microwave-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment. *Water Research*. 98, 98-108.
- Y. Liu, Y. Wang (2017). Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 4095-4101.
- Y.C. Lo, M.D. Bai, W.M. Chen, J.S. Chang (2008). Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. *Bioresource Technology*. 99, 8299-8303.
- B. Mandal, K. Nath, D. Das (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*. 28, 831-835.
- P.C.B. Martin, M. Schlien, M. Greger (2017). Production of bio-hydrogen and methane during semi-continuous digestion of maize silage in a two-stage system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 5768-5779.
- O. Mizuno, R. Dinsdale, F.R. Hawkes, D.L. Hawkes, T. Noike (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*. 73, 59-65.
- I. Moreno-Andrade, J. Carrillo-Reyes, S.G. Santiago, M.C. Bujanos-Adame (2015). Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40, 17246-17252.



- V.T. Mota, A.D.N. Ferraz Junior, E. Trably, M. Zaiat (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Research*. 128, 350-361.
- K.M. Munoz-Paez, N. Ruiz-Ordaz, J. Garcia-Mena, M.T. Ponce-Noyola, A.C. Ramos-Valdivia, I.V. Robles-Gonzalez, L. Villa-Tanaca, J. Barrera-Cortes, N. Rinderknecht-Seijas, H.M. Poggi-Varaldo (2013). Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35°C. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 12570-12579.
- K. Nath, A. Kumar, D. Das (2006). Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Canadian Journal of Microbiology*. 52, 525-532.
- T.A. Ngo, M.S. Kim, S.J. Sim (2011). Thermophilic hydrogen fermentation using *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 by fed-batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36, 14014-14023.
- T.A.D. Nguyen, S.J. Han, J.P. Kim, M.S. Kim, S.J. Sim (2010). Hydrogen production of the hyperthermophilic eubacterium, *Thermotoga neapolitana* under N<sub>2</sub> sparging condition. *Bioresource Technology*. 101, 38-41.
- A. Noblecourt, G. Christophe, C. Larroche, P. Fontanille (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*. 247, 864-870.
- A. Noblecourt, G. Christophe, C. Larroche, G. Santa-Catalina, E. Trably, P. Fontanille (2017). High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 24656-24666.
- H. Petrosyan, L. Vanyan, A. Trchounian, K. Trchounian (2018). Biohydrogen production by *Escherichia coli* during dark fermentation: Novel properties of different subunits in hydrogenases 3 and 4 depending on glucose concentration. Congress: 22<sup>nd</sup> World Hydrogen Energy Conference, Rio de Janeiro. Brazil.
- B. Ruggeri, T. Tommasi (2012). Efficiency and efficacy of pre-treatment and bioreactors for bio-H<sub>2</sub> energy production from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 6491-6502.
- P. Sinha, A. Pandey (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36, 7460-7478.
- P. Sivagurunathan, B. Sen, C.Y. Lin (2014). Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 19232-19241.
- Z.X. Song, Y. Dai, Q.L. Fan, X.H. Li, Y.T. Fan, H.W. Hou (2012). Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 5631-5636.
- Y. Sun, J.P. Zhuang, L. Lin, P.K. Ouyang (2009). Clean conversion of cellulose into fermentable glucose. *Biotechnology Advances*. 27, 625-632.
- J. Tang, Y. Yuan, W.Q. Guo, N.Q. Ren (2012). Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinense* B49. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 741-747.
- E. Trably, G. Christophe, E. Latrille, C. Larroche (2018). Production de bio hydrogène : Voie fermentaire sombre. Techniques de l'Ingénieur. BIO3351 v2. Editor: Lavoisier. France. (*En français*).
- Z. Trad, J. Akimbomi, C. Vial, C. Larroche, M.J. Taherzadeh, J.P. Fontaine (2015b). Development of a submerged anaerobic membrane bioreactor for concurrent extraction of volatile fatty acids and biohydrogen production. *Bioresource Technology*. 196, 290-300.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable Energy*. 98, 264-282.

- Z. Trad, C. Vial, J.P. Fontaine, C. Larroche (2015a). Modeling of hydrodynamics and mixing in a submerged membrane bioreactor. *Chemical Engineering Journal*. 282, 77-90.
- Z. Trad, C. Vial, J.P. Fontaine, C. Larroche (2017). Mixing and liquid-to-gas mass transfer under digester operating conditions. *Chemical Engineering Journal*. 170, 606-627.
- K. Trchounian, R.G. Sawers, A. Trchounian (2017). Improving biohydrogen productivity by dark- and photo-fermentations: Novel data and future approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 80, 1201-1216.
- A.A. Tsygankov, E.A. Minakov, N.A. Zorin, K.S. Gosteva, O.G. Voronin, A.A. Karyakyn (2007). Measuring the pH dependence of hydrogenase activities. *Biochemistry (Moscow)*. 968-973.
- K. Urbaniec, R.R. Bakker (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40, 3648-3658.
- I. Valdez-Vasquez, E. Rios-Leal, F. Esparza-Garcia, F. Cecchi (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30, 1383-1391.
- E.W.J. van Niel, P.A.M. Claassen, A.J.M. Stams (2002). Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 81, 255-262.
- S. van Ginkel, B.E. Logan (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental Science and Technology*. 39, 9351-9356.
- S. Venkata Mohan, P. Chiranjeevi, G. Mohanakrishna (2012). A rapid and simple protocol for evaluating biohydrogen production potential (BHP) of wastewater with simultaneous process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 3130-3141.
- B. Wang, W. Wan, J. Wang (2008a). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 7013-7019.
- J. Wang, Y. Yin (2017). Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 4804-4823.
- X. Wang, N. Tang, Y. Guan, C. Feng, Y. Zhao, H. Sun, J. Cai (2018). Hydrogen production from shrimp mariculture waste based on sludge pretreatment by heating. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 9591-9598.
- Y. Wang, Q.B. Zhao, Y. Mu, H.Q. Yu, H. Harada, Y.Y. Li (2008b). Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1164-1171.
- Y.B. Wang, R.J. Li, W.W. Li, Y. Fan, H.W. Hou (2012). Effects of pretreatment of natural bacterial source and raw material on fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 831-836.
- J.F. Xu, Y.T. Mi, N.Q. Ren (2016). Buffering action of acetate on hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49. *Electronic Journal of Biotechnology*. 23, 7-11.
- R. Zagrodnik, M. Laniecki (2017). The effect of pH on cooperation between dark- and photo-fermentative bacteria in a co-culture process for hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 2878-2888.
- S.C. Zhang, Q.H. Lai, Y. Lu, Z.D. Liu, T.M. Wang, C. Zhang, X.H. Xing (2016). Enhanced biohydrogen production from corn stover by the combination of *Clostridium cellulolyticum* and hydrogen fermentation bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 122, 482-487.

- Y. Zhang, G. Liu, J. Shen (2005). Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30, 855-860.
- Y. Zhang, F. Zhang, M. Chen, P.N. Chu, J. Ding, R.J. Zeng (2013). Hydrogen supersaturation in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. *Applied Energy*. 109, 213-219.
- X.J. Zheng, H.Q. Yu (2005). Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *Journal of Environmental Management*. 74, 65-70.

## 2.2 Modeling and simulation of the biohydrogen production processes

B. Chezeau<sup>1,2</sup>, J.P. Fontaine<sup>1,2</sup>, Ch. Vial<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, LabEx IMobS<sup>3</sup>, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

### Abstract

This chapter summarizes the recent advances in the modeling of biohydrogen production processes, *i.e.*, photo-fermentation and dark fermentation. The different strategies that can be applied for the design, scale-up or optimization of the corresponding bioreactors are reviewed, with their requirements that may strongly differ. First, black-box models are depicted, which include both empirical equations and various statistical approaches, from the conventional design of experiments methodology to advanced techniques, such as artificial neural networks. For semi-empirical modeling, biokinetic models usually coupled to the assumption of ideal reactor are summarized from unstructured to structured approaches. Then, integrated bioreactor models able to account for local heterogeneity are compared: these encompass non-ideal and compartmental models, but also three-dimensional modeling based on *Computational Fluid Dynamics* (CFD), as well as population balance models to discriminate cell populations. Finally, the closing discussion summarizes the benefits and challenges related to these simulation strategies, as well as their respective shortcomings.

**Keywords:** Bioreactor modeling; Biogas production; Biokinetic model; Dark fermentation; Hydrodynamic reactor model; Integrated bioreactor model; Photo-fermentation; Statistical bioreactor model.

### 2.2.1 Introduction

Biohydrogen, *i.e.*, hydrogen produced biologically, presents the advantages to be a renewable, sustainable and environment-friendly resource. It constitutes an alternative to steam methane reforming for use in fuel cells as power sources or can be mixed with methane for green home supply or as biofuels. Biohydrogen production processes from biomass or organic waste can be divided into two main families: namely, *acidogenic fermentation*, also denoted as *dark fermentation* (DF), and *photo-fermentation* (PF). Both of them are key technologies for biomass valorization that can be included in biorefinery strategies, as they are able to produce a biogas consisting mainly of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. However, it must be pointed out that even if several simulators for biogas production through anaerobic digestion are commercialized now, none of them are available for biohydrogen. The first reason is that biohydrogen production processes are less mature than anaerobic digestion; another reason is that there is a lack of robust models for DF and PF. Thus as various technologies of bioreactors have been developed recently to produce biohydrogen, a big challenge remains to establish reliable modeling methodologies and simulation tools for the design, scale-up, comparison, or the optimization of these bioreactors, so as to save developmental time and costs, and cut the needs for expensive experimental investigation.

In this chapter, the fundamental aspects of biohydrogen production processes, as well as the respective specificities of DF and PF that must be considered in the modeling and the simulation of these biohydrogen production processes, are summarized first. Then, the various strategies that can be applied for the prediction of biohydrogen yield and productivity are reviewed and discussed with the aim to highlight their respective advantages and limitations in relation to objectives, among which the optimization of an existing bioreactor, or the design of a new one. The review of the various modeling strategies includes, first, *black-box bioreactor models*, such as empirical equations and statistical approaches, from the simplest that can only predict hydrogen production to the most advanced that could be used for bioreactor control. Then, *semi-empirical models* are addressed. This usually implies an *ideal bioreactor* (*e.g.*, a perfectly-mixed homogeneous and uniform reactor) in which conventional formal biokinetic models are applied at the reactor-scale to predict not only hydrogen production rate, but also

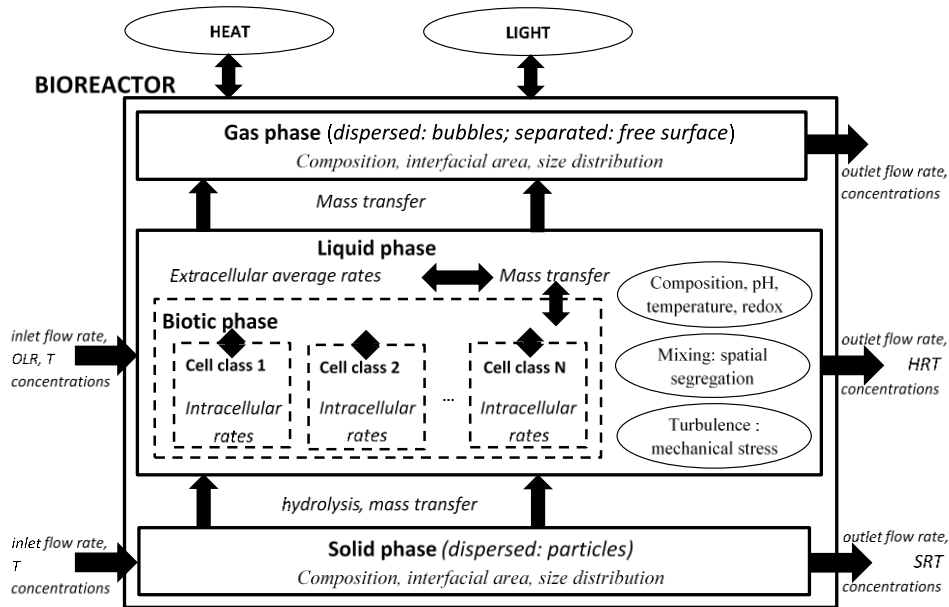
substrate consumption and growth rates. The transition from semi-empirical to advanced *integrated bioreactor models* covers several assumptions. Among them, the most common are:

- ✓ *Segregated models*, which account for the heterogeneity of microbial populations;
- ✓ *Distributed models* that consider transport processes, the spatial heterogeneity of concentrations, and sometimes multiphase flows;
- ✓ *Structured models* that distinguish intracellular and extracellular processes;
- ✓ Any combination of the three previous assumptions.

A comparison of these strategies is drawn at the end of this chapter, with a focus on distributed models, often used *integrated bioreactor models*. These encompass non-ideal and compartmental models but have also benefited from the development of *Computational Fluid Dynamics* (CFD), as CFD is able to account for transient, three-dimensional, and separated or dispersed multiphase reactive flows coupled with mass, heat, and even light transfer. Even though a strategy coupling structured and segregated models to CFD remains in the future for DF and PF, CFD coupled with a *population balance* approach accounting for cell age, size, or type is also addressed. Finally, the benefits, challenges, and perspectives related to all the modeling strategies described in this work, as well as their respective shortcomings are critically discussed.

### 2.2.2 Fundamental aspects of biohydrogen production processes

Dark fermentation and photo-fermentation, as most of biochemical processes, are intrinsically multiphase and multi-species processes, involving multistep kinetically or thermodynamically limited mass transfer and reaction steps. A schematic representation of the complex interplay between these physical, chemical, and biological processes is depicted in **Figure 2.4** for a generic continuous bioreactor.



**Figure 2.4.** Schematic representation of the multiphase and multiscale properties of bioreactors in the biohydrogen production processes.

For modeling purpose, this interplay must be expressed mathematically by a set of ordinary differential equations (ODE) or partial derivative equations (PDE), often coupled with algebraic equations (AE) that describe conservation laws (mass balance for each species in each phase, first law of thermodynamics) and chemical equilibria, at the molecular and microscopic scales. This set of equations must, however, be related to macroscopic operating parameters at the bioreactor scale, which are the inputs and the outputs of the model in any modeling and simulation methodology. For DF or PF, these inputs include:

- ✓ *In the bioreactor:* namely, the initial conditions (batch mode), and the operating temperature and pH (when controlled); some inputs may be reactor-dependent, such as stirring speed in mechanically stirred tanks; in PF, light radiation power must also be accounted for;

- ✓ *At the inlet for a continuous bioreactor:* the hydraulic retention time (HRT, replaced by culture time under batch conditions), and the organic loading rate (OLR), which hinders two key parameters: namely, substrate content and composition. When continuous solid recirculation is applied, the solids retention time (SRT) can be dissociated from HRT and operated independently, with  $SRT \gg HRT$ .

The main outputs are the composition of the liquid phase, the hydrogen production rate (or hydrogen productivity), the composition of the gas phase, and hydrogen yield (mol H<sub>2</sub>/mol hexose equivalent in the substrate).

In practice, as it emerges from **Figure 2.4**, a complete mathematical description of all the processes involved in DF or PF at the molecular scale is far too complex and cannot be reached for many reasons, including limited knowledge of the intracellular and microscopic processes, but also because of the limitations in CPU (Central Processing Unit) usage and computation time if spatial maldistribution and microbial diversity could be both accounted for. Thus, only simplified models have been used for biohydrogen production processes, more or less refined, among which the most common are by decreasing order of complexity:

- ✓ Spatially-distributed models with unstructured kinetics, usually non-segregated;
- ✓ Unstructured kinetic models, in general, non-distributed and non-segregated;
- ✓ Unstructured non-segregated and non-distributed models, disregarding all heterogeneities, which encompass kinetic and statistical models.

However, none of these approaches have received a general acceptance for simulating hydrogen production rate, but these simplifications can be explained as follows. First, **Figure 2.4** highlights that biomass growth, substrate utilization, as well as product formation, including hydrogen gas, result not only from intracellular biological processes, but also from the mass transfer rates between microorganisms and their local environment. This view is expressed by a *structured* approach among which the most common is the *metabolic flux analysis* (MFA), able to determine the main metabolic pathway based on an optimal criterion (maximum growth) using stoichiometric and energy constraints (ATP/ADP ratio, H<sup>+</sup> and e<sup>-</sup> transport by NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH). This approach is also able to predict metabolic switches as a function of extracellular changes. Such a model, although attractive, has only been scarcely used in DF and PF because its application is limited to pure cultures in which all the cells are assumed to behave similarly, whereas PF and DF can be driven using either pure or mixed cultures in which productivity may vary with cell ageing. The main reason is the need to limit the number of unknown parameters. Another limitation is that MFA is often used with the assumption of a pseudo-homogeneous culture medium, in which the multiphase character and the spatial distribution of extracellular concentrations, pH or temperature are neglected using only spatial-



average data to achieve reasonable computational times. As a result, while cells interact locally with their microenvironment in an industrial bioreactor, MFA considers an “average cell” in interaction with a volume-average environment. Finally, the last limitation of the MFA approach is that it can deal with a limited number of substrates, usually a unique simple substrate, such as glucose or acetate in the literature. As a conclusion, conventional structured models only assume a two-phase system with a homogeneous *biotic phase* in which bioreactions proceed and a uniform liquid phase containing a single substrate and extracellular metabolites. In practice, MFA has been more often applied to DF because biohydrogen production can be achieved through several main pathways, in competition with alternative pathways that do not produce hydrogen (Figure 2.5).

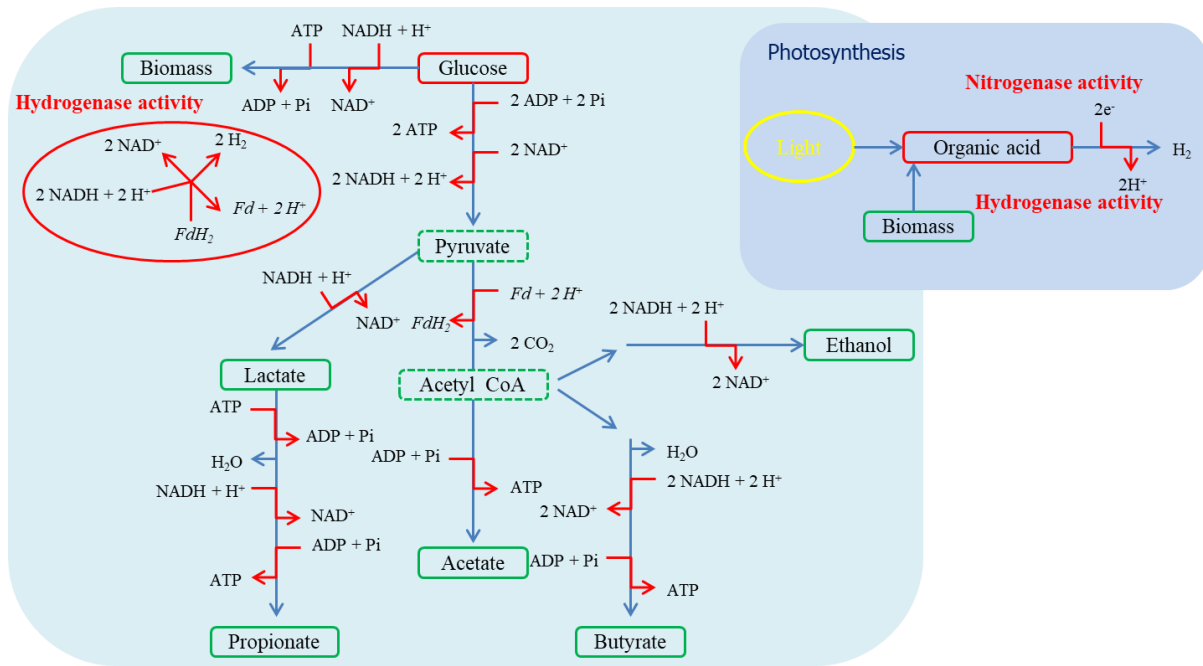
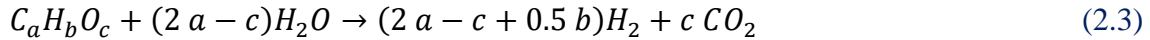


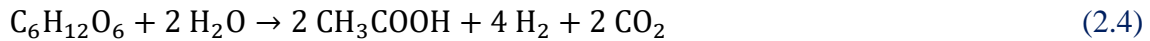
Figure 2.5. Example of metabolic pathways of hydrogen production from glucose in dark fermentation (adapted from Batstone et al., 2002) and in photofermentation (adapted from Hallenbeck and Benemann, 2002).

The most common alternative to structured models, the *unstructured* approach, considers the opposite situation in which the biotic phase and the liquid medium are confounded so that only “apparent” extracellular mechanisms can be estimated. In this case, formal kinetics can be applied, taking into account inhibitions (mainly by pH, products, fatty acids, nitrogen or phosphorus, but also metals, etc., as highlighted by Elbeshbishy et al., 2017). This approach is, therefore, not able to predict metabolic switches, and only apparent kinetic and equilibrium

processes can be assumed, which usually leads to the reduction of complex biochemical mechanisms to a set of a few equations and adjustable kinetic rate constants. For example, PF is usually limited to wastewater treatment, so that for fatty acids, ethanol or sugars, reaction stoichiometry can be reduced to:



Thus, only the values of reaction rate constants can show that PF is more efficient using organic acids than sugars as the substrate. The same method can be applied for DF, even though its mechanism is more complex. This is close to anaerobic digestion in which methanogenesis has been suppressed. So only two metabolic pathways can usually produce biohydrogen (namely, the acetate and the butyrate pathways), which can be described from hexose as follows:



Alternatively, the most advanced unstructured models correspond to *distributed approaches* and account for the multiphase character of the flow in bioreactors and concentration maldistribution due to poor mixing at least in the culture medium. However, for PF, **Figure 2.4** can be simplified, as this process is usually limited to the treatment of liquid effluents so that the suspended solid phase can be neglected. Conversely, **Figure 2.4** is even over-simplified for DF. Even though DF has been applied first in wastewater treatment plant chains, not only to improve water quality but also for its contribution to the energy balance of water treatment processes, this process can also treat various organic feedstocks, which encompass food waste and agrowaste, or algal and microalgal biomass. This means that a particulate phase of various composition, size, and density can settle, float, or be suspended in the liquid phase, leading both to small- and large-scale inhomogeneity. Finally, DF and PF also present a similar issue in terms of the modeling of the biogas; this is more complex than displayed in **Figure 2.4** in which the gas phase seems confounded with the headspace of the bioreactor. Actually, gas production does not only result from the biogas desorption through the free gas-liquid interface, but also from bubble nucleation within the liquid medium due to the local supersaturation of the dissolved gas. This means that a dispersed bubbly phase should also be accounted for. Actually, no information is available in the

literature on this dispersed gas phase, as culture media are usually opaque, so that the mass balance on any gas species  $i$  in a uniform headspace is usually expressed as:

$$\frac{dG_i}{dt} \cdot V_H = k_L a \cdot (\langle C_i \rangle - P_i H_i) \cdot V_L + G_i \cdot \dot{G}_{out} \quad (2.6)$$

where  $G_i$  is the concentration of gas  $i$  in the headspace (mol/m<sup>3</sup>),  $\langle C_i \rangle$  is the volume-average concentration of  $i$  in the liquid phase (mol/m<sup>3</sup>),  $\dot{G}_{out}$  is the outlet gas flow rate (m<sup>3</sup>/s),  $P_i$  is the partial pressure of  $i$ , and  $H_i$  is the Henry's law solubility constant of species  $i$ , while  $V_H$  and  $V_L$  are the volume of the headspace and liquid phase, respectively. In **Equation 2.6**,  $k_L a$ , the volumetric mass transfer coefficient (s<sup>-1</sup>, but usually expressed in h<sup>-1</sup>) is the product of  $k_L$  (m.s<sup>-1</sup>), the mass transfer coefficient, which is a function of gas diffusivity and mixing conditions, and of  $a$  (m<sup>-1</sup>), the interfacial area, which is the gas surface-to-liquid volume ratio. Even though theoretical models can predict  $k_L$  (such as the Whitman's two-film model or the Higbie model), the contribution of bubbles to  $a$  is difficult to estimate and, as a result,  $k_L a$  must usually be deduced from correlations or estimated empirically. In the liquid phase, a spatial distribution of pH and concentrations implies that a set of PDE must be used to describe mathematically the transport of soluble species  $i$ . For the sake of simplicity, a typical local transport equation of the local concentration  $C_i$  of species  $i$  vs. time  $t$  is reported below only in the Cartesian frame ( $x, y, z$ ):

$$\begin{aligned} \varepsilon_L \frac{\partial C_i}{\partial t} + \varepsilon_L v_{Lx} \frac{\partial C_i}{\partial x} + \varepsilon_L v_{Ly} \frac{\partial C_i}{\partial y} + \varepsilon_L v_{Lz} \frac{\partial C_i}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial x} \left( \varepsilon_L D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left( \varepsilon_L D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial y} \right) + \\ \frac{\partial}{\partial z} \left( \varepsilon_L D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) + \sum_j \varepsilon_L r_{ij} \end{aligned} \quad (2.7)$$

In this PDE,  $v_{Lk}$  is the local liquid velocity in the  $k$ -direction,  $D_{L,i}$  is the diffusion coefficient of species  $i$  in the liquid phase, and  $r_{ij}$  is the  $j^{th}$  physical, biological, or chemical process rate that produces/consumes/transfers species  $i$ , while  $\varepsilon_L$  is the volume fraction of the liquid phase. For any process  $j$ ,  $r_{ij} > 0$  when the species  $i$  is produced or transferred to the liquid phase, while  $r_{ij} < 0$  when the species is a substrate transferred from the liquid phase. It must be pointed out that PDE systems are far more expensive to solve than AE or explicit ODE systems. Similar equations could be written for a dispersed solid and a bubbly dispersed phase with  $\sum \varepsilon_i = 1$  for two or three phases. It must be pointed out that  $v_{Lk}$ ,  $C_i$ ,  $\varepsilon_L$ , but also the process rates  $r_{ij}$  in **Equation 2.7** depend on time and on the three spatial coordinates. Among the processes that can be either thermodynamically or kinetically limited by chemical or physical phenomena, the

dissolution of solid compounds occupies a privileged place, as it can be described by a partition coefficient  $K_i = C_i / X_i$ , or by a rate-limiting step corresponding to the kinetics of hydrolysis  $r_{ij} = f(X_i)$  or to the kinetics of solid-liquid mass transfer described using the same mathematical form as in **Equation 2.6**:

$$|r_{ij}| = k_d a_d (K_i X_i - C_i) \quad (2.8)$$

in which  $X_i$  is the concentration of  $i$  in the solids. Conversely, if a pseudo-homogeneous liquid phase is considered (when there is no solid phase, or when a slurry phase is considered in which the solid is uniformly dispersed), **Equation 2.7** reduces to:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + v_{Lx} \frac{\partial C_i}{\partial x} + v_{Ly} \frac{\partial C_i}{\partial y} + v_{Lz} \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{L,i} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) + \sum_j r_{ij} \quad (2.9)$$

When volume-averaging is applied on any subvolume of the bioreactor, an ODE is derived from **Equation 2.9**, which makes numerical computations quite less expensive:

$$\frac{d\langle C_i \rangle}{dt} + \sum_k \dot{L}_{out,k} \cdot \langle C_i \rangle_{out,k} = \sum_k \dot{L}_{in,k} \cdot \langle C_i \rangle_{in,k} + \sum_j r_{ij}(\langle C_i \rangle) \quad (2.10)$$

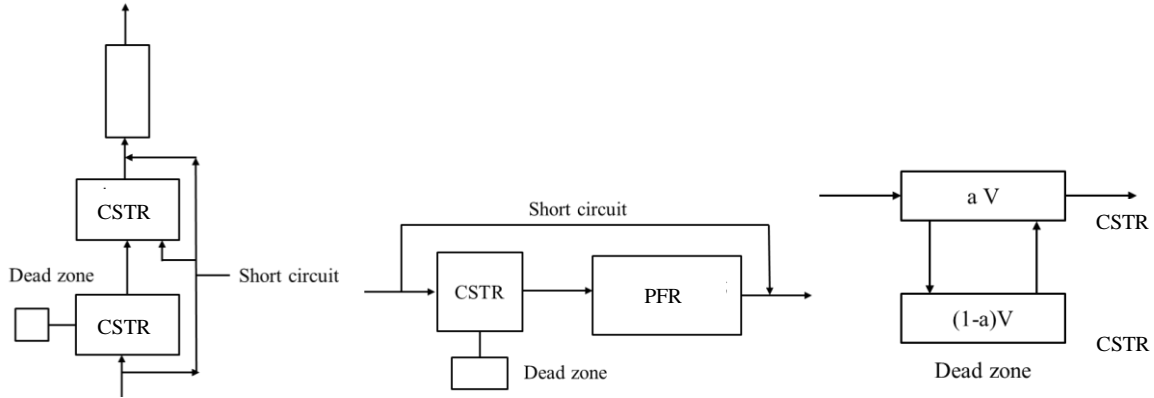
In **Equation 2.10**, the subscripts *in* and *out* mean “at the inlet” and “at the outlet”, respectively;  $\langle C_i \rangle$  is a volume-average concentration in the subvolume,  $\dot{L}_k$  is an incoming or outgoing liquid flow rate (m<sup>3</sup>/s), and  $\langle C_i \rangle_{in,k}$  and  $\langle C_i \rangle_{out,k}$  the concentrations of  $i$  in the  $k^{\text{th}}$  inlet and outlet flow streams. With the assumption of perfect mixing in a subvolume,  $\langle C_i \rangle = \langle C_i \rangle_{out}$  is uniform and **Equation 2.10** becomes:

$$\frac{d\langle C_i \rangle_{out}}{dt} + \sum_k \dot{L}_{out,k} \cdot \langle C_i \rangle_{out,k} = \sum_k \dot{L}_{in,k} \cdot \langle C_i \rangle_{in,k} + \sum_j r_{ij}(\langle C_i \rangle_{out}) \quad (2.11)$$

**Equation 2.11** corresponds to the well-known ideal *continuous stirred tank reactor* (CSTR) approximation. When the CSTR assumption is applied to the whole bioreactor, a non-distributed model is finally obtained, which can be simulated using ODE only, which corresponds to the *ideal CSTR*, i.e., the *perfectly mixed reactor*. Another approximation leading to an alternative ideal reactor, the *plug flow reactor* (PFR), is obtained using a surface-averaging technique on the  $x - y$  plane with only one inlet and one outlet stream. Thus,  $C_i(t, z)$  is defined as:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + v_{Lz} \frac{\partial C_i}{\partial z} = \sum_j r_{ij}(C_i) \quad (2.12)$$

However, contrary to **Equation 2.11**, a PFR corresponds to a 1-D distributed model and leads to PDE. When the bioreactor is divided in several CSTR or PFR connected by a set of flow rates  $\dot{L}_k$ , this defines a *non-ideal bioreactor models*. Typical examples of non-ideal bioreactor models combining CSTR and PFR can be found in **Figure 2.6**.



**Figure 2.6.** Examples of non-ideal bioreactor models.

Segregated models, which account for the inhomogeneity of the microbial population can be coupled to distributed models but can also be used with the ideal CSTR assumption. Segregated models may include several species of microorganisms that act in parallel, which is useful to simulate mixed cultures. However, a generalized form of segregated models corresponds to *population balance models* (PBM) that divide the microbial population in classes described by one or several continuous properties (size, age, *etc.*). For the sake of simplicity, the following example describes only a population balance based on cell size  $l$  as the unique class property; in this case, the population balance equation expresses the evolution of the probability density function  $f(t, x, y, z, l)$  of cell size as a function of the probability of cell division  $g(l)$ , the probability  $p(l, l')$  to form a cell of size  $l$  by the division of a cell of size  $l'$ , and the growth rate  $\dot{l}$  of cells of size  $l$ :

$$\frac{\partial f}{\partial t} + v_{Lx} \frac{\partial f}{\partial x} + v_{Ly} \frac{\partial f}{\partial y} + v_{Lz} \frac{\partial f}{\partial z} + \frac{\partial l \cdot f}{\partial l} = 2 \int f(l') \cdot g(l') \cdot p(l, l') \cdot dl' - g(l) \cdot f(l) \quad (2.13)$$

Even if a volume-average technique or the ideal CSTR assumption is used, population balance models always include at least one PDE as a function of time  $t$  and size  $l$ . Several

methods can be used to solve this equation, among them the most common involve the calculations of a discrete number of classes (which need numerical tricks to ensure mass conservation), or the estimation of the statistical moments of  $f$ . However, the main issue of this approach consists in the estimation of  $p(l, l')$  and  $g(l)$ . **Equation 2.13** is, however, simpler when cell age  $\tau$  is the property described by  $f(t, x, y, z, \tau)$  and  $p(\tau, \tau') = 0$ , while the growth rate of  $\tau$  is  $\dot{\tau} = 1$ .

Finally, a simple way of modeling either DF or PF consists in an ideal CSTR approximation which disregards the complex framework of **Figure 2.4**, considering only a pseudo-homogeneous uniform phase in the bioreactor without microorganism segregation, which operates either under batch or steady state conditions and in which only growth, substrate uptake, and hydrogen production are considered. But the simplest way corresponds to *black-box* bioreactor models in which metabolism, chemical equilibria, and mass transfer limitations are neglected. Generally, only the hydrogen production rate is fitted as a function of “*system inputs*” by either a specific phenomenological equation, or any statistical models dedicated to optimization or reactor control. Thus only a set of AE describes biohydrogen production processes. However, even the predictions of advanced black-box models are valid only in the variation-interval of each input parameter used to fit their adjustable coefficients; so they are never robust against scale-up.

### 2.2.3 Black-box empirical and statistical bioreactor models

These models are based on purely mathematical equations that are able to fit experimental data by linear or non-linear regression, such as the *modified Gompertz equation*, or the *modified logistic equation*, but they also include generalized linear models or advanced statistical modeling techniques able to describe any complex process.

#### 2.2.3.1 Modified Gompertz equation

The modified Gompertz model, developed by Zwietering *et al.* (1990), is a sigmoid function able to describe microorganism or tumor growth. It has been extensively used to describe batch biohydrogen production, independently from substrate type and concentration. It is expressed as:

$$H(t) = H_{max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{max} \cdot \exp(1)}{H_{max}} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2.14)$$

where  $H(t)$  is the cumulative hydrogen production at time  $t$  (usually expressed in mL and h, respectively),  $H_{max}$  is the hydrogen production potential of the substrate (mL),  $R_{max}$  is the maximum production rate (mL/h), and  $\lambda$  is the lag time (h). Theoretically, substrate concentration, the concentration of any product, or the growth of hydrogen-producing bacteria can be described, but only hydrogen volume  $H(t)$  is usually simulated, so that  $H_{max}$ ,  $R_{max}$ , and  $\lambda$  can be fitted using non-linear regression. The fitted parameters can be used to compare and optimize culture media and operating conditions. The Gompertz model presents the advantage to be simple, easy to use, and to fit correctly experimental data, but  $H_{max}$  and  $R_{max}$  depend on substrate concentration and it cannot be used to fit continuous steady or dynamic processes.

### 2.2.3.2 Modified logistic model

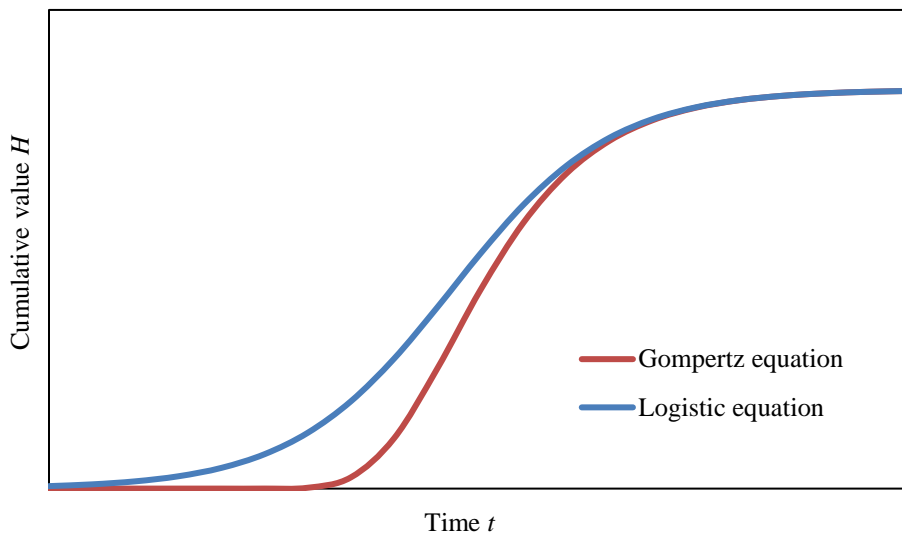
As the Gompertz equation, the logistic function also fits a sigmoid curve, but the modified model adds a lag time  $\lambda$  to account for a latency phase, as in the modified Gompertz model. Thus, for bacterial growth, it is expressed as:

$$H(t) = \frac{H_{max}}{1 + \exp \left[ 4R_{max} \cdot \frac{(\lambda - t)}{H_{max} + 2} \right]} \quad (2.15)$$

where  $H(t)$  and  $H_{max}$  are the cumulative production at time  $t$  and the hydrogen production potential achieved in the stationary phase, respectively;  $R_{max}$  is the maximum production rate. **Equation 2.15** was applied by Wang *et al.* (2008a) to describe hydrogen production and the growth of hydrogen-producing bacteria using glucose as the substrate in batch tests. Wang *et al.* (2008b) also proposed a modified expression inspired by the Gompertz equation to describe hydrogen production using synthetic wastewater in the presence of acetate as the substrate, as follows:

$$H = \frac{H_{max}}{1 + \exp \left[ - \left[ \frac{R_{max} \cdot \exp(1)}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right]} \quad (2.16)$$

Shortly, this model presents the same advantages and suffers from the same limitations as the modified Gompertz equation. A comparative plot of the Gompertz and the logistic equations is displayed in **Figure 2.7**.



**Figure 2.7.** Comparison of Gompertz (Equation 2.14) and logistic (Equation 2.16) equations using  $H_{max} = R_{max} = 1$  and  $\lambda = 1.5$ .

### 2.2.3.3 Statistical models

Statistical modeling encompasses several families of models that can fit several objectives. First, they are often used to define the most influent parameters and to develop optimization strategies for biohydrogen production. The main methods involved in this case include the *design of experiments* (DOE) methodology, in particular, *factorial designs* and *response surface methodology* (RSM). Statistical tools, such as *principal component analysis* (PCA), can also be used to define pseudo-stoichiometric coefficients when complex feedstock is used as the substrate for microorganism growth. All these methods correspond to *generalized linear models* and need to fit the adjustable coefficients from experimental data using linear algebra. More advanced statistical tools can be used for optimization and dynamic process control, such as statistical learning models, which include non-linear *artificial neural networks* (ANN), usually coupled to *genetic algorithms* (ANN-GA) to fit the adjustable coefficients. As all the black-box bioreactor models previously described, their main objective is to establish a relationship between the inputs and the outputs without any physical analysis or detailed description of the processes involved (metabolism, transport phenomena, *etc.*). However, a preliminary step consists in defining the parameters to be investigated. These correspond to the inputs reported in **section 2.2.2**, but at the bench scale, microorganisms and the composition of the inoculum have also been widely reported in the literature.



2.2.3.3.1 Models deriving from the “Design of Experiments” (DOE) methodology

DOE constitutes a branch of statistics aimed at maximizing the useful information extracted from experimental data, while minimizing the size of the data set. An experimental design describes a planned approach based on a mathematical model, in general, a quadratic polynomial of the experimental inputs  $x_i$  (the *main factors*) for determining qualitatively the variability of an output  $y$  (the response) of any system or process as a function of a controlled modification of some of its  $n$  inputs:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{(i<j)=1}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (2.17)$$

In this equation,  $x_i$ ,  $x_i x_j$  and  $x_i^2$  are the *predictors* of the model. It must be pointed out that **Equation 2.17** is quadratic in the predictors, but linear in the adjustable coefficients  $\beta$ , so that  $\beta_i$  and  $\beta_{ij}$  coefficients can be estimated by multiple linear regression. Contrary to the conventional studies that often use linear or linearizable models deduced from a “*one-factor at a time*” experimental approach, statistical models based on DOE are more robust because the experiments are planned to minimize the uncertainty on the fitted coefficients of the model. First, *analysis of variance* (ANOVA) is usually applied to identify the predictors exhibiting a significant effect on the response(s), in order to estimate only the coefficients of these predictors; then, the design minimizes the intercorrelation between the estimated coefficients, so that  $\beta_i$  is not biased by the effect of  $x_j$  ( $i \neq j$ ). Thus DOE provides robust models at minimum cost, which is very attractive for engineers and researchers. Two main categories of experimental designs have been used for modeling biohydrogen production processes are as follows:

✓ *Screening designs*: their objective is to discriminate among many factors those that exhibit a critical effect on the process from the others, so that the number of influencing factors can be reduced. The resulting model, including only the linear terms of **Equation 2.17** ( $\beta_{ii} = \beta_{ij} = 0$ ), can predict accurately the effects of the main factors, but their interactions are biased in general; so this model cannot be used directly for optimization. As a result, screening designs are very useful to investigate the effect of the nutrients of the culture medium on hydrogen production.

✓ *Response surface designs*: their usual application is process optimization using an objective function based on a single response or a combination of several responses using a desirability function when multiple responses are studied, such as hydrogen yield and productivity.

For screening, the most efficient approach is, theoretically, the *full factorial design*. In this case, each factor  $x_i$  is allowed to have a discrete number of levels. A full factorial design includes all the possible combinations of these levels across all the factors. For example, if  $a$  levels can be studied for  $n$  different factors, the minimum number of runs is  $a^n$ . Replications imply that the  $a^n$  runs must be replicated. So the number of experiments grows geometrically as the number of factors increases; thus full factorial designs are often too expensive for most practical purposes. However, this approach has been widely used to investigate the coupled effects of several factors on fermentative hydrogen production process. **Table 2.5** summarizes several studies using full factorial design to optimize the dark fermentation process.

**Table 2.5.** Typical studies using full factorial design for optimization of biohydrogen production processes.

Factors studied	Response(s) studied	Reactor type(s)	Inoculum(s)	Substrate(s)	Reference(s)
pH Stirring speed	HY HPR COD reduction Metabolites distribution Lag time	Batch Continuous	Grass compost	Spent grains	Chou <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9 <i>Clostridium butyricum</i> M1 <i>Bacillus thermoamylovorans</i> B5	HPR Hydrogen production potential Lag time	Batch	<i>Clostridium beijerinckii</i> L9 <i>Clostridium butyricum</i> M1 <i>Bacillus thermoamylovorans</i> B5	Yeast waste	Chou <i>et al.</i> , 2011
pH Temperature	HPR	Batch	Anaerobic sludge	Glucose	Infantes <i>et al.</i> , 2011
pH $S_0$ (starch)	HY Hydrogen content Metabolites distribution	Batch	Anaerobic sludge	Starch-containing wastewater	Lay <i>et al.</i> , 2012
$S_0$ (oil palm) [ $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ] [ $\text{FeSO}_4$ ]	HPR Phenol removal Final pH	Batch Continuous	<i>Thermoanaerobacterium</i> sludge	Palm oil	Mamimin <i>et al.</i> , 2012
Temperature pH HRT OLR	HY Hydrogen content COD reduction	Semi-continuous	Anaerobic sludge	Dairy waste	Zhong <i>et al.</i> , 2015

In practice, the most popular approach for screening is to use *Plackett-Burman* designs, which correspond to two-level *fractional designs* (only a subset of all the possible combinations

of two levels is studied). As an illustration, Saraphirom and Reungsang (2010) used a Plackett-Burman design to study the effects of six factors (total sugar, initial pH, nutrient solution, FeSO<sub>4</sub>, peptone, and sodium carbonate) on hydrogen production in DF and then, they identified only one significant factor (FeSO<sub>4</sub>) on hydrogen production rate. Recently, Samson *et al.* (2016) also applied Plackett-Burman designs to estimate the respective effects of 15 medium components on hydrogen yield; finally, five variables, including glucose, peptone, yeast extract, malt extract, and NaCl, were considered significant on hydrogen production. However, the influencing factors identified by screening designs can also be used to initiate an optimization procedure, *e.g.*, using the *method of steepest ascent*. This method uses the model deduced from the design to estimate the path of steepest ascent and then, to move the experimental region in the direction of the maximum change, *i.e.*, towards the maximum of the response. Then, a new design is generated and iteratively, a region in which a maximum is present can be defined. Pan *et al.* (2008), Saraphirom and Reungsang (2010), Long *et al.* (2010), and Khamtib and Reungsang (2014) reported studies based on the screening method of Plackett-Burman to identify the influencing factors of biohydrogen production, followed by the method of steepest ascent to approach an optimum region before finding the maximum hydrogen production through response surface methodology. **Table 2.6** summarizes typical examples of studies using Plackett-Burman designs to analyze or even start DF optimization.

**Table 2.6.** Typical studies using Plackett-Burman designs for screening and optimization of biohydrogen production processes.

Factors studied	Response(s) studied	Reactor type(s)	Inoculum(s)	Substrate(s)	Reference(s)
pH S <sub>0</sub> (glucose), 6 nutrients	HPR	Batch	<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glucose	Pan <i>et al.</i> , 2008
pH, Temperature S <sub>0</sub> (xylose), 4 nutrients	HPR	Batch	<i>Enterobacter</i> sp. CN1	Xylose	Long <i>et al.</i> , 2010
pH S <sub>0</sub> (sorghum), 4 nutrients	HPR	Batch	Anaerobic sludge	Sweet sorghum syrup	Saraphirom and Reungsang, 2010
COD/TN ratio Inoculum size 4 nutrients	HPR	Batch	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KKU19	Oil palm	Khamtib <i>et al.</i> , 2014
15 nutrients	HY	Batch	Strain from maize stalk	Maize stalk hydrolyzate	Samson <i>et al.</i> , 2016

An alternative to Plackett-Burman designs is the *Taguchi method*, which facilitates the design of experiments of industrial processes. It is more general, as it can investigate the effects of several factors with two or more levels on one or more responses with a relatively small

number of runs. Industrial constraints can be accounted for, and the most influent factors can be identified not only through ANOVA, but also using range analysis or signal-to-noise ratio analysis (Wang and Wan, 2009a). The Taguchi method is particularly attractive when the factors include at the same time, operating conditions, and medium composition. However, only a few studies applied Taguchi designs to optimize biohydrogen production (**Table 2.7**). Lin and Lay (2004) studied the effects of the concentration of three carbonate and three phosphate sources on the hydrogen production rate and yield. Based on the experimental results, these authors determined that 600 mg/L of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was the optimum concentration for the fermentative hydrogen production process. Similarly, Wang *et al.* (2013) analyzed the effects of six factors (agitation, pH, temperature, ultrasound, substrate, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentrations) on the hydrogen production rate in DF; their results confirmed that temperature and pH were the most significant factors. Recently, Kumari and Das (2017) studied the effects of the C/N ratio, pH, temperature, and concentration in yeast extracts on the cumulative hydrogen production in DF; they determined that the C/N ratio was the most influential, followed by pH and temperature, whereas yeast extract exhibited a lower effect on hydrogen production.

**Table 2.7.** Typical studies using the Taguchi method for screening and optimization of biohydrogen production processes.

Factors studied	Response(s) studied	Design	Reactor type(s)	Inoculum(s)	Substrate(s)	Reference(s)
3 carbonate sources 3 phosphate sources	HPR HY	L <sub>18</sub>	Batch	Anaerobic sludge	Sucrose	Lin and Lay, 2004
Pre-treatment method, pH Feed composition Inoculums	HPR SDR	L <sub>16</sub>	Batch	Anaerobic sludge	Glucose	Venkata Mohan <i>et al.</i> , 2009
Agitation, pH, Temperature, S <sub>0</sub> Ultrasound [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	HPR	L <sub>18</sub>	Batch	Anaerobic sludge	Cow manure	Wang <i>et al.</i> , 2013
pH, Temperature S <sub>0</sub> (Glucose) [Yeast extract] [FeSO <sub>4</sub> ]	HPR	L <sub>27</sub>	Batch	<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>Thermosaccharolyticum</i> IIT BT-ST1	Glucose	Roy <i>et al.</i> , 2014
C/N ratio, pH Temperature [Yeast extract]	HPR	L <sub>9</sub>	Batch	Anaerobic sludge	Glucose	Kumari and Das, 2017

For the accurate optimization of a process, *response surface methodology* (RSM) remains the most effective method of the DOE strategy. The most common designs of RSM are the Box-Behnken (BBD) and the Central Composite Designs (CCD). These are aimed at estimating a

robust quadratic polynomial approximation of a response (**Equation 2.17**) by multiple linear regression from experimental data, so that an optimum can be obtained. ANOVA is applied to remove insignificant predictors from the model. The first prerequisite is that an optimum must exist in the region defined by the variation interval of the factors, which can be achieved using the steepest ascent method previously described. The second prerequisite is that the number of factors must be small, usually two to four; otherwise, RSM becomes too expensive in terms of cost and time requirements.

A CCD is a five-level fractional factorial design, which consists of a  $2^n$  full factorial design to which  $2n$  “star points” and  $m$  replications of the center point of the design to assess experimental error have been added. Thus it can be obtained from a  $2^n$  full factorial design by design augmentation. The star points have the same levels as other factors, except for one of them in each run, which takes on levels strictly inside or outside the region of the  $2^n$  full factorial design (Wang and Wan, 2009a). As an illustration, Taherdanak *et al.* (2015) optimized the effects of three factors (namely, starch, iron, and nickel concentrations) on cumulative hydrogen production in 20 runs using a CCD. Their results showed the significance of the linear effects of starch and iron concentrations, of the interactive effects between iron and nickel concentrations, and of the squared effect of starch concentration on hydrogen production. Optimum concentrations of starch, iron, and nickel were obtained. Alternatively, BBD correspond to three-level fractional factorial designs. They provide an economic alternative to CCD because less runs are needed, but they do not contain an embedded  $2^n$  full factorial design and cannot be obtained by design augmentation.

**Table 2.8** summarizes various studies using BBD and CCD to optimize DF. For example, Jha *et al.* (2017) studied the effects of three factors, namely HRT, immobilized cell volume, and temperature, on hydrogen yield and chemical oxygen demand removal yield in 17 runs using a BBD. As an illustration, **Figure 2.8** displays a typical response surface obtained for fermentative hydrogen production BBD, adapted from the results of Guo *et al.* (2009), using glucose,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  contents as the factors. These plots confirm that the effect of initial glucose concentration is weaker than those of initial  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations, in agreement with ANOVA, as contours and surface plots are weakly affected when the coded glucose factor varies between -1 and 1.

Table 2.8. Typical studies using RSM for optimization of biohydrogen production processes.

Factors studied	Response(s) studied	Design	Reactor type(s)	Inoculum(s)	Substrate(s)	Reference
S <sub>0</sub> (starch), [Fe], [Ni]	HY HPR	CCD	Batch	Anaerobic sludge	Starch	Taherdanak <i>et al.</i> , 2015
[Tween] [Crude glycerol]	Glycerol utilization Viscosity	CCD	Batch	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Biodiesel waste	Pachapur <i>et al.</i> , 2016
S <sub>0</sub> (starch), [Fe <sup>2+</sup> ] [L-cysteine]	HPR	CCD	Batch	Anaerobic sludge	Starch	Kieu <i>et al.</i> , 2016
Temperature, HRT, immobilized cell volume	HY COD removal efficiency	BBD 3 <sup>k</sup>	Continuous	Anaerobic sludge	Glucose	Jha <i>et al.</i> , 2017
N/C ratio, P/C ratio, Fe/C ratio	HY HPR	BBD 3 <sup>k</sup>	Batch	Anaerobic sludge	Waste paper hydrolysate	Argun and Onaran (2017)
Bacteria ratio [Buffer] S <sub>0</sub> (Glucose)	HY HPR COD removal yield Glucose uptake	BBD 3 <sup>k</sup>	Continuous	<i>Clostridium butyricum</i>	Potato starch	Hitit <i>et al.</i> , 2017

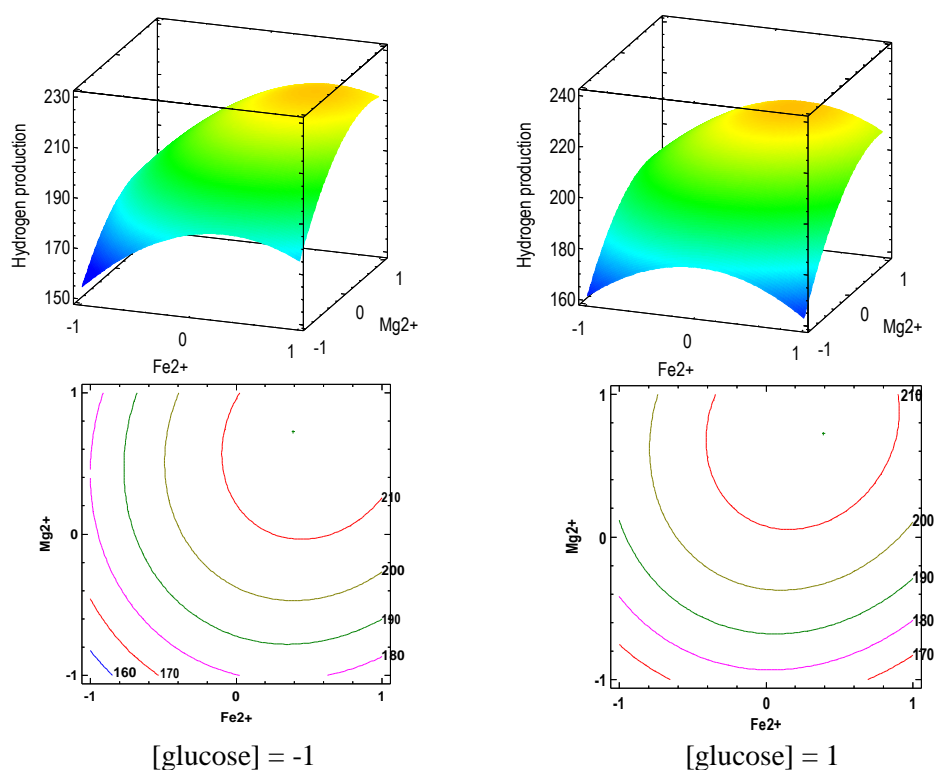


Figure 2.8. Typical response surface plots obtained for fermentative hydrogen production from glucose using BBD expressed in coded variables between -1 and +1 for [Fe<sup>2+</sup>] and [Mg<sup>2+</sup>] (plots built using the data reported by Guo *et al.*, 2009).

As a conclusion, DOE remains the most versatile and attractive modeling and optimization tool at the laboratory-scale and it can even be used for optimization at industrial-scale when the factors can be effectively controlled. However, it clearly fails for scale-up because

linear or quadratic models are too simple to simulate accurately the complex non-linear trends of biohydrogen production processes.

*2.2.3.3.2 Principal component analysis (PCA) and partial least square regression (PLS)*

Principal component analysis (PCA) is a multivariate technique used to analyze a data set in which observations are described by several inter-correlated quantitative dependent variables. The main objective is to extract the information from the data, to represent it as a set of new orthogonal variables called *principal components* derived using linear algebra, and to display the pattern of similarity between the observations and the variables as points in maps (Abdi and Williams, 2010). For example, Aceves-Lara *et al.* (2008) used an optimization algorithm coupled to PCA to estimate the pseudo-stoichiometric coefficients and reaction rates of a metabolic pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. In comparison to DOE, the advantage is that uncontrolled but measured variables can be included in the model, which is not possible in conventional DOE. Thus, it is possible to handle with larger data sets which are not necessarily optimal in terms of DOE criteria. Recently, Ghimire *et al.* (2017) applied PCA to analyze the correlation between the six major metabolites in the continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey. Their results suggested that H<sub>2</sub> production was mainly due to the butyrate pathway and that H<sub>2</sub> inhibition was correlated to the accumulation of lactate and propionate in the digestate. Similarly, Guo *et al.* (2014) used the partial least square (PLS) regression, which combined PCA to regression methods, to develop a model of fermentative hydrogen production from solid organic waste by minimizing the covariance between the dependent variables (biohydrogen production, and volatile fatty acid concentrations in the digestate) and the explicative variables (substrate concentrations). PLS provided a quantitative model that correlated BHP (Biological Hydrogen Production) under batch conditions:

$$BHP = 2.85 + 38.3557 \cdot Carb - 25.3034 \cdot Prot + 104.332 \cdot Act + 123.1281 \cdot But - 370.5045 \cdot Prop + 302.39 \cdot Lact - 2.91584 \cdot But \cdot Lac \quad (2.18)$$

where *Carb* and *Prot* correspond to carbohydrate content and protein content in the substrate when reaction starts, while *Act*, *But*, *Prop* and *Lac* are acetate, butyrate, propionate and lactate



concentrations when the maximum cumulated hydrogen was achieved. This result highlights that PCA-PLS provides a similar polynomial model as DOE (**Equation 2.17**), but with controlled factors (*Carb* and *Prot*) and uncontrolled variables (*Act*, *But*, *Prop* and *Lac*) as shown in **Equation 2.18**.

#### 2.2.3.3.3 Artificial neural network (ANN) and genetic algorithm (GA)

In the last couple of decades, *artificial neural network* (ANN) has emerged as an attractive useful tool for non-linear multivariate modeling (Desai *et al.*, 2008). ANN is a mathematical representation, which mimics the functioning and learning process of a human brain using an artificial neuron (Sewsynker and Gueguim Kana, 2016). ANN has been applied successfully to solve problems in which the parameters governing the outputs are complex. As DOE and PCA-PLS, it is able of modeling the relationship between input and output parameters without requiring a detailed mechanistic description of the rate-limiting phenomena, but the key advantage is that the linearity in the factors is not a prerequisite (Nasr *et al.*, 2013). To adjust the lumped parameters of ANN models, *genetic algorithms* (GA) are often used. GA constitute a set of optimization algorithms inspired by the process of natural selection. The coupled methodology is referred to as ANN-GA modeling. The *feed forward back-propagation neural network* (FFBPNN) has also been frequently used for the modeling of biohydrogen production. This type of neural network consists of a multilayer architecture: it includes an “*input layer*” with nodes that embody the inputs, one or more hidden layers, and one output layer with nodes corresponding to the dependent variables. The hidden layers consist of neurons which may vary in number depending on the complexity of the process (Whiteman and Gueguim Kana, 2014). The neurons in the hidden layer are linked to the neurons in the input and output layers by adjustable weights and enable the network to compute complex associations between the input and output variables (**Figure 2.9**). FFBPNN describes the way in which the error computed at the output side is propagated backward from the output layer to the hidden layer and the input layer. In this network, the neurons can be completely or partially interconnected and the data are fed forward directly in the network with no feedback (Levstek and Lakota, 2010). **Table 2.9** summarizes typical contributions using ANN-GA to optimize DF.



Table 2.9. Typical studies using ANN for optimization of biohydrogen production processes.

Input parameter(s)	Output parameter(s)	ANN structure	Reactor types(s)	Inoculum(s)	Substrate(s)	Reference(s)
OLR, HRT Influent alkalinity	HY Hydrogen production Products content Effluent TOC	-	Continuous Batch	Anaerobic sludge	-	Mu and Yu, 2007
HRT, pH, Recycle ratio , Alkalinity, ORP, [acids], [alcohols] S <sub>0</sub> (sucrose), X <sub>0</sub>	Hydrogen production	12-20-1	Continuous	Anaerobic sludge	Sucrose	Nikhil <i>et al.</i> , 2008
Temperature, pH S <sub>0</sub> (glucose)	HY Hydrogen production Substrate degradation	-	Batch	Anaerobic sludge	Glucose	Wang and Wan (2009b)
pH, Peptone, S <sub>0</sub> (xylose)	HY	3-8-1-	Batch	<i>Enterobacter</i> sp. MTCC 7104	Glucose Sucrose Xylose	Karthic <i>et al.</i> , 2013
Temperature, pH, Time, S <sub>0</sub> (glucose, sucrose, thin silage), X <sub>0</sub>	Hydrogen production	5-6-4-1	Continuous Batch	Anaerobic sludge	Glucose Sucrose Thin silage	Nasr <i>et al.</i> , 2013
Temperature, pH S <sub>0</sub> (Molasses), Inoculum size	Hydrogen production	4-(6-10)-1	Batch	Anaerobic sludge	Sugar cane molasses	Whiteman and Gueguim Kana, 2004
Temperature, pH, S <sub>0</sub> (glucose, sucrose, xylose), Inoculum type, Substrate type	HY	5-7-7-1	Continuous Batch	Anaerobic sludge	Glucose Sucrose Xylose	Sewsynker and Gueguim Kana, 2016
Temperature, Immobilized cell volume, HRT	HY Effluent COD removal efficiency	3-4-4-2	Continuous	Anaerobic sludge	Glucose	Jha <i>et al.</i> , 2017

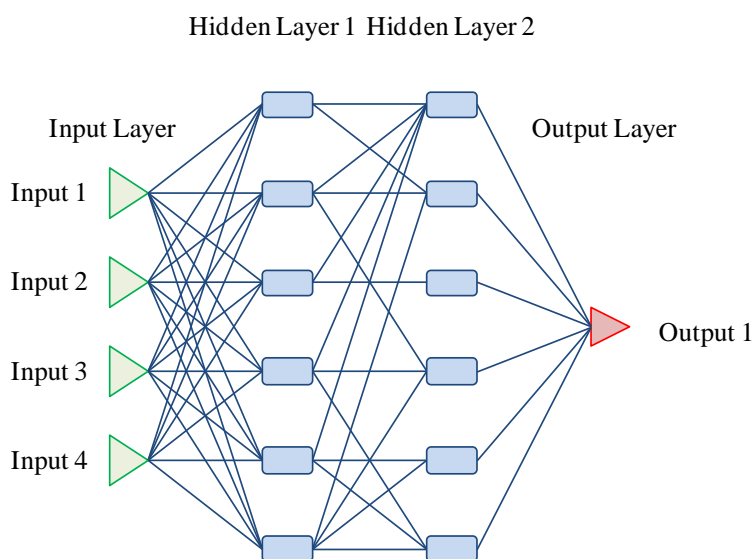


Figure 2.9. General multilayer structure of an artificial neural network.

According to Desai *et al.* (2008), the main advantages of ANN compared to RSM include:

- ✓ ANN does not require a prior specification of suitable fitting function;
- ✓ ANN has universal approximation capability; indeed, it can approximate all kinds of non-linear functions, while RSM is limited only to quadratic approximations.

In addition, ANN can be applied to industrial dynamic process control, so that current measurements can be used to predict the future behavior of the process. The main drawback of ANN is, however, that a big data set is compulsory, which must be typically divided in three subsets, for training, validation and testing. The training data subset is used to estimate the adjustable parameters of the model, *i.e.*, biases and weights, based on an iterative algorithm to minimize the differences between the predicted response and the experimental response. Then, the validation data subset is used to avoid “*overfitting*”, typically by stopping the training procedure when a decrease of the prediction error on the training data set induces an increase of the prediction error of the model on the validation data set. The ability of the model to predict accurately the outputs is finally measured by comparing ANN predictions with the testing data subset.

In practice, only a few parameters can monitor online the dynamics of biohydrogen production processes, including pH, temperature, substrate, and metabolite concentrations, or even the oxidation-reduction potential. All these parameters are known to exhibit a significant impact on the process and can be used in ANN as input variables, while hydrogen production is generally chosen as the single output variable. For example, Nikhil *et al.* (2008) applied ANN to investigate the performance of a sucrose-based hydrogen production in a CSTR over a period of 450 days. They used an ANN structure with 12 inputs-20 neurons-1 output; the inputs included HRT, pH, recycle ratio, alkalinity, oxidation-reduction potential, sucrose concentration, biomass content, and acid and alcohol concentrations, while hydrogen production was the single output variable. Similarly, Mu and Yu (2007) reported the use of ANN-GA for the simulation of a granule-based H<sub>2</sub>-producing upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB). Their network consisted of 3 input variables (HRT, OLR, and influent alkalinity) and 10 output variables (hydrogen yield, hydrogen production rate, hydrogen concentration, and total organic carbon and product concentrations in the effluent). For this purpose, a total of 140 experimentally-derived

data sets were available, divided in 100 data sets for training the ANN-GA model, and 40 data sets for validation/testing.

Finally, ANN has been demonstrated to be superior to RSM in many studies on biohydrogen production (Wang and Wan, 2009b, Karthic *et al.*, 2013, Whiteman and Gueguim Kana, 2014, Jha *et al.*, 2017). Wang and Wan (2009b) comparatively studied ANN-GA and RSM; they investigated the effects of temperature, initial pH, and glucose concentration on fermentative hydrogen yield. Their results showed that the root mean square error and the standard error of prediction for the ANN model were halved in comparison to RSM. The same conclusion was drawn by Whiteman and Gueguim Kana (2014) who compared the respective modeling efficiency of ANN and RSM for the effects of molasses concentration, temperature, initial pH, and inoculums concentration on the cumulative volume of hydrogen. Recently, Jha *et al.* (2017) compared ANN and RSM for the hydrogen yield and chemical oxygen demand removal yield using temperature, immobilized cell volume, and HRT as the inputs. Their results suggested a greater accuracy and a higher reliability of ANN in modeling and optimizing the bioprocess parameter interactions associated to the fermentation process.

#### 2.2.4 Semi-empirical unstructured models

Contrary to black-box bioreactor models, semi-empirical unstructured models are based on a formal description of the extracellular specific rate of cell growth  $\mu$ , the substrate uptake rate  $q_S$ , and the specific product formation rate  $q_P$ . However, it must not be expected that such kinetic models give access to a true mechanistic description. In a simple case (a single substrate and a single microorganism), these specific rates are related by the following equation, which highlights that substrate uptake leads to growth, product formation, and maintenance, in which  $Y_{S/X}$  and  $Y_{S/P}$  are the stoichiometric coefficients corresponding to the yield of substrate on biomass (g/g) and the yield of substrate on product (g/g), respectively:

$$-q_S = \frac{1}{Y_{S/X}}\mu + \frac{1}{Y_{S/P}}q_P + m_S \quad (2.19)$$

In practice, this formalism can be easily generalized, as biohydrogen production processes are often driven in mixed cultures with complex substrates, and involve several metabolic pathways operating in parallel, each of them exhibiting several consecutive reactions. In addition,

DF and PF are subjected to various kinds of inhibitions due to pH, temperature, but also substrate, products, nitrogen, phosphorus, metals, *etc.* (Elbeshbishy *et al.*, 2017). It must be pointed out that in several books and reviews of the literature on kinetic models, these models are usually denoted “*black-box kinetic models*”, which may be confusing for the reader because they are considered as “*grey-box bioreactor models*” in this chapter. Actually, there is no contradiction because this chapter focusses on the process scale; so statistical models, which are not kinetic models, must be introduced and better fit the definition of a black-box model in which the system can be viewed only from its inputs and outputs. For bioreactor modeling and simulation, it must be reminded that the semi-empirical unstructured models described in this section are usually coupled to the assumption of ideal mixing in the bioreactor (*i.e.*, the volume is homogeneous and uniform) and only this case will be considered in this section, while distributed models will be treated in **section 2.2.6**.

#### 2.2.4.1 Growth kinetics

Many specific growth rate equations have been proposed in the literature, but only a few of them are currently used. The empirical Monod equation (Monod, 1949) is the most common rate expression to describe the growth of microorganisms in general and hydrogen-producing bacteria in particular. This corresponds to a hyperbolic function in which the specific growth rate  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is only a function of a single limiting substrate concentration and is subjected to substrate saturation when  $S \gg K_S$ :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (2.20)$$

where  $\mu_{max}$  is the maximum specific growth rate,  $K_S$  is the Monod half-saturation constant (g/L), and  $S$  is the concentration of the limiting substrate (g/L). This expression can be generalized to several substrates, as follows for two substrates:

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \right) \left( \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \right) \quad (2.21)$$

In simple cases, **Equation 2.20** can be linearized, so that  $\mu_{max}$  and  $K_S$  can be deduced by linear regression analysis. In complex mechanisms involving consecutive and parallel equations, non-linear least square regression analysis may be compulsory. For example, a simple Monod

model was applied by Kumar *et al.* (2000) to describe glucose uptake and hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 in a batch bioreactor. The resulting equations for biomass ( $X$ , g/L) and substrate ( $S$ , g/L) concentrations in a batch bioreactor can be summarized by:

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \cdot X \quad (2.22)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_S = - \frac{1}{Y_{S/X}} \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \cdot X \quad (2.23)$$

while  $Y_{S/X}$  is expressed in g biomass/g substrate and  $r_i$  could be used in **Equations 2.9-2.12** depending on the mixing assumption. Many alternatives to the Monod equation are available in the literature. However, their use is quite rare. An inhibited growth model was proposed by Akbari and Vaziri (2017) for PF; this assumes a maximum biomass content  $X_m$ , so that growth rate follows a logistic growth instead of an exponential growth, and is subjected to an additional saturation by light radiation intensity  $\varphi$ :

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \left( \frac{\varphi}{K_\varphi + \varphi} \right) \quad (2.24)$$

In **Equation 2.24**,  $K_\varphi$  is the light saturation constant. These authors acknowledge, however, that a detailed understanding of light limitation in PF is far from been reached, so that the conventional Monod expression for  $\varphi$  in this equation is purely empirical.

When biomass decay is accounted for, the net cell production rate  $q_X$  must include both growth and decay rates. For example, in the Anaerobic Digestion Model N°1 (ADM1), the hydrolysis rate of biomass and particulate substrates is usually described by a simple decay constant  $k_X$  (Batstone *et al.*, 2002). Thus,  $q_X$  is expressed as:

$$q_X = \mu - k_X \quad (2.25)$$

so that the specific decay rate is zeroth-order. It must be pointed out that ADM1 model, which has been developed to simulate anaerobic wastewater treatment, can be adapted to biohydrogen production by suppressing methane production kinetics. Further discussion on this topic is available in **section 2.2.4.5**.

Substrate inhibition on growth rate in biohydrogen production processes has sometimes been accounted for using the Haldane-Andrews model. This implements an uncompetitive inhibition term in the Monod equation using a substrate inhibition constant  $K_I$ :

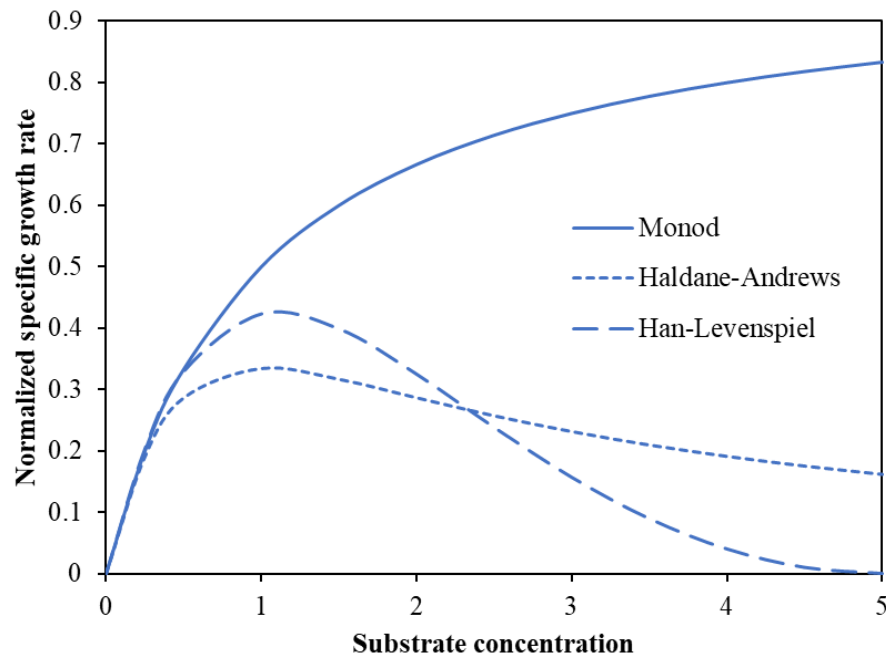
$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_S + S) + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)} \quad (2.26)$$

This was used by Nath *et al.* (2008) to describe the effects of substrate concentrations on glucose consumption and *Enterobacter cloacae* DM11 growth in batch tests for DF.

As an alternative, the Han-Levenspiel model was suggested by Wang and Wan (2008a) to account for substrate inhibition:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{S}{S_{max}}\right)^m \left(1 - \frac{S}{S_{max}}\right)^n \quad (2.27)$$

where  $S_{max}$  is the maximum substrate concentration at which  $\mu$  becomes 0, while  $m$  and  $n$  are constant parameters of the inhibition function. A comparison of the Monod, Haldane-Andrews and Han-Levenspiel equations is displayed in **Figure 2.10**.



**Figure 2.10.** Comparison of the Monod, Haldane-Andrews and Han-Levenspiel equations ( $K_S = K_I = 1$ ,  $S_{max} = 5$ ,  $m = 3$ ,  $n = 2$ ).

#### 2.2.4.2 Substrate uptake rate

Theoretically, the substrate consumption rate is described by **Equation 2.19**. But without non-catabolic products,  $q_P$  is a function of  $\mu$  and **Equation 2.19** can be simplified. Neglecting maintenance, the specific rate  $q_S$  is finally expressed as:

$$q_S = -\frac{1}{Y_{S/X}}\mu \cdot \prod_i I_i \quad (2.28)$$

where  $\mu$  follows usually a Monod equation and  $I_i$  is a non-competitive inhibition function by substrate, intermediates, or products, expressed as a function of an inhibition constant  $K_i$ :

$$I_i = \frac{K_i}{K_i + S} \quad (2.29)$$

Inhibitions by metals, nitrogen, or phosphorus are usually accounted for using **Equation 2.19**. This could also be used to simulate inhibition by pH and temperature, but a specific treatment is usually required for these parameters, which is specifically addressed in **section 2.2.4.3**.

When maintenance is not neglected, conventional or modified versions of **Equation 2.19** can be applied, accounting for additional inhibition or saturation functions. This is illustrated by Abkari and Vaziri (2017) for PF in which  $K_{SS}$  is an additional saturation constant due to substrate:

$$-q_S = \left( \frac{1}{Y_{S/X}}\mu + \frac{1}{Y_{P/X}}q_P + m_S \right) \left( \frac{S}{S+K_{SS}} \right) \quad (2.30)$$

As a conclusion, **Equation 2.28** based on the Monod equation presents the advantages to be simple, versatile, easy to modify when co-substrate or product saturations/inhibitions, maintenance, or decay are considered, and able to fit correctly most of the experimental data of the literature.

#### 2.2.4.3 Methods to account pH and temperature inhibitions

Temperature and pH strongly affect biological processes and exhibit, indeed, considerable effects on the activity of hydrogen-producing bacteria. Concerning pH, **Equation 2.28** has been applied using various inhibition functions. First, it must be pointed out that **Equation 2.29** in

which  $S$  is the  $H^+$  ion concentration,  $[H^+]$  is not commonly used because steeper variations are needed to model pH inhibition. Thus, **Equation 2.29** may be generalized by a Hill function, as follows:

$$I_{pH} = \frac{K_{pH}^n}{K_{pH}^n + [H^+]^n} \quad (2.31)$$

in which  $K_{pH}$  and  $n$  must also depend on pH to account for inhibition by both low and high pH values:

$$n = \frac{a}{pH_{UL} - pH_{LL}}, \quad K_{pH} = 10^{-\frac{pH_{LL} - pH_{UL}}{2}} \quad (2.32)$$

In **Equation 2.32**,  $a$  is a constant, while  $pH_{UL}$  and  $pH_{LL}$  are the upper and lower limit pH values where the biological processes are inhibited. Another usual expression able to describe the influence of pH on growth rate derives from the Haldane-Andrews model; this was applied, for example, by Yoon-Sun *et al.* (2008) to describe the effect of hydrogen production process using sucrose as the substrate in batch tests:

$$I_{pH} = \frac{[H^+]}{K_a + [H^+] + \frac{[H^+]^2}{K_b}} \quad (2.33)$$

in which  $K_a$  is the  $H^+$  saturation constant and  $K_b$  the  $H^+$  inhibition constant. An alternative proposed in the ADM1 can also be expressed as:

$$I_{pH} = \exp \left[ -a \cdot \left( \frac{pH - pH_{UL}}{pH_{UL} - pH_{LL}} \right)^2 \right] \quad (2.34)$$

Concerning the temperature, the Arrhenius model is the most widely used to predict the increase of kinetic constants vs. temperature:

$$\mu_{max} = A \cdot \exp \left( -\frac{E_a}{R_g \cdot T} \right) \quad (2.35)$$

where  $E_a$  is the activation energy (kJ/mol),  $A$  is the Arrhenius pre-exponential factor,  $R_g$  is the ideal gas constant (8.314 J/mol/K), and  $T$  is the absolute temperature (K). Kumar and Das (2000) used **Equation 2.35** to describe the influence of temperature on the hydrogen production rate by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using glucose as the substrate in batch conditions. The main

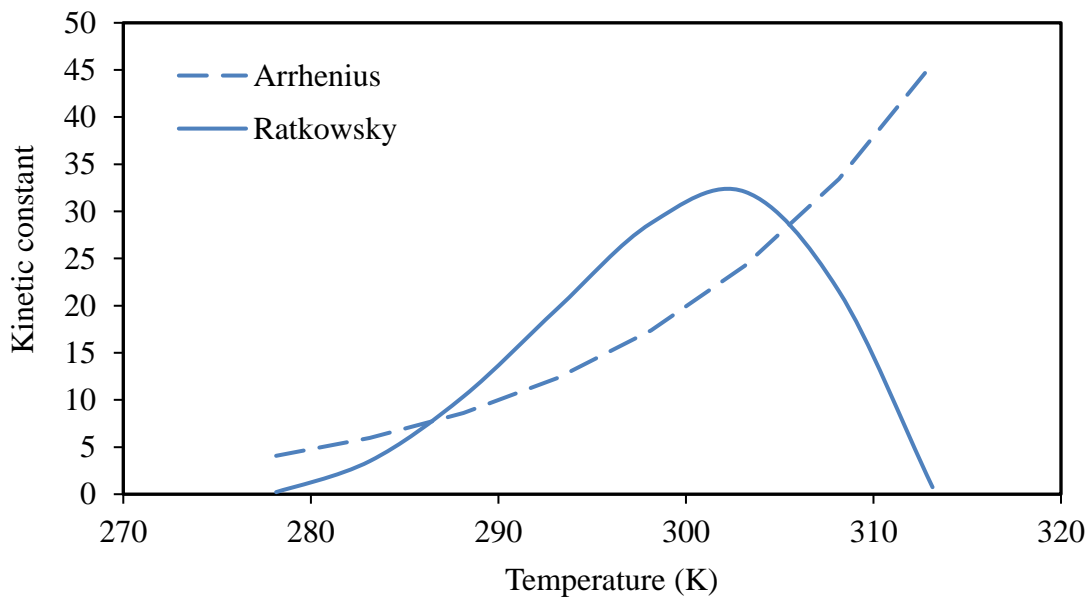


drawback of the Arrhenius model is that it cannot account for inhibition due to high temperature. An alternative is, for example, the Ratkowsky model:

$$\mu_{max} = [A \cdot (T - T_{min})]^2 \cdot \{1 - \exp[B \cdot (T - T_{max})]\}^2 \quad (2.36)$$

where  $A$  and  $B$  are constant parameters, while  $T_{min}$  and  $T_{max}$  are the minimum and maximum temperatures (K) at which  $R$  is 0, respectively. A comparison between the Arrhenius and the Ratkowsky equations is displayed in **Figure 2.11**. The Ratkowsky equation was applied by Wang and Wan (2008b) to fit the effects of temperature on hydrogen production throughout the entire temperature range, *i.e.*, considering the minimum, optimum, and maximum operating temperatures of growth of hydrogen-producing bacteria.

When temperature cannot be controlled in the bioreactor, these models present the advantage to be simple and easy to use. For pH, a key problem is the high sensitivity of kinetic constants. In many experiments at the bench scale, pH is controlled, but pH control is generally too expensive at the industrial scale, so that pH inhibition functions must be implemented in the simulations. The main issue is that pH evolution with time may induce strong instabilities in the simulations, so that the choice of the mathematical form of  $I_{pH}$  must often be based on numerical considerations.



**Figure 2.11.** Comparison between the Arrhenius and the Ratkowsky model for modeling the effect of temperature.

#### 2.2.4.4 Product formation

A general framework for specific product formation rate is provided by the Luedeking-Piret model (Luedeking and Piret, 1959):

$$q_P = Y_{P/X} \mu + \mu_{PX} \quad (2.37)$$

where the first and the second terms represent the growth-associated and the non-growth-associated product formation rates, respectively;  $Y_{P/X}$  is the product yield (g product/g biomass) and  $\mu_{PX}$  is the specific product production rate due to non-growth associated culture. The use of the Luedeking-Piret model is relevant to understand the relationship between the growth rate of hydrogen-producing bacteria, substrate hydrolysis rate, and metabolite production rates in the process. Kinetic equations can be used to simulate the production of hydrogen and soluble metabolites. The Luedeking-Piret model can fit experimental data derived from the DF process in which the hydrolysis of organic substrates results in the production of many soluble metabolites (include volatile fatty acids, lactate ions, and solvents, among others) in addition to the biogas. In PF, this approach has been applied by Abkari and Vaziri (2017) using data on pure cultures using *Rhodobacter sphaeroides*, and malate as the substrate.

As for the substrate, **Equation 2.37** can be modified to account for inhibitions:

$$q_P = (Y_{P/X} \mu + \mu_{PX}) \cdot \prod_i I_i \quad (2.38)$$

including inhibition by pH and temperature (see **section 2.2.4.3**), but also by the product itself or cometabolites. In addition to the expressions  $I_i$  described previously, a simplified Han-Levenspiel inhibition terms has often been used to describe the non-competitive inhibitory effect of volatile fatty acids (acetate, butyrate, *etc.*) on the hydrogen production rate in DF. Many metabolites usually exhibit a critical inhibitory concentration  $C_{i,max}$  when their concentration  $C_i$  increases:

$$I_i = \left(1 - \frac{C_i}{C_{i,max}}\right)^n \quad (2.39)$$

**Equation 2.39** was used, *e.g.*, by van Niel *et al.* (2003), to describe the effects of substrate and of two inhibiting compounds on hydrogen production rate in batch tests. Neglecting the non-growth associated term in **Equation 2.38**, one obtains:

$$q_P = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{C_1}{C_{1,max}}\right)^n \left(1 - \frac{C_2}{C_{2,max}}\right)^m \quad (2.40)$$

From these statements, it emerges that semi-empirical biokinetic models are versatile and able to describe mathematically complex mechanistic processes, even though they do not account for intracellular and transport phenomena at the cell scale. This is illustrated by the ADM1 model in **section 2.2.4.5**.

#### 2.2.4.5 Focus on ADM1 and derived models

When biokinetic semi-empirical kinetic models are coupled to simulate a set of consecutive and parallel biochemical reactions associated with chemical equilibria and mass transfer processes, semi-mechanistic models, or “grey box” models, can be established. As purely empirical models, they are data-driven-models based on experiments, but they also implement a physical analysis of the supposed key mechanisms and bottleneck processes, with only the need to tune adjustable parameters. However, their drawback is that as far as complexity increases, the number of adjustable parameters becomes huge, and advanced non-linear optimization tools are required to fit these parameters and estimate their respective influence and estimation error.

The main example in the domain of dark fermentation is the ADM1, developed by the task group of the International Water Association (IWA) for describing the anaerobic digestion process of wastewater in a continuous and perfectly mixed digester (Batstone *et al.*, 2002). It describes the processes involved in the bioconversion of organic substrates into methane, carbon dioxide, and inert products with metabolic intermediates (Satpathy *et al.*, 2016). Biohydrogen emerges both as an intermediate in the digestate and a final product in the gas phase, so that ADM1 can be used to predict biohydrogen production through DF. The standard version of the ADM1 includes 26 species (anions, cations, and 24 organic species including 12 particulate species corresponding to the microbial species), 6 acid-base equilibria, electroneutrality equation, 19 reaction mechanisms (including disintegration of solid substrate, hydrolysis of fractions into soluble compounds, uptake of these compounds, and disintegration/hydrolysis of biomass fractions), and 3 gas-liquid mass transfer processes, as illustrated in **Figure 2.12**, leading to 26 ODE and 7 AE for the liquid phase, and 3 ODE for the gas phase. Acid-base equilibria can also be treated as ODE, so that a system of 35 explicit ODE coupled to one non-linear AE for pH estimation can alternatively be solved. Finally, inhibitions due to pH, H<sub>2</sub> and nitrogen, as well as

the influence of the temperature, are also accounted for. The drawback is, also, that ADM1 includes about 60 stoichiometric and kinetic adjustable parameters. The global architecture of the model is complex; so it cannot be used in practice for process control even in an ideal CSTR. In order to establish a simplified model for process control, Bernard *et al.* (2001) and Hassam *et al.* (2015) developed an Anaerobic Model N°2 (AM2), but this has not received general acceptance up to now.

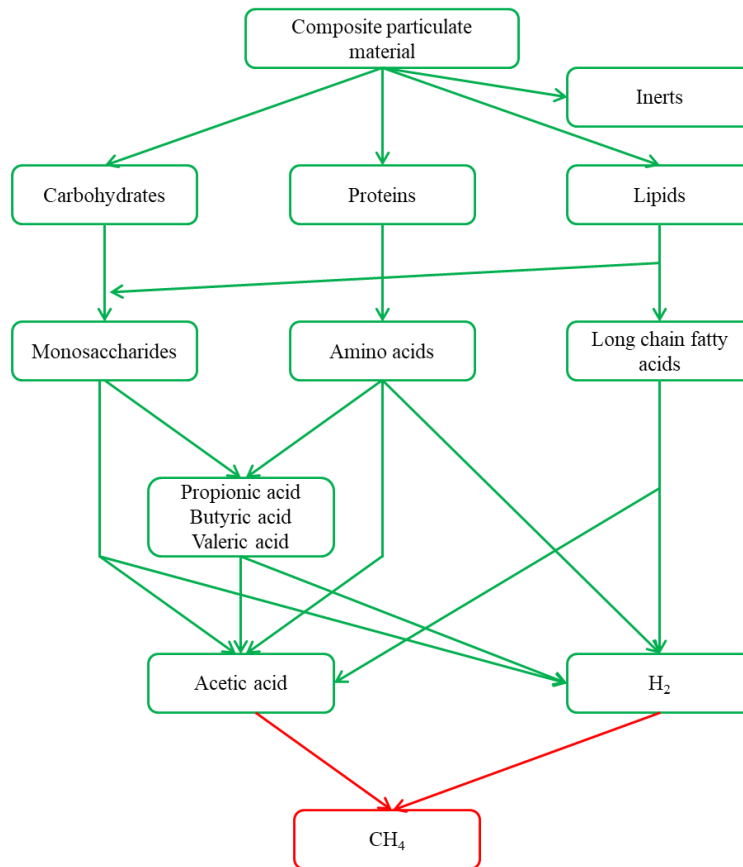


Figure 2.12. Structure of the standard ADM1 model (adapted from Batstone *et al.*, 2002).

ADM1 can be used for the estimation of biohydrogen productivity in DF, but this model presents many shortcomings limiting its applicability that have been summarized by Trad *et al.* (2016):

- ✓ The microbial diversity is roughly described, even though ADM1 may be used for mixed cultures and considered as a segregated model that indirectly distinguishes several classes of microorganisms.

✓ For prediction accuracy, the main limitation of standard ADM1 lies in the use of a constant stoichiometry to describe metabolite production from substrate fermentation. Actually, the stoichiometric and kinetic constants are a function of substrate composition; thus a calibration of the model is required. To circumvent this issue, Penumathsa *et al.* (2008) applied a modified version of ADM1 to a continuous biohydrogen production process using a variable-stoichiometry approach derived from experimental data, but this drastically increased the complexity of the model.

✓ ADM1 does not account for lactic acid and ethanol formation. It is considered in the standard model that these metabolites are quickly degraded, *i.e.*, that they play only a minor role in the kinetics of anaerobic digestion. Conversely, they have a significant impact on DF because they can be final products. Thus Peiris *et al.* (2006) were the first to implement simultaneously lactate and ethanol as products in the ADM1. Now several modified versions of ADM1 have been developed to account for ethanol as a final product (Ntaikou *et al.*, 2009), lactate as an intermediate (Penumathsa *et al.*, 2008, Willquist *et al.*, 2012), or both (Antonopoulou *et al.*, 2012), in either pure or mixed cultures and in batch or continuous processes.

✓ Homoacetogenesis is not included in ADM1. In order to reduce the discrepancy between measured and predicted data from the model hydrogen production, an extra-process describing the consumption of hydrogen from homoacetogenic bacteria, which produces acetic acid, was included in ADM1 by Antonopoulou *et al.* (2012).

✓ ADM1 has never been used in distributed models for H<sub>2</sub> production. However, the assumption of a perfectly-mixed digester does not fit mixing performance at the industrial-scale.

✓ Hydrogen supersaturation is not accounted for, which has no significance in anaerobic digestion, but may be a key issue for modeling accurately biohydrogen productivity.

This list of limitations is not exhaustive, and all may lead to erroneous predictions. This is the reason why many other versions of ADM1 can be found for the DF in the literature.

As a conclusion, ADM1 remains popular for the modeling and the simulation of biohydrogen production in DF because it constitutes a good compromise between physical understanding and mathematical complexity, especially in mixed cultures. However, its

stoichiometric and kinetic coefficients must be adjusted as a function of substrates and microorganisms, as the standard version often fails to predict accurately biohydrogen production; modifications require programming tasks and none of the revised versions have received a general acceptance in the field of dark fermentation, contrary to standard ADM1 in anaerobic digestion.

#### 2.2.5 Structured kinetic models

Structured models are based on the physiological description of the microorganism and of their regulatory adaptation to their microenvironment. The metabolism of a single cell (using a non-segregated assumption) or of the “*averaged*” metabolism of a microorganism population can be described by a multi-compartment structure and/or by pools, such as the enzyme pool, the energy pool (ATP/ADP), or the electron-metabolism pool, which are interconnected and also exchange fluxes with cell environment. Actually, a complete description of cell metabolism is too complex to be defined, but our knowledge on classical anabolic and catabolic pathways of anaerobic processes can be used to reduce the number of compounds, pools, and internal/external fluxes, while thermodynamic constraints can also be added to identify a reduced set of effective intracellular processes. Theoretically, structured models could be coupled to distributed bioreactor models, but in practice, only the assumption of an ideal CSTR is applied in the literature and only this assumption will be considered in this section.

Among structured models, *metabolic flux analysis* (MFA) is a metabolic engineering technique developed to estimate the distribution of intracellular fluxes in a single-cell biochemically-structured model from extracellular fluxes for a given set of experimental data. Thus most of the studies based on MFA involve balancing fluxes around intracellular metabolites within an “*assumed metabolic reaction network*” where external rate measurements (substrate uptake rate, microorganism growth rate, and product accumulation rate) provide constraints to determine intracellular fluxes. MFA is used as an effective tool to determine metabolic pathways, to predict metabolic switches, and to understand the regulation of the metabolism in microorganisms. Theoretically, the different steps of the metabolic reaction network from substrate to products in the microorganism need to be detailed, but a pseudo-steady state for the intermediate intracellular metabolites is usually assumed, which makes calculations simpler.

Under this assumption, the general equation of MFA that describes incoming and outgoing reaction fluxes of each intracellular metabolite is linear (Cai *et al.*, 2011):

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot v = 0 \quad (2.41)$$

where  $t$  is the time,  $x$  is the  $m \times 1$  concentration vector,  $v$  is the  $r \times 1$  reaction rate vector, and  $S$  is the  $m \times r$  stoichiometric matrix in which the element of the  $i^{\text{th}}$  row and  $j^{\text{th}}$  column corresponds to the stoichiometric coefficient of metabolite  $i$  in reaction  $j$ . The degree of freedom is defined as:

$$F = r - m \quad (2.42)$$

where  $F$  represents the number of fluxes,  $m$  is the number of intracellular metabolites, and  $r$  is the number of metabolic reactions in the model. In general, the number of reactions in the network is always greater than the number of intracellular metabolites, and many of the elements in  $v$  have to be measured in order to determine the remaining reaction rates. If all the  $F$  fluxes can be measured, the system is determined. Otherwise, if less than  $F$  fluxes are measured, the system becomes undetermined and the unknown fluxes have to be estimated by optimization procedures. In this context, MFA was successfully applied to better understand the metabolism associated with hydrogen production in pure cultures (*Table 2.10*). Up to now, only Gonzalez-Garcia *et al.* (2017) extended partially MFA to mixed cultures, but always on a simple substrate.

*Table 2.10. Typical studies based on MFA describing biohydrogen production processes.*

Inoculum(s)	Substrate(s)	Metabolic reactions ( $r$ )	Intracellular metabolites ( $m$ )	Reference(s)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ECU-15	Glucose	30	24	Niu <i>et al.</i> , 2011
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glucose	31	55	Castro <i>et al.</i> , 2013
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> FYa102	Glucose	21	16	Cheng <i>et al.</i> , 2013
<i>Clostridium pasteurianum</i> MTCC116	Glycerol	26	21	Sarma <i>et al.</i> , 2017
Mixed culture	Glucose	38	45	Gonzalez-Garcia <i>et al.</i> , 2017

As a conclusion, MFA presents the advantage to be easy to implement when experimental data is available because it requires simple linear algebra and relies on relatively robust measurements of extracellular metabolites (Antoniewicz, 2015). It is also an efficient tool in the field of metabolic engineering to optimize hydrogen production when genetic modifications of

the microorganism can be applied. However, some limitations can be exposed. In general, it appears that the number of constraints is often insufficient to cover the diversity of the possibility of metabolic pathways. In addition, the application of MFA remains practically limited to simple substrates and to pure cultures with a non-distributed assumption, which does not reflect real process.

## 2.2.6 Distributed models and integrated bioreactors models

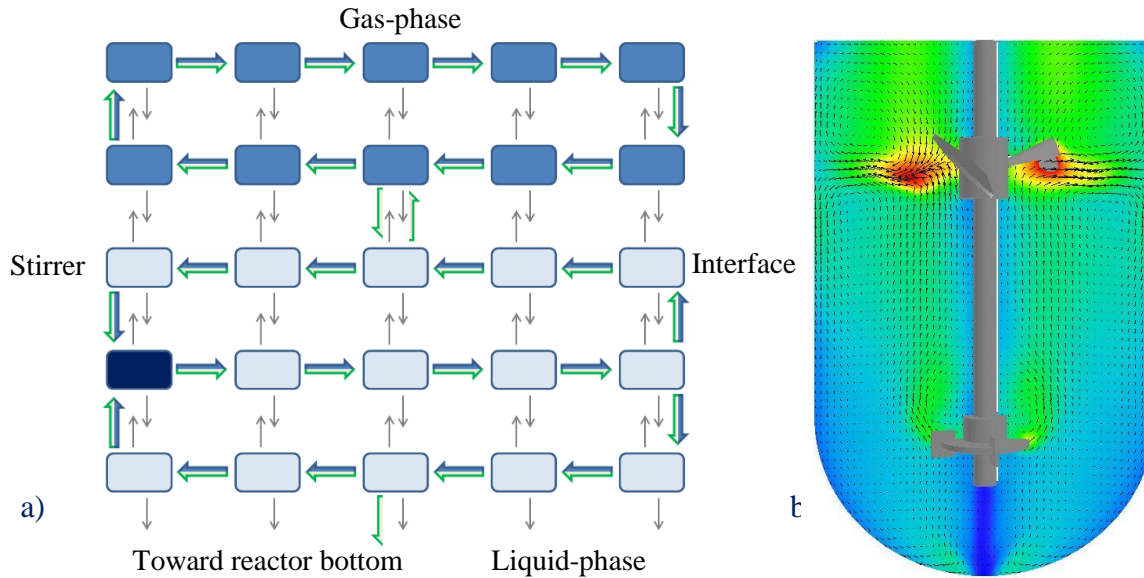
### 2.2.6.1 Non-ideal and compartmental models

Among distributed models, the simplest way to account for concentration, pH, and temperature inhomogeneities in batch or continuous industrial bioreactors consists in combining ideal reactors, PFR, or CSTR, which corresponds to *non-ideal bioreactors*. The most common objectives of distributed models, among others, are to optimize the operating conditions of industrial bioreactors, to save mixing cost by a modification of impeller geometry, to achieve robust scale-up, and/or to prevent bioreactor malfunction, which cannot be managed when ideal mixing conditions are assumed. The conventional non-ideal tank-in-series model for continuous chemical reactor, however, fails for bioreactors. Thus, CSTR and PFR coupled with bypass, recycle, and dead zones must be used, as in **Figure 2.6**. Dead zones play a critical role in industrial bioreactors because they impair the actual residence time of the substrate in comparison to HRT. Channeling must also be prevented, as it reduces productivity, while recycle flow must be increased. These models, always one-dimensional, often derive from the analysis of mixing through residence time distribution analysis (RTD), which can be obtained by various experimental techniques (Trad *et al.*, 2016), although they can also be derived from theoretical considerations. It must be reminded that non-ideal reactor models must be coupled to biokinetic models, usually the unstructured approaches of **section 2.2.4**. So even though the same kinetic model applies everywhere, spatial concentration, pH, and temperature gradients imply that production rates vary in space. Conversely, coupling with unstructured models implies that metabolic switches, which may occur locally, and the potential evolutions of the composition for the microbial population in mixed cultures cannot be predicted.

A generalized association of perfectly-mixed cells in a “*structured*” two-dimensional or three-dimensional way is denoted *compartmental model* (**Figure 2.13a**). Such models are not



new, as Reuss *et al.* (1994) already described such “structured bioreactor models”, even though this expression may induce the same confusion as reported before between the structured models of **section 2.2.5** (*i.e.*, biochemically structured kinetic models) and these “distributed-structured models”.



**Figure 2.13.** Example of compartmental model (a). Example of velocity field extracted from CFD computations in the stirred tank bioreactor of Trad *et al.* (2017) (b).

As simple non-ideal reactors, compartmental models are not commonly used to simulate biohydrogen production processes, which is quite surprising because anaerobic digesters are sensitive to mixing conditions and the same conclusion could be drawn for dark fermentation, while light distribution due to attenuation in photo-fermentation is also a key issue. The main practical reasons are that, even though compartmental models involve only ODE and many commercial ODE solvers are available, coupling complex biokinetic models to a compartmental bioreactor model is not straightforward and leads to a large set of coupled ODE for which programming tasks are compulsory. Computations may also be time-consuming; for example, in ADM1 (**section 2.2.4.5**), each set of ODE and AE for species concentrations must be solved in each compartment. In addition, a theoretical issue lies in the definition of the number of compartments and in the estimation of the flow rates between these compartments. These can no more be derived from RTD and either strong assumptions or local measurements (which is hard task in industrial bioreactors, as stated by Trad *et al.* (2016)) are required. Finally, the last reason is that CFD has emerged as an alternative, with commercial CFD software packages which need only reduced programming skills and seem easy to handle due to an attractive user interface.

However, their correct use requires expertise to avoid non-physical solutions due to numerical error. Recently, *CFD-derived compartmental models* have been proposed, but contrary to conventional CFD, no application can be found in biohydrogen production processes yet. These may be 2-D or 3-D and the flow rates between the compartments must be deduced using post-processed CFD data, which removes the issue of local measurements and preserves the advantages of compartmental models because only an ODE solver is needed. Consequently, the number of compartments may be defined from a physical analysis of the simulated flow (*Figure 2.13b*) and the mass fluxes estimated by a volume-averaging procedure (*Equations 2.10 and 2.11*) applied to small regions of the bioreactor corresponding to the compartments. A typical example of this method can be found in le Moullec *et al.* (2010), but for an aerobic wastewater treatment bioreactor only. From the discussion on CFD in *section 2.2.6.2*, it will be emphasized that *CFD-derived compartmental models* constitute a good compromise for the future application of distributed models to bioreactors because they take spatial heterogeneity, poor mixing, and industrial constraints into account, and can maintain reasonable computation costs at the same time.

#### 2.2.6.2 Models based on Computational Fluid Dynamics (CFD)

CFD consists of a set of numerical modeling tools able to simulate and predict the behavior of single-phase and multiphase fluid flows coupled to heat transfer, mass transfer, and chemical reactions on the basis of first principles (*Figure 2.13b*). CFD is, therefore, a transdisciplinary field between fluid mechanics, applied mathematics, and engineering. Actually, the development of CFD is closely linked to that of computers, as it is highly intensive in terms of CPU and memory usage. CFD has become increasingly popular in the process industries when commercial CFD packages have been available, the most popular being *Ansys®Fluent* and *StarCCM+®* (CD Adapco). The advantages of CFD are numerous: it provides an efficient, economical, and time-saving tool able to predict and visualize the spatial distribution and the transient behavior of hydrodynamic and transport properties. Thus it is able to investigate the influence of scale-up on conversion yields, while reducing the need for experimental data.

CFD methodology implies, first, geometry design and meshing, which consist in dividing the geometry in small tetrahedral, hexahedral or polygonal volumes denoted “*cells*”. 3-D meshes usually from  $10^5$  to several million cells. Non-structured tetrahedral or polyhedral mesh must

perfectly fit the geometry, but Cartesian cut-cell meshing involving a structured hexagonal grid can also be used when a special treatment is applied to cells cut by a solid body. This mesh can finally be considered as a compartmental model in which the volume of the compartments tends to zero. Meshing is a key step because predictions strongly depend on mesh quality. Then, physical models must be defined: the most conventional approach includes the Reynolds-averaged Navier-Stokes equations for solving the local velocity field, to which turbulence closure must be added when turbulent flow conditions prevail (usually, a two-equation model when isotropic turbulence is assumed). Multiphase modeling is allowed. Thus four PDE per phase must be solved in each cell to predict the velocity field, coupled to a minimum of two additional equations per cell when turbulence is supposed to be shared by all phases, which leads to a huge number of coupled PDE to solve simultaneously. The situation is getting worse when these PDE are coupled to the transport equations of temperature and species (**Equation 2.9**), but in general, the flow field is predicted first, and the transient evolution of species concentrations is simulated on a steady solution of the flow field to reduce CPU usage and computing time. Solving this set of PDE is based on their discretization and their linearization, so that a huge set of ODE can be solved numerically using special iterative or multigrid methods of linear algebra for sparse matrices. Thus even though parallel solvers are the rule, CFD simulations of bioreactors usually implies days to weeks, which may be incompatible with engineering constraints. CFD should, however, benefit in the future from the recent developments of HPC (High Performance Computing), while free CFD packages become available, such as *OpenFOAM*.

Examples of CFD applications to biohydrogen production processes remain scarce. However, many studies limited to the hydrodynamic description of anaerobic digesters may be useful for DF, which have been reviewed recently by Trad *et al.* (2016). In addition, a specific design for biohydrogen production by DF based on a vortex-ingesting mixer has been reported by Montante *et al.* (2012), while an original impeller design has been proposed by Trad *et al.* (2017) to enhance solid suspension and axial mixing at the same time. However, a key issue of DF modeling lies in the coupling between hydrodynamics and reaction kinetics. Up to now, only simplified kinetic models have been implemented in CFD codes, which usually do not include the influence of pH because this induces numerical instabilities in the simulations. Typical examples which account for multiphase (two- or three-phase) flow and reaction can be found in Wang *et al.* (2009), Vafajoo and Beigy (2013), and Azargoshasb *et al.* (2015). The interest of these

contributions is that industrial bioreactors, such as EGSB (Expanded Granular Sludge Bed), are simulated. However, the only attempt of coupling CFD with ADM1 has been reported by Gaden and Bibeau (2011), which developed a specific solver based on *OpenFOAM*. This approach has, however, not been retained in the literature. For photo-fermentation, a key issue is light distribution, which is also linked to heat transfer. Temperature profiles and hydrogen production were studied by Zhang *et al.* (2015) and Zhang *et al.* (2017) using CFD in a baffled and a tubular photobioreactor, respectively, coupling hydrodynamic equations to the radiative transfer equation. In parallel, Azargoshasb *et al.* (2015) showed how CFD can be coupled to population balance equations (PBM) in bioreactors (**Equation 2.13**), but they only calculated the bubble size distribution, even though the same methodology could be used to analyze microorganism populations. At the moment, CFD-PBM has not been used to simulate microorganism populations in DF or PF. The same stands for Lagrangian approaches that attempt to follow the trajectories of groups of microorganisms as particles in the flow field.

Finally, CFD emerges as a very effective tool to investigate the coupled influence of mixing and mass, heat, and even light transfer in biohydrogen production processes. However, it remains a time-consuming approach and the simulations are sensitive to numerical approximations and improper grid design. Similarly, the physical understanding of multiphase flow modeling is still incomplete, which may also impair the quality of the predictions and requires experimental validation. Coupling CFD with complex biokinetic models, structured or unstructured, remains in the future, which limits the applicability of the simulations to predict pH gradients and bioreactor malfunction because simulations remains too computationally-intensive. Thus compartmental models derived from CFD, as illustrated by le Moullec *et al.* (2010), emerge as an interesting compromise for bioreactor scale-up and optimization, first, because of the reduced number of compartments in comparison to cell in CFD mesh, but also because simple ODE solvers can be used, so that computation time remains compatible with engineering methodology.

### 2.2.7 Conclusions and perspectives

Biohydrogen is susceptible to play a key role in the future of the energy mix, complementary to a power-to-H<sub>2</sub> strategy in which pure hydrogen gas is used directly or mixed with methane as a biofuel or for green home supply, or used in fuel cells. Dark fermentation and

photo-fermentation constitute promising technologies in the biorefinery concept and may be the cornerstone of a hydrogen biorefinery concept. The coupling between these hydrogen production processes emerges as an attractive solution, as hydrogen yield is theoretically limited to 4 mol H<sub>2</sub>/mol hexose in dark fermentation (and in practice, to 2 mol H<sub>2</sub>/mol hexose in mixed cultures), but photo-fermentation is able to convert volatile fatty acids and solvents of the DF digestate into H<sub>2</sub> to better approach the theoretical yield of 12 mol H<sub>2</sub>/mol hexose.

However, both processes still require more robust optimization and scale-up methodologies. Thus, a better understanding and modeling of these two processes is still necessary. Indeed, the performance of any biohydrogen process depends on the optimization of various biotic and abiotic factors. In this context, the purpose of modeling and simulation is to predict the respective effects of these factors and of their interactions, so that biohydrogen production can be maximized and bioreactor malfunction can be prevented. This chapter has summarized the recent studies on modeling of biohydrogen production through DF and PF processes and given relevant knowledge about the merits and demerits of the different strategies that can be applied for design, scale-up, and optimization.

A summary of these strategies, their respective prerequisites and requirements, their potential, and their issues are presented in *Table 2.11*. First, it emerges from the literature review that the modeling of DF and PF is far less mature than that of anaerobic digestion. Actually, empirical equations remain the most widely used, even if their applicability is rather limited. Statistical models represent a good compromise not only at the laboratory-scale, but also for bioreactor optimization. Their drawback is their lack of physical basis, so that they are not robust against scale-up. For scale-up, structured kinetic models coupled to ideal reactors remain the rule. These are rather versatile and may account for microbial and substrate diversity, but do not consider potential mixing issues due to scale-up, which can lead to bioreactor malfunction at the industrial scale. CFD is useful to circumvent this issue by reconciling the space and time scales, but a full-CFD approach coupling hydrodynamics and refined kinetic models remain in the future. As a conclusion, compartmental models with detailed kinetic models derived from CFD appear as a good compromise, even though this methodology must still be popularized in the community of biochemical engineers.

Table 2.11. Pros and cons of the modeling and simulation strategies of biohydrogen production processes.

Methods	Possible objectives	Requirements	Type	Advantages	Limitations
<b>Empirical equations</b>	Comparison	Exp. data	Unstructured Non-segregated Non-distributed	Simple, rapid	Purely mathematical without any physical basis Batch conditions only
<b>Design of experiments (DOE)</b>	Screening, comparison Multiple-variable Optimization	Exp. data	Unstructured Non-segregated Non-distributed	Reduced number of experimental runs	Limited to polynomial models Optimization only of controlled variables Not robust against scale-up
<b>PCA-PLS</b>	Stoichiometry Multivariate correlation	Exp. data	Unstructured Non-segregated Non-distributed	Cross-correlation between inputs and outputs Accounts for uncontrolled factors	Linear models only No physical basis
<b>ANN and ANN-GA</b>	Optimization Bioreactor control	Exp. data	Unstructured Non-segregated Non-distributed	No prior specification of suitable fitting function Universal approximation capability	Requires a large data set No physical basis Not robust against scale-up
<b>Unstructured kinetic models</b>	Optimization Scale-up Bioreactor control	Exp. Data	Unstructured Non-distributed Possibly segregated	Versatile (simple to complex kinetic mechanisms) Combines phenomenological and theoretical considerations	Formal empirical kinetic laws Must be calibrated
<b>Structured kinetic models</b>	Optimization Scale-up	Exp. Data	Structured Possibly distributed Possibly segregated	Accounts for cell metabolism Predict metabolic switches	Single cell Pure culture
<b>Population balance models (PBM)</b>	Optimization of microorganism viability and performance	Exp. Data	Possibly structured Possibly distributed Segregated	Focus on microbial population dynamics	Probability functions must be calibrated
<b>Non-ideal and compartmental models</b>	Design Scale-up Optimization Bioreactor control	Kinetic model	Possibly structured Distributed Possibly segregated	Approximates mixing conditions Compartmental structure can be deduced from CFD Interaction between biotic/abiotic factors	Complex definition of compartmental structure and mass fluxes
<b>CFD</b>	Design Scale-up Optimization	Kinetic model	Possibly structured Distributed Possibly segregated (coupled with PBM)	First principles Real flow conditions (multiphase, multi-species, etc.) Interaction between biotic/abiotic factors	Complex Time-consuming Highly CPU-intensive

## Nomenclature

### List of symbols

$A$	Arrhenius pre-exponential factor
$C_i$	Volume-average concentration of $i$ in the liquid phase (mol/m <sup>3</sup> )
$D_{L,i}$	Diffusion coefficient of species $i$ in the liquid phase (m <sup>2</sup> /s)
$E_a$	Activation energy (kJ/mol)
$F$	Number of fluxes in MFA
$\dot{G}$	Gas flow rate (m <sup>3</sup> /h)
$G_i$	Concentration of gas $i$ in the headspace (mol/m <sup>3</sup> )
$H$	Cumulative hydrogen production (m <sup>3</sup> )
$H_i$	Henry's law solubility constant of species $i$ (mol/m <sup>3</sup> /Pa)
$H_{max}$	Maximum hydrogen production potential (m <sup>3</sup> )
$I_i$	Non-competitive inhibition constant
$I_{pH}$	pH inhibition constant
$\dot{L}_k$	Liquid flow rate (m <sup>3</sup> /s)
$K_a$	H <sup>+</sup> saturation constant
$K_b$	H <sup>+</sup> inhibition constant
$K_I$	Substrate inhibition constant (g/L)
$K_S$	Monod half-saturation constant (g/L)
$K_\varphi$	Light saturation constant (h <sup>-1</sup> )
$k_L a$	Volumetric mass transfer coefficient (h <sup>-1</sup> )
$k_X$	Decay constant (h <sup>-1</sup> )
$P_i$	Partial pressure of $i$ (Pa)
$pH_{LL}$	Lower pH limit
$pH_{UL}$	Upper pH limit
$q_i$	Specific rate of species $i$ formation (h <sup>-1</sup> )



$R_g$	Ideal gas constant (J/mol/K)
$R_{max}$	Maximum hydrogen production rate (m <sup>3</sup> /h)
$r_{ij}$	Physical, biological or chemical process rate (mol/m <sup>3</sup> /s)
$S$	Concentration of the limiting substrate (g/L)
$T$	Absolute temperature (K)
$t$	Time (h)
$V_H$	Volume of the headspace (m <sup>3</sup> )
$V_L$	Volume of liquid phase (m <sup>3</sup> )
$X$	Concentration of biomass (g/L)
$X_i$	Volume-average concentration of $i$ in the solids (mol/m <sup>3</sup> )
$Y_{P/X}$	Yield of product on biomass (g/g)
$Y_{S/P}$	Yield of substrate on product (g/g)
$Y_{S/X}$	Yield of substrate on biomass (g/g)

*Greek letters*

$\varepsilon_L$	Volume fraction of the liquid phase (m <sup>3</sup> )
$\lambda$	Lag time (h)
$\mu$	Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )
$\mu_{max}$	Maximum specific growth rate (h <sup>-1</sup> )
$v_L$	Local liquid velocity (m/s)

*Abbreviations*

<i>ADM1</i>	Anaerobic Digestion Model n°1
<i>AE</i>	Algebraic Equation
<i>AM2</i>	Anaerobic Model 2
<i>ANN</i>	Artificial Neural Network
<i>ANOVA</i>	Analysis of Variance
<i>BBD</i>	Box Behnken Design
<i>BHP</i>	Biological Hydrogen Production



<i>CCD</i>	Central Composite Design
<i>CFD</i>	Computational Fluid Dynamics
<i>COD</i>	Chemical Oxygen Demand
<i>CPU</i>	Central Processing Unit
<i>CSTR</i>	Continuous Stirred Reactor
<i>DF</i>	Dark Fermentation
<i>DOE</i>	Design of Experiment
<i>EGSB</i>	Expanded Granular Sludge Blanket
<i>FFBPNN</i>	Feed Forward Back Propagation Neural Network
<i>GA</i>	Genetic Algorithm
<i>HPC</i>	High Performance Computing
<i>HPR</i>	Hydrogen Production Rate
<i>HRT</i>	Hydraulic Retention Time
<i>HY</i>	Hydrogen Yield
<i>IWA</i>	International Water Association
<i>MFA</i>	Metabolic Flux Analysis
<i>ODE</i>	Ordinary Differential Equation
<i>OLR</i>	Organic Loading Rate
<i>PBM</i>	Population Balance Model
<i>PCA</i>	Principal Component Analysis
<i>PDE</i>	Partial Derivative Equation
<i>PF</i>	Photo-Fermentation
<i>PFR</i>	Plug Flow Reactor
<i>PLS</i>	Partial Least Square
<i>RSM</i>	Response Surface Methodology
<i>RTD</i>	Residence Time Distribution
<i>SDR</i>	Substrate Degradation Rate

<i>SRT</i>	Solid Retention Time
<i>TN</i>	Total Nitrogen
<i>TOC</i>	Total Organic Carbon
<i>UASB</i>	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

### 2.2.8 References

- H. Abdi, L.J. Williams (2010). Principal Component Analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2, 1-47.
- C.A. Aceves-Lara, E. Latrille, P. Buffiere, N. Bernet, J.P. Steyer (2008). Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chemical Engineering and Processing*. 47, 1968-1975.
- L. Akbari, B.M. Vaziri (2017). Comprehensive modeling of photo-fermentation process for prediction of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 14449-14457.
- M.R. Antoniewicz (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: A mini-review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42, 317-325.
- G. Antonopoulou, H.N. Gavala, I.V. Skiadas, G. Lyberatos (2012). Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 191-208.
- H. Argun, G. Onaran (2017). Effects of N/C, P/C and Fe/C ratios on dark fermentative hydrogen gas production from waste paper towel hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 14990-15001.
- H. Azargoshasb, S.M. Mousavi, T. Amani, A. Jafari, M. Nosrati (2015). Three-phase CFD simulation coupled with population balance equations of anaerobic syntrophic acidogenesis and methanogenesis reactions in a continuous stirred bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 27, 207-217.
- D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M. Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin (2002). Anaerobic Digestion Model N°. 1 (ADM1), Scientific and Technical Report N°. 13. Editor: IWA Publishing. London, UK.
- O. Bernard, Z. Hadj-Sadok, A. Genovesi, J.P. Steyer (2001). Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process. *Biotechnology and Bioengineering*. 75, 424-438.
- G. Cai, B. Jin, P. Monis, C. Saint (2011). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*. 29, 375-387.
- J.F. Castro, V. Razmilic, Z.P. Gerdtzen (2013). Genome based metabolic flux analysis of *Ethanoligenens harbinense* for enhanced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 1297-1306.
- H.H. Cheng, L.M. Whang, C.A. Lin, I.C. Liu, C.W. Wu (2013). Metabolic flux network analysis of fermentative hydrogen production: Using *Clostridium tyrobutyricum* as an example. *Bioresource Technology*. 141, 233-239.

- C.H. Chou, C.L. Han, J.J. Chang, J.J. Lay (2011). Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36, 13972-13983.
- C.H. Chou, C.W. Wang, C.C. Huang, J.J. Lay (2008). Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1550-1558.
- K.M. Desai, S.A. Survase, P.S. Saudagar, S.S. Lele, R.S. Singhal (2008). Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. *Biochemical Engineering Journal*. 41, 266-273.
- E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H.S. Lee (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 79, 656-668.
- D.L.F. Gaden, E. Bibeau (2011). Modelling anaerobic digesters in three dimensions. Written for presentation at the *CSBE/SCGAB 2011 annual conference Inn at the Forks, Winnipeg*.
- A. Ghimire, V. Luongo, L. Frunzo, F. Pirozzi, P.N.L. Lens, G. Esposito (2017). Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 4861-4869.
- R.A. Gonzalez-Garcia, R. Aispuro-Castro, E. Salgado-Manjarrez, J. Aranda-Barradas, E.I. Garcia-Pena (2017). Metabolic pathway and flux analysis of H<sub>2</sub> production by an anaerobic mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 4069-4082.
- W.Q. Guo, N.Q. Ren, X.J. Wang, W.S. Xiang, J. Ding, Y. You, B.F. Liu (2009). Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 100, 1192-1196.
- X.M. Guo, E. Trably, E. Latrille, H. Carrere, J.P. Steyer (2014). Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 7476-7485.
- P.C. Hallenbeck, J.R. Benemann (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1185-1193.
- S. Hassam, E. Ficara, A. Leva, J. Harmand (2015). A generic and systematic procedure to derive a simplified model from the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Biochemical Engineering Journal*. 99, 193-203.
- Z.Y. Hitit, C.Z. Lazaro, P.C. Hallenbeck (2017). Hydrogen production by co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*: Optimization of yield using response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 6578-6589.
- D. Infantes, A.G. Del Campo, J. Villasenor, F.J. Fernandez (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36, 15595-15601.
- P. Jha, E.B. Gueguim Kana, S. Schmidt (2017). Can artificial neural network and response surface methodology reliably predict hydrogen production and COD removal in an UASB bioreactor? *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 18875-18883.
- P. Karthic, S. Joseph, N. Arun, S. Kumaravel (2013). Optimization of biohydrogen production by *Enterobacter* species using artificial neural network and response surface methodology. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 5, 1-12.

- S. Khantib, A. Reungsang (2014). Co-digestion of oil palm trunk hydrolysate with slaughterhouse wastewater for thermophilic bio-hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 6872-6880.
- H.T.Q. Kieu, Y.T. Nguyen, Y.T. Dang, B.T. Nguyen (2016). Use of response surface methodology to optimize culture conditions for hydrogen production by anaerobic bacterial strain from soluble starch. *Journal of Electronic Materials*. 45, 2632-2638.
- N. Kumar, D. Das (2000). Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08. *Process Biochemistry*. 35, 589-593.
- N. Kumar, P.S. Monga, A.K. Biswas, D. Das (2000). Modeling and simulation of clean fuel production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08. *International Journal of Hydrogen Energy*. 25, 945-952.
- S. Kumari, D. Das (2017). Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 4083-4094.
- C.H. Lay, S.Y. Kuo, B. Sen, C.C. Chen, J.S. Chang, C.Y. Lin (2012). Fermentative biohydrogen production from starch-containing textile wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 2050-2057.
- Y. le Moullec, C. Gentric, O. Potier, J.P. Leclerc (2010). Comparison of systemic, compartmental and CFD modelling approaches: Application to the simulation of a biological reactor of wastewater treatment. *Chemical Engineering Science*. 65, 343-350.
- T. Levstek, M. Lakota (2010). The use of artificial neural networks for compounds prediction in biogas from anaerobic digestion: A review. *Agricultura*. 7, 15-22.
- C.Y. Lin, C.H. Lay (2004). Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29, 275-281.
- C. Long, J. Cui, Z. Liu, Y. Liu, M. Long, Z. Hu (2010). Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 6657-6664.
- R. Luedeking, E.L. Piret (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Engineering*. 1, 393-412.
- C. Mamimin, P. Thongdumyu, A. Hniman, P. Prasertsan, T. Imai, S. O-Thong (2012). Simultaneous thermophilic hydrogen production and phenol removal from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15598-15606.
- J. Monod (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*. 3.
- G. Montante, M. Coroneo, J.A. Francesconi, A. Paglianti, F. Magelli (2012). CFD modelling of a novel stirred reactor for the bioproduction of hydrogen. *14th European Conference on Mixing, Warszawa, Poland, 10-13 September 2012*.
- Y. Mu, H.Q. Yu (2007). Simulation of biological hydrogen production in a UASB reactor using neural network and genetic algorithm. *International Journal of Hydrogen Energy*. 32, 3308-3314.
- N. Nasr, H. Hafez, M.H. El Naggat, G. Nakhla (2013). Application of artificial neural networks for modeling of biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 3189-3195.
- K. Nath, M. Muthukumar, A. Kumar, D. Das (2008). Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1195-1203.

- B.O. Nikhil, A. Visa, C.Y. Lin, J.A. Puhakka, O. Yli-Harja (2008). An artificial neural network based model for predicting H<sub>2</sub> production rates in a sucrose-based bioreactor system. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*. 2, 1-6.
- K. Niu, X. Zhang, W.S. Tan, M.L. Zhu (2011). Effect of culture conditions on producing and uptake hydrogen flux of biohydrogen fermentation b metabolic flux analysis method. *Bioresource Technology*. 102, 7294-7300.
- I. Ntaikou, H.N. Gavala, G. Lyberatos (2009). Modeling of fermentative hydrogen production from the bacterium *Ruminococcus albus*: definition of metabolism and kinetics during growth on glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 3697-3709.
- V.M. Pachapur, S.J. Sarma, S.K. Brar, Y. Le Bihan, G. Buelna, M. Verma (2016). Surfactant mediated enhanced glycerol uptake and hydrogen production from biodiesel waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Renewable Energy*. 95, 542-551.
- C.M. Pan, Y.T. Fan, Y. Xing, H.W. Hou, M.L. Zhang (2008). Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. *Bioresource Technology*. 99, 3146-3154.
- B.R.H. Peiris, P.G. Rathnasiri, J.E. Johansen, A. Kuhn, R. Bakke (2006). ADM1 simulations of hydrogen production. *Water Science and Technology*. 53, 129-137.
- B.K.V. Penumathsa, G.C. Premier, G. Kyazze, R. Dinsdale, A.J. Guwy, S. Esteves, J. Rodríguez (2008). ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach. *Water Research*. 42, 4379-4385.
- M. Reuss, S. Schmalzriedt, M. Jenne (1994). Structured Modelling of Bioreactors. *In Advances in Bioprocess Engineering*. Editor: E. Galindo, O.T. Ramírez. Springer. Dordrecht, Netherlands.
- S. Roy, M. Vishnuvardhan, D. Das (2014). Improvement of hydrogen production by newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* IIT BT-ST1. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 7541-7552.
- S.K. Samson, T.R. Manikkandan, R. Dhanasekar (2016). Optimization of microbial hydrogen production using statistical experimental design from maize stalk by isolated strain. *Indian Journal of Chemical Technology*. 23, 368-373.
- P. Saraphirom, A. Reungsang (2010). Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 13435-13444.
- S. Sarma, A. Anand, V.K. Dubey, V.S. Moholkar (2017). Metabolic flux network analysis of hydrogen production from crude glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*. 245, 169-177.
- P. Satpathy, P. Biernacki, F. Uhlenhut, H. Cypionka, S. Steinigeweg (2016). Modelling anaerobic digestion in a biogas reactor: ADM1 model development with lactate as an intermediate. *Journal of Environmental Science and Health*. 51, 1216-1225.
- Y. Sewsynker, E.B. Gueguim Kana (2016). Intelligent models to predict hydrogen yield in dark microbial fermentations using existing knowledge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 12929-12940.
- M. Taherdanak, H. Zilouei, K. Karimi (2015). Investigating the effects of iron and nickel nanoparticles on dark hydrogen fermentation from starch using central composite design. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40, 12956-12963.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable Energy*. 98, 264-282.

- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2017). Experimental and numerical investigation of hydrodynamics and mixing in a dual-impeller mechanically-stirred digester. *Chemical Engineering Journal*. 329, 142-155.
- L. Vafajoo, B. Beigy (2013). A dynamic model for glucose fermentation in a three-phase bioreactor. *APCBEE Procedia*. 5, 328-332.
- E.W.J. van Niel, P.A.M. Claassen, A.J.M. Stams (2003). Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 81, 255-262.
- S. Venkata Mohan, S. Veer Raghavulu, G. Mohanakrishna, S. Srikanth, P.N. Sarma (2009). Optimization and evaluation of fermentative hydrogen production and wastewater treatment processes using data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 216-226.
- B. Wang, W. Wan, J. Wang (2008a). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 7013-7019.
- K.S. Wang, J.S. Chen, Y.H. Huang, S.L. Huang (2013). Integrated Taguchi method and response surface methodology to confirm hydrogen production by anaerobic fermentation of cow manure. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 45-53.
- J. Wang, W. Wan (2008a). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 5392-5397.
- J. Wang, W. Wan (2008b). The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Science in China Press*. 51, 1110-1117.
- J. Wang, W. Wan (2009a). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 235-244.
- J. Wang, W. Wan (2009b). Optimization of fermentative hydrogen production process using genetic algorithm based on neural network and response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 255-261.
- Y. Wang, Q.B. Zhao, Y. Mu, H.Q. Yu, H. Harada, Y.Y. Li (2008b). Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1164-1171.
- X. Wang, J. Ding, N.Q. Ren, B.F. Liu, W.Q. Guo (2009). CFD simulation of an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 9686-9695.
- J.K. Whiteman, E.B. Gueguim Kana (2014). Comparative assessment of the artificial neural network and response surface modeling efficiencies for biohydrogen production on sugar cane molasses. *BioEnergy Research*. 7, 295-305.
- K. Willquist, V. Nkongendem Nkemka, H. Svensson, S. Pawar, M. Ljunggren, H. Karlsson, M. Murto, C. Hulteberg, E.W.J. van Niel, G. Liden (2012). Design of a novel biohythane process with high H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production rates. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 17749-17762.
- J. Yoon-Sun, S.H. Yu, K.G. Ryu, T.J. Lee (2008). Kinetic study of pH effects on biological hydrogen production by a mixed culture. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 1130-1135.
- Z. Zhang, Q. Wu, C. Zhang, Y. Wang, Y. Li, Q. Zhang (2015). Effect of inlet velocity on heat transfer process in a novel photo-fermentation biohydrogen production bioreactor using computational fluid dynamics simulation. *Bioresources*. 10, 469-481.

- Z.P. Zhang, Q.G. Zhang, J.Z. Yue, L.H. Li, T. Zhang, Z.B. Liu (2017). CFD modeling and experiment of heat transfer in a tubular photo-bioreactor for photo-fermentation bio-hydrogen production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 10, 209-217.
- J. Zhong, D.K. Stevens, C.L. Hansen (2015). Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). *International Journal of Hydrogen Energy*. 40, 15470-15476.
- M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts, K. van't Riet (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1875-1881.



## Bilan

---

Au vu des objectifs de ces travaux, nous avons fait le choix de développer notre étude bibliographique autour de deux axes principaux. Le premier se focalisait sur les différentes voies d'amélioration de la production de biohydrogène par la voie fermentaire sombre. Ceci, en tenant compte de l'influence des principaux paramètres biotiques et abiotiques du système, ainsi que des différentes stratégies de culture et de conception du bioréacteur. Quant au second, il se concentrait sur les différents outils de modélisation/simulation pouvant être utilisés pour optimiser ou prédire la production de biohydrogène.

D'un point de vue général, l'état de l'art confirme que les problématiques liées aux influences de la viscosité du digestat et du mélange sur les performances du procédé de fermentation sombre ne sont quasiment pas prises en considération. Pourtant, ces deux facteurs abiotiques ont un rôle fondamental sur la conduite de la fermentation. La viscosité des intrants organiques est fonction de l'origine, de la composition et de la saisonnalité à laquelle ces derniers sont recueillis. Ainsi, la viscosité du digestat demeure un paramètre incontournable du procédé dont la variabilité doit être prise en compte. Dès lors, le mélange par agitation mécanique constitue un levier d'action qui doit contribuer à distribuer de manière homogène les substrats organiques, les microorganismes, les nutriments essentiels et les produits de la fermentation sombre dans l'ensemble du bioréacteur utilisé. De même, le mélange doit favoriser les transferts de matière aux interfaces liquide-microorganismes et liquide-gaz. Dans ce cas précis, le mélange par agitation mécanique présente une contrainte majeure à prendre en compte. Il est en effet nécessaire, que la part de la consommation énergétique qui lui est dédié soit inférieure à  $8 \text{ W/m}^3$  pour assurer la soutenabilité économique du procédé. Concernant le volet modélisation/simulation, malgré le nombre conséquent d'outils et de modèles à disposition, il subsiste encore des verrous pour la simulation des performances du procédé de fermentation sombre. Cela résulte notamment du fait de la complexité des phénomènes physiques, physico-chimiques et biologiques mis en jeu et de leur couplage au cours de la fermentation.



Aussi, pour contribuer au manque de données de la littérature en ce qui concerne la viscosité du digestat et le mélange, les effets conjugués de ces deux paramètres abiotiques sur la production et les rendements en biohydrogène en cultures batch seront étudiés dans le **Chapitre 4**.

Par ailleurs, nous avons pu relever que la qualité du mélange est un critère nécessaire à atteindre pour veiller au bon fonctionnement de tous les procédés biologiques. C'est pourquoi, le **Chapitre 5** sera consacré à sa caractérisation, et ce dans les mêmes conditions de viscosité du digestat et de mélange mises en jeu dans le **Chapitre 4**. Cette caractérisation passera par l'usage de différentes méthodes de mesure. Il s'agira des techniques de suivi conductimétrique, de décoloration chimique et PLIF pour la détermination du temps de mélange, mais aussi de la méthode d'oxygénation/désoxygénation pour le transfert de matière liquide-gaz.

La caractérisation du mélange passe également par l'étude de l'écoulement du fluide au sein du bioréacteur. A cet effet, l'étude de l'hydrodynamique locale dans les mêmes conditions de viscosité du digestat et de mélange relatées précédemment, sera abordée par l'intermédiaire d'outils expérimentaux (PIV) et numériques (CFD) dans le **Chapitre 6**.

Enfin, le couplage des processus physiques, physico-chimiques et biologiques intervenant lors de la production de biohydrogène sera décrit dans le **Chapitre 7**. Cela passera par le développement et la calibration d'un modèle ADM1 modifié et constituera l'objet du dernier chapitre de résultats.

## **Chapitre 3 : Matériels et méthodes**

---

## Préambule

---

Dans ce chapitre, nous allons présenter les matériels et méthodes mis en œuvre au cours de ces travaux. Ce dernier comporte deux principaux volets fortement liés, à savoir un volet expérimental et un volet de modélisation/simulation.

Avant toute chose, il convient de rappeler que les différents travaux menés, ainsi que les matériels et méthodes utilisés, ont été développés en vue de caractériser l'effet des paramètres abiotiques du système sur la production en biohydrogène, mais aussi dans un cadre plus large, afin d'optimiser le couplage entre les paramètres biotiques et abiotiques dans le bioréacteur. L'effet des paramètres biotiques et des principaux paramètres abiotiques du système sur les rendements globaux en biohydrogène a été défini par le biais de travaux antérieurs ; ce qui comprend les effets respectifs de la composition du milieu de culture, du pH, de la température, des concentrations en substrat et des métabolites formés en cours de réaction. L'effet de certains paramètres abiotiques du système sur les rendements globaux et les productions en biohydrogène va être étudié au cours de ces travaux car l'efficacité du procédé est également fortement liée à l'hydrodynamique locale rencontrée par les bactéries en cours de culture, mais aussi aux conditions de stress mécanique résultant à la fois du stress généré par l'écoulement et par les mobiles d'agitation. Enfin, les conditions d'agitation ont un impact non négligeable sur l'uniformité de la distribution spatiale des bactéries, des substrats ajoutés selon le mode de culture, de la solution basique injectée afin de réguler le pH du milieu de culture et des espèces solubles formées en cours de fermentation. Tous ces facteurs étant potentiellement favorables ou pas à un environnement physico-chimique à l'échelle locale permettant d'augmenter les rendements globaux et les productivités en biohydrogène.

Dans un premier temps, concernant le volet expérimental, nous présenterons la plateforme expérimentale utilisée pour conduire les expérimentations de fermentation sombre. Par la suite, nous décrirons les différentes expérimentations menées pour déterminer les effets combinés de la viscosité du digestat et de la vitesse d'agitation des mobiles sur la production en biohydrogène de deuxième génération. Nous détaillerons également les principales caractéristiques des cultures, ainsi que les méthodes de mesures permettant d'évaluer l'efficacité du procédé. Dans ce même

volet, nous exposerons les dispositifs expérimentaux ainsi que les techniques de mesure conventionnelles et avancées permettant de définir :

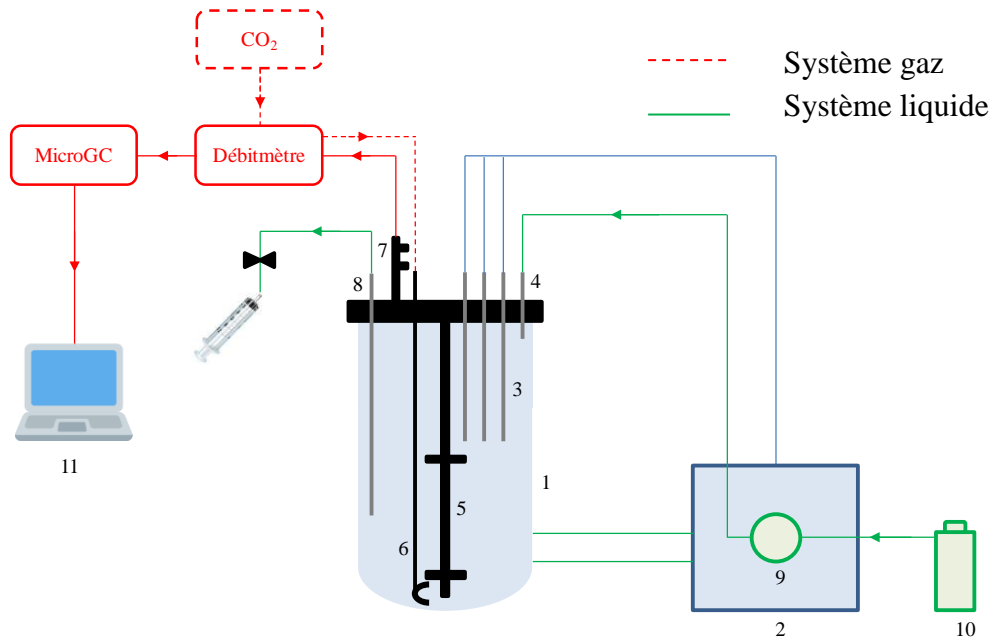
- ✓ Le transfert de matière liquide-gaz par la méthode de désoxygénation/oxygénation ;
- ✓ La qualité du mélange par le biais des techniques conductimétriques, de décoloration chimique et de Fluorescence Induite par Nappe Laser (PLIF) ;
- ✓ L'hydrodynamique locale et la caractérisation des composantes turbulentes de l'écoulement dans la cuve agitée par la technique de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV).

Dans un second temps, nous présenterons les différentes techniques et stratégies utilisées dans le volet de modélisation/simulation, permettant de prendre en compte les effets de l'hydrodynamique et du mélange dans le bioréacteur mécaniquement agité. Ainsi, nous décrirons l'outil numérique de modélisation appelé CFD (Mécanique des Fluides Numérique) qui est fondé sur la résolution numérique des équations de Navier-Stokes afin de simuler et de prédire le comportement des fluides mono- ou multi-phase en lien avec le transfert de matière et les réactions biochimiques dans le bioréacteur. Enfin, nous décrirons le modèle ADM1 (*Anaerobic Digestion Model N°1*) qui est un modèle de type « *grey box* », permettant de coupler des modèles bio-cinétiques semi-empiriques à des réactions biochimiques, en lien avec le transfert de matière et les équilibres biochimiques au sein du bioréacteur. Ce dernier sera modifié, en implémentant ou supprimant différentes réactions biochimiques, mais aussi en définissant le bioréacteur en plusieurs cellules parfaitement agitées, ceci dans l'optique de se rapprocher des conditions de culture réelles

### 3.1 Plateforme expérimentale de la fermentation sombre

#### 3.1.1 Description du bioréacteur, de son instrumentation et du système de commande et régulation

L'ensemble de l'installation est illustré par la **Figure 3.1**. Les expérimentations sont conduites dans un bioréacteur (*B. Braun*, France) à double enveloppe de 2-L de volume utile (la double enveloppe permet de réguler la température). Ce dernier comporte une cuve cylindrique en verre borosilicaté à fond hémisphérique de 130 mm de diamètre interne ( $T$ ) et dont la hauteur du liquide une fois remplie par le milieu de culture est de 160 mm ( $H_L$ ). La cuve est équipée de 4 chicanes (contre-pales) de 10 mm de largeur. Le bioréacteur est muni d'un moteur d'agitation (6SM 27LL-4500, *Kollmorgen Seidel*, Allemagne) fixé sur une platine en acier inoxydable assurant l'étanchéité du système, sur laquelle est monté un condenseur. Le moteur permet d'agiter un axe d'agitation en acier inoxydable de 10 mm de diamètre ( $d_S$ ) muni de deux turbines à disque à six pales (mobiles d'agitation de type Rushton) de 55 mm de diamètre ( $D$ ).



**Figure 3.1.** Représentation schématique de l'ensemble de l'installation : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Unité de contrôle digitale ; (3) Sondes de température, pH, redox ; (4) Entrée base ; (5) Axe d'agitation ; (6) Sparger ; (7) Condenseur ; (8) Canne de prélèvement ; (9) Pompe péristaltique ; (10) Solution de base KOH 5N ; (11) Système d'acquisition.

Le bioréacteur est également équipé de plusieurs sondes de pH (sonde 405-DPAS-SC-K8S, *Mettler Toledo*, Etats-Unis), redox (sonde Pt-4805-DPAS-SC-K8S, *Mettler Toledo*, Etats-

Unis) et de température. L'ensemble de ces éléments ainsi que le moteur d'agitation sont reliés à une unité de contrôle digital (DCU) (Biostat B-DCU, *B. Braun*, France) qui permet de suivre :

- ✓ Le pH grâce à une sonde de pH ;
- ✓ Le potentiel d'oxydoréduction grâce à une sonde redox,

et de fixer les différents points de consignes afin de réguler :

- ✓ Le pH grâce à une pompe péristaltique permettant l'ajout d'une solution alcaline ;
- ✓ La température grâce à un thermocryostat qui est relié à la double enveloppe ;
- ✓ La vitesse d'agitation.

En sortie du bioréacteur, les effluents gazeux passent par le condenseur qui est relié à un compteur volumétrique de type gaz à tambour (TG05, *Ritter*, Allemagne), qui permet de mesurer le débit volumique de biogaz produit. La sortie de ce dernier est reliée à une chromatographie en phase gazeuse de type micro-GC (Agilent 3000A, *Agilent Technologies*, Etats-Unis), qui permet d'analyser la composition chimique du biogaz produit.

### 3.1.2 Les expérimentations de la fermentation sombre

#### 3.1.2.1 Préparation des cultures

##### 3.1.2.1.1 Consortium microbien

Le consortium microbien utilisé au cours de ces travaux est issu de boues anaérobies récoltées dans une station de traitement des eaux usées de Clermont-Ferrand (France). Les boues ont été soumises à un prétraitement thermique à 90°C pendant 10 minutes et un prétraitement chimique en présence de 2-bromoethanesulfonate de sodium (10 mM) selon la méthodologie développée par Bullock et Kristiansen (1989). Cela permet d'éliminer les bactéries méthanogènes de la famille des *Archaea*, dites hydrogénotrophes de par leur faculté à produire du méthane à partir d'hydrogène et de dioxyde de carbone. A la suite de ces prétraitements, le consortium microbien a été inoculé sur milieu synthétique (10% v/v) dans des bouteilles de culture anaérobie de 125 mL et cultivé en anaérobiose stricte sous atmosphère de CO<sub>2</sub> pendant 16 heures dans une étuve (IN110, *Memmert*, Allemagne) à 37 ± 1°C. L'incubation a lieu sur une table d'agitation (KS 130 basic, *IKA®-Werke GmbH*, Allemagne) dont la vitesse est réglée à 160 trs/min. Enfin,

après inoculation, la culture est dégazée et stockée à 4°C. Le consortium microbien est entretenu par repiquages périodiques toutes les semaines. Après chaque repiquage, les mêmes quantités de biogaz sont produites, témoignant ainsi de la bonne stabilité du consortium microbien. La composition du milieu de culture est résumée dans les **Tableaux 3.1** et **3.2**.

Les travaux de Noblecourt *et al.* (2017) ont permis de caractériser la communauté bactérienne du consortium par une approche de biologie moléculaire combinant SSCP (polymorphisme de conformation des simples brins) et analyse par PCR (amplification en chaîne par polymérase) quantitative. Il ressort de cette étude que le consortium est composé en majorité de bactéries de l'espèce *Clostridium* (94-99%) dont la souche *Clostridium butyricum* CDC-51208 révélée par séquençage du génome microbien est majoritaire.

**Tableau 3.1.** Composition des solutions minérales utilisées dans le milieu de culture.

Solutions minérales	Composition	Quantité (%)	Quantité (g/L)
<b>I</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,60	6,00
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,60	6,00
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,40	24,00
<b>II</b>	NaCl	1,20	12,00
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,12	1,20
	CaCl <sub>2</sub>	0,12	1,20
	MnSO <sub>4</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,015	0,15
<b>III</b>	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0015	0,015
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,04	0,40
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O	0,60	6,00
<b>IV</b>	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,82	8,20
	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,26	2,60
	CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,15	1,50
	NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,28	2,80
	FeCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	2,50	25,00

**Tableau 3.2.** Composition du milieu de culture.

Milieu de culture (%)					
Solution minérale I	7,50	PABA	0,01	Biotine	0,02
Solution minérale II	7,50	L-cystéine	0,05	Hémine bovine	0,10
Solution minérale III	0,02	Résazurine	0,10	Eau distillée	79,30
Solution minérale IV	5,00	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,40		

#### 3.1.2.1.2 Composition des milieux de pré-culture et de culture

Le milieu de culture utilisé pour les pré-cultures et les cultures en bioréacteur est un milieu minéral dont la composition est décrite dans les **Tableaux 3.1** et **3.2**. Le glucose est la source de carbone et les concentrations sont respectivement de 8 g/L, 30 g/L et 40 g/L pour les pré-cultures, les cultures en système batch et continu en bioréacteur.

#### 3.1.2.1.3 Préparation des milieux de pré-culture et de culture

En ce qui concerne la préparation des pré-cultures, le milieu est chauffé à 60°C et mis sous flux de CO<sub>2</sub> purifié par passage sur une colonne de copeaux de cuivre chauffée à 300°C. Puis, du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et de la L-cystéine sont ajoutés. Le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> permet d'ajuster le pH du milieu à une valeur proche de 6,00 tandis que la L-cystéine permet d'abaisser le potentiel d'oxydoréduction à une valeur proche de -350 mV. Après réduction du milieu pendant 1 heure, la résazurine rose en milieu oxydant devient incolore en milieu réduit et sert d'indicateur coloré. 90 mL de milieu sont ensuite répartis dans des bouteilles de culture anaérobie de 125 mL mises sous flux de CO<sub>2</sub>. Après 10 minutes, les bouteilles sont fermées par un septum et serties. Finalement, les milieux sont autoclavés à 121°C et 1 bar pendant 20 minutes.

Concernant le bioréacteur, 1,8 L de milieu sont préparés et autoclavés à 121°C et 1 bar pendant 20 minutes. Après autoclavage, le milieu est mis sous flux de CO<sub>2</sub> pendant 1 heure comme expliqué précédemment, et le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ainsi que la L-cystéine sont ajoutés stérilement. Le CO<sub>2</sub> entrant dans le bioréacteur est préalablement filtré à l'aide d'un filtre stérilisé de 0,2 µm (Midisart 2000 PTFE, Sartorius, France).

#### 3.1.2.1.4 Préparation de l'inoculum

Afin d'inoculer le bioréacteur, 200 mL d'inoculum sont préparés. Pour cela, par deux fois, 10 mL de consortium microbien sont repiqués dans les bouteilles contenant le milieu de pré-culture, et cultivés en anaérobiose stricte sous atmosphère de CO<sub>2</sub> pendant 12 heures dans une étuve (IN110, Memmert, Allemagne) à 37 ± 1°C. L'incubation a lieu sur une table d'agitation (KS 130 basic, IKA®-Werke GmbH, Allemagne) dont la vitesse est réglée à 160 trs/min.



#### 3.1.2.1.5 Cultures en système batch

Les expérimentations ont été conduites dans un bioréacteur en système batch. Le volume utile est de 2-L, ce qui inclut 1,8 L de milieu de culture et 0,2 L d'inoculum ajoutés en début d'expérimentation. Le flux de CO<sub>2</sub> est maintenu 10 minutes après inoculation afin de conserver une anaérobie stricte dans le milieu. Le bioréacteur est équipé de sondes de pH, redox et de température reliées à une DCU permettant de fixer les différents points de consignes. Le pH est ajusté à une valeur de consigne de 6,00 après stérilisation par ajout d'une solution d'hydroxyde de potassium 5N, et contrôlé à  $\pm 0,05$  tout au long de la fermentation. Le potentiel d'oxydoréduction est suivi avec une sonde redox. Finalement, la température est maintenue à  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  par un système chauffant à double enveloppe.

#### 3.1.2.1.6 Cultures en système continu

Les expérimentations en système continu ont été conduites de manière similaire à celles en système batch. En début de culture, la fermentation est lancée en système batch avec une concentration initiale en glucose dans le milieu de culture de 40 g/L. Ensuite, lorsque la majorité du substrat est consommé par les bactéries, le procédé de fermentation sombre en système batch est changé pour un système continu en faisant varier les temps de séjour hydraulique (TSH). Les différentes étapes de culture sont présentées dans le **Tableau 3.3**. Au cours des cultures en continu, le milieu d'alimentation correspond au milieu de culture avec une concentration en glucose de 20 g/L.

**Tableau 3.3.** Caractéristiques des cultures en système continu.

Système	Batch		Continu	
Temps (j)	1,05	3,34	1,46	1,00
TSH (h)	-	12	8	4
Débit (m <sup>3</sup> /j)	-	$4 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$12 \cdot 10^{-2}$

### 3.1.2.2 Analyses des échantillons en cours de culture

#### 3.1.2.2.1 Analyses de la phase gazeuse

Afin de suivre l'évolution du débit, du volume et de la composition du biogaz, différents outils analytiques (compteur volumétrique et chromatographie en phase gazeuse) sont placés en sortie de la phase gazeuse du bioréacteur.

Le débit volumique de biogaz produit est mesuré par un compteur volumétrique de type gaz à tambour (TG05, Ritter, Allemagne). Les mesures sont enregistrées et traitées toutes les minutes par l'intermédiaire du logiciel *Rigamo*<sup>®</sup> version 3.1 (Ritter, Allemagne). Les données mémorisées permettent de calculer le débit, et par intégration, la quantité de biogaz produite au cours de la fermentation.

La composition chimique du biogaz recueilli à la sortie du bioréacteur est analysée par l'intermédiaire d'une chromatographie en phase gazeuse au moyen d'un système micro-GC (Agilent 3000A, *Agilent Technologies*, Etats-Unis), équipé d'un injecteur automatique, de deux voies d'analyse (colonnes capillaires) et de deux détecteurs à conductibilité thermique. La première voie d'analyse est équipée d'un tamis moléculaire MS5A (*Agilent Technologies*, Etats-Unis) afin de déterminer les concentrations respectives en H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et CO. L'argon est utilisé en tant que gaz vecteur à une pression de 2 bars. Les températures opératoires du port d'injection et de la colonne sont respectivement de 80°C et 90°C. La seconde voie d'analyse est équipée d'une colonne PoraPlot U (*Agilent Technologies*, Etats-Unis) afin de déterminer les concentrations en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S. L'hydrogène est employé en tant que gaz vecteur à une pression de 2 bars. Les températures opératoires du port d'injection et de la colonne sont respectivement de 90°C et 60°C. Les mesures sont enregistrées et traitées toutes les 15 minutes par l'intermédiaire du logiciel *Soprane*<sup>®</sup> (*SRA Instruments*, France). Par intégration, la proportion de chaque gaz détecté est quantifiée.

En combinant les données du débit de biogaz et sa composition chimique, le débit molaire de biohydrogène ainsi que son taux de production peuvent être déduits.

#### 3.1.2.2.2 Analyses de la phase liquide (digestat)

Afin de suivre l'évolution des concentrations du substrat carboné ainsi que des métabolites produits en cours de fermentation (acides gras volatils (AGVs), lactate, éthanol), des échantillons de 2 mL ont été prélevés chaque heure dans la phase liquide du bioréacteur pour être analysés par HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance).

La chaîne HPLC utilisée (1260 Infinity Quaternary LC system, *Agilent Technology*, Etats-Unis) est constituée de deux colonnes mixtes montées en série, combinant échange d'ions et exclusion stérique (Rezex ROA 300X 7.8 mm, *Phenomenex*, Etats-Unis). La phase mobile est une solution à 2 mM d'acide sulfurique dans de l'eau ultra-pure (MilliQ Plus, *Millipore*, France), dégazée en continu par un dégazeur (300 Ultrasonik, *Ney*, Etats-Unis). Le débit de la phase mobile est fixé à 0,7 mL/min à l'aide d'une pompe (HP 1100 Series, *Agilent Technologies*, Etats-Unis). La chaîne HPLC est équipée d'un injecteur automatique à boucle fixe (Rheodyne valve, *Agilent Technology*, Etats-Unis) qui permet d'injecter 10  $\mu$ L d'échantillon. La détection des divers composés de l'échantillon est assurée par un réfractomètre (HP 1100 series, *Agilent Technologies*, Etats-Unis). L'acquisition et l'intégration des mesures sont réalisées par l'intermédiaire du logiciel *Chemstation*<sup>®</sup> (HP Chem, *Agilent Technologies*, Etats-Unis).

Avant d'être analysés et afin d'éviter l'encrassement des colonnes, les échantillons doivent être déprotéinisés. A cet effet, 250  $\mu$ L d'une solution d'hydroxyde de baryum ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 0,3 M) et 250  $\mu$ L d'une solution de sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5% p/v) sont ajoutés à 2 mL d'échantillon. La présence de ces deux composés va entraîner la précipitation des protéines de l'échantillon. Après 5 minutes de centrifugation à 9.600 g, le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose (*Chromafil*, Allemagne) de 0,45  $\mu$ m et placé dans des vials pour analyse.

#### 3.1.2.3 Calculs utilisés pour déterminer l'efficacité de la fermentation sombre

Pour chaque métabolite soluble formé en cours de culture ainsi que pour le substrat consommé, nous avons mesuré l'évolution de la concentration en fonction du temps ainsi que les quantités initiales et finales. Cela permet de calculer d'une part, les rendements massiques et molaires en métabolite par rapport au substrat, et d'autre part, les productivités en métabolites en fonction du temps. De plus, des calculs ont été réalisés pour définir les vitesses de consommation en substrat. Finalement, les rendements molaires ainsi que les productivités en biohydrogène ont

été calculés par l'intermédiaire des volumes initiaux et finaux en biohydrogène. Les **Tableaux 3.4** et **3.5** présentent les formules utilisées pour la détermination des rendements, des productivités et des vitesses de consommation

**Tableau 3.4.** Variables mesurées au cours des cultures.

Métabolite/substrat	Désignation	Quantité initiale	Quantité finale	Unité	Masse molaire (g/mol)
Glucose consommé	Glu	Glu <sub>i</sub>	Glu <sub>f</sub>	g	180,16
Butyrate produit	Bu	Bu <sub>i</sub>	Bu <sub>f</sub>	g	88,11
Acétate produit	Ac	Ac <sub>i</sub>	Ac <sub>f</sub>	g	59,04
Lactate produit	Lac	Lac <sub>i</sub>	Lac <sub>f</sub>	g	90,08
Propionate produit	Pro	Pro <sub>i</sub>	Pro <sub>f</sub>	g	74,08
Ethanol produit	Eth	Eth <sub>i</sub>	Eth <sub>f</sub>	g	46,07
Hydrogène produit	VH2	VH2 <sub>i</sub>	VH2 <sub>f</sub>	L	-

**Tableau 3.5.** Calculs utilisés pour déterminer l'efficacité du procédé.

Calculs	Formules			
	Rendement massique (g/g <sub>glucose consommé</sub> )	Rendement molaire (mol/mol <sub>glucose consommé</sub> )	Productivité (g/L/h) ou (L <sub>H2</sub> /L/h)	Vitesse de consommation (g <sub>glucose</sub> /L/h)
Glucose	-	-	-	$\frac{(Glu_i - Glu_f)}{V} / (t_f - t_i)$
Butyrate	$\frac{Bu_f - Bu_i}{Glu_i - Glu_f}$	$\frac{(Bu_f - Bu_i)/MM_{Bu}}{(Glu_f - Glu_i)/MM_{Glu}}$	$\frac{(Bu_f - Bu_i)}{V} / (t_f - t_i)$	-
Acétate	$\frac{Ac_f - Ac_i}{Glu_i - Glu_f}$	$\frac{(Ac_f - Ac_i)/MM_{Ac}}{(Glu_f - Glu_i)/MM_{Glu}}$	$\frac{(Ac_f - Ac_i)}{V} / (t_f - t_i)$	-
Lactate	$\frac{Lac_f - Lac_i}{Glu_i - Glu_f}$	$\frac{(Lac_f - Lac_i)/MM_{Lac}}{(Glu_f - Glu_i)/MM_{Glu}}$	$\frac{(Lac_f - Lac_i)}{V} / (t_f - t_i)$	-
Propionate	$\frac{Pro_f - Pro_i}{Glu_i - Glu_f}$	$\frac{(Pro_f - Pro_i)/MM_{Pro}}{(Glu_f - Glu_i)/MM_{Pro}}$	$\frac{(Pro_f - Pro_i)}{V} / (t_f - t_i)$	-
Ethanol	$\frac{Eth_f - Eth_i}{Glu_i - Glu_f}$	$\frac{(Eth_f - Eth_i)/MM_{Eth}}{(Glu_f - Glu_i)/MM_{Glu}}$	$\frac{(Eth_f - Eth_i)}{V} / (t_f - t_i)$	-
Hydrogène	-	$\frac{P \cdot (VH2_f - VH2_i) / R \cdot T}{(Glu_f - Glu_i) / MM_{Glu}}$	$\frac{(VH2_f - VH2_i)}{V} / (t_f - t_i)$	-

### 3.1.3 Maquette froide de la cuve agitée et de ses mobiles d'agitation

Les expériences de fermentation sombre ont été menées dans le bioréacteur décrit précédemment (**section 3.1.1**), tandis que les mesures expérimentales concernant le transfert de matière liquide-gaz, le temps de mélange et l'hydrodynamique ont été conduites dans une cuve dont la géométrie est identique à celle du bioréacteur (**Figure 3.2**) ; cependant, celle-ci n'est pas équipée de la platine en acier inoxydable et des équipements assurant son étanchéité pour travailler en anaérobiose. Cette cuve chicanée à fond hémisphérique de 2-L de volume utile est transparente et fabriquée en verre borosilicaté. Son diamètre interne ( $T$ ) est de 130 mm et une fois remplie, la hauteur de liquide clair ( $H_L$ ) est de 160 mm. Quatre chicanes en acier inoxydable sont montées le long de la paroi de la cuve. Leur largeur est de 10 mm et leur épaisseur est de 1,5 mm. Leur hauteur et leur position sont telles qu'elles couvrent uniquement la zone cylindrique mais pas la zone incurvée du fond hémisphérique de la cuve. La cuve est disponible en simple et double enveloppe, mais la géométrie reste parfaitement identique.

Ainsi, les mesures de transfert de matière, transfert liquide-gaz par détermination du  $k_L a$  et mesure du temps de mélange ( $t_m$ ) par conductimétrie et décoloration chimique ont été effectuées dans la cuve à double enveloppe car les techniques utilisées ne sont pas sensibles aux distorsions optiques. *A contrario*, les mesures de transfert de matière par la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser et les mesures hydrodynamiques par Vélocimétrie par Images de Particules ont été réalisées dans la cuve à simple enveloppe afin d'améliorer la qualité de l'acquisition des images, car ce sont des méthodes optiques sensibles aux distorsions lumineuses. L'axe de rotation des mobiles est une tige en aluminium de diamètre 10 mm dont l'axe de symétrie coïncide avec celui de la cuve. Ce dernier est immergé à une distance de 10 mm du fond de la cuve et est équipé de deux turbines à disque à six pales droites (**Figure 3.2**), par des mobiles d'agitation de type turbine Rushton (agitation bi-étagée). Ce système d'agitation a pour double objectif d'homogénéiser le milieu dans l'ensemble de la cuve le plus rapidement possible, mais aussi d'améliorer le transfert de matière gaz-liquide en surface. L'axe d'agitation et les deux mobiles sont mis en rotation dans le sens horaire par un moteur électrique (Eurostar 60 Control, IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH, Allemagne) qui permet de contrôler la vitesse de rotation  $N$  pour une plage de vitesse allant de 30 à 2000 trs/min et un couple maximal de 60 N.cm. Les caractéristiques géométriques de la cuve et des mobiles d'agitation sont résumées dans le **Tableau 3.6**.

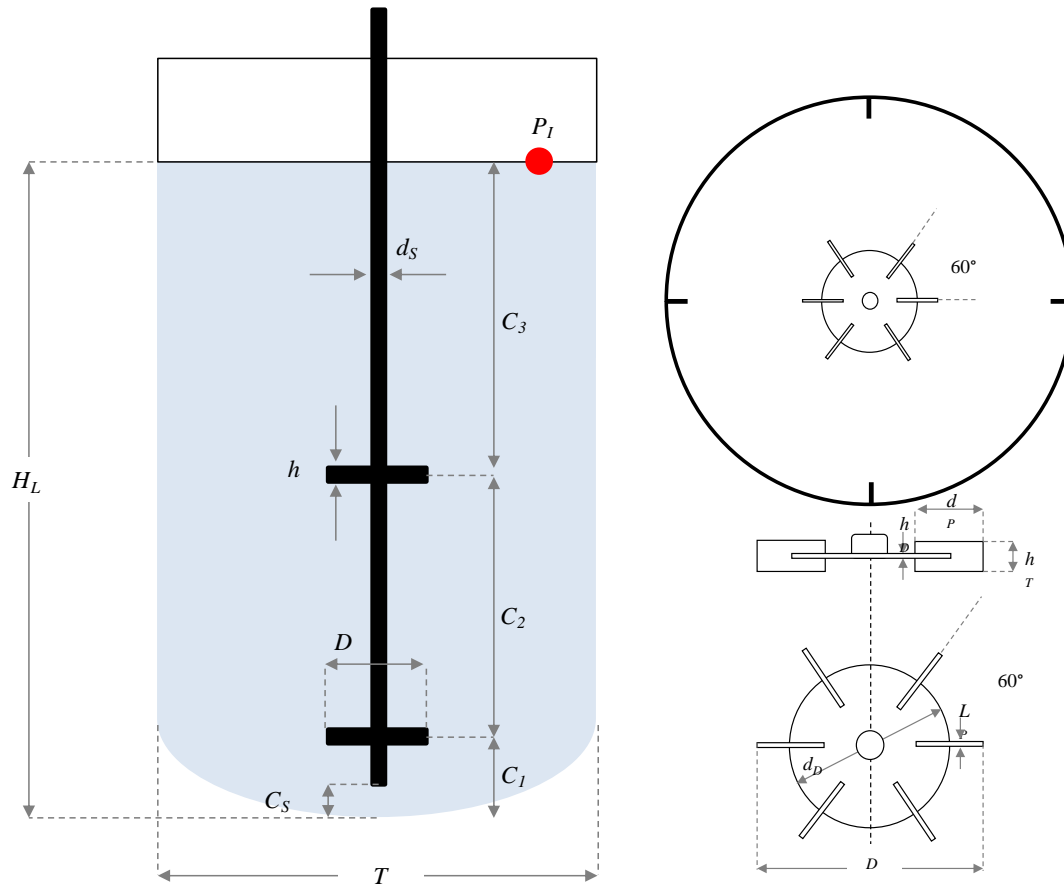


Figure 3.2. Configuration de référence : caractéristiques géométriques de la cuve agitée et des mobiles d'agitation.

Tableau 3.6. Caractéristiques géométriques de la cuve et des mobiles d'agitation.

Cuve agitée	Turbine Rushton à 6 pales
Diamètre interne $T = 130 \text{ mm}$	$\Phi = 60^\circ$
Hauteur $H = 180 \text{ mm}$	Diamètre $d_D = 32 \text{ mm}$ $D = 55 \text{ mm}$ $d_P = 15 \text{ mm}$
Hauteur du liquide $H_L = 160 \text{ mm}$	Hauteur $h_D = 1,5 \text{ mm}$ $h = 10 \text{ mm}$

### 3.1.3.1 Configuration de référence du système d'agitation et d'injection

La **configuration de référence** du système d'agitation correspond à la configuration utilisée pour les expériences de fermentation sombre et l'étude expérimentale du transfert de matière et de l'hydrodynamique associée (**Tableau 3.7**). La configuration du système d'agitation associe deux turbines Rushton à 6 pales droites à décharge radiale (séparées de  $60^\circ$ ). Le diamètre du mobile  $D$  est de 55 mm ; les pales ont une largeur  $d_p$  de 15 mm, une hauteur  $h$  de 10 mm et une épaisseur de 1,5 mm. Le disque a un diamètre  $d_D$  de 32 mm et une épaisseur  $h_D$  de 1,5 mm (**Tableau 3.6**). Le cisaillement de ces turbines est connu pour être important.

La distance entre les deux turbines  $C_2$  est de 85 mm (*clearance*), la distance entre la turbine « basse » et le bas de la cuve  $C_1$  est de 25 mm, la distance entre la turbine « haute » et le haut du liquide  $C_3$  est de 50 mm. L'injection de la solution basique en cours de culture et des différentes solutions permettant de caractériser le mélange s'accomplit à la surface du liquide. Ainsi, le point d'injection est à la position  $P_I = H_L = 160$  mm.

### 3.1.3.2 Configurations alternatives du système d'agitation et d'injection

La configuration du système d'agitation et d'injection a été modifiée afin d'analyser leur influence sur le temps de mélange. Par conséquent, toutes les caractéristiques propres à la **configuration de référence** sont similaires et uniquement deux paramètres ont été modifiés :

- ✓ La distance entre les turbines ou « *clearance* »,  $C_{2'}$  = 115 mm ;
- ✓ La position du point d'injection,  $P_{I'}$  = 110 mm.

Finalement trois **configurations alternatives** (**Figure 3.3**) ont été appliquées en vue de l'étude du temps de mélange par la technique conductimétrique et la technique de décoloration chimique :

- ✓ **Configuration alternative 1** :  $C_2 = 85$  mm et  $P_{I'} = 110$  mm ;
- ✓ **Configuration alternative 2** :  $C_{2'} = 115$  mm et  $P_I = 160$  mm ;
- ✓ **Configuration alternative 3** :  $C_{2'} = 115$  mm et  $P_{I'} = 110$  mm ;

Les différentes configurations et cuves utilisées selon les techniques appliquées sont résumées dans le **Tableau 3.8**.

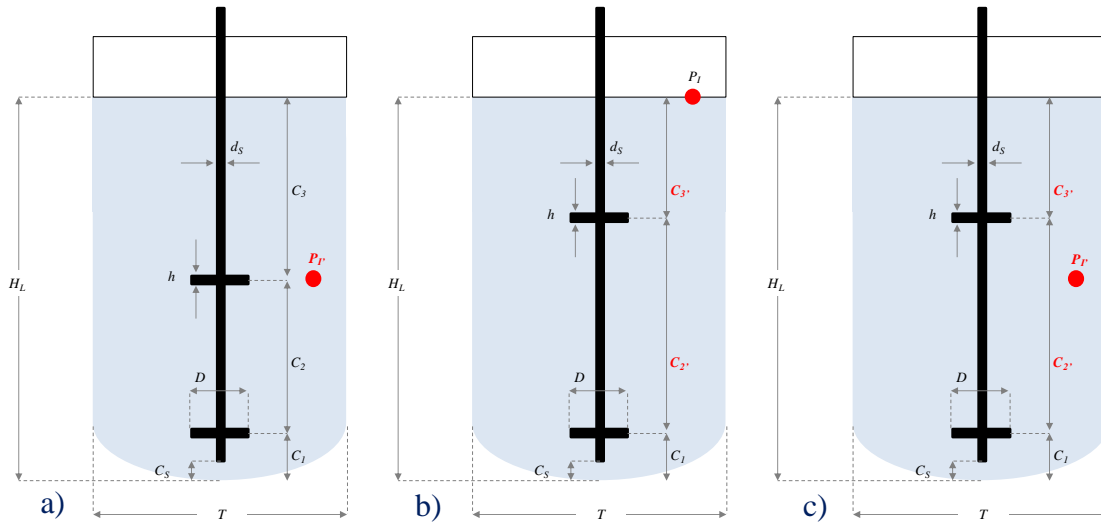


Figure 3.3. Configurations alternatives 1 (a), 2 (b) et 3 (c).

Tableau 3.7. Configurations de référence et alternatives du système d'agitation et d'injection.

Configuration de référence	Configurations alternatives		
	1	2	3
Distance entre les 2 mobiles			
$C_2=85$ mm	$C_2=85$ mm	$C_2'=115$ mm	$C_2'=115$ mm
Distance entre turbine « basse » et bas de cuve			
$C_1=25$ mm			
Distance entre turbine « haute » et haut du liquide			
$C_3=50$ mm	$C_3=50$ mm	$C_3'=20$ mm	$C_3'=20$ mm
Diamètre axe d'agitation			
$d_s = 10$ mm			
Distance axe d'agitation fond de cuve			
$C_s = 10$ mm			
Position du point d'injection			
$P_I=160$ mm	$P_I'=110$ mm	$P_I=160$ mm	$P_I'=110$ mm



Tableau 3.8. Cuves, configurations de référence et alternatives du système d'agitation et d'injection en fonction des expérimentations menées.

Principe d'étude	Technique mise en œuvre	Configuration de référence	Configuration alternative	Cuve à double enveloppe	Cuve à simple enveloppe
<b>Fermentation sombre</b>		✓	-	✓	-
<b>Transfert de matière liquide-gaz</b>	Désoxygénation/oxygénation	✓	-	✓	-
<b>Temps de mélange</b>	Conductimétrie	✓	✓	✓	-
	Décoloration chimique	✓	✓	✓	-
	PLIF	✓	-	-	✓
<b>Hydrodynamique locale</b>	PIV	✓	-	-	✓

### 3.2 Etude de l'effet de la viscosité du digestat et de la vitesse d'agitation des mobiles lors du procédé de fermentation sombre

#### 3.2.1 Conditions de culture

Pour analyser les effets de deux paramètres abiotiques lors du procédé de fermentation sombre, un plan factoriel complet a été défini, en utilisant la viscosité du digestat et la vitesse d'agitation des mobiles en tant que facteurs. Ainsi, cinq niveaux de viscosité du digestat de culture ont été étudiés ( $9,0 \cdot 10^{-4}$  à  $6,1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s). Elle est modifiée, en incorporant différentes fractions du lubrifiant *Emkarox<sup>TM</sup> HV45* au milieu de culture (% v/v). Le lubrifiant *Emkarox<sup>TM</sup> HV45* n'est pas consommé par les bactéries en cours de fermentation. C'est un fluide visqueux Newtonien composé de copolymères de polyéthylèneglycols (PEG) totalement miscibles à l'eau. Différentes fractions d'Emkarox ont été diluées dans le milieu de culture (0%, 5%, 10%, 20% et 30%). Pour chaque solution Newtonienne, trois niveaux de vitesses d'agitation des mobiles ont été testés. Ainsi, les différentes vitesses imposées sont de 0,67, 2,00 et 3.33 s<sup>-1</sup>; correspondant respectivement à 40, 120 et 200 trs/min. Au total, 15 expérimentations (**Tableau 3.9**) avec différentes conditions de viscosité du digestat et vitesses d'agitation des mobiles ont été conduites

avec la *configuration de référence*. Chaque expérimentation caractéristique d'un écoulement donné a été conduite en triplicat.

**Tableau 3.9.** Design du plan factoriel complet.

Vitesse d'agitation $N$ (trs/min)	Viscosité dynamique $\mu$ (Pa.s)
40	$9,0 \cdot 10^{-4}$
40	$2,5 \cdot 10^{-3}$
40	$2,3 \cdot 10^{-2}$
40	$3,7 \cdot 10^{-2}$
40	$6,1 \cdot 10^{-2}$
120	$9,0 \cdot 10^{-4}$
120	$2,5 \cdot 10^{-3}$
120	$2,3 \cdot 10^{-2}$
120	$3,7 \cdot 10^{-2}$
120	$6,1 \cdot 10^{-2}$
200	$9,0 \cdot 10^{-4}$
200	$2,5 \cdot 10^{-3}$
200	$2,3 \cdot 10^{-2}$
200	$3,7 \cdot 10^{-2}$
200	$6,1 \cdot 10^{-2}$

### 3.2.2 Caractérisation rhéologique des fluides

Les propriétés rhéologiques des cinq milieux de cultures ont été mesurées à pression atmosphérique à la température de 35°C correspondante à la température de culture, à l'aide d'un rhéomètre rotatif AR-G2 (TA Instruments, Etats-Unis). Les mesures sont effectuées au moyen du système à cylindres concentriques de type Couette à double entrefer (hauteur du rotor : 53 mm ; rayons externe/interne du rotor : 17,5/16,0 mm ; rayons externe/interne du stator : 18,5/15,1 mm), équipé d'un système Peltier permettant de contrôler la température. Ainsi, 10 mL de solution sont déposés dans l'entrefer. L'analyse consiste à imposer deux rampes de taux de cisaillement allant de  $100 \text{ s}^{-1}$  à  $1 \text{ s}^{-1}$  pendant 10 minutes, puis inversement. Au total, 40 points de mesures sont mesurés à un intervalle régulier de 30 secondes. L'acquisition et l'intégration des mesures sont réalisées par l'intermédiaire du logiciel AR<sup>®</sup> (TA Instruments, Etats-Unis). Les viscosités dynamiques  $\mu$  des différentes solutions Newtoniennes sont reportées dans le **Tableau 3.10**.

### 3.2.3 Caractérisation de la tension de surface des fluides

Les tensions de surface des cinq milieux de cultures ont été mesurées à pression atmosphérique à la température de 35°C correspondant à la température de culture à l'aide d'un tensiomètre K12 (*Kruss GmbH*, Allemagne). Les mesures sont effectuées au moyen d'une lame de Wilhelmy. Au total, 400 points de mesures sont mesurés à un intervalle régulier de 3 secondes. L'acquisition et l'intégration des mesures sont réalisées par l'intermédiaire du logiciel *LabsDesk<sup>TM</sup>* (*Kruss GmbH*, Allemagne). Les tensions de surface des différentes solutions Newtoniennes sont résumées dans le **Tableau 3.10**.

**Tableau 3.10.** Viscosité dynamique et tension de surface à 35°C des solutions aqueuses Newtoniennes d'Hemkarox HV45.

Composition du fluide (% v/v)	Eau 100%	HV45 5%	HV45 10%	HV45 20%	HV45 30%
Viscosité dynamique (Pa.s)	$9,0 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$6,1 \cdot 10^{-2}$
Tension de surface (mN.m <sup>-1</sup> )	66,95	49,86	47,87	44,92	43,80

### 3.2.4 Caractérisation de la taille moyenne des agrégats bactériens

La taille caractéristique des agrégats bactériens ( $D_b$ ) a été évaluée en prélevant 10 mL d'échantillon dans la phase liquide du bioréacteur. Elle a été estimée à partir de la mesure de la distribution des tailles des objets en suspension par diffusion statique de la lumière au moyen d'un granulomètre Mastersizer Micro+ (*Malvern Instr. Ltd.*, Royaume-Uni). L'analyse des données a été conduite selon la théorie de Fraunhofer, avec et sans dispersion préalable de l'échantillon par des ultrasons.

### 3.2.5 Analyse du plan factoriel complet

La réponse évaluée par l'intermédiaire du plan factoriel complet est la production en biohydrogène exprimée en volume d'H<sub>2</sub>. Ainsi, une analyse de la variance a été réalisée afin d'étudier l'influence des facteurs principaux et de leurs interactions sur la réponse.

### 3.2.6 Evaluation du stress mécanique et hydrodynamique

Les résultats obtenus ont été développés et comparés selon le mode d'écoulement du fluide, en évaluant la production en biohydrogène en fonction de la puissance mécanique  $P$ , du nombre adimensionnel de Reynolds  $Re$  et de l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$ .

La puissance mécanique dissipée  $P$  par un mobile d'agitation correspond à l'énergie mécanique que le mobile transmet au fluide par unité de temps. Elle traduit la résistance mécanique du fluide due aux frottements que rencontre le mobile à vitesse fixe. Il s'agit d'un paramètre essentiel largement utilisé dans les étapes de conception, de dimensionnement et d'extrapolation des cuves mécaniquement agitées. La puissance dissipée par l'agitation, exprimée en W, est reliée aux conditions opératoires du bioréacteur, aux propriétés physiques du fluide et à la géométrie du mobile par l'expression :

$$P = \rho \cdot N_p \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (3.1)$$

Elle est donc fonction de la masse volumique du fluide  $\rho$  (kg/m<sup>3</sup>), du nombre adimensionnel de puissance du mobile  $N_p$  (ou nombre de Newton), de la vitesse de rotation du mobile  $N$  (trs/min) et de la géométrie du mobile à travers son diamètre  $D$  (m). La valeur du nombre de puissance est dépendante de la géométrie du mobile et des caractéristiques géométriques du bioréacteur ; en présence de chicanes, elle est décroissante lorsque la vitesse d'agitation des mobiles augmente en régime d'écoulement laminaire et tend vers une constante lorsque le régime d'écoulement est turbulent. Dans un bioréacteur à agitation mécanique, le niveau de stress mécanique subi par les bactéries est relié à la quantité d'énergie dissipée par unité de volume et de temps dans le système, donc à la puissance dissipée par unité de volume  $P/V$ . Celle-ci peut être estimée par :

$$\frac{P}{V} = \frac{2\pi \cdot C \cdot N}{V} \quad (3.2)$$

où  $C$  correspond au couple résistant mesuré sur l'axe d'agitation et  $V$  est le volume de fluide dans le bioréacteur.

Conventionnellement, il existe deux méthodes pour accéder aux valeurs expérimentales de la puissance mécanique dissipée ; la « *méthode électrique* » et la « *méthode mécanique* ». La première consiste à mesurer la puissance électrique consommée par le moteur, mais elle est peu

précise car la mesure est significativement affectée par la consommation électrique interne du moteur qui dépend de sa vitesse d'agitation. La seconde, plus précise, repose sur la mesure du couple résistant  $C$  de l'axe d'agitation. Ainsi, dans notre étude,  $P$  a été déduit de l'équation 3.1 en estimant les valeurs de  $N_p$  en fonction du nombre adimensionnel de Reynolds  $Re$ . En effet, pour les fluides Newtoniens, la puissance dissipée d'un mobile est exprimée sous la forme d'une courbe maîtresse reliant le nombre de puissance au nombre de Reynolds qui est défini par :

$$Re = \frac{\rho ND^2}{\mu} \quad (3.3)$$

où  $\mu$  est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s). Le nombre de Reynolds est un paramètre adimensionnel qui représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses. Il permet de caractériser la nature du régime d'écoulement d'un fluide, qu'il soit laminaire, de transition ou turbulent. Il peut donc être utilisé pour relier les effets combinés de la viscosité du digestat de culture et de la vitesse d'agitation imposée. Ainsi, différentes données de la littérature dans des conditions expérimentales proches de celles utilisées dans notre étude ont été recueillies (**Tableau 3.11**). Une approximation des valeurs par la fonction spline du logiciel *Matlab*<sup>®</sup> (*The MathWorks*, Etats-Unis) a permis de déterminer les valeurs de  $N_p$  (**Figure 3.4**) et donc de calculer la puissance dissipée.

**Tableau 3.11.** Résumé du nombre adimensionnel de puissance  $N_p$  obtenu dans la littérature.

Références bibliographiques	$D/T$	$C_2/D$
Rushton <i>et al.</i> (1950)	-	-
Metzner <i>et al.</i> (1960)	0,42	-
Hudcova et Machon (1989)	0,33	1,50
Armenante et Chang (1998)	0,34	1,50
Jaworski <i>et al.</i> (2000)	0,50	-
Markopoulos et Pantuflas (2001)	0,52	1,40
Babalona <i>et al.</i> (2005)	0,52	1,40
Jahoda <i>et al.</i> (2007)	0,34	2,90
Pan <i>et al.</i> (2008)	0,40	1,20
Kasat <i>et al.</i> (2008)	0,31	1,44
Taghavi <i>et al.</i> (2011)	0,33	1,80

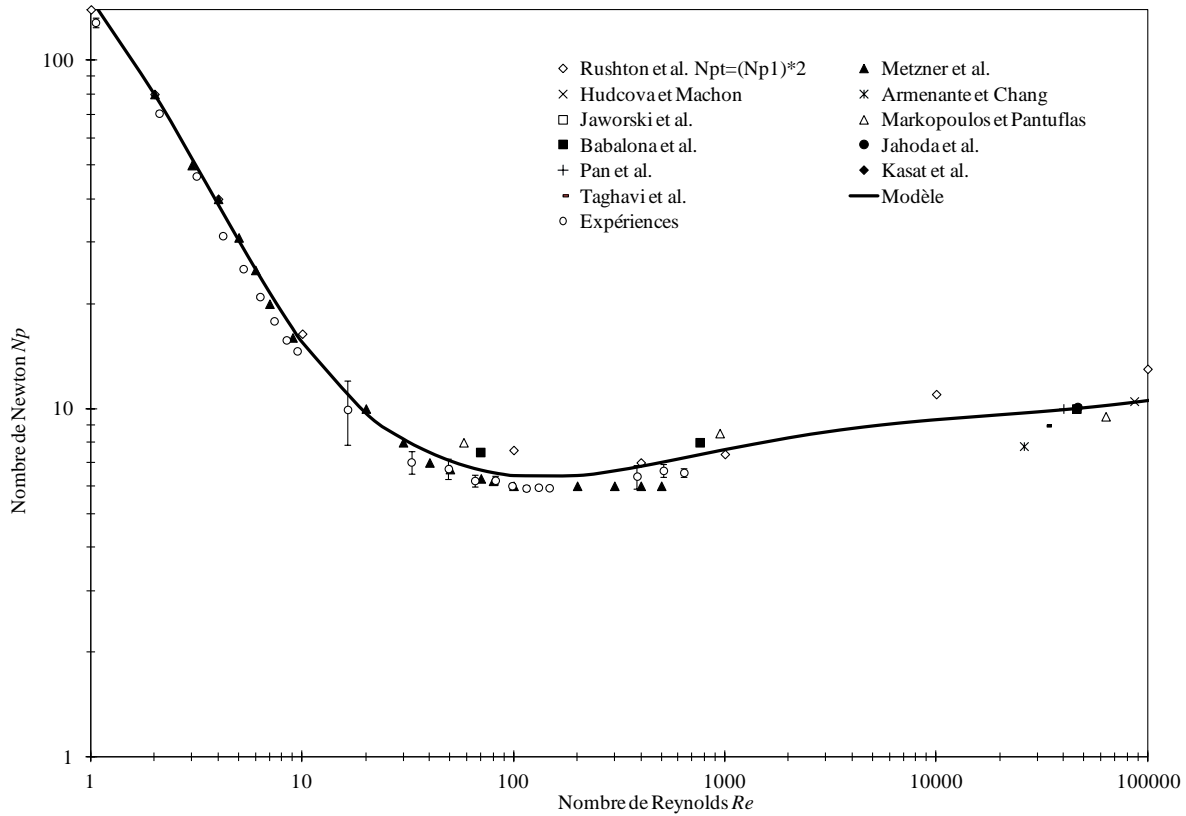


Figure 3.4. Nombre adimensionnel de puissance  $N_p$  obtenu dans la littérature et modèle obtenu.

Finalement, le modèle théorique de la turbulence isotrope de Kolmogorov (Kolmogorov, 1941) a été utilisé afin de décrire l'écoulement turbulent dans la cuve agitée. Cette approche a été rapportée par Collignon *et al.* (2016) pour caractériser le cisaillement microscopique au sein de l'écoulement turbulent, obtenu par le rapport entre le diamètre de microporteurs et la taille des plus petits agrégats tourbillonnaires à l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$  dont la valeur moyenne a été calculée à partir des mesures de la puissance dissipée. Le modèle représente l'écoulement turbulent comme étant la superposition d'une cascade de tourbillons de tailles décroissantes. Ainsi, les grands tourbillons sont formés par les mobiles d'agitation et ils transfèrent à une vitesse constante l'énergie  $\varepsilon$  vers les petites structures où elle est finalement dissipée en chaleur par les forces visqueuses. Il est généralement admis que la structure des grands agrégats tourbillonnaires est dépendante de la géométrie de la cuve, alors que leur structure devient indépendante de celle-ci à mesure que leur taille décroît. Enfin, la taille des plus petits agrégats tourbillonnaires présents au sein de l'écoulement correspond à l'échelle où les forces visqueuses sont égales aux forces inertielles et au moment où l'énergie commence à être

dissipée sous forme de chaleur par frottement. La taille moyenne des plus petits tourbillons est définie par l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$  obtenue selon la relation :

$$\lambda_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (3.4)$$

qui ne dépend pas directement de l'énergie cinétique turbulente  $k$ , mais de la viscosité cinématique du fluide  $\nu$  et de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente par unité de masse  $\varepsilon$  qui est une grandeur locale, que l'on peut estimer en moyenne à partir de  $P$  par :

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho V} \quad (3.5)$$

Finalement le rapport  $\lambda_K/D_b$ , traduisant le rapport entre la taille moyenne des plus petits agrégats tourbillonnaires de l'écoulement turbulent et la taille moyenne des agrégats bactériens ( $D_b$ ), a été calculé pour évaluer les dommages hydrodynamiques pouvant être causés par l'écoulement turbulent aux microorganismes.

### **3.3 Etude expérimentale de l'hydrodynamique et du mélange**

Les expériences menées afin d'étudier le transfert de matière liquide-gaz, le mélange et l'hydrodynamique dans la cuve agitée ont été conduites en triplicat pour chaque technique. Ceci, dans les mêmes conditions que celles des cultures de fermentation sombre (viscosité du digestat et vitesses d'agitation des mobiles) (*Tableau 3.9*). Les solutions consistent en un mélange d'eau distillée et de PEG, conduisant à des viscosités dynamiques similaires à celles des milieux de culture. Selon la technique utilisée, les cuves, les *configurations de référence/alternatives* du système d'agitation et d'injection sont différentes (*Tableau 3.8*). Avant chaque mesure, les solutions sont agitées pendant 30 minutes à leur condition respective de mélange, ceci afin que les conditions d'écoulement soient établies, mais surtout pour éliminer les bulles d'air pouvant être présentes en milieu visqueux.

### 3.3.1 Etude du transfert de matière liquide-gaz par mesure du coefficient de transfert volumétrique $k_L a$

#### 3.3.1.1 Principe de la technique de désoxygénation/oxygénation

Dans notre étude, nous avons mesuré le transfert de matière d'oxygène  $(k_L a)_{O_2}$  par la méthode de désoxygénation/oxygénation (réoxygénation), ceci afin d'estimer indirectement le transfert de matière d'hydrogène  $(k_L a)_{H_2}$ . Le montage expérimental ainsi que son schéma représentatif sont illustrés par la **Figure 3.5**. Cette technique consiste premièrement à saturer la solution en oxygène par bullage à l'air. Dans un second temps, la solution est désoxygénée par bullage à l'azote pur. Enfin, une réoxygénation de la solution par bullage à l'air permet de suivre la dynamique de la remontée en oxygène dissous dans la solution et de déduire le coefficient volumétrique de transfert de matière. Le suivi de l'évolution de la concentration en oxygène dissous est généralement relevé à l'aide d'une sonde à oxygène (**Figure 3.6**). Finalement, le coefficient volumétrique de transfert d'hydrogène peut être déduit à partir de la valeur expérimentale calculée pour l'oxygène en utilisant le modèle de pénétration de Higbie, qui relie le coefficient de transfert de matière  $k_L$  à l'interface gaz-liquide d'une espèce  $i$  à son coefficient de diffusion moléculaire  $D_i$  dans de l'eau par :

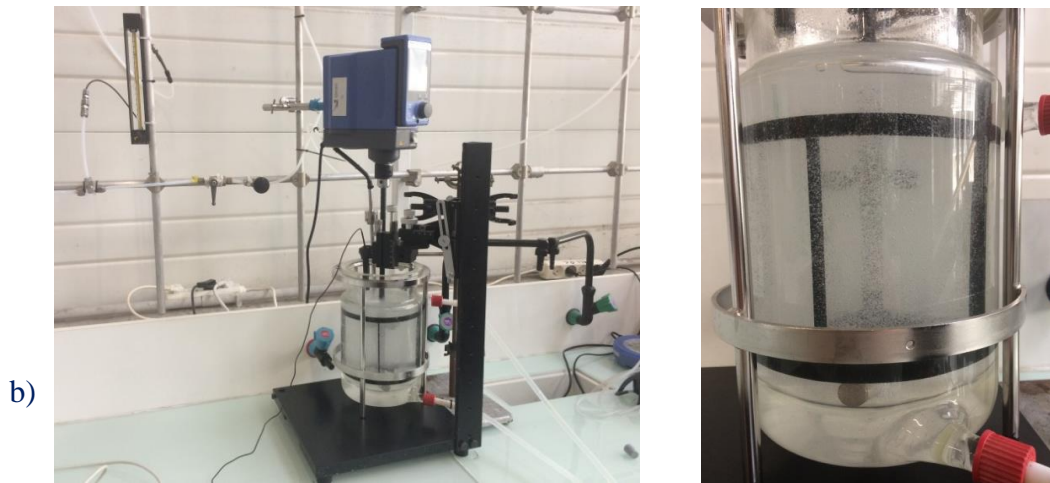
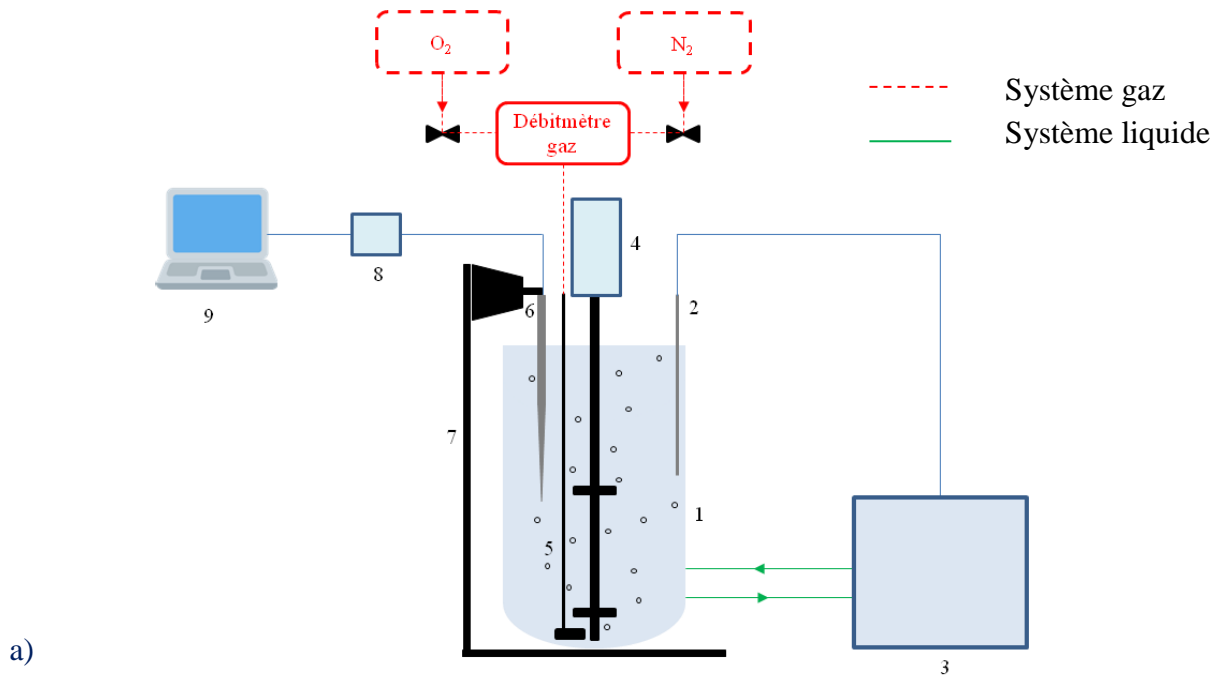
$$(k_L)_i \sim \sqrt{D_i} \quad (3.6)$$

$$(k_L a)_{H_2} = (k_L a)_{O_2} \cdot \sqrt{\frac{D_{H_2}}{D_{O_2}}} \quad (3.7)$$

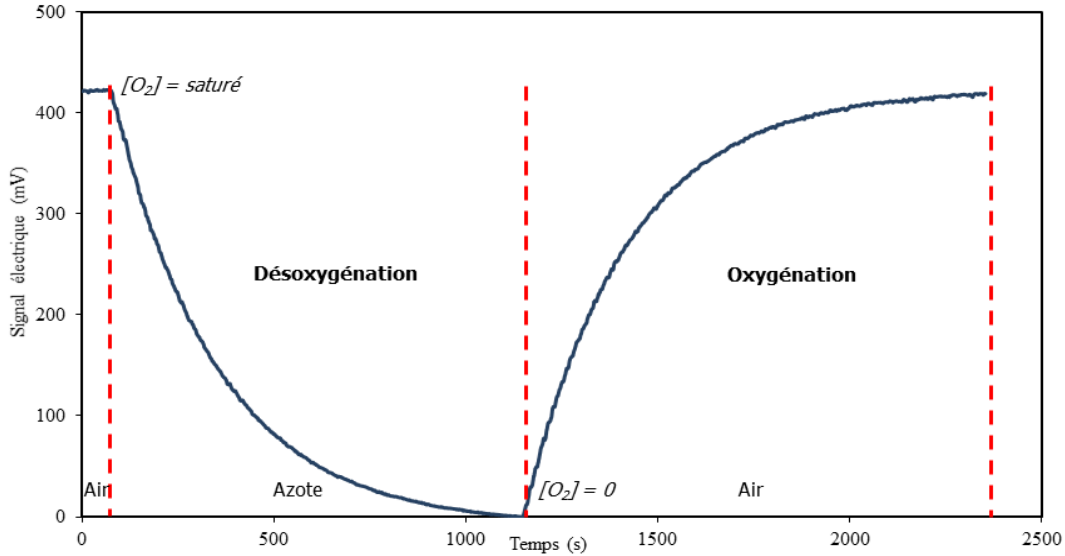
à 35 °C,  $D_{H_2}$  est égal à  $6,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  et  $D_{O_2}$  est égal à  $3,2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ , ce qui conduit à un facteur de correction de 1,4. Ainsi, à aire interfaciale  $a$  constante et à la température de 35 °C l'**équation 3.7** devient :

$$(k_L a)_{H_2} = 1,4 \cdot (k_L a)_{O_2} \quad (3.8)$$





**Figure 3.5.** Schéma du banc expérimental de la technique de désoxygénation/oxygénation : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Sonde de température ; (3) Cryostat à circulation ; (4) Moteur ; (5) Sparger et fritté inox ; (6) Microsonde ; (7) Support et micromanipulateur ; (8) Oxymètre ; (9) Système d'acquisition (a) ; Photographies du montage (b).



**Figure 3.6.** Exemple de courbe de réponse du signal électrique relevé par la microsonde pour un cycle de désoxygénation/oxygénation.

Dans notre cas, les transferts de matière liquide-gaz ont été longs avec des cycles de désoxygénation/oxygénation pouvant aller de 30 minutes à 4 heures. Ainsi, la phase liquide a été considérée comme parfaitement mélangée et aucune corrélation de premier ordre du signal de la microsonde n'a été nécessaire. De même, l'effet du temps de réponse de la microsonde (environ 15 secondes) est considéré comme négligeable. Aussi, la comparaison du temps caractéristique du transfert de matière  $1/(k_L a)$  au temps de mélange  $t_m$  dans la cuve ( $t_m \ll 1/(k_L a)$ ), montre que l'approximation d'une cuve parfaitement mélangée peut être appliquée pour la concentration en oxygène dissous. Finalement, le coefficient volumétrique de transfert de gaz peut être déduit de l'équation 3.9 dans les cycles de désoxygénation et de l'équation 3.10 dans les cycles d'oxygénation.

$$\ln \left( \frac{C_{max} - C_{min}}{C(t) - C_{min}} \right) = k_L a \cdot t \quad (3.9)$$

$$\ln \left( \frac{C_{max} - C_{min}}{C_{max} - C(t)} \right) = k_L a \cdot t \quad (3.10)$$

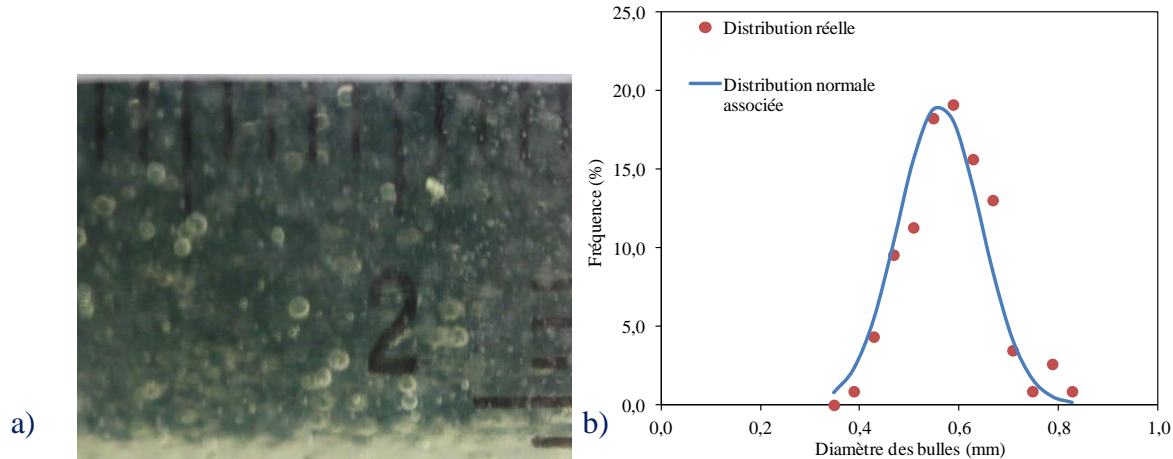
où  $C_{min}$  et  $C_{max}$  sont respectivement les concentrations minimales et maximales en oxygène dissous, et  $C(t)$  est la concentration en oxygène dissous mesurée à l'instant  $t$ .

### 3.3.1.2 Equipement disponible et conduite opératoire

Le gaz (air ou azote pur) est dispersé dans la cuve au moyen d'un fritté inox monté en sortie de diffuseur placé en dessous de la turbine « basse » en fond de cuve. Les injections d'air ou d'azote sont contrôlées à l'aide d'une vanne à trois voies et d'un débitmètre gaz à flotteur. La vanne permet de basculer rapidement entre un flux d'air et un flux d'azote à débit constant. Au cours de nos travaux, le débit maximum en hydrogène observé lors des expérimentations biologiques a été utilisé, soit 5 L/h.

L'évolution dynamique de la concentration en oxygène dissous a été mesurée par le biais d'une microsonde à oxygène (sonde OX500-15019, *Unisense A/S*, Danemark). En préambule de chaque mesure, la microsonde est calibrée durant 5 minutes dans une chambre de barbotage à flux d'air et 5 minutes dans une solution désoxygénée d'acide ascorbique 0,1 M. Une fois la microsonde calibrée, le signal électrique relevé peut être relié à la concentration en oxygène dissous selon une loi linéaire. Pour chaque expérimentation, la microsonde est positionnée au moyen d'un micromanipulateur. Elle est ainsi immergée à 20 mm de la paroi de la cuve et son extrémité est placée à hauteur de la turbine « haute », soit à 50 mm en dessous de la surface libre du liquide. La microsonde est reliée à un oxymètre contrôlé par le logiciel *SensorTrace Pro*<sup>®</sup> (*Unisense A/S*, Danemark) qui permet par l'intermédiaire des données de calibration, de convertir le signal électrique relevé par la microsonde en concentration d'oxygène dissous.

Afin de caractériser plus précisément le transfert de matière, la qualité de la dispersion du gaz, la taille et la forme des bulles générées au sein des solutions ont été étudiées. Cela permet notamment de vérifier si la viscosité du fluide ainsi que la vitesse d'agitation imposée ont un impact sur ces paramètres. Pour chaque configuration 10 images ont été prises à intervalle de 2 minutes en cycle d'oxygénation par l'intermédiaire d'un appareil photographique Canon EOS 70D (*Canon*, Japon). L'appareil est muni d'un objectif macro à ouverture fixe f/2.8 de 150 mm de focale (*Sigma Corp.*, Japon). L'analyse des images a été menée au moyen du logiciel *ImageJ*<sup>®</sup> développé par les *National Institutes of Health* (Etats-Unis). La répartition de la taille des bulles a été décrite selon une loi normale. Une graduation appliquée sur la paroi interne de la cuve a servi de calibration pour le traitement. Une illustration zoomée de la prise d'image ainsi qu'un exemple de la répartition du diamètre des bulles sont présentés sur la **Figure 3.7**.



**Figure 3.7.** Photographie des bulles dans la cuve (a) ; Exemple de résultat de la distribution du diamètre des bulles (b).

Dans le cadre de cette étude, il faut toutefois affirmer que l'estimation du transfert volumétrique  $(k_L a)_{H_2}$  par la méthode de désoxygénation/oxygénation avec dispersion de gaz ne reflète pas avec précision le phénomène de nucléation *in situ* des bulles d'hydrogène au sein du milieu de culture. En effet, même si aucune étude ne relate la description de ce processus au cours de la fermentation sombre, il peut être facilement imaginé qu'un site de nucléation donné peut générer des bulles suivant différents rythmes tout au long du processus de désorption et que les tailles de bulles peuvent être plus petites que celles générées par dispersion. De même, les sites de nucléation peuvent être présents en tout point du milieu de culture ou non. Cependant, l'estimation du  $(k_L a)_{H_2}$  apporte des informations pertinentes pour comprendre davantage le phénomène de saturation en hydrogène et les moyens à disposition afin de le prévenir, notamment en augmentant la désorption du gaz par le biais de la vitesse d'agitation.

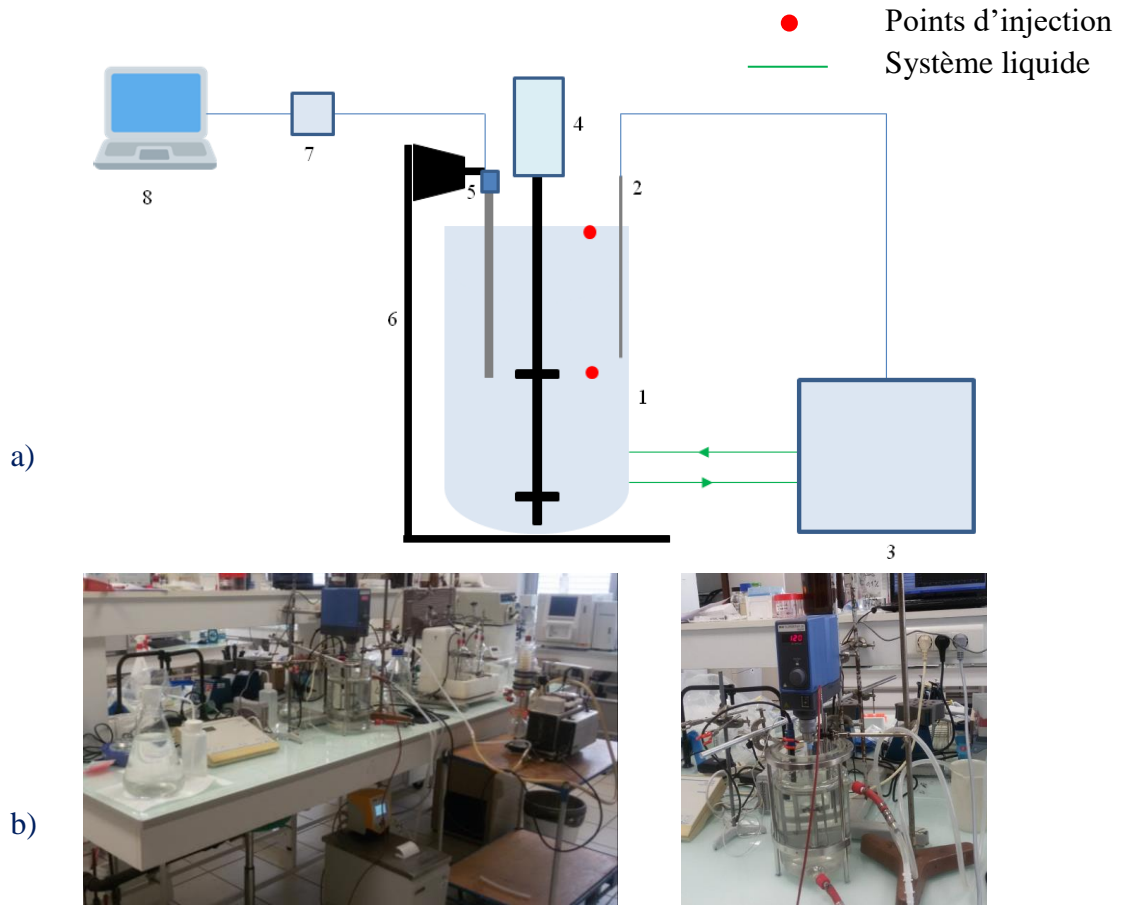
### 3.3.2 Etude du mélange dans la cuve : détermination du temps de mélange

#### 3.3.2.1 Mise en œuvre de la technique conductimétrique

##### 3.3.2.1.1 Principe de la technique conductimétrique

Dans notre étude, la méthode utilisée pour déterminer le temps de mélange  $t_m$  repose sur la technique conductimétrique. Cette technique intrusive consiste à suivre, au moyen d'une sonde conductimétrique, la conductivité de la solution dans la cuve agitée après injection d'une quantité d'électrolyte concentré. Par la suite, le temps de mélange est déterminé comme étant l'intervalle

de temps entre l'instant où l'électrolyte est injecté dans la solution et l'instant où les variations de conductivité sont inférieures à une valeur de 95% de l'échelon de conductivité. Le montage expérimental ainsi que son schéma représentatif sont illustrés par la *Figure 3.8*.



**Figure 3.8.** Schéma du banc expérimental de la technique conductimétrique : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Sonde de température ; (3) Cryostat à circulation ; (4) Moteur ; (5) Sonde conductimétrique ; (6) Support et micromanipulateur ; (7) Conductimètre ; (8) Système d'acquisition (a) ; Photographies du montage (b).

### 3.3.2.1.2 Equipement disponible et conduite opératoire

Une solution de chlorure de sodium (NaCl) a été utilisée comme traceur passif en raison de sa nature non-réactive, mais également car le NaCl a un effet négligeable sur les propriétés physiques des solutions (densité, viscosité, *etc.*), à l'exception de la conductivité de l'eau distillée. Ainsi, une injection de 2 mL d'une solution de NaCl à 1 M a été réalisée manuellement avec une seringue de 6 mL. L'injection est considérée comme étant instantanée en approchant la fonction  $\delta$  de Dirac ; plus précisément, il s'agit d'une introduction par une impulsion d'un

nombre de moles  $n_0$  pendant un temps très court.

La détection de la conductivité a été effectuée par une microsonde CDC 241-9 non platinée de constante de cellule égale à  $0,913 \text{ cm}^{-1}$ , cette dernière est placée à hauteur de la turbine « haute ». Elle permet de mesurer l'évolution de la conductivité en continu et d'estimer la concentration en NaCl dans la solution  $C_i(t)$  (Figure 3.9) suite à un étalonnage. Le signal a été enregistré à une fréquence de 1 Hz et les valeurs de conductivité ont été enregistrées par un dispositif d'acquisition des données (USB DAQ-1901, Adlink Technology, Etats-Unis). La constante de cellule a été déterminée au préalable en utilisant une solution étalon de NaCl dans de l'eau distillée à 0,05% de conductivité connue ( $913,13 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  à  $20^\circ\text{C}$ ). Le conductimètre CDM210 (Radiometer Analytical, France) est équipé d'une sonde de température permettant une correction de la température.

Une courbe d'étalonnage de la conductivité en fonction de la concentration en NaCl a ensuite été tracée pour différentes solutions allant de 0 à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La distribution des temps de séjour dans la cuve exige que la conductivité mesurée soit directement proportionnelle à la concentration en NaCl. La valeur de la conductivité de l'eau distillée à  $35^\circ\text{C}$  est de  $1,5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , ce qui est considéré comme étant négligeable par rapport à l'augmentation de conductivité consécutive à l'apport en NaCl d'une injection.

Usuellement le temps de mélange  $t_m$  à 95% ( $\theta_{95}$ ), correspond au temps à partir duquel la conductivité varie de  $\pm 5\%$  autour de la valeur d'équilibre. Il est déterminé par conversion des valeurs de conductivité en concentration selon l'équation :

$$C_i(t) = \frac{C(t) - C_0}{C_\infty - C_0} \quad (3.11)$$

où  $C_0$  est la concentration initiale en NaCl dans la solution,  $C_\infty$  est la concentration finale en NaCl dans la solution et  $C(t)$  est la concentration en NaCl au temps  $t$ . Cependant, lorsque la solution en NaCl est diluée dans le milieu, il y a proportionnalité entre la conductivité et la concentration et le signal linéarisé du conductimètre peut être utilisé directement pour déterminer le temps de mélange.

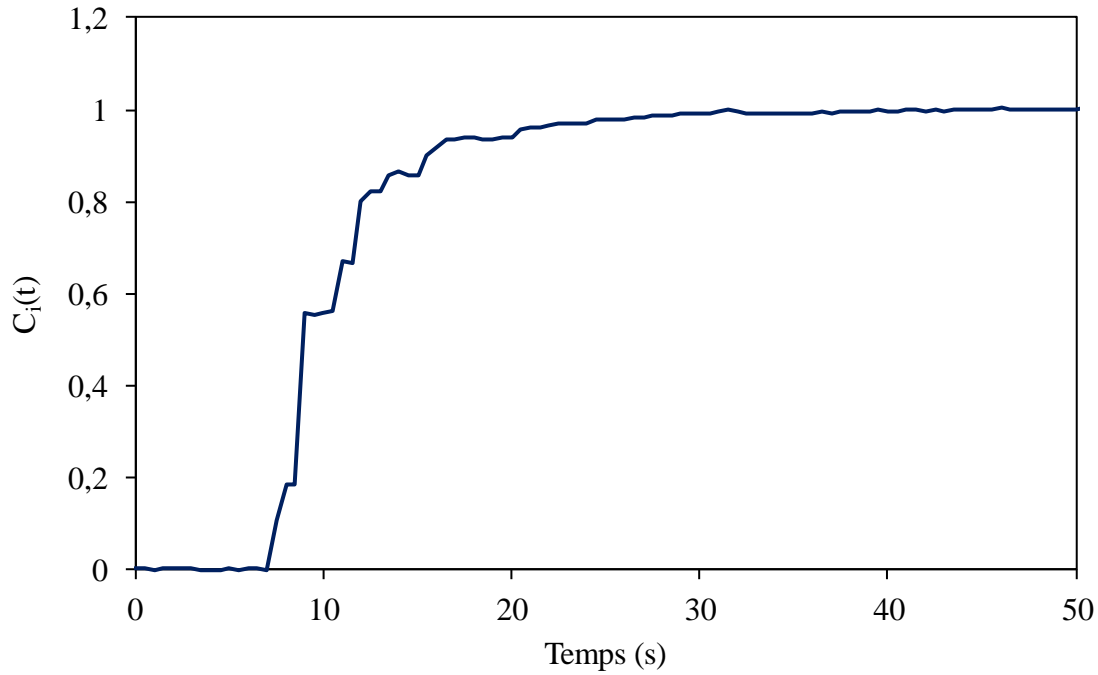
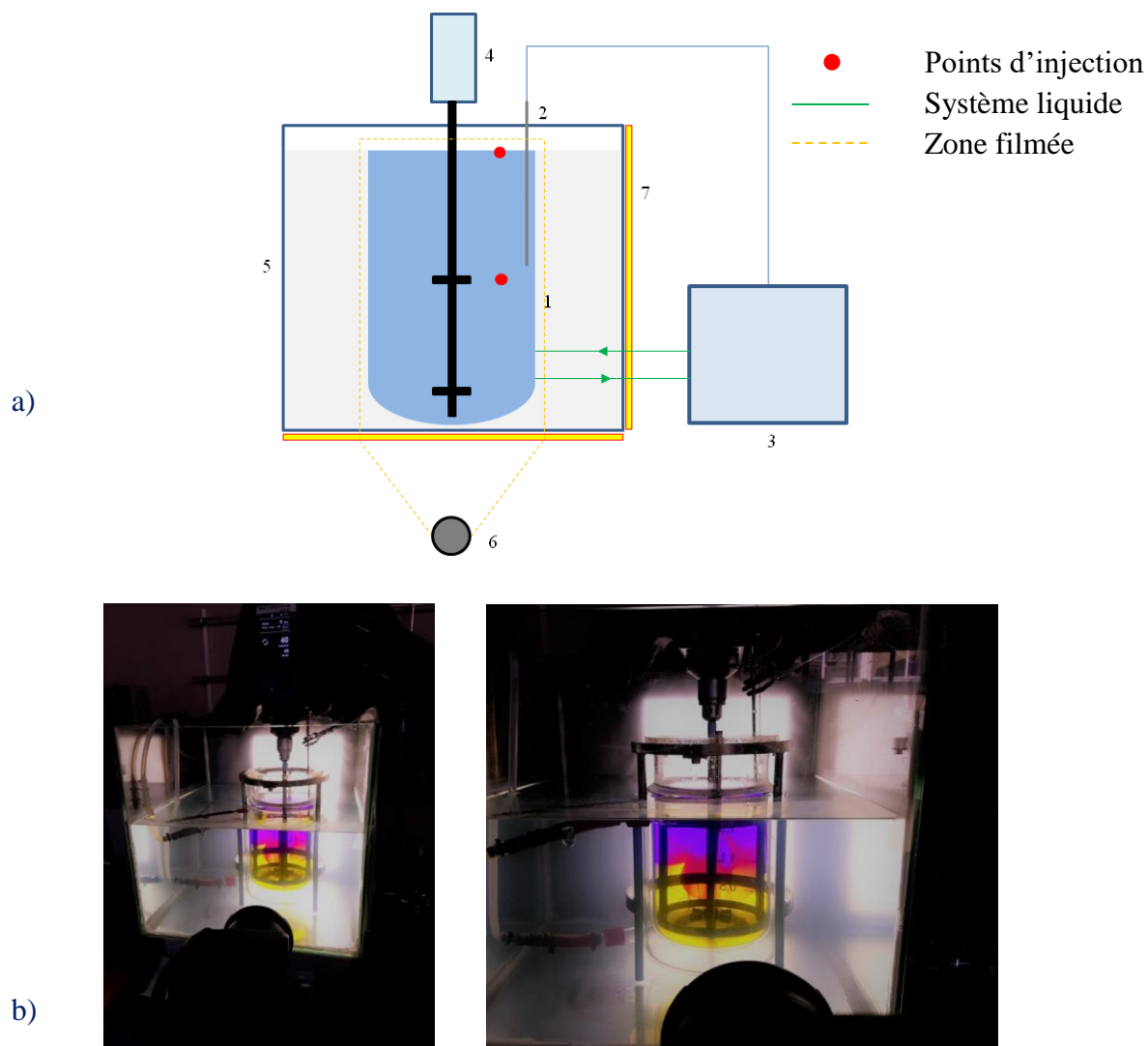


Figure 3.9. Exemple d'évolution de la concentration normalisée en NaCl.

### 3.3.2.2 Mise en œuvre de la technique de décoloration chimique

#### 3.3.2.2.1 Principe de la technique de décoloration chimique

Dans notre étude, la méthode utilisée pour déterminer le temps de mélange  $t_m$  repose sur la technique de décoloration chimique. Cette technique consiste à suivre par imagerie l'évolution du macromélange dans la cuve suite à une réaction chimique acido-basique instantanée en présence d'un indicateur coloré. La méthode présente l'avantage d'être non-intrusive et par conséquent de ne pas perturber l'écoulement du fluide au sein de la cuve. Elle permet également d'obtenir en plus du temps de mélange des informations telles que la localisation des zones mal mélangées ou mortes. La technique de décoloration chimique adoptée dans ces travaux s'appuie sur les travaux de Cabaret *et al.* (2007). Le montage expérimental ainsi que son schéma représentatif sont illustrés par la **Figure 3.10**.



**Figure 3.10.** Schéma du banc expérimental de la technique de décoloration chimique : (1) Cuve agitée à double enveloppe ; (2) Sonde de température ; (3) Cryostat à circulation ; (4) Moteur ; (5) Aquarium ; (6) Appareil photographique ; (7) Panneaux LED (a) ; Photographies du montage (b).

### 3.3.2.2.2 Equipement disponible et conduite opératoire

Le dispositif optique de prise d'images consiste en un appareil photographique Canon EOS 70D (Canon, Japon) muni d'un capteur APS-C. L'appareil est équipé d'un objectif Canon EF 24-105 mm f/3.5-5.6 IS STM (Canon, Japon) dont le stabilisateur IS et le moteur pas à pas de type STM permet une mise au point rapide des objets en mouvement. L'appareil permet d'enregistrer des vidéos en couleur au format *.mov* à une fréquence de 30 images par seconde sous un format de 2 mégapixels (1920×1080). Les vidéos sont converties en images au format *.bmp* par l'intermédiaire du logiciel gratuit *VirtualDubMOD*.



Afin de minimiser la distorsion des images, la cuve a été plongée dans un aquarium en verre (40×40×37 cm). Pour cela, l'aquarium est rempli d'eau déminéralisée à la même hauteur que la hauteur de liquide dans la cuve. Ceci permet notamment de réduire la déformation liée à la circularité de la cuve et de diminuer la variation d'indice de réfraction. La cuve est éclairée par ombroscopie au moyen de deux panneaux LED-Backlight de 300×220 mm<sup>2</sup> de surface, alimentés en 24 V DC (LEDW-BL-300/220-LLUB-Q-1R24, *Phlox corp*, France). Le premier et le second panneau sont respectivement placés du côté opposé et du côté droit de l'aquarium par rapport à la caméra. L'utilisation des panneaux LED permet d'avoir un éclairage blanc avec une uniformité de l'intensité lumineuse ( $\pm 5\%$ ), une température de couleur de 5000 K et de travailler en rétro-éclairage de manière quasi-athermique pour ne pas chauffer la cuve. Afin d'obtenir une luminosité plus homogène, du papier calque est appliqué sur les trois faces de l'aquarium autres que celle d'observation.

L'indicateur coloré utilisé est le pourpre de bromocrésol dont la zone de virage coloré s'étend de pH 5,2 correspondant au jaune, à pH 6,8 correspondant au violet. Cet indicateur présente, en plus de son fort pouvoir colorant, l'avantage d'avoir un contraste de couleur important entre le violet (condition basique) et le jaune (condition acide) (*Figure 3.11*). Pour colorer efficacement les solutions, le pourpre de bromocrésol a été ajouté à une concentration de 43 mg/L. Au cours des expérimentations, le suivi du changement de coloration se fait du violet au jaune car il est plus aisé de détecter des zones ségréguées violettes dans un fluide jaune que l'inverse.

Au début de chaque expérimentation, 1 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 5 M) est ajouté au fluide de la cuve. Pour étudier le mélange au sein de la cuve, lorsque le régime d'écoulement du fluide au sein de la cuve est permanent, 2 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 2,5 M) sont injectés manuellement (injection approchant la fonction  $\delta$  de Dirac) à l'instant initial dans une canne en inox avec une seringue de 6 mL. Au même moment, l'acquisition des images par la caméra est lancée afin de filmer le changement progressif de couleur de la solution. Finalement les images sont analysées par l'intermédiaire du logiciel *Matlab*<sup>®</sup> pour caractériser la dynamique temporelle et spatiale du mélange.

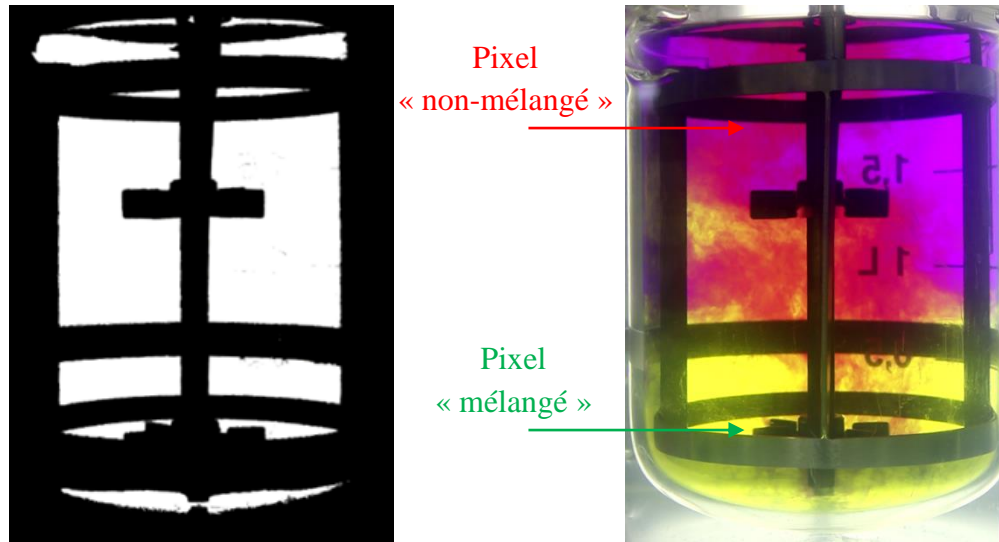


Figure 3.11. Masque appliqué à la cuve (à gauche) ; Pixels mélangés ou non dans la zone de travail (à droite).

### 3.3.2.2.3 Traitement des images de la technique de décoloration chimique

Concernant le traitement des images, comme expliqué précédemment, les images ont été prises sous la forme d'une vidéo (30 img./sec) au format *.mov*. Puis, la vidéo est fractionnée en images au format *.bmp* par l'intermédiaire du logiciel *VirtualDubMOD*. La première étape du traitement consiste à appliquer un masque de la cuve afin de définir une zone de travail pour l'analyse. Pour cela, les zones extérieures de la cuve ainsi que les zones correspondantes à l'agitateur et aux chicanes sont exclues par l'intermédiaire du logiciel gratuit *Photofiltre 7*. Ensuite, pour ce qui est du traitement des images, la méthode consiste à suivre la couleur qui varie le plus. Dans notre cas, les images sont stockées au format RGB (Red, Green, Blue) et la couleur la plus sensible est le vert noté G. Afin de discriminer un pixel dit « mélangé » de couleur jaune d'un pixel dit « non-mélangé » dans une image, on peut définir un paramètre  $X$  qui représente l'avancement de la transformation entre les états initiaux et finaux. La valeur du paramètre  $X$  oscille entre 0 et 1, mais on considèrera dans notre cas que le mélange est atteint lorsque  $X$  est supérieur à la valeur seuil de 0,95. Ainsi, un seuil exprimé en niveau de couleur  $\beta_{i,j}^G$  correspondant au mélange peut être estimé par rapport aux valeurs initiales ( $G_{i,j}^0$ ) et finales ( $G_{i,j}^\infty$ ) en chaque pixel de coordonnées  $(i, j)$  dans l'image. La valeur  $\beta_{i,j}^G$  est définie selon :

$$\beta_{i,j}^G = G_{i,j}^0 + X(G_{i,j}^\infty - G_{i,j}^0) \quad (3.12)$$

Lorsque  $G_{i,j} > \beta_{i,j}^G$ , le pixel est considéré comme « mélangé ». Enfin, le temps de mélange  $t_m$  correspond au temps nécessaire pour que 95% des pixels de la zone de travail de l'image soient considérés comme « mélangés ».

Finalement, nous avons préféré travailler sur des images au format HSV (Hue, Saturation, Value) car ce format a une meilleure sensibilité au changement de couleur entre une couleur sombre et une couleur claire. Les images au format RGB sont donc converties au format HSV et les pixels « mélangés » correspondent à ceux qui se situent dans un intervalle de valeurs entre 0,1 et 0,2. Si cette valeur est obtenue, le pixel correspondant dans le masque reçoit la valeur 255 (blanc) ; sinon, il reçoit la valeur 0 (noir). Cela permet de séparer les pixels en deux classes distinctes ; la première correspondante à la couleur à isoler (jaune), la seconde à toutes les autres couleurs. Un exemple de courbe de décoloration obtenu après analyse des images par le code *Matlab*<sup>®</sup> est illustré dans la *Figure 3.12*.

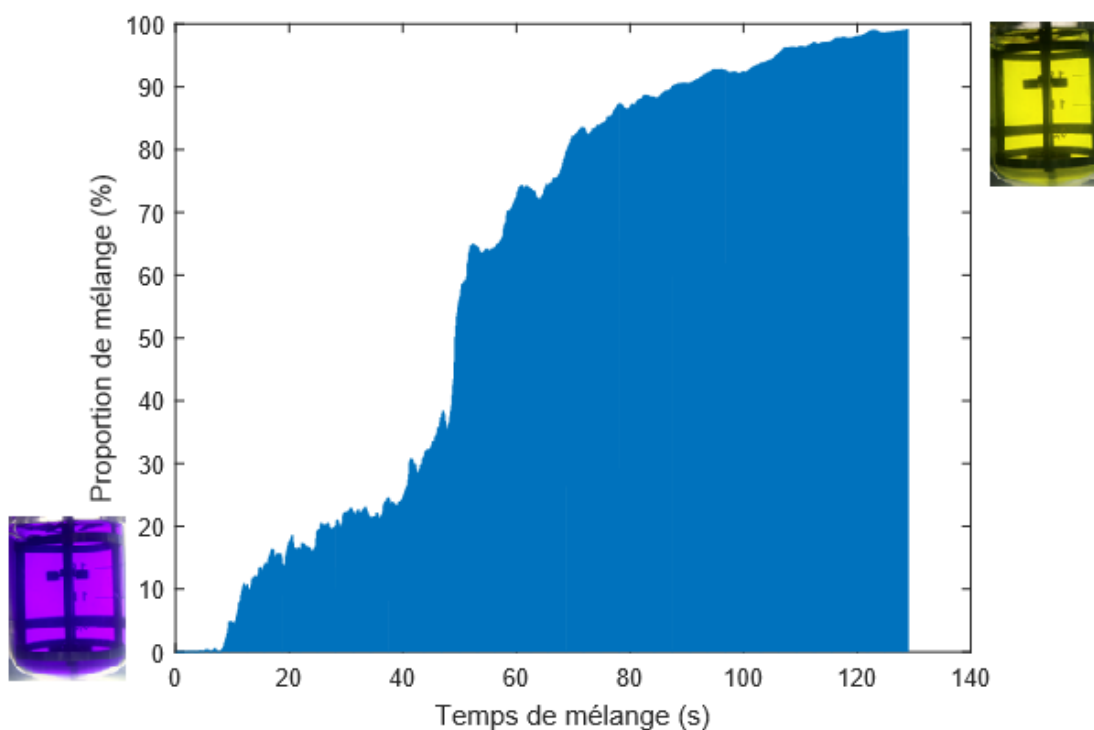


Figure 3.12. Exemple de courbe de décoloration.

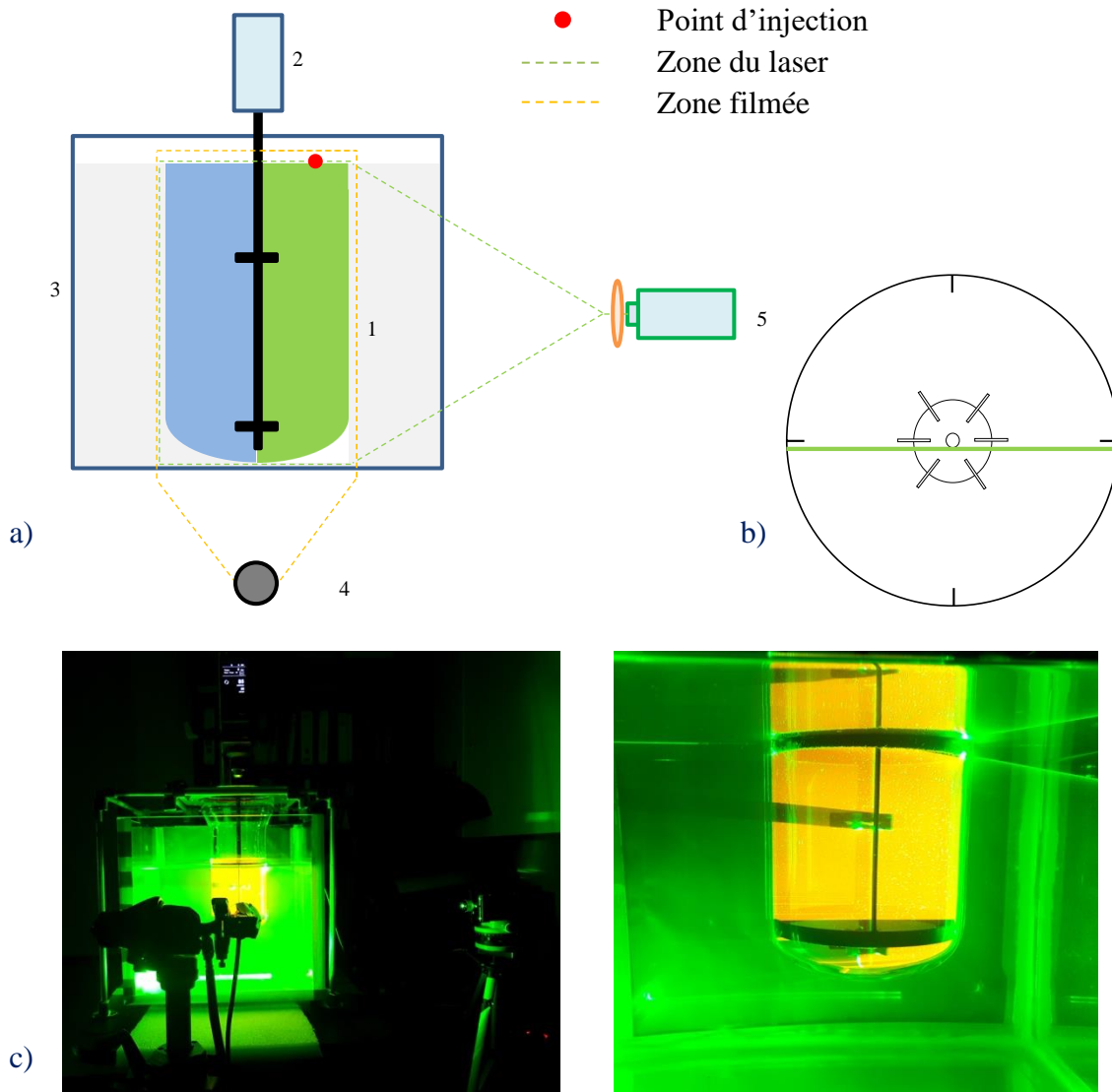
### 3.3.2.3 Mise en œuvre de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser (PLIF)

#### 3.3.2.3.1 Principe de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser

Dans notre étude, la méthode utilisée pour déterminer le temps de mélange  $t_m$  repose sur la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser. C'est une méthode non intrusive qui permet par imagerie d'avoir accès à la carte du champ des concentrations d'un traceur fluorescent dans un plan éclairé de l'écoulement dans la cuve, et de suivre son évolution au cours du temps. La solution injectée contient un traceur fluorescent qui sera excité par une nappe laser. Ainsi, le traceur absorbe l'énergie du rayonnement lumineux à la longueur d'onde du laser, et en réémet une fraction à une longueur d'onde supérieure. L'intensité lumineuse est observée au moyen d'une caméra CCD (Charge Coupled Device) placée perpendiculairement au plan lumineux et munie d'un filtre passe-haut qui filtre la longueur d'onde du laser ; et par conséquent, permet de mesurer uniquement l'intensité lumineuse provenant de la fluorescence du traceur. En effet, cela permet également de minimiser l'erreur expérimentale résultant de la non-uniformité de l'intensité de la lumière du laser qui provient à la fois de la fluctuation de l'intensité du laser, du caractère gaussien de la distribution spatiale d'énergie dans le faisceau laser, mais aussi des réflexions lumineuses parasites dues à la géométrie de la cuve, aux mobiles et à l'axe d'agitation. A la suite d'un étalonnage, l'image contenant la lumière émise par le phénomène de fluorescence est transformée en champ de concentrations. En l'occurrence, lorsque le traceur fluorescent est fortement dilué, l'intensité lumineuse réémise est proportionnelle à la puissance lumineuse incidente et à la concentration locale de traceur  $C$ . Quand la concentration en traceur est la même en tout point du plan de la cuve éclairé par le laser, la concentration est égale à une valeur moyenne  $\bar{C}$  et l'homogénéité est atteinte. Finalement, la qualité de non-homogénéité entre les zones dans le plan au temps  $t$  est décrite par l'intensité de ségrégation selon :

$$I_S(t) = \frac{\sum_i (C^i(t) - \bar{C})^2}{\sum_i (C_0^i - \bar{C})^2} \quad (3.13)$$

Le montage expérimental ainsi que son schéma représentatif sont illustrés par la **Figure 3.13**.



**Figure 3.13.** Schéma du banc expérimental de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser : (1) Cuve agitée à simple enveloppe ; (2) Moteur ; (3) Aquarium ; (4) Caméra ; (5) Laser + Filtre (a) ; Zone balayée par le laser (b) ; Photographies du montage (c).

### 3.3.2.3.2 Equipement disponible et conduite opératoire

Le dispositif optique de prise d'images consiste en une caméra monochrome USB 3.0 uEye de la marque IDS Imaging (*IDS GmbH*, Allemagne). C'est un modèle de type UI-3370CP-M-GL muni d'un capteur CMOS de 4 mégapixels (2048×2048). La caméra permet d'enregistrer des images au format *.png* à une fréquence de 60 images par seconde. Elle est équipée d'une optique 23-FM-25-SP (*Tamron*, Japon) de distance focale 25 mm. Un filtre passe haut est monté sur l'optique pour mesurer uniquement l'intensité de la fluorescence des particules de traceur. La caméra est alimentée et raccordée par le port USB à un PC qui permet de piloter l'acquisition et

de sauvegarder les images par l'intermédiaire du logiciel *uEye Cockpit*<sup>®</sup> (*IDS GmbH*, Allemagne). Par l'intermédiaire du logiciel, l'acquisition des images a été réglée à 10 img./sec, ce qui donne un temps d'exposition de 99,90 ms et une bonne qualité d'image. Les images sont converties au format *.bmp* par l'intermédiaire du logiciel gratuit *VirtualDubMOD*.

Afin de minimiser la distorsion des images, la cuve est placée sur une structure en aluminium et immergée dans un aquarium en verre (40×40×37 cm) rempli d'eau déminéralisée. Comme précédemment, ce montage a pour objectif de limiter les distorsions optiques dues à la forme incurvée de la cuve, mais aussi de minimiser les déformations dues à la réfraction des rayons lumineux du laser à travers les différents matériaux.

L'éclairage est fourni au cours de l'expérimentation par un laser Raypower de type Nd :Yag (*Dantec Dynamics SA*, Danemark). Il possède une puissance maximale de 2 W qui est modulable manuellement et produit un faisceau de lumière d'une longueur d'onde de 532 nm. Le faisceau peut être émis en continu ou en discontinu pour obtenir un effet stroboscopique s'il est relié à un générateur qui fournit des impulsions TTL (5 V) ou une modulation analogique (< 1 kHz). Une lentille cylindrique permet de transformer le faisceau laser en un plan lumineux. L'épaisseur du plan laser est de l'ordre de 3 mm. Enfin, le laser est monté sur un support réglable en hauteur permettant son positionnement.

Le traceur fluorescent utilisé est la rhodamine B dont les pics d'adsorption et d'émission dans l'eau sont respectivement de 555 nm et 580 nm. La caméra est équipée d'un filtre optique passe-haut avec un seuil de coupure à 565 nm. Au début de chaque expérience, dans une pièce sombre (chambre noire), le laser est allumé en mode continu et la nappe laser est dirigée sur l'axe d'agitation, ce qui définit la zone de travail filmée par la caméra, laquelle est placée perpendiculairement à la nappe laser. Pour étudier le mélange au sein de la cuve, lorsque le régime d'écoulement du fluide au sein de la cuve est permanent, 2 mL d'une solution de rhodamine B ( $5,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L) ont été injectés manuellement (injection approchant la fonction  $\delta$  de Dirac) à l'instant initial dans une canne en inox avec une seringue de 6 mL. Au même moment, l'acquisition des images par la caméra est lancée afin de suivre l'évolution au cours du temps de la concentration en rhodamine B dans le plan éclairé de la cuve. Finalement les images sont analysées par l'intermédiaire du logiciel *Matlab*<sup>®</sup> pour caractériser la dynamique temporelle du mélange.

3.3.2.3.3 Traitement des images de la technique de Fluorescence Induite par Nappe Laser

Concernant le traitement des images, comme expliqué précédemment, les images ont été prises sous la forme d'une vidéo (10 img./sec) au format *.mov*. La vidéo est ensuite fractionnée en images au format *.bmp* par l'intermédiaire du logiciel *VirtualDubMOD*. La première étape du traitement consiste à appliquer un masque de la cuve afin de définir une zone de travail pour l'analyse, dénommée  $A_p$  (Active Pixel zone). Pour cela, les zones extérieures de la cuve ainsi que les zones correspondantes à l'agitateur et aux chicanes sont exclues par l'intermédiaire du logiciel gratuit *Photofiltre 7* (**Figure 3.14**).



**Figure 3.14.** Masque appliqué aux images (a) ; Visualisation de l'image avant injection (b) ; Visualisation de l'image après mélange (c).

Ensuite, pour ce qui est du traitement des images, la méthode consiste à suivre la variation du niveau de gris. Avant l'injection du traceur fluorescent, l'intensité moyenne est calculée à chaque coordonnée  $(i, j)$  des pixels de la zone de travail  $A_p$  ; l'intensité moyenne notée  $Im_i(i, j)$  est alors calculée en faisant la moyenne d'intensité des 10 premières images en tout point de  $A_p$ . De même, lorsqu'une homogénéité parfaite est atteinte en fin d'expérimentation, l'intensité moyenne est calculée à chaque coordonnée  $(i, j)$  des pixels de la zone de travail  $A_p$  ; l'intensité moyenne notée  $Im_f(i, j)$  est alors estimée en faisant la moyenne d'intensité des 10 dernières images en tout point de  $A_p$ . Les calculs d'intensité moyenne initiale  $Im_i(i, j)$  et finale  $Im_f(i, j)$  sont résumés dans les expressions suivantes où  $t$  est l'image en cours d'analyse et  $n$  est le nombre total de trames acquises.

$$Im_i(i, j) = \frac{1}{10} \sum_{t=1}^{10} Im_t(i, j) \quad (i, j) \in A_p \quad (3.14)$$

$$Im_f(i, j) = \frac{1}{10} \sum_{t=n-10}^{10} Im_t(i, j) \quad (i, j) \in A_p \quad (3.15)$$

*A posteriori*, pour chaque image, l'écart en tout pixel de l'intensité de l'image par rapport à l'image initiale ( $i$ ) est calculé, normalisé par l'écart entre l'image initiale ( $i$ ) et l'image finale ( $f$ ), ce qui correspond à la définition d'un indice adimensionnel  $Im_{dev,t}(i, j)$  de mélange selon l'expression suivante :

$$Im_{dev,t}(i, j) = 100 \frac{Im_t(i, j) - Im_i(i, j)}{Im_f - Im_i(i, t)} \quad (i, j) \in A_p \quad (3.16)$$

La normalisation des données permet notamment d'obtenir des données uniformément distribuées et le niveau de gris est alors défini de sorte que l'indice adimensionnel de mélange varie sur une échelle de 0 à 100 pour chaque pixel dans l'image. Ainsi, avant l'injection du traceur fluorescent, tous les pixels ont une valeur d'indice égale à 0, alors que tous les pixels ont une valeur d'indice égale à 100 à l'équilibre.

L'étape suivante consiste à estimer la qualité du mélange pour chaque image à partir du coefficient de variation  $CoV_t$  au cours du temps. Ce paramètre est égal au rapport de l'écart-type  $Im_{dev,t}(i, j)$  sur les pixels  $(i, j)$  de la zone de travail  $A_p$  à chaque image ou instant  $t$ , divisé par la moyenne de  $Im_{dev,t}(i, j)$  sur l'image au même instant  $t$ . Comme précédemment, le coefficient de variation  $CoV_t$  est normalisé, à partir de sa valeur maximale  $CoV_{max}$  obtenue après l'injection du traceur et de sa valeur finale  $CoV_f$  afin de tenir compte du bruit dans le signal pouvant être causé par exemple par des réflexions lumineuses.

$$CoV_n = \frac{CoV_t - CoV_f}{CoV_{max} - CoV_f} \quad (3.17)$$

Finalement, le temps de mélange  $t_m$  est défini comme étant le temps nécessaire pour atteindre une valeur du coefficient de variation  $CoV_n$  inférieure à 0,05 ; ce qui correspond au temps nécessaire pour que 95% des pixels de la zone de travail de l'image soient considérés « mélangés ». Un exemple des courbes de  $CoV$  normalisé en fonction du temps et du mélange obtenu après analyse des images par le code *Matlab*<sup>®</sup> est illustré dans la **Figure 3.15**.



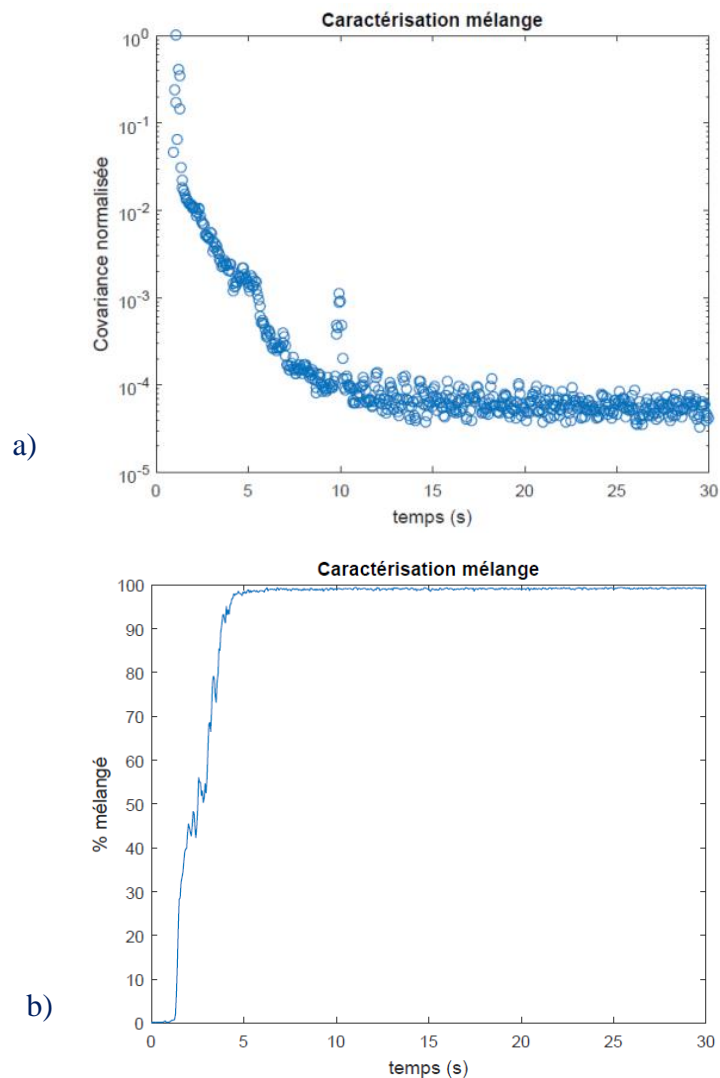


Figure 3.15. Exemple de CoV normalisé en fonction du temps (a) ; Courbe caractéristique du mélange (b).

### 3.3.3 Etude de l'hydrodynamique locale dans la cuve agitée par la technique de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV)

#### 3.3.3.1 Principe de la technique de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV)

La technique de Vélocimétrie par Image de Particules est une méthode optique non intrusive qui permet de mesurer en temps réel au moins deux composantes du champ de vitesse dans un plan de l'écoulement étudié. Elle possède des applications dans une large gamme de domaines où intervient la Mécanique des Fluides, comme l'ingénierie aérospatiale, automobile, aéronautique, mais également la combustion. La *PIV classique* qui mesure deux composantes de

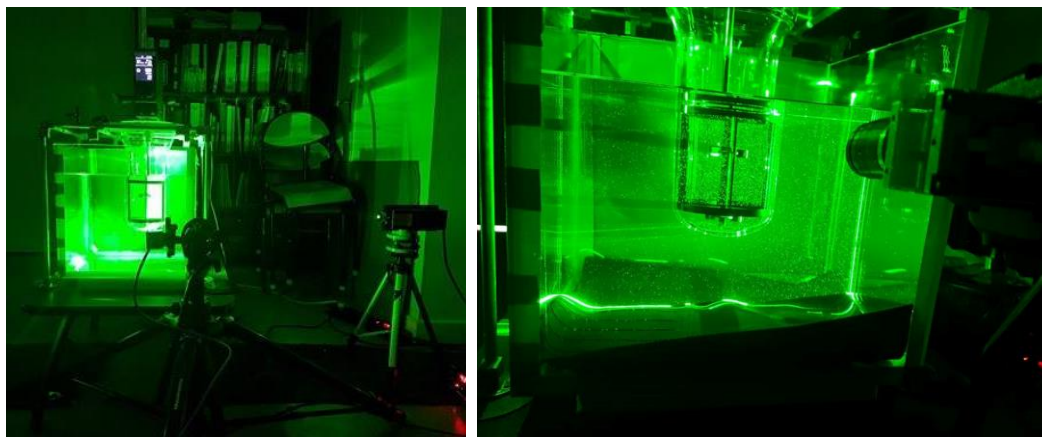
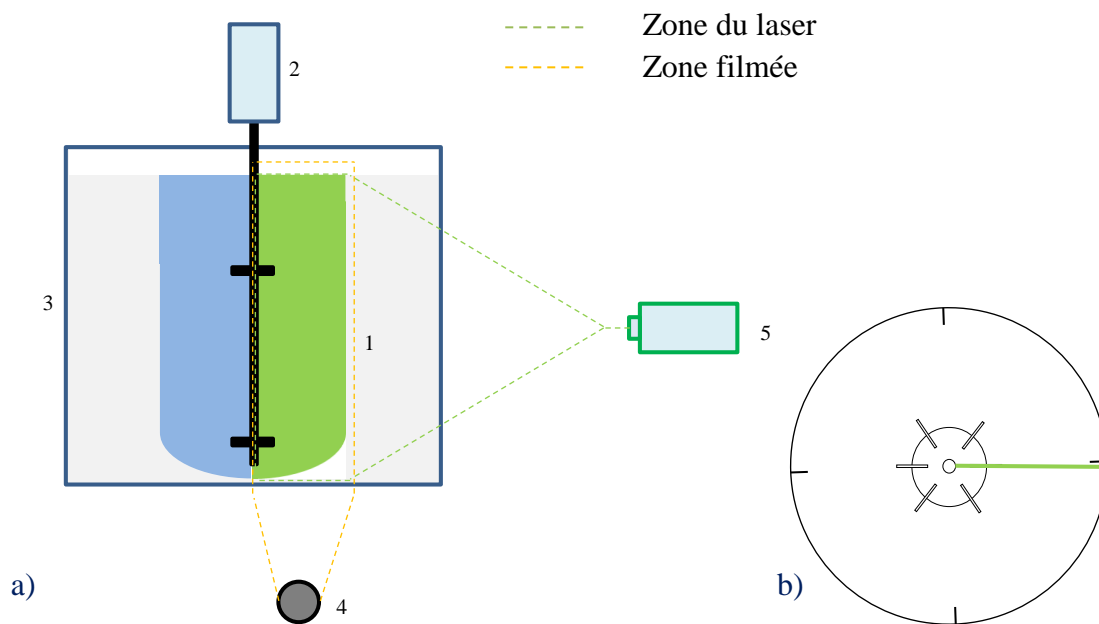
la vitesse dans un plan (PIV 2D-2C) est une technique expérimentale très utilisée dans le domaine de la recherche de par sa rapidité de mesure et sa simplicité de mise en œuvre.

La méthode consiste à mesurer par le biais d'une caméra le déplacement du fluide ( $\Delta x$ ) pendant un intervalle de temps programmé ( $\Delta t$ ) en illuminant de façon stroboscopique ou continu une tranche du fluide par une nappe laser. Les images peuvent être obtenues par paires avec une technique de *PIV classique* au moyen d'un éclairage pulsé (simple ou double pulse) et d'une caméra simple ou double shutter synchronisée avec les impulsions lumineuses du laser, soit avec une technique de *PIV résolue en temps* avec un éclairage continu en utilisant une caméra rapide qui permet de figer l'image à de très hautes cadences. Au cours de l'utilisation de ces techniques, le fluide est préalablementensemencé par des microparticules suffisamment petites et de densité voisine à celle du fluide, afin que ces dernières se comportent comme de parfaits traceurs passifs de l'écoulement local. L'enregistrement de l'écoulement et du déplacement du fluide intervient à chaque illumination des images du plan éclairé au moyen de caméras digitales (CCD, CMOS ou sCMOS) placées perpendiculairement au plan lumineux. Cela permettant d'étudier le déplacement entre deux images successives des traces laissées par la lumière réfléchiée par les microparticules. Ainsi, lors du traitement des images, les images numériques des points lumineux sont subdivisées en plusieurs régions carrées appelées fenêtres d'interrogation (*FI*). Le déplacement moyen ( $D_{moyen}$ ) des particules est calculé par transformée de Fourier rapide (FFT) qui permet de calculer l'inter-corrélation entre deux images successives pour chaque fenêtre d'interrogation, en général avec un recouvrement de 50% afin de minimiser les pertes d'informations aux bords des fenêtres d'interrogation. Ce calcul permet d'accéder à un pic dont la hauteur et la position permettent d'estimer à la fois la direction et la vitesse moyenne de déplacement des particules dans chaque fenêtre d'interrogation. La vitesse moyenne des particules dans chaque FI est obtenue par une relation de type :

$$\vec{V}_{FI} = \frac{1}{M} \frac{D_{moyen}}{\Delta t} \quad (3.18)$$

où  $M$  est le facteur d'échelle permettant de convertir en mètre les distances exprimées en pixels dans les images.

Le montage expérimental ainsi que son schéma représentatif sont illustrés par la *Figure 3.16*.



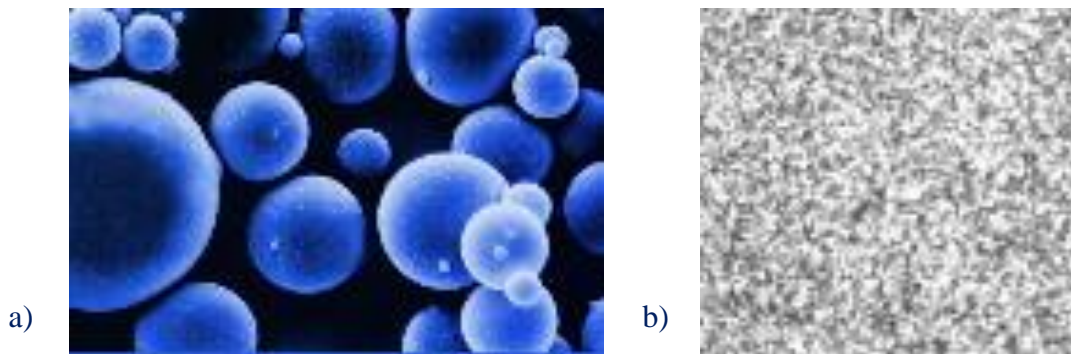
**Figure 3.16.** Schéma du banc expérimental de la technique de Vélocimétrie par Images de Particules : (1) Cuve agitée à simple enveloppe ; (2) Moteur ; (3) Aquarium ; (4) Caméra ; (5) Laser (a) ; Zone balayée par le laser (b) ; Photographies du montage (c).

### 3.3.3.2 Equipement disponible et conduite opératoire

Le dispositif expérimental (cuve, aquarium, laser, acquisition, *etc.*) est exactement le même que celui utilisé lors des mesures du temps de mélange par PLIF. Cependant, il se distingue par le fait qu'au lieu d'évaluer l'évolution de la dispersion d'une solution de Rhodamine B au cours du temps, nous investiguerons le mouvement de particules réparties uniformément.

Les fluides étudiés ont étéensemencés par des particules de traceur de verre creuses recouvertes d'argent S-HGS (Silver-coated hollow glass spheres). Les particules fournies par la société *Dantec Dynamics SA* (Danemark) sont en verre borosilicaté de géométrie sphérique à

surface lisse (**Figure 3.17**), de diamètre moyen 10  $\mu\text{m}$  avec une distribution de taille 2-20  $\mu\text{m}$  et d'une masse volumique de 1040  $\text{kg}/\text{m}^3$ . Ces particules émettent un rayonnement aux longueurs d'ondes correspondant à la lumière visible et le revêtement mince en argent augmente davantage la réflectivité. La concentration d'ensemencement choisie pour toutes les expériences a été ajustée pour avoir entre 5 et 10 particules dans chaque fenêtre d'interrogation de  $32 \times 32$  pixels<sup>2</sup>. Cette concentration est suffisamment élevée pour que le nombre de mesures corresponde à la résolution recherchée, et suffisamment faible pour que l'éclairage ainsi que la prise de vue ne soient pas perturbés par les particules.



**Figure 3.17.** Particules de traceurs S-HGS (a) ; Fluide ensemencé par les particules de traceur exposés au laser (b).

Dans un premier temps les mesures PIV 2D-2C ont été effectuées pour caractériser les champs instantanés des vitesses dans l'ensemble de la cuve dans un plan vertical par la technique de *PIV classique*. Ensuite, la technique de *PIV résolue en temps* a été utilisée pour caractériser les champs instantanés des vitesses dans un plan vertical au voisinage des turbines Rushton. L'application de ces deux techniques fait intervenir deux types de caméras et deux modes d'utilisation du laser. Les champs instantanés des vitesses sont calculés respectivement à partir de 8000 et 16000 paires d'images pour la *PIV classique* et la *PIV résolue en temps*.

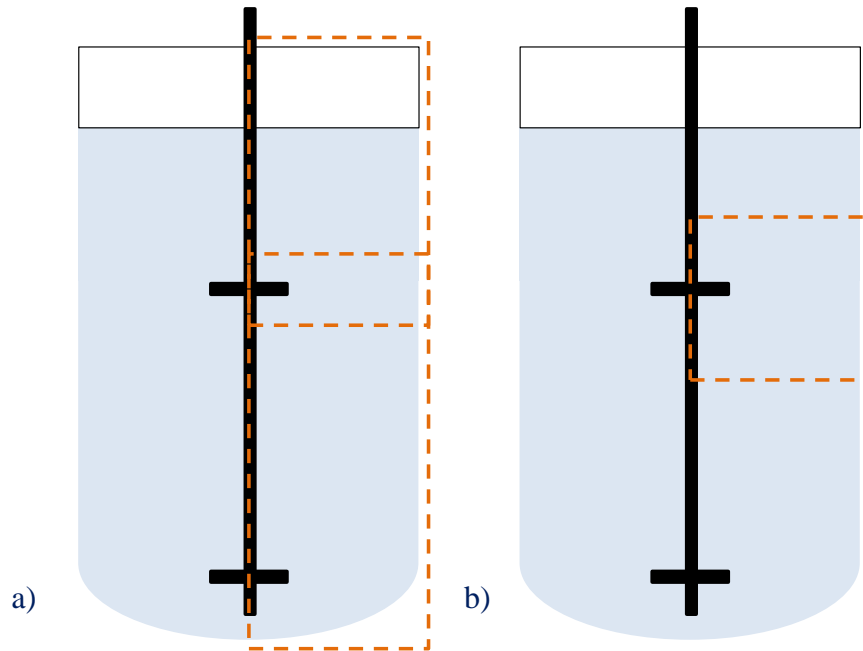
#### 3.3.3.2.1 PIV classique

Les champs de vitesse dans le plan vertical, en vue d'une caractérisation globale des vitesses dans l'ensemble de la cuve, ont été mesurés au moyen d'une caméra monochrome USB 2.0 de la marque PCO Pixelfly (PCO AG, Allemagne). C'est un modèle de type QE X270D muni d'un capteur CCD de 1,4 mégapixels ( $1392 \times 1040$ ). La caméra permet d'enregistrer des images au format .jpg à une fréquence de 12 images par seconde. Elle est équipée d'une optique 23-FM-25-SP (Tamron, Japon) de distance focale 25 mm. La caméra est alimentée et raccordée par le

port USB à un PC qui permet de piloter l'acquisition et de sauvegarder les images par l'intermédiaire du logiciel *Camware64*<sup>®</sup> (*PCO AG*, Allemagne). La caméra a été utilisée en mode « *double shutter* » avec la prise d'une paire d'images avec un faible délai entre les images d'une même paire, ceci à une fréquence de 6 paires d'images par seconde. L'axe optique de la caméra est positionné perpendiculairement au plan éclairé par le laser. Le laser est utilisé en mode pulsé afin de contrôler le  $\Delta t$  entre les deux images d'une même paire avec un générateur de délai qui permet également de synchroniser le déclenchement de la caméra par des impulsions TTL. Le générateur est piloté par le logiciel *EG*<sup>®</sup> (V.3.47). Les images sont converties au format *.bmp* par l'intermédiaire du logiciel gratuit *VirtualDubMOD*. Le plan vertical étudié est situé sur le plan vertical contenant l'axe d'agitation, ce qui correspond à la demi-cuve. Afin d'améliorer la résolution spatiale et de mesurer avec plus de précision les vitesses, la zone d'intérêt qui s'étend de la surface au fond de la cuve a été divisée en deux régions dans lesquelles les images ont été enregistrées séparément (**Figure 3.18**). Les deux régions se chevauchent, ce qui facilite la reconstruction des champs de vitesse dans l'ensemble de la zone d'intérêt.

#### *3.3.3.2.2 PIV résolue en temps*

Les champs de vitesse dans le plan vertical, en vue d'une caractérisation locale des vitesses au voisinage des turbines, ont été mesurés au moyen d'une caméra rapide FPS 1000HD USB 3.0 (*TSMCCL*, Royaume-Uni). Elle est équipée d'une optique 23-FM-25-SP (*Tamron*, Japon) de distance focale 25 mm. La caméra permet d'enregistrer des images à la résolution 0,9 mégapixels 1280×720 au format *.jpg* à une fréquence maximale de 1000 images par seconde. Elle est munie d'une mémoire de stockage intégrée de 256 Go. La caméra a été utilisée en mode « *global shutter* » à une fréquence de 1000 images par seconde. L'axe optique de la caméra est positionné perpendiculairement au plan éclairé par le laser. Le laser est utilisé en mode continu. Le plan vertical étudié est situé sur le plan vertical contenant l'axe d'agitation. Afin d'améliorer la résolution spatiale et de mesurer avec plus de précision les vitesses en vue de caractériser les composantes turbulentes de l'écoulement, la zone d'intérêt se limite au voisinage de la turbine « *haute* » conformément à la **Figure 3.18**.



**Figure 3.18.** Zones filmées par PIV classique (a) ; Zone filmée par PIV résolue en temps (b).

### 3.3.3.3 Traitement des images de la technique de Vélométrie par Images de Particules

Concernant le traitement des images obtenues par *PIV classique*, ces dernières sont converties au format *.bmp* par l'intermédiaire du logiciel gratuit *VirtualDubMOD*, tandis que les images obtenues par *PIV résolue en temps* sont extraites au format *.jpg* de la mémoire interne de la caméra par l'intermédiaire du logiciel *fps1000*.

La première étape du traitement consiste à utiliser le logiciel gratuit *PIVLab* (V.1.43) (Thielicke et Stamhuis, 2014) développé sous l'environnement *Matlab*<sup>®</sup>. Il permet de traiter soit une série de paires d'images obtenues par *PIV classique*, soit une série d'images acquises à fréquence fixe par *PIV résolue en temps*. La méthode consiste à sélectionner toutes les images, définir la zone de travail pour l'analyse en excluant les zones extérieures de la cuve ainsi que les zones correspondantes à l'agitateur et aux chicanes, puis définir le pas de temps entre les images, ainsi que les échelles spatiales. Le paramètre clé de l'analyse d'images réside dans le dimensionnement des fenêtres d'interrogation car il définit le nombre de vecteurs pouvant être calculé et la résolution spatiale des mesures. Effectivement, dans chaque fenêtre d'interrogation, le déplacement le plus probable des particules est calculé. Cette estimation repose sur trois hypothèses principales :

- ✓ L'hypothèse d'iso-vitesse, qui suppose que la fenêtre d'interrogation soit assez petite pour que les vecteurs vitesses des particules soient quasiment identiques dans une même fenêtre ;
- ✓ L'hypothèse statistique, qui suppose que la fenêtre d'interrogation doit être assez grande pour que le nombre de particules soit suffisant ;
- ✓ L'hypothèse de suivi des particules, qui suppose que la majorité des particules restent dans le même plan entre deux images successives.

L'hypothèse de suivi des particules est dépendante de l'épaisseur de la nappe laser, du pas de temps entre deux images successives et de la structure de l'écoulement. Pour la valider nous avons fixé l'épaisseur de la nappe laser. Afin de valider les hypothèses d'iso-vitesse et statistique nous avons fixé la taille des fenêtres d'interrogation.

Le calcul des vecteurs vitesses dans chaque fenêtre d'interrogation par transformée de Fourier rapide a été effectué en deux passes. Ainsi, la taille de la première fenêtre d'interrogation a été fixée à  $32 \times 32$  pixels<sup>2</sup> et la taille de la seconde est réduite à  $16 \times 16$  pixels<sup>2</sup> avec un recouvrement de 50%. Après analyse, un post-traitement par une méthode de seuillage permet d'éliminer les vecteurs vitesses aberrants. Finalement, le logiciel *PIVLab* donne accès aux vitesses locales instantanées et calcule les vitesses locales moyennées sur l'ensemble des images.

En fin de compte, *PIVLab* permet d'estimer les quantités moyennées sur le temps, tels que le champ de la vitesse moyenne et les vitesses de cisaillement dans le plan éclairé à partir des images de PIV 2D-2C. Les données obtenues avec *PIVLab* ont été retraitées sous *Matlab*<sup>®</sup> de façon à estimer l'énergie cinétique turbulente  $k$  qui peut alors être déduite en utilisant l'hypothèse d'isotropie de la turbulence en estimant les composantes fluctuantes de la vitesse à partir de l'écart-type des composantes de la vitesse locale instantanée. De même, la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente  $\varepsilon$  a pu être déduite de la dérivée des fluctuations de la vitesse instantanée, ceci donnant accès à la taille des plus petits agrégats tourbillonnaires et donc à l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$ .

#### 3.3.3.4 Caractérisation de la composante turbulente de l'écoulement

L'écoulement turbulent peut être caractérisé par deux grandeurs caractéristiques qui sont l'énergie cinétique turbulente  $k$  et la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente  $\varepsilon$ . Les



deux grandeurs sont calculées respectivement à partir de 8000 et 16000 champs instantanés de vitesse pour la *PIV classique* et la *PIV résolue en temps*.

#### 3.3.3.4.1 Distribution de l'énergie cinétique turbulente $k$

L'énergie cinétique turbulente  $k$  correspond à l'énergie cinétique associée à la composante fluctuante de la vitesse (fluctuations des composantes du vecteur vitesse). Elle est définie comme étant égale à la moitié de la somme des carrés des moyennes quadratiques des composantes de fluctuation de la vitesse ( $u'_x ; u'_y ; u'_z$ ) par :

$$k = \frac{1}{2} \left( \overline{u'^2_x} + \overline{u'^2_y} + \overline{u'^2_z} \right) \quad (3.19)$$

La moyenne quadratique de la composante tangentielle doit être estimée *via* les moyennes quadratiques des deux composantes fluctuantes de la vitesse comprises dans le plan de mesure en faisant l'hypothèse d'isotropie. Dans notre cas, l'énergie cinétique turbulente est donc calculée par :

$$k = \frac{3}{4} \left( \overline{u'^2_x} + \overline{u'^2_y} \right) \quad (3.20)$$

Ensuite, l'étude de la convergence des résultats permet de déterminer si le nombre et la résolution spatiale des mesures réalisées permettent d'accéder à des valeurs fiables de l'énergie cinétique turbulente au sein du bioréacteur. Dans notre cas la taille des fenêtres d'interrogation est de  $16 \times 16$  pixels<sup>2</sup> et la résolution spatiale des mesures PIV est de 0,45 mm (*PIV résolue en temps*) et 1,1 mm (*PIV classique*). Ainsi, il faut vérifier que le nombre de champs fluctuants soit suffisant pour obtenir un résultat convergé. Il convient par la suite de s'assurer que la résolution spatiale des mesures PIV réalisées est suffisante pour couvrir la gamme d'échelles spatiales du spectre de l'énergie cinétique turbulente. Le spectre s'étend de l'échelle intégrale à l'échelle de Taylor. L'ordre de grandeur de l'échelle intégrale est égal au dixième du diamètre du mobile, soit 5,5 mm. Si la résolution spatiale des mesures PIV est supérieure à la micro-échelle de Taylor, les structures dont la taille est comprise entre cette micro-échelle de Taylor et la résolution spatiale ne sont pas mesurées. Par conséquent, l'énergie cinétique turbulente associée n'est pas connue assez précisément et les valeurs calculées de cette dernière sont sous-estimées. L'échelle de Taylor a été estimée à partir des champs fluctuants de la vitesse selon :



$$\lambda_{Taylor} = \sqrt{\frac{10 \nu \Lambda}{1.1 \sqrt{u'^2}}} \quad (3.21)$$

où  $\Lambda$  est l'échelle intégrale et  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide. La validation des mesures est ensuite vérifiée en faisant le rapport entre l'échelle de Taylor estimée à partir de la moyenne quadratique de la composante radiale  $\overline{u'_x^2}$  ou axiale  $\overline{u'_y^2}$  de la fluctuation de la vitesse et la résolution spatiale des mesures PIV.

#### 3.3.3.4.2 Distribution de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente $\varepsilon$

Comme expliqué dans la **section 3.3.4**, la distribution de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente correspond à l'énergie cinétique turbulente transférée d'une échelle des agrégats tourbillonnaires à l'autre par unité de temps et qui est finalement dissipée en chaleur à l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$ . En général, l'estimation de  $\varepsilon$  s'effectue selon :

$$\varepsilon = \nu \left\{ \begin{array}{l} 2 \left( \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial y} \right)^2} + 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial z} \right)^2} \right. \\ \left. + \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial z} \right)^2} + 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial z} \right)^2} + 2 \left( \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial y} \right) \left( \frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)} + \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial z} \right) \left( \frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)} + \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial z} \right) \left( \frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)} \right) \right\} \quad (3.22)$$

Au vu de cette équation, pour calculer  $\varepsilon$ , il faut mesurer au même moment les trois composantes de fluctuation de la vitesse dans l'ensemble d'un volume tridimensionnel, avec une résolution spatiale de l'ordre du  $\mu\text{m}$  afin d'être proche de  $\lambda_K$ . Avec l'outil de mesure PIV mis en œuvre pour la détermination du  $\varepsilon$ , les conditions du volume étudié et de résolution spatiale des mesures ne sont pas remplies. Dès lors, différentes méthodes de calcul de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ont été utilisées sur la base des mesures expérimentales effectuées pour son estimation. Les travaux se sont basés sur la méthode dite « *directe* » et la méthode « *LE-PIV de Smagorinsky* ». Il est évident que l'utilisation de ces deux méthodes donne lieu à des écarts de résultats, fonctions des hypothèses de chaque relation mathématique. En effet, il n'existe pas à ce jour de méthode définie comme étant parfaitement exacte.

La méthode directe consiste à utiliser la définition de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente développée précédemment. En faisant l'hypothèse d'une turbulence statistiquement isotrope, les dérivés non mesurables qui sont dans les directions perpendiculaires

au plan de mesures PIV (composantes tangentielles) sont estimées à partir des dérivées comprises dans le plan de mesures selon :

$$\overline{\left(\frac{\partial w_z}{\partial z}\right)^2} = \frac{1}{2} \left[ \overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial x}\right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial y}\right)^2} \right] \quad (3.23)$$

$$\overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial z}\right)^2} = \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial z}\right)^2} = \overline{\left(\frac{\partial w_z}{\partial z}\right)^2} = \overline{\left(\frac{\partial w_z}{\partial y}\right)^2} = \frac{1}{2} \left[ \overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial y}\right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial x}\right)^2} \right] \quad (3.24)$$

$$\overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial z} \frac{\partial w_z}{\partial x}\right)} = \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial z} \frac{\partial w_z}{\partial y}\right)} = -\frac{1}{4} \left[ \overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial x}\right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial y}\right)^2} \right] \quad (3.25)$$

Finalement,

$$\varepsilon = \nu \left\{ 2 \overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial x}\right)^2} + 3 \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial x}\right)^2} + 3 \overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial y}\right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial w_y}{\partial y}\right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial w_x}{\partial y} \frac{\partial w_y}{\partial x}\right)} \right\} \quad (3.26)$$

Les faiblesses de cette méthode pour obtenir des estimations fiables de  $\varepsilon$  résident dans le fait que l'utilisation de cette relation nécessite une résolution spatiale des mesures PIV au plus proche de l'échelle spatiale de Kolmogorov.

La méthode LE-PIV a été développée pour s'affranchir des problèmes de résolution spatiale de la méthode directe. C'est une méthode basée sur les mêmes théories que la méthode de simulation numérique Large Eddy Simulation (LES), où le champ fluctuant de vitesse est résolu jusqu'à une certaine échelle correspondant à la taille de la maille CFD. Le modèle de sous-maille utilisé est celui développé par Smagorinsky (1963) qui estime la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente selon :

$$\varepsilon_{SGS} = \frac{1}{2} \nu_t \overline{\left(\frac{\partial w_i}{\partial x_j} + \frac{\partial w_j}{\partial x_i}\right)^2} = (C_s \Delta)^2 \overline{\left[\frac{1}{2} \left(\frac{\partial w_i}{\partial x_j} + \frac{\partial w_j}{\partial x_i}\right)^2\right]^{3/2}} \quad (3.27)$$

$$\nu_t = (C_s \Delta)^2 \overline{\left[\frac{1}{2} \left(\frac{\partial w_i}{\partial x_j} + \frac{\partial w_j}{\partial x_i}\right)^2\right]^{1/2}} \quad (3.28)$$

où la viscosité turbulente  $\nu_t$  est calculée à partir des gradients de fluctuation de la vitesse mesurée par la technique PIV, de la résolution spatiale  $\Delta$  et de la constante de Smagorinsky  $C_s$ .

Les limites de cette méthode résident dans le fait que la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente estimée est fortement dépendante de la valeur de constante de Smagorinsky associée. En effet, la  $C_s$  étant élevé au carré dans l'expression de la viscosité turbulente, les valeurs de  $\varepsilon_{SGS}$  peuvent changer assez fortement même si les valeurs habituelles de  $C_s$  sont comprises entre 0,17 et 0,21 (Collignon, 2012).

#### 3.3.3.4.3 Contraintes mécaniques au sein de l'écoulement turbulent

Le modèle théorique de la turbulence isotrope de Kolmogorov décrit dans la **section 3.2.6** a encore une fois été utilisé afin de décrire l'écoulement turbulent dans la cuve agitée. Ceci avec pour principal objectif de déterminer les contraintes hydrodynamiques subies par les agrégats bactériens ; associées à la taille des plus petits tourbillons de l'écoulement turbulent. Ainsi l'échelle spatiale de Kolmogorov locale  $\lambda_K$  a été estimée en chaque point du plan de mesure à partir des mesures de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente obtenues selon la méthode directe  $\varepsilon$  ou la méthode LE-PIV  $\varepsilon_{SGS}$ .

$$\lambda_K = \left(\frac{v^3}{\varepsilon}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (3.29)$$

$$\lambda_{KSGS} = \left(\frac{v^3}{\varepsilon_{SGS}}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (3.30)$$

Finalement les rapports  $\lambda_K/D_b$  et  $\lambda_{KSGS}/D_b$  traduisant le rapport entre la taille des plus petits tourbillons dans le plan de l'écoulement et la taille moyenne des agrégats bactériens ( $D_b$ ), ont été calculés pour évaluer les dommages hydrodynamiques pouvant être causés par l'écoulement turbulent aux microorganismes. Cela permettra entre autres de définir des zones pouvant être problématiques pour le développement et le métabolisme bactérien.

## 3.4 Outils de modélisation/simulation

### 3.4.1 Etude de la modélisation et de la simulation de la production de biohydrogène par le modèle ADM1

Afin de modéliser et de simuler la production de biohydrogène et des métabolites formés pendant le procédé de fermentation sombre, un modèle de type ADM1 (*Anaerobic Digestion Model N°1*) a été appliqué. Ce dernier a été modifié pour prendre en compte tous les métabolites

rencontrés au cours de nos expérimentations ; de plus, un modèle de mélange a été implémenté pour se rapprocher de conditions de culture réelles.

#### 3.4.1.1 Principe du modèle ADM1

Le modèle ADM1 a été développé en 1997 par un groupe interdisciplinaire de l'IWA (*International Water Association*) dans le but de modéliser le procédé de digestion anaérobie des eaux usées, dans un réacteur parfaitement agité en mode de culture continu. Le modèle inclut les principaux processus impliqués dans la bioconversion de matières organiques complexes en biogaz (méthane, dioxyde de carbone), métabolites inertes et leurs intermédiaires. Pour cela, il utilise un flux de DCO (Demande Chimique en Oxygène) en prenant en compte différentes étapes de la dégradation du matériel biologique (désintégration, hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse, méthanogénèse) (*Figure 3.19*). Au sein de l'ADM1, le biohydrogène est décrit à la fois comme un intermédiaire réactionnel dans le digestat et comme un produit final dans la phase gazeuse ; c'est pour cela que le modèle a été choisi pour prédire la production de biohydrogène *via* le procédé de fermentation acidogénique.

La version standard du modèle ADM1 comprend 26 espèces (anions, cations et 24 espèces organiques dont 12 correspondent aux espèces microbiennes), 6 équilibres acide/base, 19 mécanismes réactionnels (régis par deux étapes extracellulaires de solubilisation des substrats solides et leur hydrolyse enzymatique en composés solubles ; ainsi que trois étapes intracellulaires d'acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse), et 3 processus de transfert de matière gaz/liquide. Finalement, le modèle est résolu par le biais de 26 équations différentielles et 7 équations algébriques pour ce qui concerne la phase liquide, et 3 équations différentielles pour ce qui est de la phase gazeuse. Les processus d'inhibition résultant du pH, de la température, de la concentration en azote ainsi que la pression partielle en hydrogène sont également pris en compte dans le modèle. Enfin, un inconvénient majeur de l'ADM1 réside dans le fait qu'il inclut environ 60 paramètres stœchiométriques et cinétiques ajustables.

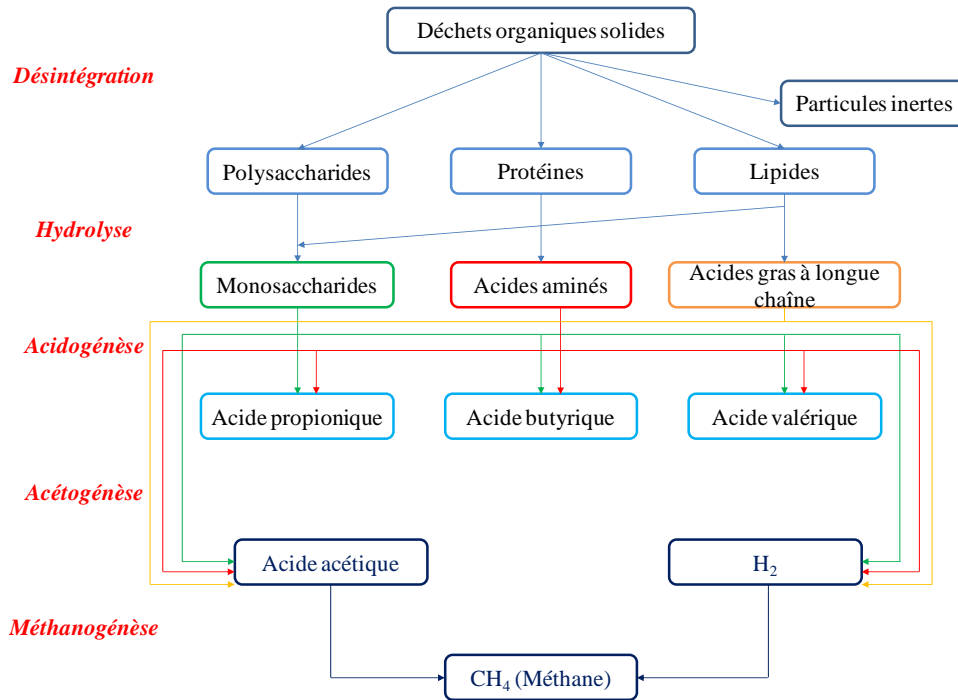


Figure 3.19. Structure du modèle ADM1 standard (adapté de Batstone et al., 2002).

### 3.4.1.2 Modifications du modèle ADM1

Le modèle ADM1 utilisé lors de nos travaux s'inspire du code développé sous l'univers *Matlab*<sup>®</sup> par Danielson (2014). Il s'agit à la base d'un modèle ADM1 modifié qui utilise un flux de DCO pour la production de méthane à partir du crottin de cheval. Il prend en compte les différentes étapes de la dégradation du matériel biologique du modèle originel tout en incluant le lactate en tant qu'intermédiaire réactionnel.

Afin de représenter notre système au plus proche des conditions rencontrées lors de nos essais de fermentation, plusieurs modifications ont été apportées. Ainsi, notre modèle utilise un flux de DCO en prenant en compte les étapes d'hydrolyse et d'acidogénèse pour la dégradation du glucose qui est un monosaccharide (**Figure 3.20**). Ceci inclut donc le blocage des variables de certains processus de désintégration, d'hydrolyse et de la méthanogénèse, mais également de l'acidogénèse des acides gras à longue chaîne et des acides aminés.

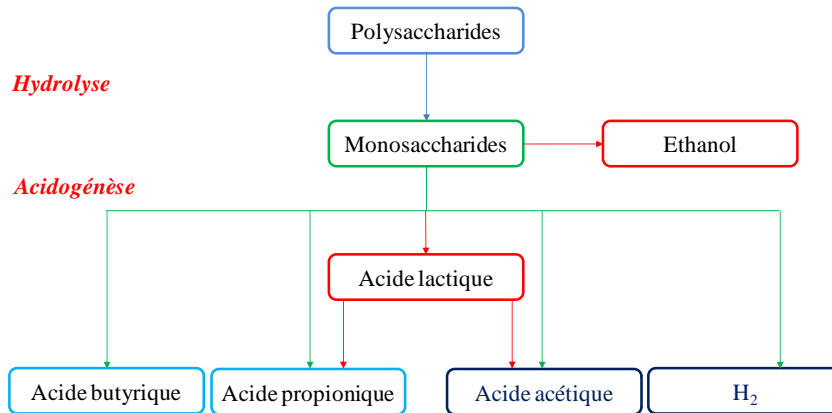


Figure 3.20. Structure du modèle ADM1 modifié.

Au cours des cultures biologiques de fermentation acidogénique à partir du glucose, il a été observé la formation de lactate et d'éthanol en cours de réaction. La formation du lactate et de l'éthanol n'étant ni représentée dans le modèle ADM1, ni dans la version modifiée de Danielson pour ce qui concerne l'éthanol, les processus de formation du lactate, de l'éthanol, la fermentation du lactate et les variables correspondantes ont été implémentés dans le modèle.

La formation du lactate ( $S_{la}$ ) et de l'éthanol ( $S_{eth}$ ) est supposée correspondre à celle d'un sous-produit de la dégradation du glucose ( $S_{su}$ ) au cours de l'étape d'acidogénèse. La réaction est régie par le groupe de bactéries qui dégradent le glucose ( $X_{su}$ ) à une vitesse maximale de consommation spécifique  $K_{m,su}$ .

$$K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim} \quad (3.31)$$

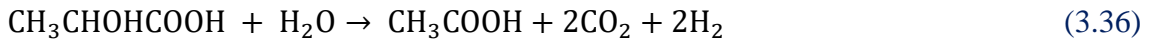
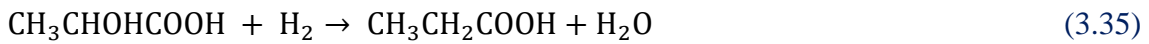
où  $K_{s,su}$  est la constante de saturation,  $S_{su}$  est la concentration en glucose et  $I_{pH}$  et  $I_{IN,lim}$  sont les constantes d'inhibition relatives au pH et au manque d'azote inorganique pour les microorganismes. Ainsi, la dégradation spécifique du glucose en lactate et en éthanol est définie selon les équations :



La formation de l'acétate ( $S_{ac}$ ) et du propionate ( $S_{pro}$ ) est supposée correspondre à celle d'un sous-produit de la dégradation du lactate ( $S_{la}$ ). La réaction est régie par le groupe de bactéries qui dégradent le lactate ( $X_{la}$ ) à une vitesse maximale de consommation spécifique  $K_{m,la}$ .

$$K_{m,la} \cdot \frac{S_{la}}{K_{s,la} + S_{la}} \cdot X_{la} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim} \quad (3.34)$$

où  $K_{s,la}$  est la constante de saturation. Ainsi, la dégradation spécifique du lactate en acétate et propionate est définie selon les équations :



La production des métabolites à partir du glucose en cours de réaction est décrite à partir de coefficients stœchiométriques. De ce fait, les coefficients stœchiométriques de production de l'éthanol  $f_{eth,su}$  et du lactate  $f_{la,su}$  à partir du glucose, ainsi que ceux correspondant à la production de l'acétate  $f_{ac,la}$  et du propionate  $f_{pro,la}$  à partir du lactate ont été implémentés. A noter que la dégradation de l'éthanol n'intervient pas en cours de réaction car il est défini comme étant un produit métabolique de fermentation final du glucose.

#### 3.4.1.3 Calibration du modèle

Les valeurs des paramètres définies par Batstone *et al.* (2002), Antonopoulou *et al.* (2012) et Danielson (2014) ont été utilisées pour initialiser la calibration du modèle. Les paramètres cinétiques et stœchiométriques liés à la formation du lactate et de l'éthanol ainsi que la dégradation du lactate ont été calibrés manuellement à partir des résultats expérimentaux des fermentations acidogéniques batch du glucose à 30 g/L (32 kgCOD/m<sup>3</sup>) et 60 g/L (64 kgCOD/m<sup>3</sup>). Ceci a permis d'obtenir des valeurs des paramètres stœchiométriques correspondant à la proportion des métabolites formés à partir du glucose ( $f_{ac,su}$ ,  $f_{pro,su}$ ,  $f_{bu,su}$ ,  $f_{h2,su}$ ,  $f_{la,su}$  et  $f_{eth,su}$ ) ainsi qu'à la proportion de l'acétate et du propionate formée à partir du lactate ( $f_{ac,la}$  et  $f_{pro,la}$ ), fidèles aux données expérimentales.

Pour la suite de la calibration du modèle, nous avons utilisé les valeurs expérimentales de fermentation acidogénique du glucose à 30 g/L et 60 g/L. Ensuite, nous avons confronté les données des essais expérimentaux de dégradation du glucose et de formation des métabolites en cours de réaction à celles simulées par le modèle. Ceci a permis de vérifier les écarts entre modèle et expérimentation.

#### 3.4.1.4 Mise en œuvre du réacteur en cascade pour les cultures en mode continu

Comme expliqué précédemment, le modèle ADM1 standard a été développé selon l'hypothèse d'un réacteur parfaitement agité, ce qui ne correspond pas aux conditions de culture réelles. Une autre façon d'aborder la problématique est donc de considérer que le réacteur est divisé en plusieurs cellules parfaitement agitées en série. La cascade de réacteurs agités permet de réaliser la transition entre les performances d'un réacteur parfaitement mélangé unique et celles d'un réacteur piston. On peut ainsi tenter de représenter l'écoulement du fluide dans un réacteur réel en assimilant celui-ci à une cascade de  $N_{bac}$  réacteurs agités en série de même volume total (**Figure 3.21**). Ainsi, le modèle mathématique a été modifié en tenant compte de la division du réacteur en plusieurs cellules en cascade. Le choix du nombre de cellules étant possible ( $N_{bac}$ ), cela permet d'analyser le rôle clé des conditions de mélange sur l'efficacité du procédé de fermentation acidogénique.

Pour vérifier ce modèle, nous avons utilisé les mêmes valeurs des paramètres cinétiques et stœchiométriques validés précédemment. Ensuite nous avons confronté les données des essais expérimentaux d'une culture continue (**3.1.2.1.6**) à celles simulées par le modèle en considérant le réacteur selon  $N_{bac} = 1, 2, 3$  et 4.



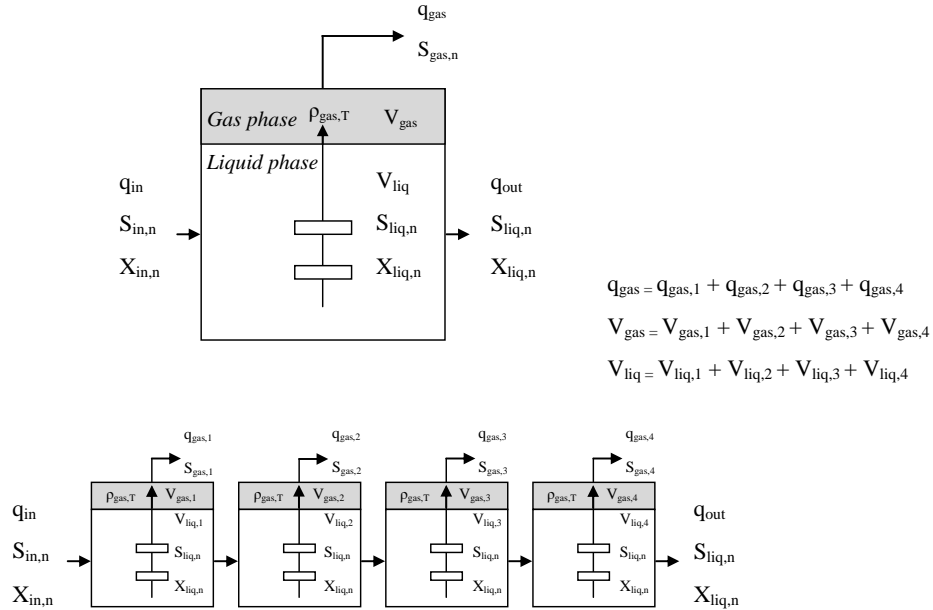


Figure 3.21. Schéma de principe du réacteur en cascade.

### 3.4.2 Etude de la modélisation et de la simulation de l'écoulement turbulent par CFD

Dans l'optique de modéliser et de simuler numériquement l'écoulement dans la cuve mécaniquement agitée lorsque les conditions sont turbulentes, un outil numérique de Mécanique des Fluides Numérique (CFD) a été appliqué. Cela permet, entre autres, de comparer les profils de vitesse obtenus par CFD à ceux déterminés expérimentalement par la technique de Vélocimétrie par Images de Particules.

#### 3.4.2.1 Principe et démarche de la CFD

La mise en œuvre de la CFD se fait par l'intermédiaire du logiciel commercial *Phoenix*<sup>®</sup> (*Parabolic Hyperbolic Or Elliptic Numerical Integration Code Series*) qui est un outil développé et commercialisé par la société CHAM Ltd. (Royaume-Uni). Le logiciel est capable de résoudre les équations de Navier-Stokes à une, deux ou trois dimensions avec la méthode des volumes finis, et ce pour des fluides compressibles ou incompressibles, pour des systèmes simples ou polyphasiques (à phases dispersées ou séparées), en conditions stationnaires ou transitoires, et en régime laminaire ou turbulent (fluides Newtoniens ou non-Newtoniens). Dans nos travaux nous utilisons un fluide Newtonien incompressible ; ainsi, en régime turbulent les équations de Navier-Stokes moyennées au sens de Reynolds (RANS équations : *Reynolds-averaged Navier-Stokes equations*) se résument selon :

$$\sum_i \frac{\partial u_i}{\partial x_i} = 0 \quad (3.37)$$

$$\rho \frac{\partial u_i}{\partial t} + \rho \sum_j u_j \frac{\partial u_i}{\partial x_j} = -\frac{\partial(P+\rho gz)}{\partial x_i} + \sum_j \frac{\partial}{\partial x_j} \left( \mu \frac{\partial u_i}{\partial x_j} \right) - \sum_j \overline{\rho u'_i u'_j} \quad (3.38)$$

où les composantes moyennées dans le temps du vecteur vitesse selon les directions  $x_i$  sont notées  $u_i$ ,  $u'_i$  est la composante fluctuante de la vitesse selon  $x_i$  et  $P$  est la pression statique.

La démarche mettant en œuvre l'utilisation de la CFD se résume en trois étapes distinctes de pré-traitement, traitement et post-traitement :

- ✓ Le *pré-traitement* inclut :
  - ✓ La définition du domaine de calcul, ainsi que des géométries de l'axe d'agitation, des deux mobiles d'agitation et des contre-pales au moyen de l'outil de Conception Assistée par Ordinateur (CAO) du logiciel ;
  - ✓ La définition du maillage qui définit les volumes de contrôle sur lesquels les équations aux dérivées partielles vont être discrétisées, donc transformées en équations algébriques ;
  - ✓ La modélisation, par la définition des modèles physiques qui décrivent les processus physiques se déroulant dans le domaine de calcul, ainsi que des conditions initiales et aux limites associées.
- ✓ Le *traitement* correspond à la mise en œuvre du solveur qui résout le système d'équations algébriques sur l'ensemble des volumes de contrôle.
- ✓ Le *post-traitement* correspond à l'exploitation directe et indirecte par calcul ou visualisation des résultats, puis en leur analyse.

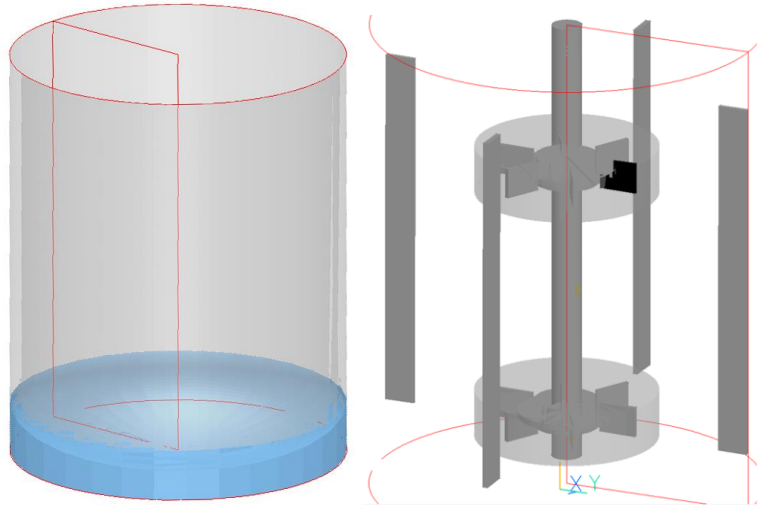
L'interface graphique du logiciel *Phoenix*<sup>®</sup> appelée VR-Viewer, associe des outils de CAO pour la définition des géométries simples et des maillages (maillages structurés cartésiens et polaires, on non-structurés) à un solveur appliquant la méthode des volumes finis sur maillage décalé ou non-décalé, fondé sur l'algorithme itératif ségrégré SIMPLEST. Le logiciel dispose d'un solveur simple précision et d'un solveur double précision pour lesquels des variantes monoprocresseurs et parallèles sont applicables. Aussi, *Phoenix*<sup>®</sup> est capable de coupler les équations de Navier-Stokes aux équations de transfert de matière, de transfert de chaleur ainsi

qu'à plusieurs modèles de turbulences. Les derniers modèles cités comprennent entre autres les modèles à deux équations de type RANS fondés sur une moyenne temporelle des équations de Navier-Stokes et une hypothèse de la turbulence isotrope, et les modèles de type *Large Eddy Simulation* (LES) fondés sur des simulations aux grandes échelles qui s'affranchissent des limitations rencontrées avec l'approche RANS. Il est également possible par l'intermédiaire du logiciel d'implémenter des variables externes propres à l'utilisateur qui peuvent être calculées *via* les formules algébriques ou être la solution d'une équation de transport (équation aux dérivées partielles similaire à l'équation 3.38). Finalement, *Phoenix*<sup>®</sup> peut modéliser la transmission des contraintes mécaniques fluide-solide.

### 3.4.2.2 Mise en œuvre pratique

#### 3.4.2.2.1 Géométrie

Les géométries dessinées par le logiciel comprennent la cuve, l'axe d'agitation, les deux mobiles d'agitation et les contre-pales (*Figure 3.22*). Toutes les géométries ont été construites à partir d'objets standards disponibles dans la bibliothèque du logiciel. Ensuite, les géométries ont été implémentées dans un domaine cylindrique arbitraire, initialement rempli d'un fluide, dont les propriétés sont celles d'un fluide Newtonien isotherme.

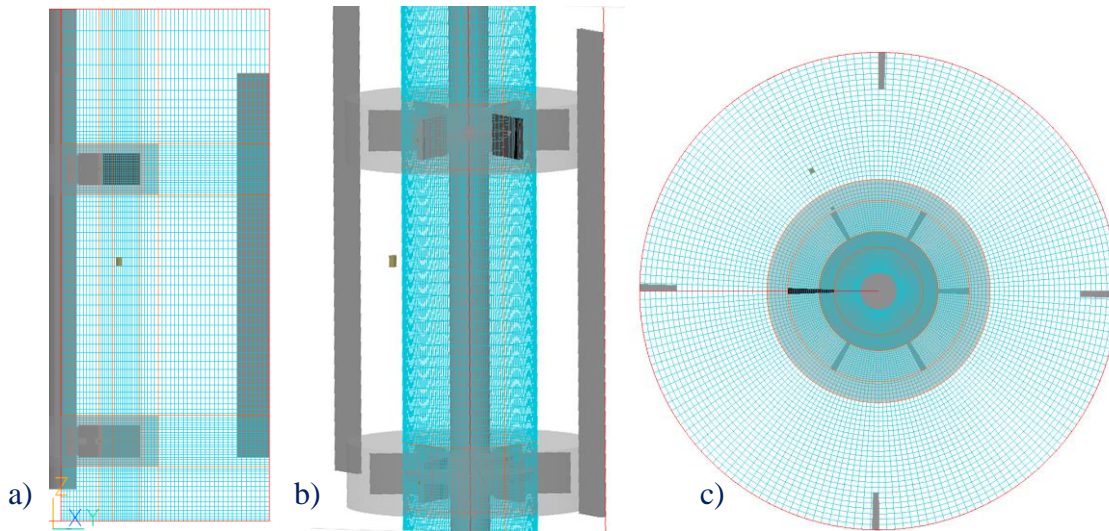


*Figure 3.22. Géométries du système de référence.*

#### 3.4.2.2.2 Maillage

Dans nos travaux, nous avons privilégié le maillage structuré polaire couplé à une

approche *cut-cells* appelée PARSOL (*Partial solids*) qui permet aux interfaces fluide-solide de « couper » une maille (**Figure 3.23**). Autrement dit, la méthode du PARSOL permet de détecter les mailles dans lesquelles une phase solide occupe une fraction du volume. Ces dernières sont traitées spécifiquement en ne considérant que la sous-maille fluide après détection de la forme de l'interface. *A priori*, la présence d'une intersection dans la maille peut augmenter l'erreur numérique en son sein, mais elle reste du même ordre de grandeur que l'erreur induite par la diffusion numérique.



**Figure 3.23.** Maillage selon  $x$  (a),  $y$  (b) et  $z$  (c).

#### 3.4.2.2.3 Référentiel tournant : approche MRF

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la méthode du PARSOL pour les maillages polaires structurés avec l'approche MRF (*Multiple Reference Frame*). C'est une approche de type « référentiel tournant » où le maillage est fixe et les équations de Navier-Stokes sont modifiées pour tenir compte du déplacement du référentiel sur une région du domaine. Cette technique a été employée car elle permet de gagner un temps de calcul considérable puisque le maillage est immobile, tout comme l'objet dans le cas d'un mobile d'agitation puisque celui-ci tourne avec le référentiel, ce qui permet d'utiliser des simulations stationnaires.

#### 3.4.2.2.4 Conditions initiales, aux limites et hypothèses de modélisation

Des simulations stationnaires en régime turbulent ont été mises en œuvre en définissant des vitesses d'agitations de 40, 120 et 200 trs/min appliquées au référentiel en MRF. Le fluide est

supposé Newtonien avec une viscosité dynamique définie de  $9,0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s, incompressible et isotherme. La condition initiale correspond à un fluide immobile, avec un gradient de pression dans la direction verticale résultant de la gravité. Le principe d'adhérence s'applique aux parois solides, ce qui impose des vitesses nulles aux parois de la cuve et des vitesses égales à celles du référentiel aux frontières de l'agitateur et des mobiles d'agitations.

#### 3.4.2.2.5 Modélisation de la turbulence

La fermeture des équations de Navier-Stokes pour l'expression empirique de la turbulence nécessite la description mathématique de cette turbulence, donc du terme  $-\sum_k \overline{\rho u'_i u'_k}$  (équation 3.38). La première simplification consiste à employer l'hypothèse de la turbulence isotrope ( $u'_i = u'_j = u'$ ) pour tout couple  $(i, j)$ , de sorte que l'énergie cinétique turbulente  $k$  peut être exprimée de manière simplifiée par  $k = (3/2)\overline{u'^2}$ .

Par conséquent, dans ce travail, nous avons utilisé des modèles de type «  $k - \varepsilon$  » (variantes « *bas* » et « *haut* » Reynolds) à deux équations (RANS) qui utilisent l'hypothèse de la turbulence isotrope. Ainsi les modèles utilisés comprennent le modèle  $k - \varepsilon$  de base et ses variantes :

- ✓ Modèle  $k - \varepsilon$  *Realizable* : KEREAL
- ✓ Modèle  $k - \varepsilon$  de *Chen-Kim* : KECHEN
- ✓ Modèle  $k - \varepsilon$  de *Yakhot-Orszag* basé sur la théorie de groupe de renormalisation (RNG) : KERNG
- ✓ Modèle  $k - \varepsilon$  de *Murukami-Mochida-Kondo* : KEMMK
- ✓ Modèle  $k - \varepsilon$  de *Kao-Launder* : KEKL

Ces modèles à constantes multiples reposent sur l'hypothèse selon laquelle il existe une viscosité turbulente  $\nu_t$  telle que le terme de Reynolds puisse être modélisé selon un terme diffusionnel et sur le fait que  $\nu_t$  peut être déduit à partir de deux équations de transport de  $k$  et de  $\varepsilon$ .

$$-\sum_k \overline{\rho u'_i u'_k} = \sum_k \frac{\partial}{\partial x_k} \left( \rho \nu_t \frac{\partial v_i}{\partial x_k} \right) \quad (3.39)$$

Les modèles diffèrent de par la valeur empirique de leurs constantes, les différentes façons

de les estimer, mais aussi par la présence de termes sources additionnels dans le cas du modèle  $k - \varepsilon$  de Chen-Kim par exemple (CHAM, 2018).

## Nomenclature

### Liste des symboles

$C_1$	Distance fond de cuve et turbine base (m)
$C_2, C_{2'}$	Distance entre les turbines (m)
$C_3$	Distance turbine haute et haut du liquide (m)
$C$	Couple (N.m)
$C_S$	Constante de Smagorinsky
$D$	Diamètre des turbines (m)
$D_b$	Taille des agrégats bactériens ( $\mu\text{m}$ )
$D_i$	Diffusivité moléculaire ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$d_D$	Diamètre du disque (m)
$d_P$	Largeur des turbines (m)
$d_S$	Diamètre de l'axe d'agitation (m)
$H$	Hauteur du bioréacteur (m)
$H_L$	Hauteur de liquide dans le bioréacteur (m)
$h$	Hauteur des turbines (m)
$h_D$	Epaisseur du disque (m)
$k$	Energie cinétique turbulente ( $\text{m}^2/\text{s}^2$ )
$k_L a$	Coefficient volumétrique de transfert de matière ( $\text{h}^{-1}$ )
$N$	Vitesse d'agitation (trs/min)
$N_{bac}$	Nombre de réacteurs en série
$N_P$	Nombre de puissance
$P$	Puissance dissipée (W)

$P_I, P_{I'}$	Hauteur du point d'injection (m)
$P/V$	Puissance dissipée par unité de volume (W/m <sup>3</sup> )
$Re$	Nombre de Reynolds
$T$	Diamètre du bioréacteur (m)
$t$	Temps (h)
$t_m$	Temps de mélange (h)
$V$	Volume du bioréacteur (m <sup>3</sup> )

*Lettres grecques*

$\varepsilon$	Vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (W/kg)
$\Lambda$	Echelle intégrale ( $\mu\text{m}$ )
$\lambda_K$	Echelle spatiale de Kolmogorov ( $\mu\text{m}$ )
$\lambda_{Taylor}$	Echelle de Taylor ( $\mu\text{m}$ )
$\mu$	Viscosité dynamique (Pa.s)
$\nu$	Viscosité cinématique (m <sup>2</sup> /s)
$\rho$	Densité du fluide (kg/m <sup>3</sup> )

*Abréviations*

<i>ADMI</i>	<i>Anaerobic Digestion Model n°1</i>
<i>A<sub>p</sub></i>	<i>Active Pixel Zone</i>
<i>AGVs</i>	Acides Gras Volatils
<i>CAO</i>	Outil de Conception Assisté
<i>CCD</i>	<i>Charge Coupled Device</i>
<i>CoV</i>	Coefficient de Variation
<i>DCO</i>	Demande Chimique en oxygène
<i>DCU</i>	Unité de Contrôle Digital
<i>FFT</i>	Transformée de Fourier Rapide
<i>FI</i>	Fenêtre d'Interrogation
<i>HPLC</i>	Chromatographie phase Liquide à Haute Performance

<i>HSV</i>	<i>Hue, Saturation, Value</i>
<i>IWA</i>	<i>International Water Association</i>
<i>LES</i>	<i>Large Eddy Simulation</i>
<i>MRF</i>	<i>Multiple Reference Frame</i>
<i>PARSOL</i>	<i>Partial Solids</i>
<i>PCR</i>	Amplification en Chaîne par Polymérisation
<i>PEG</i>	Polyéthylène Glycols
<i>PIV</i>	Vélocimétrie par Images de Particules
<i>PLIF</i>	Fluorescence Induite par Nappe Laser
<i>RANS</i>	<i>Reynolds-Average Navier-Stokes equations</i>
<i>RGB</i>	<i>Red, Green, Blue</i>
<i>SSCP</i>	Polymorphisme de Conformation des Simples Brins
<i>TSH</i>	Temps de Séjour Hydraulique

### 3.5 Références bibliographiques

- G. Antonopoulou, H.N. Gavala, I.V. Skiadas, G. Lyberatos (2012). Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 191-208.
- P.M. Armenante, G.M. Chang (1998). Power consumption in agitated vessels provided with multiple-disk turbines. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 37, 284-291.
- E. Babalona, D. Bahouma, S. Tagia, E. Pantouflas, J. Markopoulos (2005). Power consumption in dual impeller gas-liquid contactors: Impeller spacing, gas flow rate, and viscosity effects. *Chemical Engineering and Technology*. 28, 802-807.
- D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M. Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin (2002). Anaerobic Digestion Model N°. 1 (ADM1), Scientific and Technical Report N°. 13. Editor: IWA Publishing. London, UK.
- J.D. Bullock, B. Kristiansen (1989). Basic Biotechnology. Editor: J.D. Bullock, B. Kristiansen. Academic Press, Saunders College Publishing/Harcourt Brace. London, UK.
- F. Cabaret, S. Bonnot, L. Fradette, P.A. Tanguy (2007). Mixing time analysis using colorimetric methods and image processing. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 46, 5032-5042.
- CHAM (2018). The Phoenix Encyclopedia.  
([http://www.cham.co.uk/phoenixes/d\\_polis/d\\_enc/turmod/enc\\_tu.htm](http://www.cham.co.uk/phoenixes/d_polis/d_enc/turmod/enc_tu.htm)).



- M.L. Collignon (2012). Etude de l'hydrodynamique au sein d'un bioréacteur à cuve agitée utilisé pour la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs : Caractérisation expérimentale et théorique des écoulements *via* des outils eulériens et lagrangiens. Université de Liège. Thèse. (*En français*).
- M.L. Collignon, A. Delafosse, S. Calvo, C. Martin, A. Marc, D. Toye, E. Olmos (2016). Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 108, 30-43.
- O. Danielson (2014). Modeling and simulation of anaerobic manure digestion into biogas. Chalmers University of Technology. Master.
- V. Hudcova, V. Machon (1989). Gas-liquid dispersion with dual rushton turbine impellers. *Biotechnology and Bioengineering*. 34, 617-628.
- M. Jahoda, M. Mostek, A. Kukukova, V. Machon (2007). CFD modelling of liquid homogenization in stirred tanks with one and two impellers using large eddy simulation. *Chemical Engineering Research and Design*. 85, 616-625.
- Z. Jaworski, W. Bujalski, N. Otomo, A.W. Nienow (2000). CFD study of homogenization with dual rushton turbines: Comparison with experimental results. *Chemical Engineering Research and Design*. 78, 327-333.
- G.R. Kasat, A.B. Pandit, V.V. Ranade (2008). CFD simulation of gas-liquid flows in a reactor stirred by dual Rushton turbines. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 6, A60.
- A.N. Kolmogorov (1941). Dissipation of energy in the locally isotropic turbulence. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 32, 19-21.
- J. Markopoulos, E. Pantouflas (2001). Power consumption in gas-liquid contactors agitated by double-stage rushton turbines. *Chemical Engineering and Technology*. 24, 1147-1150.
- A.B. Metzner, R.H. Feehs, H. Lopez Ramos, R.E. Otto, J.D. Tuthill (1960). Agitation of viscous newtonian and non-newtonian fluids. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 7, 3-9.
- A. Noblecourt, G. Christophe, C. Larroche, G. Santa-Catalina, E. Trably, P. Fontanille (2017). High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 24656-24666.
- C. Pan, J. Min, X. Liu, Z. Gao (2008). Investigation of fluid flow in a dual rushton impeller stirred tank using particle image velocimetry. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 16, 693-699.
- J.H. Rushton, E.W. Costich, H.J. Everett (1950). Power characteristics of mixing impellers. *Chemical Engineering Progress*. 46, 395-402.
- J. Smagorinsky (1963). General circulation experiments with the primitive equation: I. The basic experiments. *Monthly Weather Review*. 91, 99-164.
- M. Taghavi, R. Zadghaffari, J. Moghaddas, Y. Moghaddas (2011). Experimental and CFD investigation of power consumption in a dual Rushton turbine stirred tank, *Chemical Engineering Research and Design*. 89, 280-290.
- W. Thielicke, E.J. Stamhuis (2014). PIVlab: Towards user-friendly, affordable and accurate digital particle image velocimetry in MALAB. *Journal of Open Research Software*. 2

---

# Bilan

---

En accord avec les matériels et méthodes présentés, nous disposons à présent de tous les outils nécessaires pour étudier l'effet des paramètres abiotiques du système sur les rendements globaux et les productions en biohydrogène, pour mesurer la cinétique de transfert de matière liquide-gaz, le temps de mélange et les propriétés locales de l'écoulement, ainsi que pour modéliser et simuler l'hydrodynamique, le mélange et la production de biohydrogène dans le bioréacteur. Pour mener à bien ces travaux, nous utiliserons les outils et méthodes suivants :

- ✓ Une cuve à double enveloppe pour les expérimentations de fermentation sombre, de transfert de matière liquide-gaz, et de temps de mélange par conductimétrie et décoloration chimique ; une cuve à simple enveloppe de même dimension pour les expérimentations du temps de mélange par PLIF et de l'hydrodynamique locale par PIV ;
- ✓ Une méthode de désoxygénation/oxygénation pour estimer le transfert de matière liquide-gaz ;
- ✓ Des méthodes conductimétrique, de décoloration chimique et de Fluorescence Induite par Nappe Laser pour estimer le temps de mélange, ses mécanismes et son évolution dynamique ;
- ✓ Une méthode de Vélocimétrie par Images de Particules (PIV 2D-2C) pour mesurer les champs de vitesse dans un plan de l'écoulement, caractériser la composante turbulente de l'écoulement (énergie cinétique turbulente  $k$  et sa vitesse de dissipation  $\varepsilon$ ) et estimer le stress hydrodynamique induit aux agrégats bactériens par comparaison avec l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$  ;
- ✓ Un outil de modélisation et simulation par l'intermédiaire du modèle ADM1 pour simuler la production de biohydrogène et des métabolites formés pendant le procédé ;
- ✓ Un outil de modélisation et simulation numérique par l'intermédiaire du logiciel *Phoenix*<sup>®</sup> pour obtenir les profils de vitesse au sein du bioréacteur en régime turbulent, caractériser la composante turbulente de l'écoulement ( $k$  et  $\varepsilon$ ) et estimer le stress hydrodynamique induit aux agrégats bactériens par l'estimation de l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$  à partir des simulations.



# **Chapitre 4 : Effets de la viscosité du digestat et du mélange sur la production en biohydrogène**

---

## Préambule

---

L'objectif principal de ce chapitre est d'étudier l'influence de la viscosité du digestat et du mélange induit par agitation mécanique sur les performances du procédé de fermentation sombre. Pour ce faire, comme décrit dans le *Chapitre 3*, la production de biohydrogène en culture mixte sera menée en système batch au sein d'un bioréacteur à chicanes de 2-L. Pour atteindre les objectifs de cette étude et afin d'éliminer les possibles sources d'erreurs pouvant être causées par les variabilités de comportement rhéologique des digestats naturels, des digestats synthétiques seront préparés en substituant l'eau distillée du milieu de culture par différentes fractions de polyéthylène glycol. Ainsi, 5 niveaux de viscosité du digestat ( $9,0 \cdot 10^{-4}$ - $6,1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s) et 3 niveaux de vitesse d'agitation des mobiles (40, 120 et 200 trs/min) seront étudiés. Les valeurs des deux paramètres abiotiques permettront d'observer une large gamme de puissance dissipée ( $P/V$  1-100 W/m<sup>3</sup>) et de nombre de Reynolds ( $Re$  30- $1,1 \cdot 10^4$ ). La production de biohydrogène, l'évolution de la concentration en glucose et en métabolites dans le digestat seront mesurées pour évaluer l'efficacité de la production de biohydrogène par voie fermentaire sombre. Afin de relier les effets de la viscosité du digestat et du mélange sur les performances du procédé, les résultats seront décrits en fonction :

- ✓ De la puissance dissipée ( $P/V$ ) ;
- ✓ Du nombre adimensionnel de Reynolds ( $Re$ ) ;
- ✓ De l'échelle spatiale ( $\lambda_K$ ) de Kolmogorov en régime turbulent.

Ce *Chapitre 4* a été publié dans le *Biochemical Engineering Journal*. De plus, les principaux résultats ont été présentés sous la forme d'une communication orale au cours de la conférence mondiale WHEC 2018 (22<sup>nd</sup> *World Hydrogen Energy Conference*) qui s'est déroulée à Rio de Janeiro (Brésil) du 17 au 22 juin 2018.

## **Combined effects of digestate viscosity and agitation conditions on the fermentative biohydrogen production**

B. Chezeau<sup>1,2</sup>, Ch. Vial<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, LabEx IMobS<sup>3</sup>, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

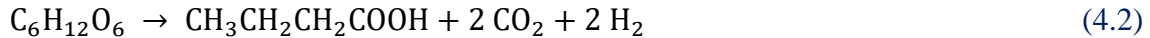
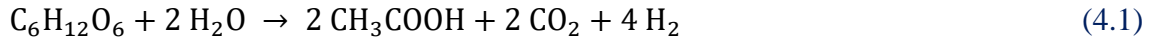
### **Abstract**

The combined effects of agitation and viscosity on fermentative hydrogen production were investigated in mixed cultures. The hydrogen production potential was studied in a batch fully-baffled cylindrical bioreactor, monitoring gas production and the composition of the gas effluents over time, while the profiles of volatile fatty acids in the digestate were analyzed. Viscosity was varied between  $9.0 \cdot 10^{-4}$  and  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s by adding polyalkylene glycols that could not be used as a substrate by microorganisms. Experimental results demonstrated that hydrogen yield and production varied significantly as a function of viscosity and rotation speed between 0.90–1.38 mol H<sub>2</sub>/mol of glucose and 7.4–11.3 L, respectively. Their evolution did not correlate with power input, but was adequately described by a unique quantity, the dimensionless Reynolds number: in laminar flow, mixing enhanced slightly hydrogen production, which peaked in the transitional regime, and finally fell under established turbulent conditions. Hydrogen production was significantly impaired when the Kolmogorov length scale approached the size of sludge aggregates. Butyric acid concentration was strongly correlated to H<sub>2</sub> production, whereas acetic acid content was unaffected by mixing. Finally, this study brings new knowledge on the effects of flow regime and mixing in the dark fermentation process.

**Keywords:** Agitation; Biohydrogen; Biogas production; Dark fermentation; Hydromechanical stress.

## 4.1 Introduction

Among hydrogen production processes, dark fermentation constitutes an eco-friendly technology able to produce biological hydrogen, *i.e.* biohydrogen (Agator *et al.*, 2008). Dark fermentation (acidogenic fermentation) is an anaerobic process where organic substrates are broken down by microorganisms, either in pure or mixed cultures, resulting in the production of hydrogen, carbon dioxide in the gas phase and the co-production of metabolites of commercial interest in the liquid phase (the digestate). The soluble metabolites include organic acids and solvents (such as ethanol or acetone, *etc.*) (Bundhoo and Mohee, 2016). The acetic and butyric acid pathways are commonly defined as the main ways to produce hydrogen from organic substrates:



When the prevailing metabolic pathway favors the production of acetic acid, the theoretical stoichiometric yield of  $\text{H}_2$  is 4 mol/mole of glucose, whereas it is only 2 mol/mole of glucose when the final product is butyric acid (Ghimire *et al.*, 2015). The butyric acid pathway is the most common in mixed cultures and 2.5 is considered as the maximum theoretical yield when this pathway prevails (Hawkes *et al.*, 2007).

To optimize the dark fermentation process, recent research mainly addressed substrate selection and pretreatment (Ruggeri and Tommasi, 2012), concentration of organic acids (Castro-Villalobos *et al.*, 2012, Sivagurunathan *et al.*, 2014, Ciranna *et al.*, 2014), pH (Lee *et al.*, 2012b, Lee *et al.*, 2014), temperature (Guo *et al.*, 2010, Qiu *et al.*, 2017), biohydrogen partial pressure (Lee *et al.*, 2012a). Conversely, the effects of process abiotic factors on hydrogen production have not been clearly established, even though the rheology of the digestate and agitation directly control mixing conditions are thus key process parameters.

In bioreactors, mixing is usually described macroscopically through power input (Trad *et al.*, 2016). In anaerobic digestion, the US guideline is to limit power input to 5–8  $\text{W}/\text{m}^3$  to achieve economic sustainability, but Lindmark *et al.* (2014) pointed out that there is no general agreement on the optimum intensity of mixing in these digesters. In dark fermentation, economic

sustainability also depends on the valorization of the digestate (mainly organic acids), but Trad *et al.* (2016) estimated that the same guideline may apply for biohydrogen production. In practice, agitation aims to homogenize nutrient concentrations in the liquid phase, and enhance gas-liquid mass transfer (*i.e.* hydrogen desorption), with the additional constraint that hydrogen inhibition must be prevented (Trad *et al.*, 2016). However, biogas production differs strongly from aerobic processes in which high power input is required to enhance gas-liquid oxygen mass transfer, higher than 100 and even 1,000 W/m<sup>3</sup>, because the interfacial mass transfer is not the rate-limiting step in the biogas production processes.

In dark fermentation, both local and global hydrodynamic features are also strongly affected by the rheology of the digestate. Viscosity depends on the feedstock especially when organic waste is involved (Ruggeri and Tommasi, 2012, Urbaniek and Bakker, 2015, Noblecourt *et al.*, 2018). However, the effect of viscosity has not been often discussed in the literature, even though Ruggeri and Tommasi (2012) mentioned poor mixing resulting from the non-Newtonian behavior of a digestate. In addition, digestate viscosity may change with time in a continuous bioreactor due to the variability of feedstock origins and composition. At constant rotation speed, an increase in viscosity may impair the development of the bacterial community (Lindmark *et al.*, 2014) due to the resulting higher hydromechanical shear stress applied to microorganisms, and/or due to the slowest mass transfer rate which results from the fact that diffusivity of soluble species scales as  $1/\mu$  ( $\mu$  is the dynamic viscosity of the culture medium) and that mass transfer coefficients scale as  $1/\sqrt{\mu}$  when the penetration theory of Higbie applies (Trad *et al.*, 2017b). Consequently, higher viscosity may slow down the transfer rate of nutrients to microorganisms, and at the same time, liquid-to-gas mass transfer rate which favors hydrogen production, both contributing to slow down hydrogen production rate.

However, the knowledge on the effects of viscosity and mixing conditions on the microbial community remains poor in dark fermentation: these have been mainly investigated only for the culture of animal (Croughan *et al.*, 1988, Cherry and Papoutsakis, 1989) and human cells (Leung *et al.*, 2011, Rafiq *et al.*, 2013, Jossen *et al.*, 2014, Collignon *et al.*, 2016) in the turbulent flow regime, and in anaerobic digestion in the laminar flow regime because methanogens are reputed to be highly sensitive to shear stress (Zhang *et al.*, 2012, Kundu *et al.*, 2014, Jiang *et al.*, 2016). Thus, the transition region between laminar and turbulent flow



(Edwards *et al.*, 1992) has not been explored. Even though bacteria are theoretically less sensitive than *Archaea* to mechanical stress in anaerobic digestion, the regeneration of acid-forming microorganisms is slow, about 80–90 hours (Lindmark *et al.*, 2014), and the composition of microbial consortia including the bacterial community has already been shown to be affected by mixing (McMahon *et al.*, 2001), which could affect dark fermentation.

As a conclusion, the objective of this study is to investigate the influence of digestate viscosity and of agitation on hydrogen production potential on the dark fermentation process. For this purpose, a synthetic digestate was prepared using glucose as the unique substrate and a solution of polyalkylene glycols to adjust viscosity because these could not be used as a substrate by microorganisms. The aim is to mimic the effect of viscosity when organic waste is used as the feedstock, which has been disregarded in the literature up to now. The experiments were conducted in a mechanically stirred tank as a function of rotation speed for two decades of viscosity, so that the laminar, transitional and turbulent flows could be investigated. Hydrogen production potential, glucose concentration, and the evolution of the profile of the volatile fatty acids in the digestate were measured. Experimental results were critically discussed, so as to define quantities able to account at the same time for the respective influence of viscosity and rotation speed on biogas production. The authors propose to compare power input ( $P$ ), the dimensionless Reynolds number ( $Re$ ), and in turbulent flow the Kolmogorov length scale ( $\lambda_K$ ). At the moment, only power input is empirically used for the design of anaerobic digesters based on economic sustainability. Thus, the aim is also to explore alternative scale-up parameters that could account for the prevailing flow regime ( $Re$ ), or for the interaction between microorganisms and turbulent eddies ( $\lambda_K$ ).

## **4.2 Methods**

### 4.2.1 Culture preparation

#### 4.2.1.1 Microbial consortium

Anaerobic sludge collected from the wastewater treatment plant in Clermont-Ferrand (France) was used as a seed. The sludge was subjected to pretreatment in the presence of sodium 2-bromoethanesulfonate, using a methodology adapted from Bullock and Kristiansen (1989). This allows the removal of *Archaea* responsible for hydrogen consumption and methane

production. After this pretreatment, the microbial consortium was inoculated in a nutrient medium 10% v/v (see **section 4.2.1.2**) for 16 h at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.1.2 Culture medium

To prepare the synthetic digestate, viscosity ( $\mu$ ) was adjusted from  $9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s to  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s (**Table 4.1**) by adding water soluble polyalkylene glycols (PAG) Emkarox™ HV45 to water. Then, glucose was added as the unique carbon source: the concentrations were 8 g/L and 30 g/L for the nutrient medium used in the precultures and batch cultures, respectively. The nutrient medium also contained (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.86;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.22;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.22;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.13;  $\text{NaCl}$ , 0.81;  $\text{ZnSO}_4$ , 0.37;  $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.27;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.13;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.12;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.1 \cdot 10^{-2}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.1 \cdot 10^{-2}$ ;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.8 \cdot 10^{-2}$ ; Hemin from bovine,  $10^{-3}$ ; Biotin,  $2.0 \cdot 10^{-4}$ ; PABA,  $10^{-4}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.0 \cdot 10^{-5}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-5}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-6}$ . Finally, the viscous nutrient media were steam autoclaved at  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  and 1 bar for a batch time of 20 min. All of them exhibited a Newtonian rheological behavior.

**Table 4.1.** Dynamic viscosity and surface tension as a function of the percentage of PAG in the medium.

<b>% PAG (v/v)</b>	<b>Viscosity (Pa.s)</b>	<b>Surface Tension (mN/m)</b>
0	$9.0 \cdot 10^{-4}$	67.0
5	$2.5 \cdot 10^{-3}$	49.9
10	$2.3 \cdot 10^{-2}$	47.9
20	$3.7 \cdot 10^{-2}$	44.9
30	$6.1 \cdot 10^{-2}$	43.8

#### 4.2.1.3 Inoculum preparation

The inoculums were prepared as follows: 10 mL of the consortium were transferred into a 90 mL preculture medium. The medium was inoculated with the consortium and incubated for 12 h at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . The incubation took place in a rotary shaker with the agitation speed set at 120 rpm.

#### 4.2.1.4 Start-up and batch experiments

All hydrogen production experiments were conducted in a batch anaerobic bioreactor. This consisted of a mechanically-stirred 2-L tank which contained 1.8 L of nutrient medium and 0.2 L of inoculum (added at the beginning of each run). After autoclaving, the nutrient medium was flushed with CO<sub>2</sub> and L-cysteine was added to remove trace oxygen. pH was adjusted using a 5 N-KOH solution and was controlled at the value of  $6.00 \pm 0.05$ , using a pH controller. Redox potential was monitored. After the addition of the inoculum, dark fermentation was carried out at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Concerning the analysis of abiotic processes, a full factorial design was defined using rotation speed and viscosity as the factors. A design of experiments methodology (Montgomery, 2012) was retained in order to minimize the number of runs because the cultivation time was between 16 and 32 hours for each run. Five levels of digestate viscosity  $\mu$  were studied between  $9.0 \cdot 10^{-4}$  and  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s (**Table 4.1**), each for three levels of rotation speed ( $N$ ): 0.67, 2.00 and  $3.33 \text{ s}^{-1}$ ; corresponding to 40, 120 and 200 rpm, respectively. The high and low levels of the two factors were based on preliminary experiments, showing that power input per unit volume  $P/V$  ranged between 0.5 and  $90 \text{ W/m}^3$  (see **section 4.2.1.5** for power draw measurements), which covers two decades nearly centered around the guideline of  $8 \text{ W/m}^3$ . In total, the 15 treatments of the design were studied in triplicate, which corresponds to 45 runs. This number of levels per factor is high enough to apply Analysis of Variance (ANOVA) which is the most common tool to assess the statistical influence of factors, and Response Surface Methodology (RSM) for dealing with a response variable influenced by several factors which presents an optimum value (Montgomery, 2012).

The experimental set-up is displayed schematically in **Figure 4.1**. The diameter of the baffled flat-bottomed tank (four baffles, width  $T/10$ ) was  $T = 130 \text{ mm}$ ; it was filled with the culture medium to a height  $H_L = 160 \text{ mm}$ . Two six-blade disk turbines (Rushton type impeller) of  $D = 55 \text{ mm}$  diameter were used as a dual-stage impeller. The off-bottom clearance was  $C_1 = 25 \text{ mm}$ , the inter-impeller clearance was  $C_2 = 85 \text{ mm}$ , and the distance between the top impeller and the free surface was  $C_3 = 50 \text{ mm}$ . The Rushton turbines were mounted on an aluminum shaft of 10 mm diameter driven by a variable-speed 6SM 27LL-4500 0.34 kW electric motor (*Kollmorgen Seidel*, Germany).

#### 4.2.1.5 Power draw measurements

Power input ( $P$ ) was derived from torque measurements on the shaft of the impeller using a ViscoClick VK 600 torquemeter based on a strain gauge (*IKA Werke GmbH*, Germany). Using torque ( $M$ ) and rotation speed ( $N$ ),  $P$  was deduced as follows (Trad *et al.*, 2016):

$$P = 2\pi NM \quad (4.3)$$

Measurements on PAG solutions in single phase flows were used to build the power draw curve that plots the dimensionless power number  $N_p$  as a function of the Reynolds number  $Re$  (Edwards *et al.*, 1992).  $Re$  and  $N_p$  are defined as (Edwards *et al.*, 1992, Nienow *et al.*, 1992):

$$Re = \frac{\rho ND^2}{\mu} \quad (4.4)$$

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5} \quad (4.5)$$

where  $\rho$  is the fluid density, and  $D$  the diameter of the impeller. The biogas production rate remained low in this work: the maximum biogas production rate recorded was  $R_m = 4$  L/h, which corresponds to 0.033 vvm. Thus, the maximum dimensionless gas flow number estimated as  $R_m/(ND^3)$  when the minimum rotation speed was accounted for was about  $1 \cdot 10^{-2}$ , so that the effect of the gas phase could be neglected and  $N_p$  in single phase flow has been confounded with the gassed power number from literature data (Middleton, 1992). As already stated, the levels of rotation speed and the five levels of viscosity used in this work covered two decades of power input, but more than two decades of  $Re$  values from the laminar ( $Re = 30$ ) to the established turbulent flow regime ( $Re = 1.1 \cdot 10^4$ ).

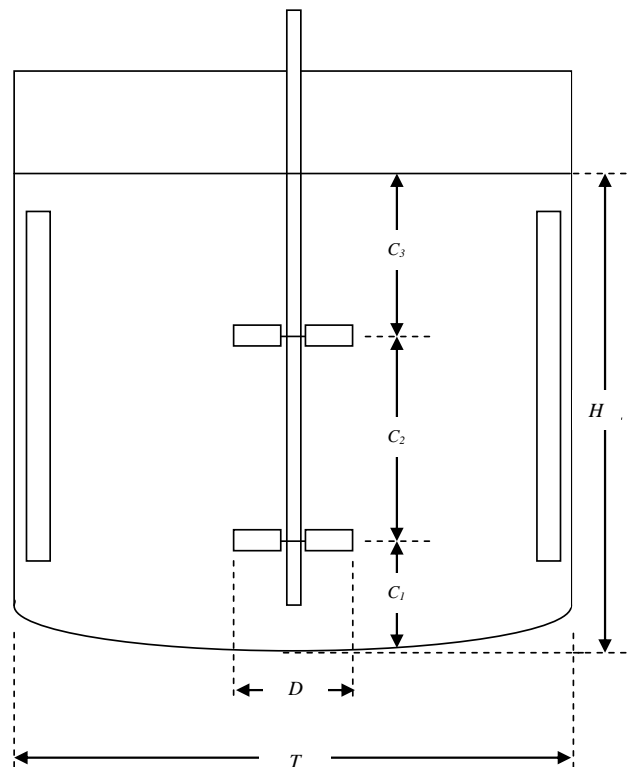


Figure 4.1. Geometry of the stirred tank.

#### 4.2.2 Analytical methods

##### 4.2.2.1 Chemical analysis in the liquid phase

In the liquid phase, samples of 2 mL were taken each hour for chemical analysis. The concentrations of glucose and of by-products (butyric acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid and ethanol) were measured using a high-performance liquid chromatography (HPLC) device (1260 Infinity Quaternary LC system, *Agilent Technology*, USA). This was equipped with two ionic exclusion columns in series (Rezex ROA 300×7.8 mm, *Phenomenex*, USA). The mobile phase was a solution of 5 mM sulfuric acid in ultrapure water continuously degassed. The eluent flow rate was fixed at 0.7 mL/min using a quaternary pump (HP 1100 Series, *Agilent Technologies*, USA). The HPLC device was equipped with an automatic injector with fixed loop (Rheodyne valve, *Agilent Technology*, USA) that delivers 10  $\mu$ L. By-product detection was done using a refractometer (HP 1100 series, *Agilent Technologies*, USA). The signal delivered by the sensor was processed by an integrator (HP 1100 series). The acquisition and integration of data were achieved through *ChemStation*<sup>®</sup> software (HP Chem, *Agilent Technologies*, USA). Prior to analysis, each sample was deproteinized to prevent clogging of the column. For this purpose, 250

$\mu\text{L}$  of barium hydroxide solution ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 0.3 M) and 250  $\mu\text{L}$  of zinc sulfate solution ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5% w/v) were added to the samples. These compounds caused protein precipitation. After centrifugation (*Beckman Coulter*, USA) for 5 minutes at 9600 g, the supernatant was filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filter (*Chromafil*, Germany) and placed in vials.

#### 4.2.2.2 Gas flow rate and chemical analysis of biogas

The volumetric gas flow rate of biogas produced was measured using a drum-type gas-meter (TG05, *Ritter*, Germany). The measurements were recorded and processed by the *Rigamo*<sup>®</sup> software version 3.1 (*Ritter*, Germany). The chemical composition of the biogas collected from outlet stream was analyzed every 15 min using a micro-gas chromatograph (Agilent 3000A, *Agilent Technologies*, USA), equipped with two analysis channels and a thermal conductivity detector. The first one was equipped with a molecular sieve (MS5A column) to determine the amount of  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  and  $\text{CH}_4$ ; argon was used as the carrier gas at a pressure of 2 bars. The operating temperatures of the injection port and the column were 80°C and 90°C, respectively. The second channel was equipped with a PoraPlot U column (*Agilent Technologies*, USA) to determine the amount of  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{S}$ ; hydrogen was used as the carrier gas at a pressure of 2 bars. The operating temperatures of the injection port and the column were 90°C and 60°C, respectively. The results were recorded and processed by the *Soprane*<sup>®</sup> software (*SRA Instruments*, France). By combining volumetric gas flow rate to chemical composition data, the molar hydrogen flow rate and hydrogen production rate could be deduced.

#### 4.2.2.3 Rheological and surface tension measurements

The rheological properties of the culture medium were measured using a stress-controlled rheometer AR-G2 (*TA Instruments*, USA) equipped with a double wall Couette geometry fitted with a cell temperature control device. The flow curves were monitored from 1 to 100  $\text{s}^{-1}$ . All experiments were conducted at 35°C, which corresponds to culture conditions. The *AR*<sup>®</sup> software was used for instrument control and for collecting the data. All media displayed a Newtonian behavior. Due to the high viscosity of the culture media, viscosity did not change significantly from the start to the end of the fermentation assays. The surface tension of the culture medium was measured using a tensiometer K12 (*Krüß Gmbh*, Germany) using Wilhelmy's plate method for 20 minutes at 35°C. Experimental data was collected using the *LabDesk*<sup>™</sup> 2.0 software.

#### 4.2.2.4 Characteristic size of bacterial aggregates

The characteristic size of bacterial aggregates ( $\mu\text{m}$ ) was measured by laser light scattering using a Mastersizer Micro+ granulometer (*Malvern Instr. Ltd.*, UK). Data analysis was carried out using the Fraunhofer theory, both with and without ultrasonic dispersion.

#### 4.2.3 Statistical analysis

As kinetic data was collected, hydrogen production (L), hydrogen productivity (L/h/L digestate), glucose concentration, and acetic acid and butyric acid contents could be measured over time. The hydrogen yield, expressed in mol H<sub>2</sub>/mol of glucose consumed, was deduced from the evolution of glucose concentration and hydrogen production. However, as samples from the liquid phase were collected each hour for statistical analysis, experimental error on kinetic data in general (glucose and volatile fatty acid contents, hydrogen yield, *etc.*) was higher than on the final values when glucose was totally consumed. Thus, kinetic data will be discussed, but ANOVA and RSM will be applied only to the final value of hydrogen production. This corresponds to the hydrogen production potential (L), which is the volume of hydrogen gas produced when glucose is totally consumed. However, for a better comparison with literature data, the final hydrogen yield (mol H<sub>2</sub>/mol of glucose consumed) will also be reported, as it accounts for the initial substrate content. RSM was applied to the hydrogen production potential using regression analysis based on a conventional quadratic model in which the response ( $y$ ) is expressed as:

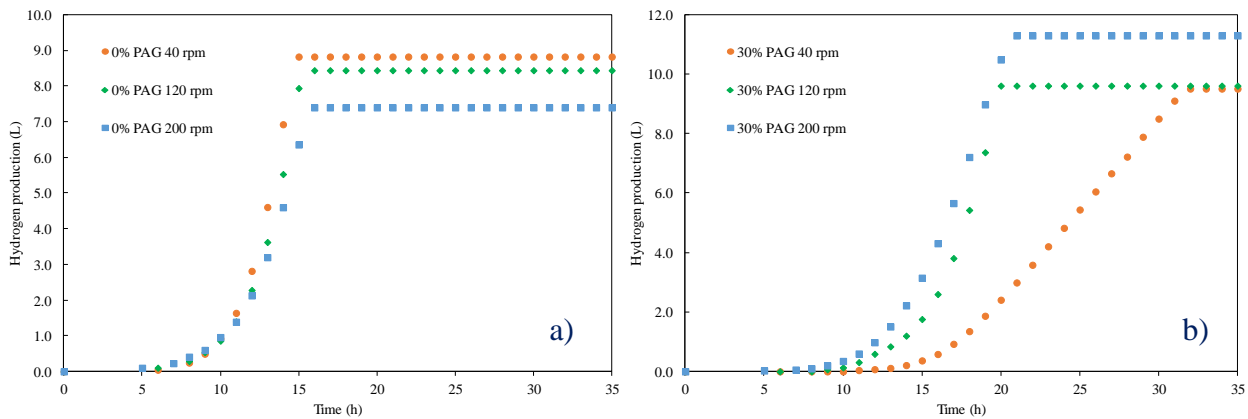
$$y = a_0 + b_1 \cdot N + b_2 \cdot \mu + c_{11} \cdot N^2 + c_{22} \cdot \mu^2 + c_{12} \cdot N \times \mu \quad (4.6)$$

The coefficients represent the main effect of the factors ( $b$ ), their quadratic effect ( $c_{11}$ ,  $c_{22}$ ), and their interaction ( $c_{12}$ ), respectively (Montgomery, 2012). The respective effect of each term of **Equation 4.6** was assessed using factorial ANOVA.

### 4.3 Results

In this section, the experimental design that assessed the effects of viscosity and rotation speed on hydrogen production over time, on hydrogen production potential and on the final values of acetic and butyric acids is analyzed. First, these final values of hydrogen production potential and hydrogen yield are summarized in **Table 4.2**, together with kinetic data (latency,

cultivation time, glucose consumption rate). Hydrogen yield varied from  $0.90 \pm 0.01$  to  $1.38 \pm 0.02$  mol H<sub>2</sub>/mol of glucose, while hydrogen production potential ranged from  $7.4 \pm 0.1$  to  $11.3 \pm 0.1$  L, which demonstrates that the variability due to the main factors is statistically significant in comparison to experimental error. This analysis is confirmed by **Figure 4.2** which displays the evolution over time of hydrogen production for two viscosity values and three rotation speeds. In this figure, the hydrogen production potential is impaired by high rotation speed in water ( $9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s) (**Figure 4.2a**), but enhanced by an increase in  $N$  in the viscous medium (**Figure 4.2b**). This highlights an interplay between  $N$  and  $\mu$  in the dark fermentation process and confirms that a change of viscosity may affect hydrogen production. Even though homogenization and mass transfer should be improved by intense mixing, the kinetics of hydrogen production was significantly enhanced only in the viscous medium, but a more rapid kinetics did not necessarily imply a higher final hydrogen production potential, as shown in **Figure 4.2b** when the curves for  $N = 40$  and  $N = 120$  rpm are compared. **Table 4.2** also shows that the latency increases only drastically at the lowest rotation speed and the highest viscosity (40 rpm,  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s), while a significant increase in cultivation time is observed as a function of viscosity for the three levels of rotation speed when  $\mu$  is  $3.7 \cdot 10^{-2}$  Pa.s or higher. In addition, the glucose consumption rate also decreases when viscosity increases at all  $N$  values, while the influence of rotation speed does not seem statistically significant on this parameter.



**Figure 4.2.** Comparison of the evolution of hydrogen production potential as a function of rotation speed: in water (0% PAG) (a); in a viscous medium (30% PAG) (b).



*Table 4.2. Hydrogen production potential and yield, and kinetic parameters (latency, cultivation time and glucose consumption rate) derived from the experimental design.*

Rotation speed $N$ (rpm)	Dynamic viscosity $\mu$ (Pa.s)	% PAG (v/v)	Hydrogen yield (mol H <sub>2</sub> /mol of glucose)	Hydrogen production potential (L)	Cultivation time (h)	Latency (h)	Glucose consumption rate (g/L/h)
40	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0	$1.10 \pm 0.01$	$8.8 \pm 0.1$	$16 \pm 1$	$8 \pm 1$	$1.9 \pm 0.1$
40	$2.5 \cdot 10^{-3}$	5	$1.22 \pm 0.02$	$10.3 \pm 0.1$	$17.7 \pm 0.6$	$8.7 \pm 0.6$	$1.7 \pm 0.1$
40	$2.3 \cdot 10^{-2}$	10	$1.22 \pm 0.02$	$9.98 \pm 0.09$	$18.3 \pm 0.6$	$8.3 \pm 0.6$	$1.6 \pm 0.1$
40	$3.7 \cdot 10^{-2}$	20	$1.20 \pm 0.01$	$9.8 \pm 0.1$	$22 \pm 1$	$8 \pm 1$	$1.4 \pm 0.1$
40	$6.1 \cdot 10^{-2}$	30	$1.17 \pm 0.01$	$9.5 \pm 0.1$	$32 \pm 2$	$15 \pm 2$	$0.9 \pm 0.1$
120	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0	$1.04 \pm 0.02$	$8.4 \pm 0.1$	$16.3 \pm 0.6$	$8.3 \pm 0.6$	$1.8 \pm 0.1$
120	$2.5 \cdot 10^{-3}$	5	$1.13 \pm 0.01$	$9.20 \pm 0.05$	$16.3 \pm 0.6$	$8.3 \pm 0.6$	$1.8 \pm 0.1$
120	$2.3 \cdot 10^{-2}$	10	$1.24 \pm 0.02$	$10.1 \pm 0.1$	$17.7 \pm 0.6$	$8.7 \pm 0.6$	$1.7 \pm 0.1$
120	$3.7 \cdot 10^{-2}$	20	$1.29 \pm 0.02$	$10.52 \pm 0.09$	$20 \pm 1$	$10 \pm 1$	$1.5 \pm 0.1$
120	$6.1 \cdot 10^{-2}$	30	$1.17 \pm 0.02$	$9.6 \pm 0.1$	$20 \pm 1$	$10 \pm 1$	$1.5 \pm 0.1$
200	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0	$0.90 \pm 0.01$	$7.4 \pm 0.1$	$16 \pm 1$	$7 \pm 1$	$1.9 \pm 0.1$
200	$2.5 \cdot 10^{-3}$	5	$1.11 \pm 0.01$	$9.08 \pm 0.06$	$17.3 \pm 0.6$	$7.3 \pm 0.6$	$1.7 \pm 0.1$
200	$2.3 \cdot 10^{-2}$	10	$1.23 \pm 0.01$	$10.03 \pm 0.09$	$17.7 \pm 0.6$	$7.7 \pm 0.6$	$1.7 \pm 0.1$
200	$3.7 \cdot 10^{-2}$	20	$1.28 \pm 0.02$	$10.4 \pm 0.1$	$20 \pm 1$	$9 \pm 1$	$1.5 \pm 0.1$
200	$6.1 \cdot 10^{-2}$	30	$1.38 \pm 0.01$	$11.3 \pm 0.1$	$20.3 \pm 0.6$	$9.3 \pm 0.6$	$1.5 \pm 0.1$

For hydrogen production potential, the minimum values were reached when  $N$  was the highest and  $\mu$  the smallest value of this work, *i.e.* 200 rpm and  $9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s in **Table 4.2**. Conversely, the hydrogen production potential was maximized when  $N$  was still 200 rpm, but  $\mu$  was the highest value of this work in **Table 4.2** ( $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s). This could lead to the erroneous conclusion that only viscosity had a significant effect. Actually, it emerges that several pairs ( $N$ ,  $\mu$ ) with different individual  $N$  and  $\mu$  values reached the same production potential, as shown by the superscript letters that highlight homogeneous subsets derived by a classification method in **Table 4.2**, which suggests an interaction between these two factors. The same conclusion could be drawn from the final concentration of butyric acid in the digestate. Experimental data are summarized in **Table 4.3**. While the metabolism of acetic acid production did not seem significantly modified by agitation and viscosity, with a final acetic acid concentration always between  $2.25 \pm 0.05$  and  $2.55 \pm 0.09$  g/L, the final butyric acid concentration significantly varied between  $7.94 \pm 0.02$  and  $9.0 \pm 0.1$  g/L. However, several pairs ( $N$ ,  $\mu$ ) exhibited the same final butyric acid concentration in **Table 4.3**, as shown by the superscript letters that show statistically

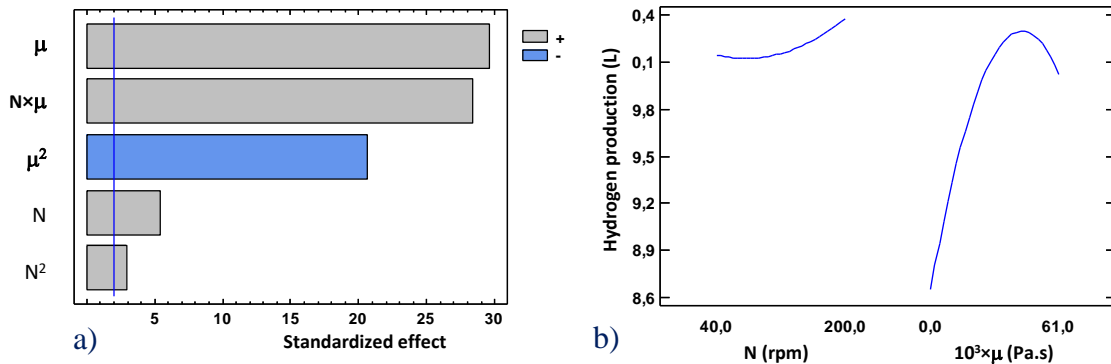
homogeneous subsets, which highlights a complex interplay between  $N$  and  $\mu$ . The two smallest values were reported in water ( $9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s), when rotation speed was 200 and 120 rpm, respectively.

**Table 4.3.** Final butyric and acetic acid concentrations in the digestate as a function of viscosity and rotation speed.

Rotation speed $N$ (rpm)	Dynamic viscosity $\mu$ (Pa.s)	[butyric acid] (g/L)	[acetic acid] (g/L)
40	$9.0 \cdot 10^{-4}$	$8.61 \pm 0.08$	$2.38 \pm 0.02$
40	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$8.91 \pm 0.01$	$2.36 \pm 0.02$
40	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$8.43 \pm 0.05$	$2.39 \pm 0.03$
40	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$8.50 \pm 0.02$	$2.33 \pm 0.01$
40	$6.1 \cdot 10^{-2}$	$8.42 \pm 0.02$	$2.55 \pm 0.02$
120	$9.0 \cdot 10^{-4}$	$8.23 \pm 0.03$	$2.25 \pm 0.05$
120	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$8.71 \pm 0.01$	$2.34 \pm 0.01$
120	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$8.96 \pm 0.10$	$2.53 \pm 0.06$
120	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$8.62 \pm 0.07$	$2.52 \pm 0.01$
120	$6.1 \cdot 10^{-2}$	$8.63 \pm 0.05$	$2.55 \pm 0.09$
200	$9.0 \cdot 10^{-4}$	$7.94 \pm 0.02$	$2.33 \pm 0.06$
200	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$8.43 \pm 0.05$	$2.47 \pm 0.03$
200	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$8.96 \pm 0.07$	$2.42 \pm 0.02$
200	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$9.0 \pm 0.1$	$2.52 \pm 0.05$
200	$6.1 \cdot 10^{-2}$	$8.95 \pm 0.08$	$2.54 \pm 0.03$

To better assess the conclusion that both  $N$  and  $\mu$  had a significant effect on the hydrogen production potential, ANOVA was applied. The standardized Pareto charts and the main effects of both factors for this response are displayed in **Figure 4.3**. The quadratic model of **Equation 4.6** was applied, the coefficients of the model were estimated ( $a_0 = 10.16 \pm 0.04$ ;  $b_1 = 0.23 \pm 0.04$ ;  $b_2 = (1.37 \pm 0.05) \cdot 10^3$ ;  $c_{11} = 0.22 \pm 0.07$ ;  $c_{12} = (1.60 \pm 0.06) \cdot 10^3$ ;  $c_{22} = -(1.63 \pm 0.08) \cdot 10^6$ ), and this model as well as all the standardized effects of the predictors were statistically significant, as shown in **Figure 4.3a**. These plots confirm that both  $N$  and  $\mu$  significantly affect hydrogen production, which demonstrates that viscosity and agitation may be used to optimize dark fermentation, as maximum values emerge in **Figure 4.3b**. In **Figure 4.3a**, the advantage of standardized effects is that they account for the difference of order of magnitude of  $N$  and  $\mu$ , so that this figure expresses that in **Equation 4.6**,  $\mu$  is the most influential parameter, followed by  $N \times \mu$  and  $\mu^2$ , and to a lesser extent by  $N$  and  $N^2$  which approach the significance limit

represented by the vertical line. Thus, the strong effect of the interaction term  $N \times \mu$  in comparison to the main factors in **Figure 4.3a** highlights that non-linear effects probably prevail and that **Equation 4.6** should be modified to better fit the effects and the interplay between viscosity and rotation speed on dark fermentation. ANOVA is, indeed, a purely statistical tool which does not account, for instance, for the flow regime and its influence on mixing and mass transfer. As a result, the objective is, now, to express the response using a physical approach by introducing other flow variables linked to the global hydrodynamic and turbulence features, such as the dimensionless impeller Reynolds number  $Re$  in a stirred tank.



**Figure 4.3.** Pareto charts showing the standardized effects and their sign (+ or -) from the largest to the smallest effect on hydrogen production potential (a): the vertical line discriminates the predictors with a significant effect from insignificant factors. The influence of the main effects is also plotted on hydrogen production potential (b).

## 4.4 Discussion

In this section, the experimental results are discussed as a function of power input ( $P$ ), dimensionless Reynolds number ( $Re$ ), and Kolmogorov length scale ( $\lambda_K$ ) in order to define alternative scale-up parameters that could account simultaneously for the effects of viscosity and rotation speed on hydrogen production potential.

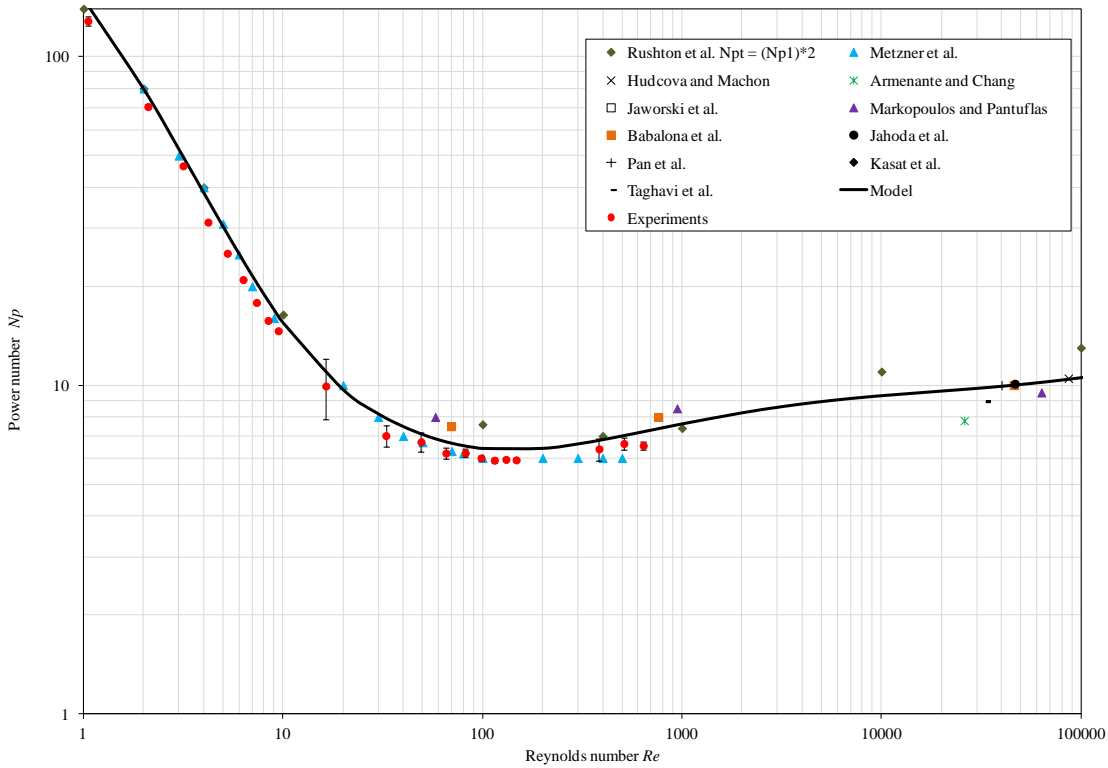
### 4.4.1 Effect of power input on hydrogen production potential

Power input per unit volume  $P/V$  ( $W/m^3$ ) is the most commonly used parameter for the scale-up of chemical and biochemical reactors, especially for aerobic fermentation when oxygen mass transfer is the rate-limiting step. Power input and  $N_p$  depend on impeller design and on the geometric parameters of the vessel and the internals in the absence of gas (Wang *et al.*, 2009).  $N_p$  usually tends to be a constant in turbulent flow conditions, *i.e.* when  $Re$  is higher than  $10^4$ .

Conversely,  $N_p$  decreases proportionally to  $1/Re$  in laminar flow conditions. Experimental torque data was used to estimate  $P$  and  $N_p$  with the assumptions described in **section 4.2.1.5**. Data from the literature on dual-stage Rushton turbine impellers was also used for comparison purpose as function of  $Re$  between 30 and  $1.1 \cdot 10^4$ , which corresponds to the range of  $Re$  values of this work. Dual Rushton impellers have been widely studied for various  $D/T$  and  $C_2/D$  ratios for baffled tanks (**Table 4.4**). The data was fitted numerically using a cubic spline approximation method using the GNU Octave software package, so as to define the master curve  $Re - N_p$  of the impeller used in this work that interpolates experimental data (**Figure 4.4**). This figure highlights, that when  $Re$  varies from 30 and  $1.1 \cdot 10^4$ ,  $N_p$  varies slightly, which is expected in the transitional and the turbulent flow regime (Armenante and Chang, 1998), and remains between 5–10.

**Table 4.4.** Summary of the power number data from the literature.

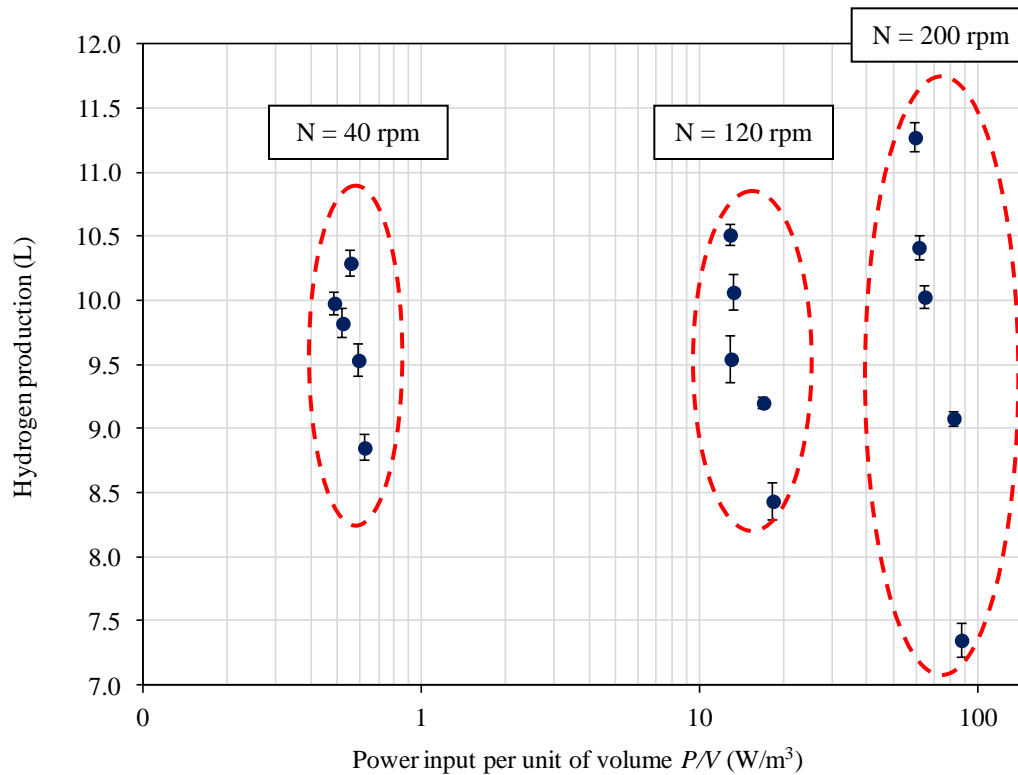
References	$D/T$	$C_2/D$
Rushton <i>et al.</i> , 1950	-	-
Metzner <i>et al.</i> , 1960	0.42	-
Hudcova and Machon, 1989	0.33	1.50
Armenante and Chang, 1998	0.34	1.50
Jaworski <i>et al.</i> , 2000	0.50	-
Markopoulos and Pantouflas, 2001	0.52	1.40
Babalona <i>et al.</i> , 2005	0.52	1.40
Jahoda <i>et al.</i> , 2007	0.34	2.90
Pan <i>et al.</i> , 2008	0.40	1.20
Kasat <i>et al.</i> , 2008	0.31	1.44
Taghavi <i>et al.</i> , 2011	0.33	1.80



**Figure 4.4.** Power number data from the literature and from torque measurements versus Reynolds number with a model derived from spline interpolation.

Experimental hydrogen production potential is plotted as a function of  $P/V$  in **Figure 4.5**. This plot shows that three groups emerge as a function of  $P/V$  in the figure (a group corresponds points of similar  $P/V$ ), corresponding in practice to the three levels of rotation speed (*i.e.* 40, 120 and 200 rpm). It appears that  $P/V$  values mainly depended on  $N$  in **Figure 4.5** and did not account for the significant effect of viscosity. In each group, hydrogen production potential varied significantly, and the ranges of values widened due to the influence of viscosity when  $P/V$  increased. For example, when  $P/V$  was close to  $5 \cdot 10^{-1}$ , 10 and  $7 \cdot 10^1$   $W/m^3$ , hydrogen production was between 8.8–10.3, 8.4–10.52 and 7.4–11.3, respectively. The same trends were observed with hydrogen yield that was between 1.10–1.22, 1.04–1.29 and 0.90–1.38 mol  $H_2$ /mol of glucose in the three groups, respectively (**Table 4.2**). This behavior can be explained quantitatively by the fact  $N_p$  varied only between 6 and 10 in this work when  $Re$  was between 30 and  $1.1 \cdot 10^4$  in **Figure 4.4**. So,  $N_p$  appears to be nearly constant in comparison to the evolution of viscosity that ranges from  $9 \cdot 10^{-4}$  and  $6 \cdot 10^{-2}$  Pa.s. Consequently, **Equation 4.5** confirms that  $P/V$  scales as  $N^3$ , *i.e.* it is roughly multiplied by 125 from the lowest to the highest rotation speed of

this work. As a conclusion, the evolution of the response variable cannot be deduced from power input only. Contrary to ANOVA in **Figure 4.3**, it emerges that  $P/V$  overestimates the effect of rotation speed and underestimates the effect of viscosity in the dark fermentation process. Thus,  $P/V$  which is the conventional parameter for scale-up in aerobic fermentation cannot describe properly the influence of rotation speed and viscosity in dark fermentation.



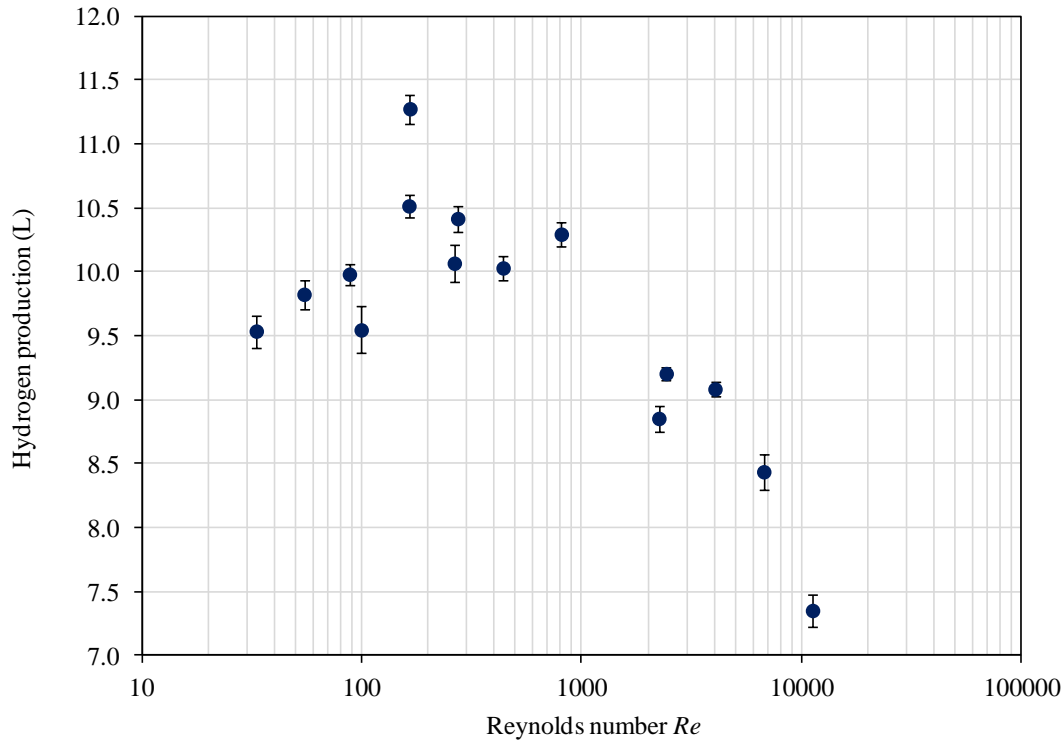
**Figure 4.5.** Experimental hydrogen production potential versus power input.

#### 4.4.2 Effect of Reynolds number on hydrogen production potential

The impeller Reynolds number is a dimensionless parameter which represents the ratio of the inertial to the viscous forces. The transition from laminar to transitional flow occurs when  $Re$  is less than 100, and the tank is highly turbulent when  $Re$  is greater than  $10^3$  or sometimes  $10^4$  (Hemrajani *et al.*, 2004). The transition between laminar and turbulent flows is not fully understood. From **Figure 4.4**, it emerges that laminar flow prevails when  $Re < 10$  and established turbulent flow conditions are observed when  $Re > 10^4$ . However, mixing experiments based on chemical decolorization (Trad *et al.*, 2017a) showed that laminar flow conditions prevailed when

$Re < 100$  and turbulent flow could be assumed when  $Re > 10^3$ . These values are used to define the prevailing flow regime in this work.

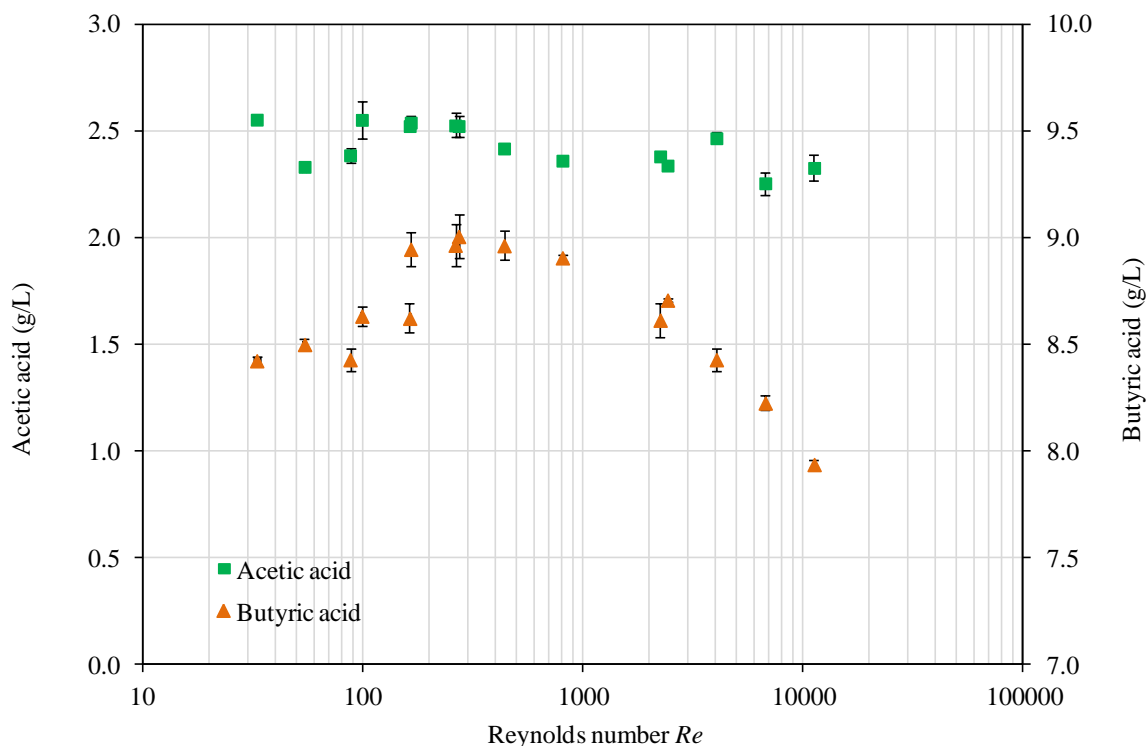
**Figure 4.6** illustrates the evolution of hydrogen production as function of  $Re$ . As it can be seen, hydrogen production potential lies between 9.5–10.0 L at low Reynolds number, *i.e.* when  $Re < 100$ ; hydrogen production potential increases with  $Re$  and peaks at 11.3 L when  $Re$  is about 165. Conversely, under turbulent flow conditions when  $Re > 10^3$ , hydrogen production decreases steeply to approach a minimum value of 7.4 L when  $Re$  reaches the highest value of this work (about  $1.1 \cdot 10^4$ ). From these results, it arises that the flow regime exhibits a significant effect on the response variable, but also that **Figure 4.6** reconciles the respective influence of  $N$  and  $\mu$  on hydrogen production as a function of a unique parameter,  $Re$ .



**Figure 4.6.** Experimental hydrogen production potential versus Reynolds number.

A remaining question is the link of the trends observed in **Figure 4.6** with the biological processes and the metabolic pathway of hydrogen production. From **Figure 4.7**, it emerges that the metabolism of the bacterial consortium is clearly affected by the flow regime. While the metabolism of acetic acid production did not seem significantly modified by agitation and

viscosity, as already stated from *Table 4.3* with a final acetic acid concentration always between  $2.25 \pm 0.05$  and  $2.55 \pm 0.09$  g/L, the final butyric acid concentration vs.  $Re$  in *Figure 4.7* followed the same trends as the hydrogen production potential vs.  $Re$  in *Figure 4.6*. These results highlight that the butyric acid pathway always prevailed, governing hydrogen production, and that the flow regime had a direct effect on hydrogen production by slowing down the metabolic activity of the butyric acid pathway when  $Re > 10^3$ .



*Figure 4.7.* Final values of butyric and acetic acid content in the digestate versus Reynolds number.

First, the slight increase of hydrogen and butyric acid production in *Figures 4.6* and *4.7* in the laminar region can be explained by an improved mass transfer, as higher  $Re$  implies an enhanced transfer of nutrients from the digestate to the cells and, reciprocally, of metabolites and hydrogen from the cells to the liquid phase. Simultaneously, hydrogen desorption is also improved. However, when the transition is reached, the formation of turbulent eddies improves even more the mass transfer properties of the flow, but turbulent eddies are also known to be able to potentially damage microbial cells, especially when the size of the eddies approaches the size of the microorganisms because of the hydromechanical stress induced on microbial aggregates, as



described by the eddy-particle collision theory (Lebranchu *et al.*, 2017). Thus, a comparison between the size of the turbulent eddies and microorganisms is carried out in the next section.

Nevertheless, a key finding of this work is that the combined influence of viscosity and rotation speed in a stirred tank bioreactor in which dark fermentation is operated must not be expressed as a function of power draw. Conversely, it can be optimized as a function of the purely hydrodynamic dimensionless Reynolds number, which had never been reported so clearly in the literature up to now.

#### 4.4.3 Effect of eddy size on hydrogen production potential

Turbulent flow in stirred tanks, except close to the impeller, can usually be described by Kolmogorov's theory of isotropic turbulence in which the turbulent kinetic energy is distributed between turbulent eddies of different sizes (Kolmogorov, 1941). The stirrer forms large eddies which are broken down in small eddies which produce even smaller eddies. Mechanical energy is transferred from the large to the small scales until viscous and inertial forces reach the same order of magnitude, so that a minimum eddy size at which the turbulent kinetic energy of the eddies is dissipated as thermal energy (Collignon *et al.*, 2016). The size of these smallest eddies is denoted the Kolmogorov length scale ( $\lambda_K$ ).  $\lambda_K$  does not directly depend on the turbulent energy, but is a function of the kinematic viscosity  $\nu = \mu/\rho$  of the fluid and the dissipation rate of the turbulent kinetic energy  $\varepsilon$  (W/kg) which is the rate at which turbulent kinetic energy is converted into thermal energy per unit mass. Thus,  $\lambda_K$  is defined as (Nienow *et al.*, 1992):

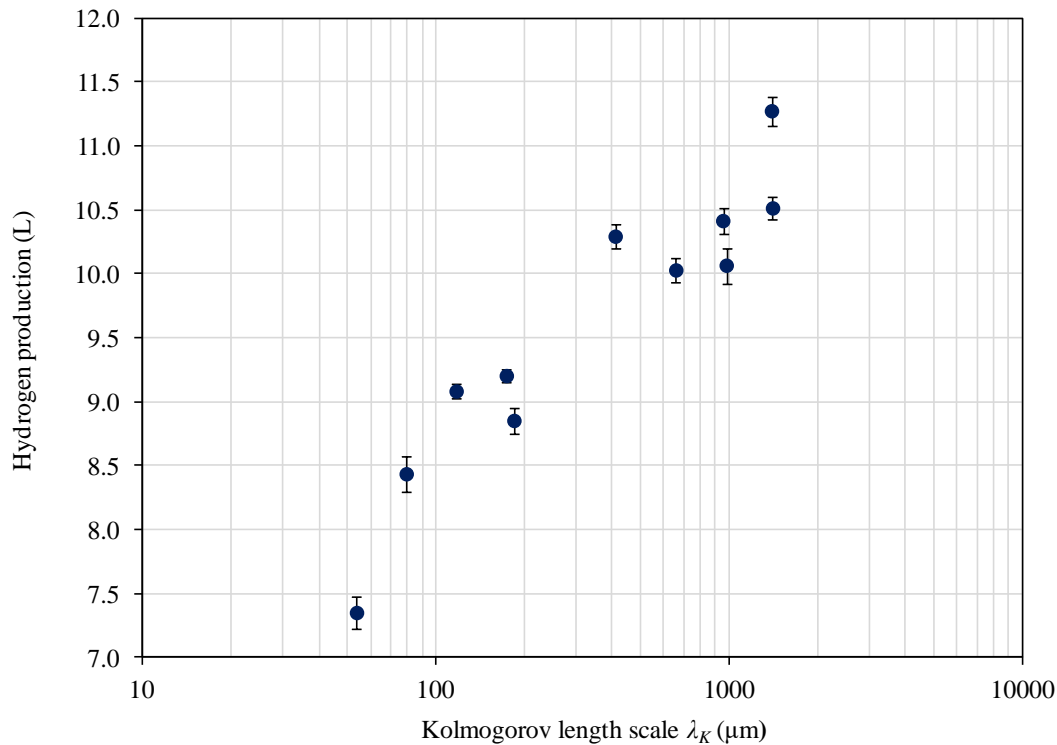
$$\lambda_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (4.7)$$

$\lambda_K$  is a local parameter, but a volume-average value can be deduced from power input using the power dissipation rate  $\varepsilon$  (Nienow *et al.*, 1992):

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho V} \quad (4.8)$$

in which  $P$  is deduced from **Figure 4.5**. **Equation 4.7** applies in established turbulent flow, but can be extended to the transitional flow region even if this constitutes a rough approximation. Hydrogen production potential is plotted in **Figure 4.8** as a function of  $\lambda_K$ . In the digestate, the analysis of the size distribution of microorganisms shows the presence of aggregates larger than

100  $\mu\text{m}$  that are sensitive to ultrasounds (*Figure 4.9*). In *Figure 4.8*, hydrogen production potential decreases, as expected with  $\lambda_K$ . However, hydrogen production switches from 9.2 L to 7.4 L when  $\lambda_K$  decreases from 185 to 54  $\mu\text{m}$ . As in *Figure 4.6*, *Figure 4.8* highlights that dark fermentation is drastically impaired when turbulent conditions are established, which corresponds to the point at which eddy size is close to the size of microorganism aggregates:  $\lambda_K < 200 \mu\text{m}$ . This could indicate that small turbulent eddies are potentially damaging to some of the microorganisms of the consortium, increasing their need for maintenance and thus impairing hydrogen production. It is clear that such an approach based only on the average Kolmogorov length scale is a rough approximation, as the eddy size may be far smaller than this value in the vicinity of the impellers. However, it indicates that further work should be driven to better assess the local interaction between microorganisms in dark fermentation and hydrodynamic conditions, which can be conducted either using an experimental methodology (Trad *et al.*, 2017a, Trad *et al.*, 2017b) or numerical simulations based on CFD (Computational Fluid Dynamics) (Collignon *et al.*, 2016, Trad *et al.*, 2017a, Trad *et al.*, 2017b).



*Figure 4.8.* Experimental hydrogen production potential versus Kolmogorov length scale.

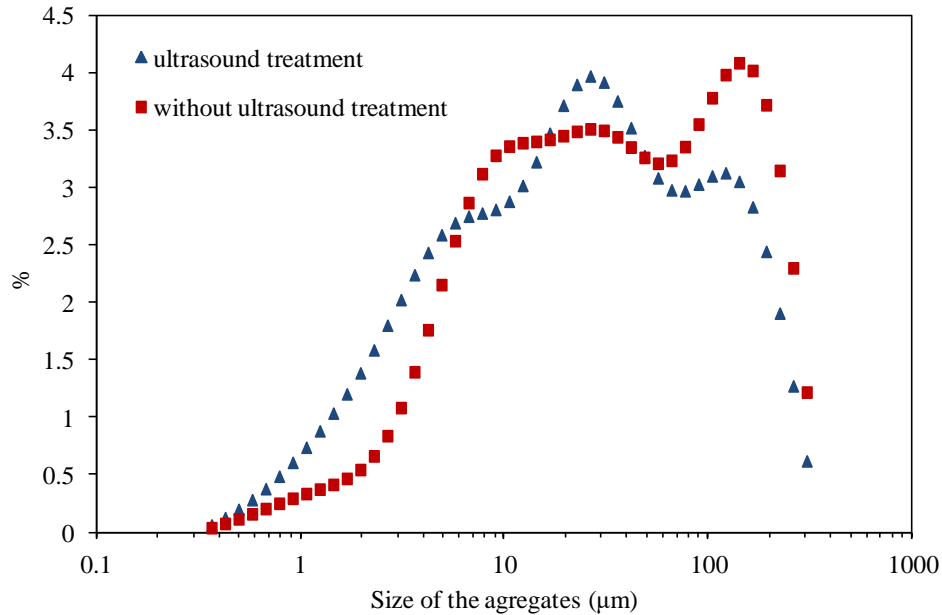


Figure 4.9. Size distribution of biomass aggregates in the digestate (typical example with  $N = 120$  rpm and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s).

## 4.5 Conclusions

Finally, the following conclusions could be drawn from the experimental results. First, both viscosity and rotation speed were shown to affect strongly dark fermentation. However, contrary to conventional scale-up methodology, power draw was not the key parameter that could optimize the hydrogen production process. Only the Reynolds number seemed able to reconcile the influence of viscosity and rotation speed, highlighting a simultaneous optimum of hydrogen production potential in the transition region. This optimum was also observed for the production of butyric acid in the digestate, which demonstrates that the flow regime also affects the metabolic activity of the bacterial consortium. While mixing improves dark fermentation under laminar flow, probably because of better homogenization and mass transfer conditions, turbulence clearly impairs this process. This may be explained by the potentially damaging effect of turbulent eddies on aggregated microorganisms. The estimation of the Kolmogorov length scale was used to support this statement, even though further work is needed to definitely conclude on the impact of the eddy-microorganism interaction. However, it must be pointed out that this study brings new knowledge on the combined effect of viscosity and agitation in dark fermentation and that the effect of  $Re$  as a key dimensionless number and of flow regime emerge

as a new rule for the design and operation of acidogenic fermentation. Thus,  $Re$  between 150–200 seems to approach the optimum range that will be fine-tuned in further works.

### **Acknowledgements**

LABEX IMobS<sup>3</sup> *Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions*, the French National Centre for Scientific Research (CNRS), Auvergne-Rhône-Alpes Regional Council and the European Funds of Regional Development (ERDF/FEDER) are gratefully acknowledged.

### **Nomenclature**

#### *List of symbols*

$C_1$	Off-bottom clearance (m)
$C_2$	Inter-impeller clearance (m)
$C_3$	Distance between top impeller and free surface (m)
$D$	Impeller diameter (m)
$H$	Liquid height in the bioreactor (m)
$M$	Torque (N.m)
$N$	Rotation speed (rpm)
$N_p$	Power number
$P$	Power input (W)
$R_m$	Maximum biogas production rate (m <sup>3</sup> /s)
$Re$	Reynolds number
$T$	Bioreactor diameter (m)
$V$	Bioreactor volume (m <sup>3</sup> )

#### *Greek letters*

$\varepsilon$	Dissipation rate of the turbulent kinetic energy (W/kg)
$\lambda_K$	Kolmogorov length scale ( $\mu\text{m}$ )

$\mu$	Dynamic viscosity (Pa.s)
$\nu$	Kinematic viscosity (m <sup>2</sup> /s)
$\rho$	Fluid density (kg/m <sup>3</sup> )

*Abbreviations*

<i>ANOVA</i>	Analysis of Variance
<i>CFD</i>	Computational Fluid Dynamics
<i>HPLC</i>	High-Performance Liquid Chromatography
<i>PAG</i>	Polyalkylene glycols
<i>RSM</i>	Response Surface Methodology

## 4.6 References

- J.M. Agator, J. Chéron, C. Ngô, G. Trap (2008). Hydrogène : Energie de demain ? Editor: Omniscience. France. (*In french*).
- P.M. Armenante, G.M. Chang (1998). Power consumption in agitated vessels provided with multiple-disk turbines. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 37, 284-291.
- E. Babalona, D. Bahouma, S. Tagia, E. Pantouflas, J. Markopoulos (2005). Power consumption in dual impeller gas-liquid contactors: Impeller spacing, gas flow rate, and viscosity effects. *Chemical Engineering and Technology*. 28, 802-807.
- J.D. Bullock, B. Kristiansen (1989). Basic Biotechnology. Editor: J.D. Bullock, B. Kristiansen. Academic Press, Saunders College Publishing/Harcourt Brace. London, UK.
- M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 6713-6733.
- M.C. Castro-Villalobos, J.L. Garcia-Morales, F.J. Fernandez (2012). By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 7077-7083.
- R.S. Cherry, E.T. Papoutsakis (1989). Growth and death rates of bovine embryonic kidney cells in turbulent microcarrier bioreactors. *Bioprocess Engineering*. 4, 81-89.
- A. Ciranna, R. Ferrari, V. Santala, M. Karp (2014). Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 6391-6401.
- M.L. Collignon, A. Delafosse, S. Calvo, C. Martin, A. Marc, D. Toye, E. Olmos (2016). Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 108, 30-43.
- M.S. Croughan, J.F. Hamel, D.I.C. Wang (1988). Effects of microcarriers concentration in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 32, 975-982.

- M.F. Edwards, M.R. Baker, J.C. Godfrey (1992). Mixing of liquids in stirred tanks. *In* Mixing in the process industries (2<sup>nd</sup> edition) (chapter 8). Editor: N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow. Butterworth-Heinemann. Oxford, UK.
- A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. 144, 73-95.
- X.M. Guo, E. Trably, E. Latrille, H. Carrere, J.P. Steyer (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 10660-10673.
- F.R. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D.L. Hawkes (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*. 32, 172-184.
- R.R. Hemrajani, G.B. Tattersson (2004). Mechanically stirred vessels. *In* Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice (1<sup>st</sup> edition) (chapter 6). Editor: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- V. Hudcova, V. Machon (1989). Gas-liquid dispersion with dual rushton turbine impellers. *Biotechnology and Bioengineering*. 34, 617-628.
- M. Jahoda, M. Mostek, A. Kukukova, V. Machon (2007). CFD modelling of liquid homogenization in stirred tanks with one and two impellers using large eddy simulation. *Chemical Engineering Research and Design*. 85, 616-625.
- Z. Jaworski, W. Bujalski, N. Otomo, A.W. Nienow (2000). CFD study of homogenization with dual rushton turbines: Comparison with experimental results. *Chemical Engineering Research and Design*. 78, 327-333.
- J. Jiang, J. Wu, S. Poncin, H.Z. Li (2016). Effect of hydrodynamic shear on biogas production and granule characteristics in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry*. 51, 345-351.
- V. Jossen, S.C. Kaiser, C. Schirmaier, J. Herrmann, A. Tappe, D. Eibl, A. Siehoff, C. van den Bos, R. Eibl (2014). Modification and quantification of a stirred single-use bioreactor for the improved expansion of human mesenchymal stem cell at benchtop scale. *Pharmaceutical Bioprocessing*. 2, 311-322.
- G.R. Kasat, A.B. Pandit, V.V. Ranade (2008). CFD simulation of gas-liquid flows in a reactor stirred by dual Rushton turbines. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 6, A60.
- A.N. Kolmogorov (1941). Dissipation of energy in the locally isotropic turbulence. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 32, 19-21.
- K. Kundu, I. Bergmann, M. Klocke, S. Sharma, T.R. Sreekrishnan (2014). Influence of hydrodynamic shear on performance and microbial community structure of a hybrid anaerobic reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89, 462-470.
- A. Lebranchu, S. Delaunay, P. Marchal, F. Blanchard, S. Pacaud, M. Fick, E. Olmos (2017). Impact of shear stress and impeller design on the production of biogas in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*. 245, 1139-1147.
- J.Y. Lee, X.J. Chen, E.J. Lee, K.S. Min (2012a). Effects of pH and carbon sources on biohydrogen production by co-culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22, 400-406.
- K.S. Lee, T.S. Tseng, Y.W. Liu, Y.D. Hsiao (2012b). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15556-15562.

- C. Lee, S. Lee, S.K. Han, S. Hwang (2014). Effect of operational pH on biohydrogen production from food waste using anaerobic batch reactors. *Water Science and Technology*. 69, 1886-1893.
- H.W. Leung, A. Chen, A.B.H. Choo, S. Reuveny, S.K.W. Oh (2011). Agitation can induce differentiation of human pluripotent stem cells in microcarrier cultures. *Tissue Engineering Part C*. 17, 165-172.
- J. Lindmark, E. Thorin, R. Bel Fdhila, E. Dahlquist (2014). Effect of mixing on the result of anaerobic digestion: review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40, 1030-1047.
- J. Markopoulos, E. Pantouflas (2001). Power consumption in gas-liquid contactors agitated by double-stage rushton turbines. *Chemical Engineering and Technology*. 24, 1147-1150.
- K.D. McMahon, P.G. Stroot, R.I. Mackie, L. Raskin (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions-II: Microbial population dynamics. *Water Research*. 35, 1817-1827.
- A.B. Metzner, R.H. Feehs, H. Lopez Ramos, R.E. Otto, J.D. Tuthill (1960). Agitation of viscous newtonian and non-newtonian fluids. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 7, 3-9.
- J.C. Middleton (1992). Gas-liquid dispersion and mixing. In *Mixing in the process industries* (2<sup>nd</sup> edition) (chapter 15). Editor: N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow. Butterworth-Heinemann. Oxford, UK.
- D.C. Montgomery (2012). *Design and Analysis of Experiments* (8<sup>th</sup> edition). John Wiley and Sons, Inc.
- A.W. Nienow, N. Harnby, M.F. Edwards (1992). Introduction to mixing problems. In *Mixing in the process industries* (2<sup>nd</sup> edition) (chapter 1). Editor: N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow. Butterworth-Heinemann. Oxford, UK.
- A. Noblecourt, G. Christophe, C. Larroche, P. Fontanille (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*. 247, 864-870.
- C. Pan, J. Min, X. Liu, Z. Gao (2008). Investigation of fluid flow in a dual rushton impeller stirred tank using particle image velocimetry. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 16, 693-699.
- C. Qiu, P. Yuan, L. Sun, S. Wang, S. Lo, D. Zhang (2017). Effect of fermentation temperature on hydrogen production from xylose and the succession of hydrogen-producing microflora. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 92, 1990-1997.
- Q.A. Rafiq, K.M. Brosman, K. Coopman, A.W. Nienow, C.J. Hewitt (2013). Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in 5L stirred tank bioreactor. *Biotechnology Letters*. 35, 1233-1245.
- B. Ruggeri, T. Tommasi (2012). Efficiency and efficacy of pre-treatment and bioreactors for bio-H<sub>2</sub> energy production from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 6491-6502.
- J.H. Rushton, E.W. Costich, H.J. Everett (1950). Power characteristics of mixing impellers. *Chemical Engineering Progress*. 46, 395-402.
- P. Sivagurunathan, B. Sen, C.Y. Lin (2014). Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 19232-19241.
- M. Taghavi, R. Zadghaffari, J. Moghaddas, Y. Moghaddas (2011). Experimental and CFD investigation of power consumption in a dual Rushton turbine stirred tank, *Chemical Engineering Research and Design*. 89, 280-290.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche. C. Vial (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable Energy*. 98, 264-282.

- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2017a). Experimental and numerical investigation of hydrodynamics and mixing in a dual-impeller mechanically-stirred digester. *Chemical Engineering Journal*. 329, 142-155.
- Z. Trad, C. Vial, J.P. Fontaine, C. Larroche (2017b). Mixing and liquid-to-gas mass transfer under digester operating conditions. *Chemical Engineering Journal*. 170, 606-627.
- K. Urbaniec, R.R. Bakker (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40, 3648-3658.
- T. Wang, G. Yu, Y. Yong, C. Yang, Z-S. Mao (2009). Hydrodynamic characteristics of dual-impeller configurations in a multiple-phase-stirred tank. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 49, 1001-1009.
- J.B. Zhang, J. Wu, S. Poncin, M. Hamelin, H.Z. Li (2012). Microscale investigation of anaerobic biogas production under various hydrodynamic conditions. *Environmental Science and Technology*. 46, 8698-8704.



## Bilan

---

Compte tenu des résultats de ce chapitre, plusieurs conclusions peuvent être tirées quant à l'influence de la viscosité du digestat et celle du mélange induit par agitation mécanique sur les performances du procédé de fermentation sombre :

- ✓ Les deux paramètres abiotiques ont une influence significative sur les cinétiques de consommation en glucose mais aussi sur la production de biohydrogène et des métabolites.
- ✓ Contrairement aux bioprocédés aérobies, la puissance dissipée par unité de volume ( $P/V$ ) ne peut pas être utilisée pour définir les conditions optimales de production du biohydrogène.
- ✓ Le nombre adimensionnel de Reynolds ( $Re$ ) réconcilie les effets conjugués de la viscosité et de l'agitation. Ainsi, les conditions optimales d'écoulement correspondent au régime de transition ( $Re$  150–200) alors qu'une diminution significative des performances se produit en régime turbulent ( $Re > 1000$ ). Ainsi, lorsque l'écoulement est turbulent dans le bioréacteur, les voies métaboliques en cours de fermentation semblent modifiées avec une baisse de la concentration finale en butyrate dans le digestat.
- ✓ L'estimation de l'échelle spatiale de Kolmogorov ( $\lambda_K$ ) montre que la production en biohydrogène diminue lorsque la taille moyenne des agrégats tourbillonnaires de l'écoulement turbulent est inférieure à la taille moyenne des agrégats bactériens ( $\lambda_K < 200 \mu\text{m}$ ), ce qui permet dès lors d'émettre l'hypothèse selon laquelle les interactions agrégats tourbillonnaires-agrégats bactériens impacteraient négativement les performances de la fermentation sombre.

Dans l'immédiat, les résultats de ce chapitre sont prometteurs car l'effet du régime d'écoulement du digestat au sein du bioréacteur n'avait jamais été mis en évidence jusqu'à ce jour et cela constitue un élément clé pour la compréhension des performances du procédé. Cependant, des travaux complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre pourquoi la production de biohydrogène peut être (dé)favorisée par de la nature de l'écoulement. Cela passera notamment par une étude approfondie de l'hydrodynamique locale et du régime turbulent, mais aussi par l'analyse du transfert de matière liquide-gaz et du mélange. Ce dernier point fait l'objet du chapitre suivant.

# **Chapitre 5 : Transfert de matière et temps de mélange en lien avec la production de biohydrogène**

---

## Préambule

---

Au vu des principaux résultats du *Chapitre 4*, il est apparu important d'étudier plus en détail les effets de la viscosité du digestat et du mélange sur la production de biohydrogène par la voie fermentaire sombre. Ainsi, l'influence des deux paramètres abiotiques sur le transfert de matière liquide-gaz et sur le temps de mélange sera analysée. Il appert en effet, au vu des résultats de la littérature, que le transfert d'hydrogène et le temps nécessaire à l'homogénéisation de la solution alcaline et/ou des intrants au cours de la fermentation sont des paramètres à prendre en compte pour comprendre et optimiser le procédé car ils peuvent constituer des étapes limitantes. A ce titre, dans des conditions de viscosité et d'agitation similaires au *Chapitre 4*, l'étude expérimentale du transfert de matière et du temps de mélange impliquera la mise en œuvre :

- ✓ De différentes méthodes de mesure du temps de mélange (conductimétrie, décoloration chimique et PLIF) ;
- ✓ D'une méthode de désoxygénation/oxygénation pour déterminer le transfert d'hydrogène.

Plus spécifiquement, les objectifs de ce chapitre seront d'examiner les cinétiques de mélange et de transfert en hydrogène liquide-gaz en lien avec la production de biohydrogène, mais aussi d'analyser les effets de la configuration du système d'agitation (espace entre les mobiles d'agitation) et de la position du système d'injection sur le temps de mélange. Comme précédemment, les résultats seront décrits en fonction :

- ✓ De la puissance dissipée ( $P/V$ ) ;
- ✓ Et du nombre adimensionnel de Reynolds ( $Re$ ) ;
- ✓ Mais aussi du nombre de Damköhler ( $Da$ ).

Ce *Chapitre 5* a été publié dans le *Chemical Engineering Journal*. De plus, les principaux résultats ont été présentés sous la forme d'une communication orale au cours du congrès mondial CHEMREACTOR-23 (23<sup>th</sup> International Conference on Chemical Reactors) qui s'est déroulé à Gand (Belgique) du 5 au 9 novembre 2018.

## Analysis of liquid-to-gas mass transfer, mixing and hydrogen production in dark fermentation process

B. Chezeau<sup>1,2</sup>, J.P. Fontaine<sup>1,2</sup>, Ch. Vial<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, LabEx IMobS<sup>3</sup>, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

### Abstract

The aim of this work was to investigate mixing and liquid-to-gas mass transfer of hydrogen in relation to hydrogen production in the dark fermentation process as a function of agitation conditions and digestate viscosity. Experiments were carried out in a baffled mechanically-stirred reactor equipped with a dual-stage impeller using five levels of viscosity. Biohydrogen production was studied using glucose as substrate under controlled pH. Three experimental techniques, namely local conductimetric, chemical decolorization and Planar Laser Induced Fluorescence, were used to measure mixing time  $t_m$  and describe the flow pattern. The effects of inter-impeller clearance and tracer injection position were also studied. Then,  $(k_L a)_{H_2}$  was deduced from dynamic deaeration/aeration experiments. Experimental results showed that biohydrogen production presented a maximum in the transitional flow regime ( $Re$  about 200), and fell under turbulent flow ( $Re > 1000$ ). Similarly, the evolution of  $(k_L a)_{H_2}$  was better described by  $Re$  than by the volumetric power input, contrary to literature data. Finally, the Damköhler number showed that hydrogen production was limited by liquid-to-gas mass transfer in the laminar regime and that maximum reaction rate could be reached only due to dissolved  $H_2$  supersaturation in the liquid phase. Conversely, the steep decrease of  $H_2$  production under turbulence conditions could be attributed neither to mass transfer, nor to mixing conditions, highlighting a probable negative interaction between turbulent eddies and biomass aggregates. Regarding  $k_L a \cdot t_m$ , the transitional flow region also approached ideal mixing, which strengthened the conclusion that  $H_2$  production was optimized in the transition region in the dark fermentation process.

**Keywords:** Dark fermentation; Hydrodynamics; Mixing time; Liquid-to-gas mass transfer; Biohydrogen.

## **5.1 Introduction**

In the current world, primary energy supply and electricity generation are predominantly based on fossil fuels (oil, natural gas and coal), leading to carbon dioxide emissions responsible of environmental damage and climate change on a larger-scale (Baykara, 2018). The present situation is unsustainable and requires the development of renewable energy sources which does not involve critical pollutant emissions for environmental, economic, social, and health sustainability. In this context, hydrogen is considered, since the last decade, as an attractive solution because it can be used as an energy carrier without CO<sub>2</sub> emission. Various methods are available for hydrogen production from biomass, which corresponds to second-generation biofuels, such as pyrolysis/gasification, thermal, photochemical, photoelectrochemical, photofermentation and dark fermentation (acidogenic fermentation) processes. The latter is an anaerobic process where biohydrogen, carbon dioxide and soluble metabolites are produced during the breakdown of organic compounds by the microorganisms. The soluble metabolites resulting from this process include volatile fatty acids (VFAs), *i.e.* acetic acid, butyric acid, propionic acid and other products such as lactic acid and solvents (Ghimire *et al.*, 2015). This process presents the advantages to be environment friendly and sustainable because it uses renewable sources, as it can consume various organic wastes as substrates, including agricultural and food residues (Noblecourt *et al.*, 2018). Despite genuine progress concerning the process development, industrial applications remain scarce, in particular because of the poor knowledge concerning the effects of the abiotic parameters on the process. Indeed, while recent research mainly addressed the effects of biotic and conventional abiotic parameters, such as pH (de Gioannis *et al.*, 2014, Silva-Illanes *et al.*, 2017), temperature (Elbeshbishy *et al.*, 2017), substrate selection (Ghimire *et al.*, 2015), by-products concentration (Castro-Villalobos *et al.*, 2012), and biohydrogen partial pressure (Mandal *et al.*, 2006, Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2012), research should focus on the optimization of both families of factors now.

In this context, mixing is usually considered as a key parameter for the scale-up of chemical and biochemical reactors; the culture medium must be homogenized to achieve a uniform distribution of nutrients and prevent pH gradients in the liquid phase for enhancing bacterial growth and activity. Contrary to conventional anaerobic digestion, dark fermentation necessitates pH control because of VFAs accumulation during the reaction that leads to pH

decrease and, finally, to the inhibition of the biohydrogen production (Bundhoo and Mohee, 2016). Mixing must also ensure biogas desorption by enhancing liquid-to-gas mass transfer, so as to prevent process inhibition since a decrease in pH due to dissolved CO<sub>2</sub> can switch metabolic pathway of acidogenic fermentation (Rodriguez *et al.*, 2006), or because dissolved biohydrogen can reach supersaturation levels that may inhibit the activity of hydrogen producing bacteria (Zhang *et al.*, 2013). Moreover, even if high agitation speed levels lead to rapid homogenization and to more efficient heat and liquid-to-gas mass transfer, the appropriate rotation speed must be applied to prevent too high hydromechanical shear stress applied to the bacterial community under turbulent conditions which could inhibit biohydrogen production by metabolic switches, or even promote microbial lethality (Chezeau and Vial, 2019). Finally, an optimization of these parameters is needed to establish an environment leading to enhanced biohydrogen production potential and yield. However, operating costs need also to be taken into account for the sustainability of the process, as economic sustainability needs very low power input, usually lower than 5–10 W/m<sup>3</sup> (Lindmark *et al.*, 2014). This strongly differs from the most common conditions of mixing investigated in the literature for stirred tanks. Besides, the variability in organic loading composition may lead to a wide range of digestate viscosity that may impair pH control and reaction yield, as pointed out by Ruggeri and Tommasi (2012). The robustness of mixing process in the dark fermentation process thus deserves further investigation.

To evaluate mixing efficiency under dark fermentation operating conditions, the mixing time and the volumetric mass transfer coefficient of hydrogen  $(k_L a)_{H_2}$  can be used for scale-up purpose. The direct measurement of  $(k_L a)_{H_2}$  was never reported for the characterization of liquid-to-gas mass transfer of the acidogenic fermentation process due to the lack of sensors for measuring dissolved hydrogen concentrations in culture media. For assessing the influence of agitation on mass transfer in the conditions of dark fermentation, Trad *et al.* (2017b) studied the respective effects of 9 impellers design and 3 liquid media viscosity at 25°C (pure water, mineral solution and digestate) on the  $(k_L a)_{H_2}$  using the conventional oxygen mass transfer measurements based on the dynamic gassing-in/gassing-out method; the  $(k_L a)_{H_2}$  was deduced from the experimental value of  $(k_L a)_{O_2}$  with the Higbie penetration model. Macromixing time  $t_m$  is another key parameter currently used to evaluate the mixing performance of impellers and the effect of hydrodynamics in stirred tanks. It is defined as the time required for achieving a

certain degree of homogeneity, using a passive tracer injected in the tank (Vega-Alvarado *et al.*, 2011). Many techniques for measuring  $t_m$  have been developed with various degrees of success in the past (Cabaret *et al.*, 2007). Recently, Ascanio (2015) reviewed all the different experimental techniques used for 50 years to measure  $t_m$  and it appears that the different methods can be divided in two groups: intrusive and non-intrusive techniques. The intrusive methods are based either on local measurements which estimate  $t_m$  at a given location, while non-intrusive methods usually imply global measurements which deduce  $t_m$  values from the analysis of a large area/volume with the capability to quantify and identify dead zones. The non-intrusive techniques have the advantage to avoid disturbing the flow field, contrary to the intrusive techniques where the flow field is modified by the presence of the probes. Despite the number of techniques to estimate the mixing time, there is no general accepted method because each of them exhibits limitations, as pointed out in **Table 5.1**.

**Table 5.1.** Advantages and limitations of the conductimetric, chemical decolorization and PLIF methods (adapted from Ascanio(2015).

Techniques	Advantages	Limitations
<b>PLIF</b>	Non-intrusive	Expensive (camera and laser)
	Direct measurement	Only for transparent systems
	Visualisation of 2-D isolated mixing regions	Calibration prior to the experiments
	Reveal flow structure	Limited applicability under aerated conditions
	Possible with low aerated conditions	
<b>Chemical Decolorization</b>	Non-intrusive	Only for transparent systems
	Direct measurement	Limited applicability under highly aerated conditions in turbulent regime
	Visualisation of 2-D isolated mixing regions	
	Reveal flow structure	Temporal resolution with image processing techniques
	No calibration	
<b>Conductimetric</b>	Possible under aerated or unaerated conditions	
	Direct measurement	Intrusive and invasive
	For transparent and opaque systems	Calibration prior to the experiments
	Possible under aerated or unaerated conditions	Mixing time depends on the position of the probe Sensitive to temperature changes and no flow structure

Therefore, the objective of the present work is to understand the influence of the mass transfer and mixing properties of culture media on biohydrogen production in the dark fermentation process using cold flow experiments mimicking the conditions of cultures already carried out using glucose as the substrate (Chezeau and Vial, 2019). Experiments were conducted in a mechanically stirred reactor equipped with a dual-impeller device operated under different flow regimes, so that laminar, transitional and turbulent flow conditions could be investigated. For this purpose, five levels of viscosity ( $9.0 \cdot 10^{-4}$  to  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s) and three levels of rotation speed (40, 120, 200 rpm) were studied. Liquid-phase mixing times were deduced from local conductimetric, chemical decolorization and Planar Laser Induced Fluorescence (PLIF) techniques;  $t_m$  values obtained with these different methods were critically discussed and compared. Experiments also investigated two inter-impeller clearances and several injection position in relation to the injection of the alkaline solution for pH control during the biological process to assess their effects on mixing time. The volumetric mass transfer of hydrogen gas was also estimated using the dynamic gassing-in/gassing-out method. Finally, the aim is to define the optimum conditions to maximize hydrogen yield and production potential which prevent liquid-to-gas mass transfer limitation and ensure good mixing for the scale-up of the dark fermentation process.

## **5.2 Materials and methods**

### **5.2.1 Stirred reactor geometry and design**

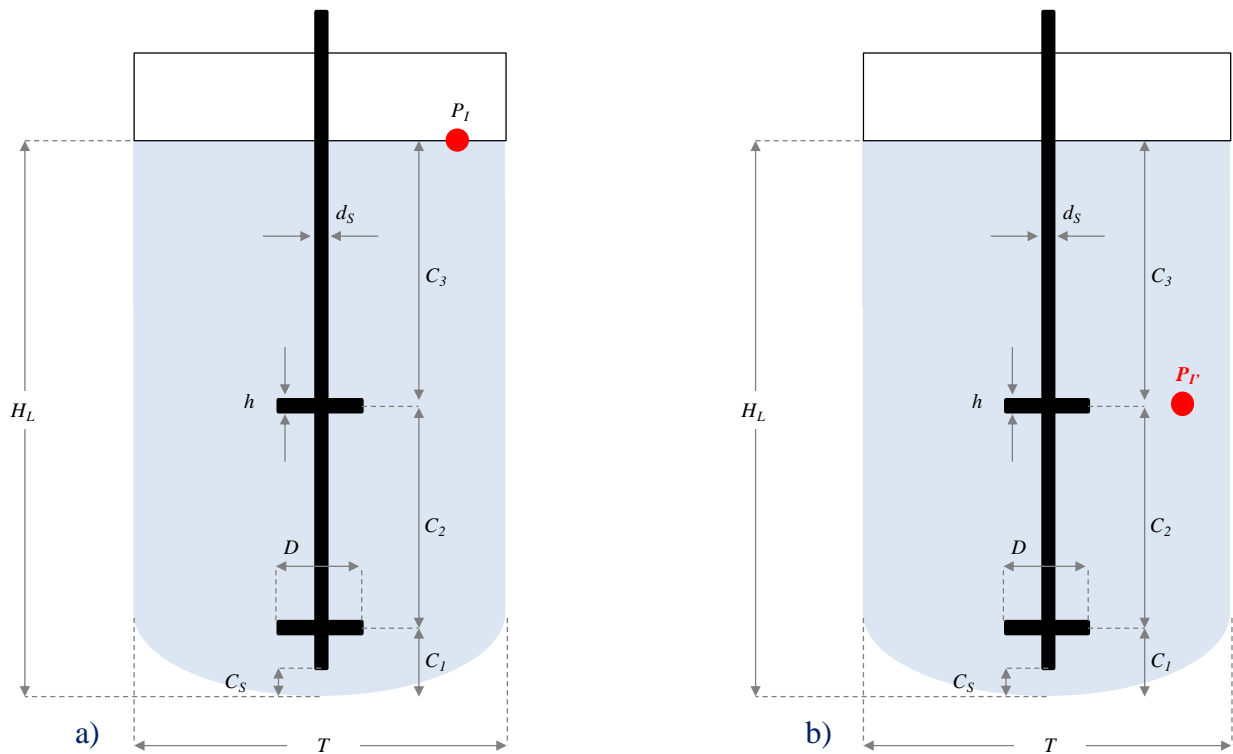
The reference configuration set-up is displayed schematically in *Figure 5.1a*. The experiments were conducted in a fully-baffled 2-L bioreactor which consisted of a transparent borosilicate glass cylindrical vessel with an open top and a hemispherical-bottom. The diameter of the baffled flat-bottomed reactor (four baffles, width  $T/10$ ) was  $T = 130$  mm and the clear liquid height was  $H_L = 160$  mm. This mechanically stirred vessel was equipped with a dual-stage impeller device consisted of two six-blade Rushton turbines of 55 mm diameter ( $D$ ) and 10 mm height ( $h$ ), mounted on an aluminium shaft of 10 mm diameter ( $d_S$ ). The off-bottom clearance was  $C_1 = 25$  mm, the inter-impeller clearance  $C_2 = 85$  mm, and the distance between the top impeller and the free surface  $C_3 = 50$  mm. The shaft was immersed under 10 mm ( $C_S$ ) of the off-bottom of the vessel and driven clockwise by a variable speed electric motor (Eurostar 60

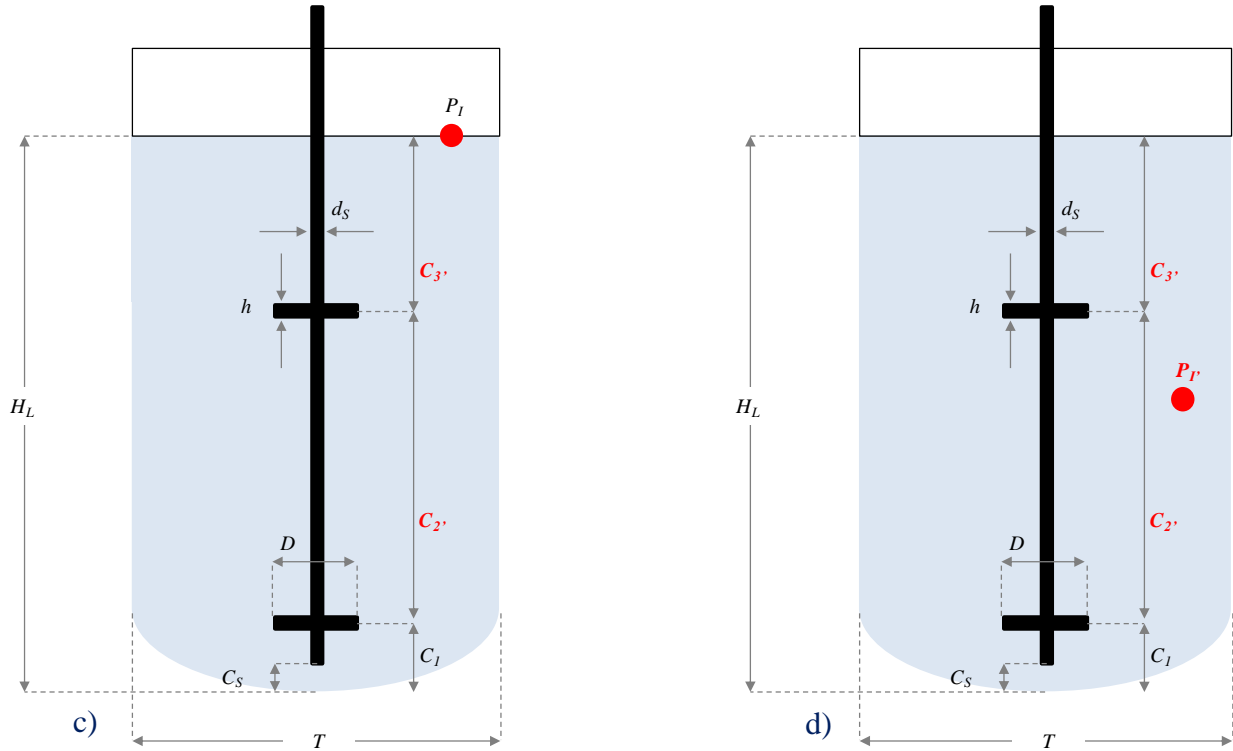


Control, IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH, Germany). The injection point position of passive tracers in the reference configuration was at the surface of the liquid: so  $P_I = H_L = 160$  mm, corresponding to the injection of the alkaline solution for pH control in the dark fermentation process.

Alternative configurations including another inter-impeller clearance  $C_{2i} = 115$  mm and another injection point position  $P_{Ii} = 110$  mm were studied to define the respective effects of these parameters on the value of the mixing time. For this purpose, three configurations were studied:

- ✓ Alternative configuration 1:  $C_2 = 85$  mm,  $P_{Ii} = 110$  mm (**Figure 5.1b**);
- ✓ Alternative configuration 2:  $C_{2i} = 115$  mm,  $P_I = 160$  mm (**Figure 5.1c**);
- ✓ Alternative configuration 3:  $C_{2i} = 115$  mm,  $P_{Ii} = 110$  mm (**Figure 5.1d**).





**Figure 5.1.** Sketch of the impeller design of the reference configuration (a) and the alternative configurations 1 (b), 2 (c) and 3 (d).

### 5.2.2 Operating conditions

The viscosity of the liquid phase at 35°C was adjusted from  $9.0 \cdot 10^{-4}$  to  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s by adding viscous solutions of water soluble polyalkylene glycol Emkarox™ HV 45 to distilled water (**Table 5.2**). The rheological properties of these Newtonian solutions were measured using a stress-controlled rheometer AR-G2 (*TA Instruments*, USA) equipped with a double-walled Couette geometry fitted with a cell temperature control device set to 35°C, and the *Advantage*® software was used for instrument control and data collection. Each solution was driven at three values of rotation speed: 0.67, 2.00 and  $3.33 \text{ s}^{-1}$ ; corresponding to 40, 120 and 200 rpm, respectively. In total, 15 viscosity/speed conditions were studied in triplicate for each configuration by each method in order to minimize experimental error and ensure reproducibility. As the viscosity of the solutions varied significantly with the temperature, the experiments were conducted at a constant controlled temperature of 35°C. Before each experiments, the solutions were maintained 30 min at the corresponding rotation speed and temperature to prevent the presence of air bubbles and ensure established flow and temperature conditions.

In a recent work, Chezeau and Vial (2019) demonstrated that the combined influence of viscosity and rotation speed in a stirred tank bioreactor in which dark fermentation is operated can be optimized as a function of a the purely hydrodynamic dimensionless Reynolds number  $Re$ .  $Re$  for a conventional stirred tank is defined as:

$$Re = \frac{\rho ND^2}{\mu} \quad (5.1)$$

where  $\rho$  is the density of the fluid,  $N$  the impeller rotation speed,  $D$  the diameter of the impellers used and  $\mu$  the fluid dynamic viscosity.  $Re$  is a dimensionless parameter which represents the ratio of the inertial to the viscous forces. The transition from laminar to transitional flow occurs when  $Re$  is less than 100, and the tank is highly turbulent by  $Re$  superior to 1000 (Hemrajani and Tatterson, 2004). The transition between laminar and turbulent flows is known as laminar-turbulent transition and even today, transitional flows are not fully understood. In this work,  $Re$  varied from 30 to  $1.1 \cdot 10^4$  and this range was used to study mixing time and liquid-to-gas mass transfer, as it corresponds to a volumetric power input between 1 and  $100 \text{ W/m}^3$ , which includes the typical values  $5\text{--}10 \text{ W/m}^3$ .

*Table 5.2. Dynamic viscosity of the solution as a function of the percentage of polyalkylene glycol.*

<b>% PAG (v/v)</b>	<b>Viscosity (Pa.s)</b>
0	$9.0 \cdot 10^{-4}$
5	$2.5 \cdot 10^{-3}$
10	$2.3 \cdot 10^{-2}$
20	$3.7 \cdot 10^{-2}$
30	$6.1 \cdot 10^{-2}$

### 5.2.3 Measurements of the mixing time

Mixing time measurements were measured in non-reactive and unaerated flow using conductimetric, chemical decolorization and PLIF methods; experiments were conducted using a similar procedure for comparison purpose: this includes the same volume (2 mL) for the injection of the passive tracer, and an injection performed on a very short time to mimic an instantaneous

tracer input function (Dirac-type  $\delta$ ). For each method, the value of mixing time was estimated for a 95% homogeneity.

#### 5.2.3.1 Conductimetric method

The conductimetric method or “*local conductivity tracer technique*” based on pulse injection was applied to estimate the mixing time  $t_m$ . A conductivity probe CDC 241-9 (cell constant  $1.012 \text{ cm}^{-1}$ ) supplied with a digital conductivity-meter CDM210 (*Radiometer Analytical*, France) was utilized for tracer detection at 1 Hz frequency using a data recorder (USB DAQ-1901, *Adlink Technology*, USA). Sodium chloride was selected as the tracer because of its non-reactive nature and its negligible effect on the physical properties of the fluid (density, viscosity), with the exception of the conductivity of distilled water. The injection of the NaCl solution (1.0 M) was carried out manually with a syringe of 6.0 mL at the same positions reported in the previous sections. The detection of the signal was operated by the conductivity probe localized at the position  $C_2 = 85 \text{ mm}$ ; this probe allowed the continuous measurement of the conductivity and, after calibration, the estimation to the local salt concentration  $C(t)$  in the solution. The proportionality between salt concentration and conductivity could be assumed in diluted solution, so that  $t_m$  could be deduced.

#### 5.2.3.2 Chemical decolorization method

The chemical decolorization method or “*acid-base decolorization technique*” was applied to estimate the mixing time and evolution in the tank reactor. This method based on image analysis consists in recording the color change of the solution depending on pH. A digital camera (Canon EOS 70D, *Canon*, Japan) equipped with a camera lens EF 24-105 mm f/3.5-5.6 IS STM (*Canon*, Japan) was utilized to record video sequences at 30 fps ( $1920 \times 1080 \text{ pixels}^2$ ). The stirred tank was immersed in a square vessel ( $40 \times 40 \text{ cm}^2$ ) filled with distilled water to reduce optical distortion, and was illuminated by a LED panel (LEDW-BL-300/220-LLUB-Q-1R24, *Phlox corp*, France) placed on the opposite site using an ombroscopy technique. This enables to have white light with a high uniformity of the light intensity ( $\pm 5\%$ ), a color temperature of 5000 K, and to operate in the backlight mode and quasi-isothermally to avoid heating tank. Bromocresol purple was used as the pH indicator and was added in the tank at a concentration of  $4 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$ . The tracer is yellow when the pH solution is below 5.2 (acid color) and purple when the pH

solution is above 6.8 (alkaline color). Mixing time was measured for an alkaline to acid reaction *i.e.* a color evolution from purple to yellow; this allows an easier detection of the unmixed zones. Before  $t_m$  measurements, the solutions were set to the purple color by adding 1 mL of an aqueous solution of NaOH (5.0 M) and the measurements started when adding 2 mL of an aqueous solution of HCl (2.5 M) as the tracer with a syringe of 6.0 mL at the positions already reported in the previous sections.

The resulting images were analyzed with a *Matlab*<sup>®</sup> (*The MathWorks*, USA) code. This consisted in creating a masking wall and internals with *PhotoFiltre* freeware, and the mixing time was deduced by following the evolution of the HSV (Hue Saturation Value) value of each pixel in the pictures in the working zone.

#### 5.2.3.3 Planar Laser Induced Fluorescence method (PLIF)

The mixing time and evolution in the tank reactor was also studied using the PLIF method. This technique based on image analysis allows determining the instantaneous concentration field of a tracer in the plane lighted by a laser. The experimental setup included a monochrome camera (UI-3370CP-M-GL, *IDS GmbH*, Germany) placed perpendicularly to the laser sheet, equipped with a camera lens 23-FM-25-SP (*Tamron*, Japan) and with a high pass optical filter (550 nm to remove the light scattered by laser reflections) to record video sequences at 10 fps (2048×2048 pixels<sup>2</sup>), and a Raypower Nd:Yag laser (*Dantec Dynamic SA*, Denmark) emitting light at 532 nm wavelength and operated in the continuous mode which illuminated a vertical plane parallel to the shaft of the impellers. As in the chemical decolorization technique, the stirred tank was immersed in a squared vessel filled with distilled water to reduce optical distortion. A Rhodamine B (peak absorption 555 nm and peak emission 580 nm) solution was used as the passive tracer and was injected with a syringe of 6.0 mL to achieve a final passive tracer concentration of 5 µg/L in the tank reactor.

A method similar to that of Busciglio *et al.* (2015) was applied with a *Matlab*<sup>®</sup> (*The MathWorks*, USA) code for image analysis. This consisted in masking walls and internals with the *PhotoFiltre* freeware, separating the background from a set of images before tracer injection, and defining the grey level when mixing was achieved from a set of images at the end of the experiments; thus, a dimensionless index between 0 to 100 could be defined for each pixel.

Mixing was finally assessed through the monitoring of the coefficient of variation of this index in each image over time, which was normalized to account for image noise before injection, once homogenization was achieved. Finally, the mixing time was defined as the time necessary to achieve a value lower than 0.05.

#### 5.2.4 Measurements of the volumetric mass transfer coefficient

$(k_L a)_{O_2}$  was measured using dynamic deaeration/aeration experiments based on air and nitrogen gas supply alternatively. The experiments were conducted without biochemical reactions in the same fluids and under the same agitation conditions already reported at a constant gas flow rate (5.0 L/h, *i.e.* 0.042 vvm), corresponding to the highest levels of biogas production rate reported in the biohydrogen production process. The volumetric mass transfer coefficient of hydrogen  $(k_L a)_{H_2}$  was deduced from experimental  $(k_L a)_{O_2}$  using the Higbie penetration model, which expresses the mass transfer coefficient in the liquid film  $k_L$  as a function of the molecular diffusivity ( $D_i$ ) of species  $i$  in water:

$$(k_L)_{H_2} = (k_L)_{O_2} \cdot \sqrt{\frac{D_{H_2}}{D_{O_2}}} \quad (5.2)$$

At 35°C,  $D_{H_2} = 6.3 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s while  $D_{O_2} = 3.2 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s, leading to a correction factor about 1.4. Thus, at constant interfacial area  $a$ ,  $(k_L a)_{H_2, 35^\circ C}$  is defined as:

$$(k_L a)_{H_2, 35^\circ C} = 1.4 \cdot (k_L a)_{O_2, 35^\circ C} \quad (5.3)$$

Volumetric mass transfer measurements were conducted using a dissolved oxygen micro-sensor (OX500-15019, *Unisense A/S*, Denmark). At the beginning of every experiment, the microprobe was calibrated and then mounted on a micromanipulator system, so that it was immersed at 10 mm from the vessel wall and 50 mm below the free surface. It was connected to an oxymeter controlled by the *SensorTrace Pro*<sup>®</sup> software, which allowed to convert the electric signal into dissolved oxygen concentration. Gas was introduced through a stainless steel sparger (hole diameter: 2 μm) located under the lower impeller at mid-height of the off-bottom clearance, leading to tiny bubbles.

In this work, gas-liquid mass transfer was slow with cycles of gassing-in/gassing-out between 30 min and 4 h long. Consequently, the response time of the microprobe (15 s) was

neglected, the liquid phase was considered as perfectly mixed and no first-order correction of the microprobe signal was necessary. Finally, the volumetric mass transfer coefficient could be deduced from **Equation 5.4** in gassing-in experiments and from **Equation 5.5** in gassing-out experiments, respectively.

$$\ln\left(\frac{C_{max}-C_{min}}{C_{max}-C_{(t)}}\right) = k_L a \cdot t \quad (5.4)$$

$$\ln\left(\frac{C_{max}-C_{min}}{C_{(t)}-C_{min}}\right) = k_L a \cdot t \quad (5.5)$$

where  $C_{min}$  and  $C_{max}$  are the minimum and maximum concentrations of dissolved oxygen, respectively, while  $C_{(t)}$  is the dissolved oxygen concentration measured at time  $t$ .

The bubble size distribution was studied to ensure that the interfacial area  $a$  was not affected by viscosity. For this purpose, pictures were captured at 2 min intervals by a digital camera (Canon EOS 70D, *Canon*, Japan) provided with a camera lens EF 24-105 mm f/3.5-5.6 IS STM (*Canon*, Japan). The analysis of the pictures was carried out using *ImageJ*<sup>®</sup> (National Institutes of Health, USA); graduation was put on the vessel wall for calibration, and the resulting bubble size distribution could be usually described using a normal distribution.

Nevertheless, it must be pointed that gas injection does not accurately represent actual *in situ* nucleation of bubbles in the dark fermentation process. Indeed, even if no studies reported the description of bubble nucleation in acidogenic fermentation, it might be hypothesized that the nucleation process can occur everywhere in the culture medium and release bubbles at various frequencies, which is not the case when gas is dispersed. However, the  $(k_L a)_{H_2}$  estimation provides relevant information to better understand the hydrogen supersaturation in the liquid phase.

### **5.3 Results and discussion**

In this section, the experimental results of  $t_m$  and  $(k_L a)_{H_2}$  are first discussed and analyzed as a function of rotation speed and fluid viscosity. Then, a relationship between hydrogen production, liquid-to-gas mass transfer and mixing is developed to improve scale-up methodology of the dark fermentation process.

### 5.3.1 Mixing time analysis and influence of the measuring method

Experimental data on 95% mixing time derived from conductimetric, chemical decolorization and PLIF experiments according to the reference configuration are reported in *Table 5.3*.

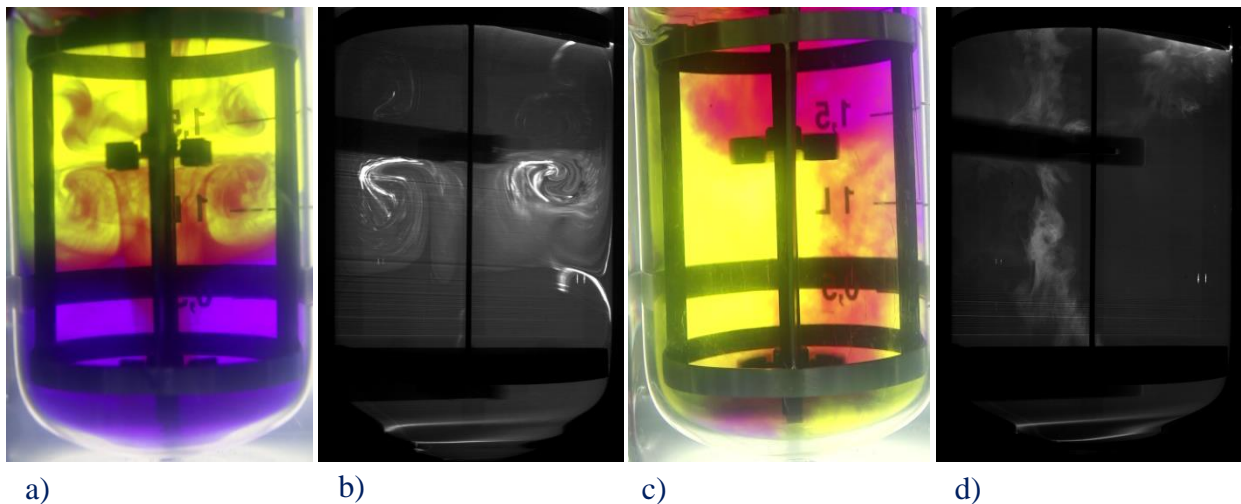
*Table 5.3. Comparison of mixing time data from several techniques with the reference configuration.*

Mixing time $t_m$ (s)					
Rotation speed $N$ (rpm)	Dynamic viscosity $\mu$ (Pa.s)	Reynolds number $Re$	Conductimetric technique	Chemical decolorization technique	PLIF technique
40	$9.0 \cdot 10^{-4}$	2240	$20 \pm 1$	$18 \pm 5$	$14 \pm 2$
40	$2.5 \cdot 10^{-3}$	807	$24 \pm 8$	$27 \pm 6$	$14 \pm 1$
40	$2.3 \cdot 10^{-2}$	88	$140 \pm 7$	$110 \pm 10$	$130 \pm 10$
40	$3.7 \cdot 10^{-2}$	55	$160 \pm 8$	$164 \pm 6$	$145 \pm 5$
40	$6.1 \cdot 10^{-2}$	33	$230 \pm 20$	$220 \pm 20$	$253 \pm 6$
120	$9.0 \cdot 10^{-4}$	6722	$10 \pm 1$	$6 \pm 1$	$8 \pm 1$
120	$2.5 \cdot 10^{-3}$	2420	$12 \pm 1$	$6 \pm 1$	$11 \pm 3$
120	$2.3 \cdot 10^{-2}$	263	$38 \pm 3$	$21 \pm 4$	$16 \pm 2$
120	$3.7 \cdot 10^{-2}$	163	$99 \pm 9$	$40 \pm 5$	$45 \pm 5$
120	$6.1 \cdot 10^{-2}$	99	$122 \pm 6$	$90 \pm 10$	$130 \pm 10$
200	$9.0 \cdot 10^{-4}$	11204	$4 \pm 1$	$3 \pm 1$	$5 \pm 1$
200	$2.5 \cdot 10^{-3}$	4033	$9 \pm 1$	$3 \pm 1$	$7 \pm 2$
200	$2.3 \cdot 10^{-2}$	438	$22 \pm 3$	$6 \pm 2$	$8 \pm 2$
200	$3.7 \cdot 10^{-2}$	273	$36 \pm 8$	$7 \pm 1$	$16 \pm 4$
200	$6.1 \cdot 10^{-2}$	165	$100 \pm 10$	$28 \pm 3$	$27 \pm 3$

The comparison of the mixing time data obtained with the three methods highlights that the results are very close. However, some discrepancies can be observed, especially when the dimensionless Reynolds number  $Re$  is between 150 and 500, *i.e.* under transitional flow conditions. In this case, the resulting  $t_m$  values with the conductimetric technique are higher than those obtained with the chemical decolorization and PLIF techniques. From *Table 5.1*, these discrepancies can be explained because the conductimetric method is local and intrusive, which

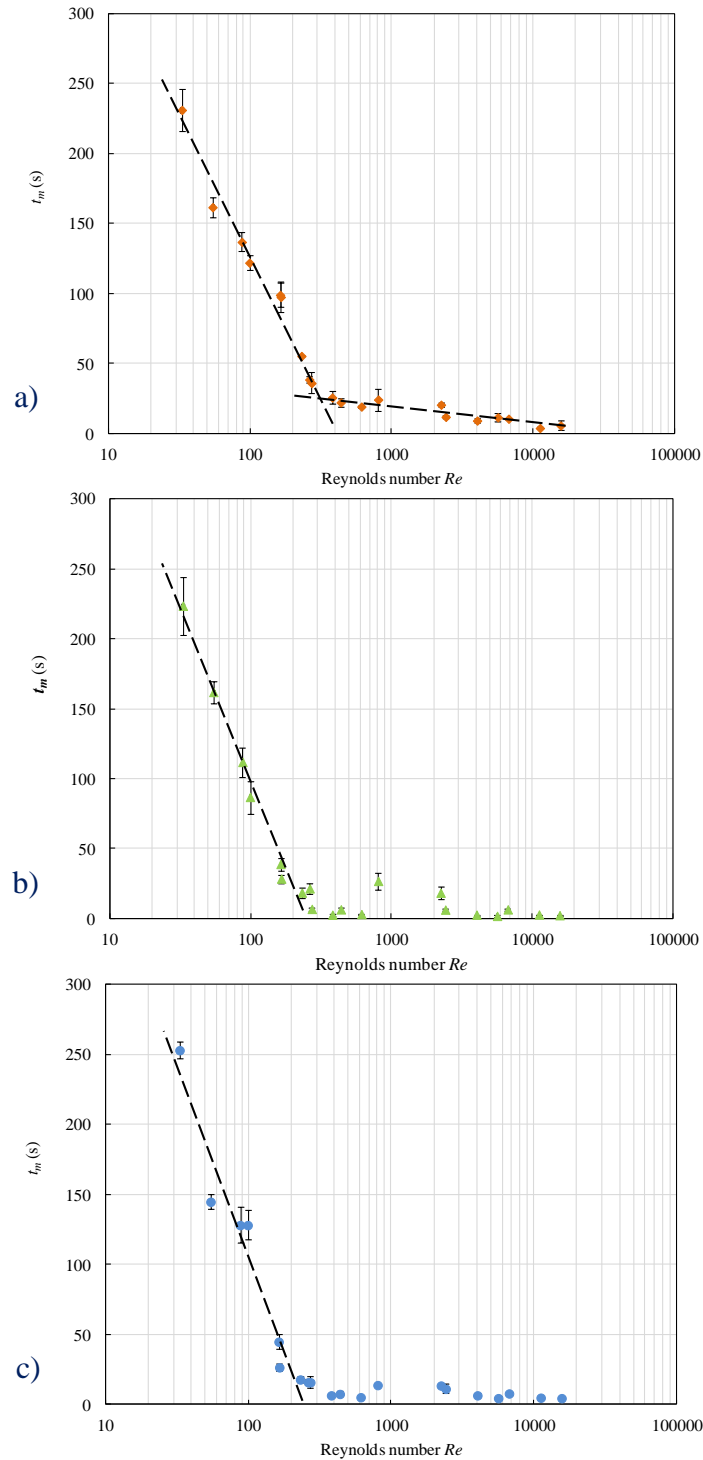


may therefore disturb the flow close to the probe. To prevent the disturbing effect of the probe on the flow, Giona *et al.* (2002) reported the use of probes attached to the baffle system or on the shaft. Moreover,  $t_m$  values recorded with the conductimetric method are highly dependent of the probe position especially in laminar regime, while Bouwmans *et al.* (1997) found that in the turbulent regime, the probe position does not exhibit a significant effect on the mixing time measurement. Contrary to the local conductimetric technique, chemical decolorization and PLIF techniques are supplemented with digital image processing, which results in more accurate measurement methods allowing to discriminate the segregated and well-mixed regions during mixing (Alvarez *et al.*, 2002, Ascanio *et al.*, 2004, Stamatopoulos *et al.*, 2016). It may be advocated that chemical decolorization is based only on a front image, so that regions of the reactor which are not mixed might not be seen and mixing time is underestimated; but this issue is circumvented by PLIF in which a planar region is lighted, so that good mixing conditions close to the wall cannot hide mixing conditions in the core region of the tank. According to **Figure 5.2**, the influence of flow regime and the occurrence of segregated and well-mixed regions can be observed under laminar (**Figures 5.2a** and **5.2b**) and turbulent (**Figures 5.2c** and **5.2d**) regimes with the chemical decolorization and PLIF techniques, respectively. Thus, the use of these methods is particularly beneficial to discriminate the flow patterns even if they have the disadvantage to be expensive, particularly the PLIF method that requires the use of both camera and laser (Ascanio, 2015).



**Figure 5.2.** Flow structure obtained under laminar flow at  $Re = 33$  ( $N = 40$  rpm and  $\mu = 6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s) after 60 s mixing with the chemical decolorization (a) and PLIF methods (b), respectively; under turbulent flow at  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  ( $N = 200$  rpm and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s) after 2 s of mixing with the chemical decolorization (c) and PLIF methods (d), respectively.

As pointed out by Chezeau and Vial (2019), hydrogen production data as a function of rotation speed and viscosity could be expressed on a master curve as a function of  $Re$ . The same methodology was applied to  $t_m$  in **Figure 5.3** for the three methods.



**Figure 5.3.** Experimental mixing time versus Reynolds number using the conductimetric (a), chemical decolorization (b) and PLIF methods (c). Error bars are based on triplicate experiments.

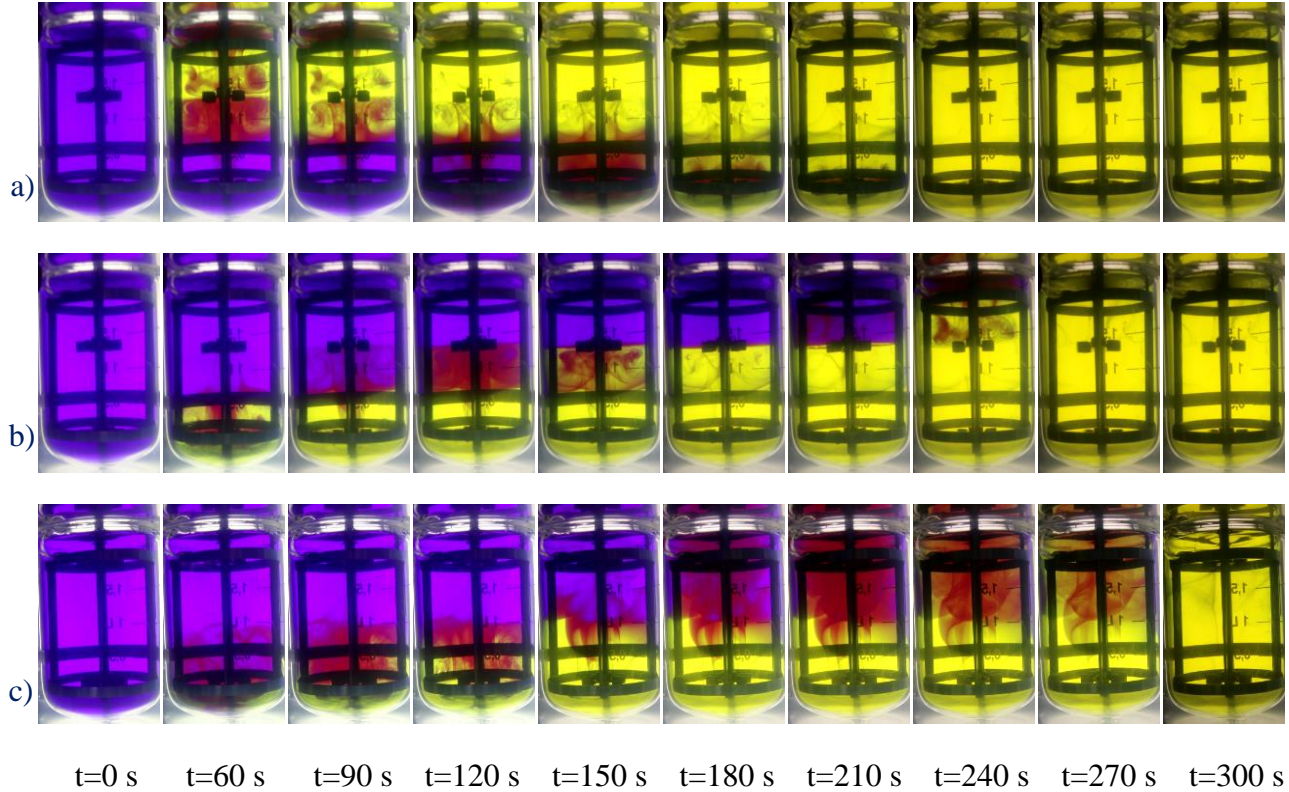
This plot highlights that whatever the fluid viscosity, the same conclusion could be made and that  $t_m$  vs.  $Re$  also displayed a master curve of mixing time. As it can be seen,  $t_m$  decreases as  $Re$  increases in the laminar flow region ( $Re < 100$ ) and in the fully turbulent regime ( $Re > 1000$ ) when  $Re$  varies from 30 to  $1.1 \cdot 10^4$ . Using the conductimetric technique, it is noteworthy that the evolution of  $t_m$  vs.  $Re$  can be described by two straight lines in the semilog plot of **Figure 5.3a**; the first one where  $t_m$  falls steeply corresponds to the laminar-flow regime up to  $Re = 300$ , while the second one where  $t_m$  slowly decreases is characteristic of the transitional-turbulent regime ( $Re > 300$ ). Conversely, only the first straight line can be observed in **Figure 5.3b** and **5.3c** using chemical decolorization and PLIF, respectively. In the transition region ( $100 < Re < 1000$ ),  $t_m$  exhibits a local minimum around  $Re = 450$ , followed by a local maximum below  $Re = 1000$ . This illustrates why  $t_m$  values differ in **Table 5.3** in the transitional flow regime in which the local intrusive method deviates from the values of both 2D/3D visualization techniques. Conversely, it must be pointed out from **Table 5.3** that below a value of 10 s, the decolorization technique may underestimate mixing time when poorly mixed areas are in the core region of the tank, whereas  $t_m$  approaches the response time of conductimetric probes. In this case, PLIF emerges as a good trade-off.

Finally, **Table 5.3** and **Figure 5.3** display that  $t_m$  falls from about 240 s when  $Re = 30$  to values close to 110 s when  $Re = 100$  in the laminar region, while it decreases from 18 s to 4 s when  $Re$  increases from 1000 to  $1.1 \cdot 10^4$  in the fully turbulent region. In the dark fermentation process, these values measure the time necessary for concentration homogenization when alkaline solution is added to maintain constant pH. It is, therefore, a characteristic time of the process that can be compared to the characteristic times of mass transfer and biohydrogen production, respectively.

### 5.3.2 Influence of injection position and impeller clearance on mixing time

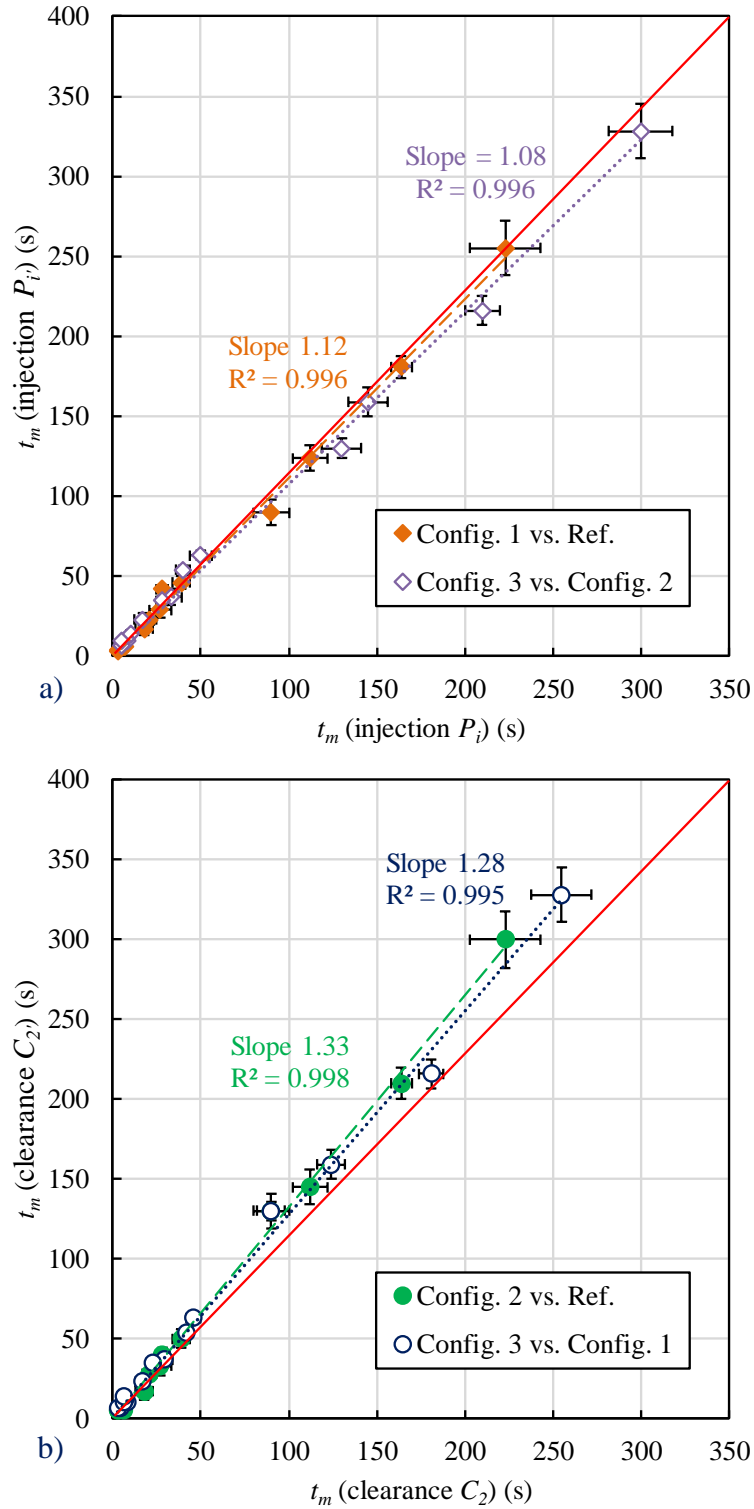
To assess the influence of viscosity and rotation speed on mixing, the influence of the injection position and the impeller clearance were investigated. As shown in **Figure 5.1**, reference design and configuration 2 correspond to an increase of the inter-impeller clearance with the same injection point, while configurations 1 and 3 correspond to the previous ones with a change of the injection position, respectively.

**Figure 5.4** displays pictures of the evolution of mixing using the decolorization technique for both impeller designs and injection positions when  $Re = 33$ . This figure highlights the strong differences in mixing time between the configurations.



**Figure 5.4.** Mixing pattern obtained under laminar flow at  $Re = 33$  ( $N = 40$  rpm and  $\mu = 6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s) for the reference configuration (a) and the alternative configurations 1 (b) and 2 (c).

First, considering the influence of injection position, the comparison between  $t_m$  values is plotted in **Figure 5.5a**. This displays a linear trend with a slope of  $1.12 \pm 0.03$  ( $R^2 > 0.99$ ) between configuration 1 and the reference design, and of  $1.08 \pm 0.03$  ( $R^2 > 0.99$ ) between configuration 3 and configuration 2, respectively. In detail, this difference mainly results from the laminar flow conditions; *i.e.* when  $Re < 100$ : this means that the same plot for  $Re > 100$  between configuration 1 and the reference design also provides a linear slope with a slope around  $1.06 \pm 0.04$  ( $R^2 > 0.98$ ), which highlights that the differences in mixing time are reduced in transitional and turbulent flows. The same conclusions can be drawn with the three measuring techniques, even though the same discrepancy between the conductimetric technique on the one hand, and the two others on the other hand, already reported in the transition region in **section 5.3.1** can also be observed.



**Figure 5.5.** Comparison of experimental mixing time between configuration 1 and the reference design, and between configuration 3 and 2 (a); comparison of experimental mixing time between configuration 2 and the reference design, and between configuration 3 and 1 (b). Error bars are based on triplicate experiments.

The conclusion is that faster mixing is always observed when injection is located at the top of the tank than at mid-height in the reactor. In **Figure 5.4**, these differences can be explained by the well-known overall cascade structure that prevails in multiple-turbine agitated tanks (Vasconcelos *et al.*, 1996). When the acidic solution was injected in the top region (**Figure 5.4a**), this region was rapidly mixed, and the tracer reached also rapidly the inter-impeller zone and, finally, the bottom of the tank. Conversely, when this solution was injected in the discharge of the lower impeller (**Figure 5.4b**), the spherical bottom of the reactor, which distorted the streamlines in the lower part of the tank, always promoted fast mixing in the bottom region, but delayed mixing in the upper part of the tank which behaved as a stagnant zone between 150 s and 210 s. Changing the position of the upper disk turbine did not reduce mixing time in this case, as the faster mixing in the upward region of the tank was counterbalanced by slower mixing rate in the inter-impeller region (**Figure 5.4c**), which finally lead to higher  $t_m$  values. These results highlight that mixing clearly depends on the injection point in the laminar and the transitional flow regimes, but they also highlight the key role of a dual-impeller design that avoids biomass settling and prevents segregation in the upward region of the tank at the same time. With a single impeller, Collignon (2007) reported that  $t_m$  values were 1.2 to 2.5 times higher when the injection was close to the free surface than when it was operated close to the wall of the tank at the level of the impeller discharge. Even though the free surface remains a region very difficult to homogenize in this work from **Figure 5.4**, the upper turbine in the dual-stage geometry enhances the circulation between the top and the middle of the tank, which makes possible the addition of an alkaline solution for pH control in dark fermentation close to the free surface with a pH probe in the inter-impeller region to prevent pH gradients. A similar conclusion had been drawn by Trad *et al.* (2017a), but in an unbaffled vessel in which the flow field thus significantly differs. Finally, these results highlight that the injection of the alkaline solution for pH control in the dark fermentation experiments is more appropriate at the top of the tank in laminar and transitional flow conditions to achieve faster mixing, and prevent segregated regions and pH gradients.

Regarding the effect of the impeller position, **Figure 5.5b** exhibits the same linear trends between configurations when the position of the upper impeller is modified at fixed injection point. This shows a slope around  $1.33 \pm 0.03$  ( $R^2 > 0.99$ ) between configuration 2 and the reference design, and  $1.28 \pm 0.04$  ( $R^2 > 0.99$ ) between configuration 3 and configuration 1, respectively. The effect of impeller position is more influential than injection position, as pointed



out by the values of the slopes. As already stated, major differences between the two inter-impeller configurations resulted from the mixing efficiency in inter-impeller region. Effectively, when the clearance was set to  $C_{2i} = 115$  mm, the circulation between both impellers was too weak to induce an efficient mixing between the top and the bottom of the tank, whatever the position of the injection point. For example, mixing in the inter-impeller region of the tank was complete after 210 s with  $C_2 = 85$  mm (**Figure 5.4a**), while 300 s were necessary with  $C_{2i} = 115$  mm (**Figure 5.4c**). This means that mixing is enhanced when  $C_2/D$  is close to 1.5. As a conclusion, accounting for these results, the reference configuration with  $C_2 = 85$  mm and  $P_i = 160$  mm emerges as a good compromise to obtain faster mixing under laminar to turbulent flow conditions.

In order to analyze mixing effectiveness more deeply, the dimensionless mixing time  $Nt_m$  could be plotted as a function of  $Re$ . This plot is presented in **Figure 5.6a** and displays that, as expected,  $Nt_m$  is constant under turbulent flow conditions in a baffled vessel because it is only a function of the impeller-to-tank diameter ratio  $D/T$  and is expressed as follows for a single Rushton turbine (Nienow, 1997):

$$N \cdot t_m = 5.3 \cdot N_p^{-1/3} \cdot \left(\frac{D}{T}\right)^{-2} \quad (5.6)$$

where  $N_p$  is the power number defined as:

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5} \quad (5.7)$$

where  $P$  is power input into the reactor due to mechanical stirring, and  $\rho$  is fluid density. This gives  $Nt_m = 15$ . **Figure 5.6a** displays  $Nt_m$  about  $12 \pm 3$ , which is rather close to the expected value, even though a dual-stage impeller with a  $H/D = 1.23$  is used, achieving more rapidly homogeneity than a single Rushton turbine. But **Figure 5.6a** also shows that  $Nt_m$  vs.  $Re$  does not follow a simple trend when  $Re < 300$  and provides values that depend on the viscosity. This effect has been accounted by Grenville and Nienow (2004) in transitional flow who pointed out that for the same geometry, mixing time can be derived from the following expression:

$$N_p^{1/3} \cdot Re \cdot \sqrt{Fo} = 184 \quad (5.8)$$

where  $Fo$  is a mixing Fourier number:

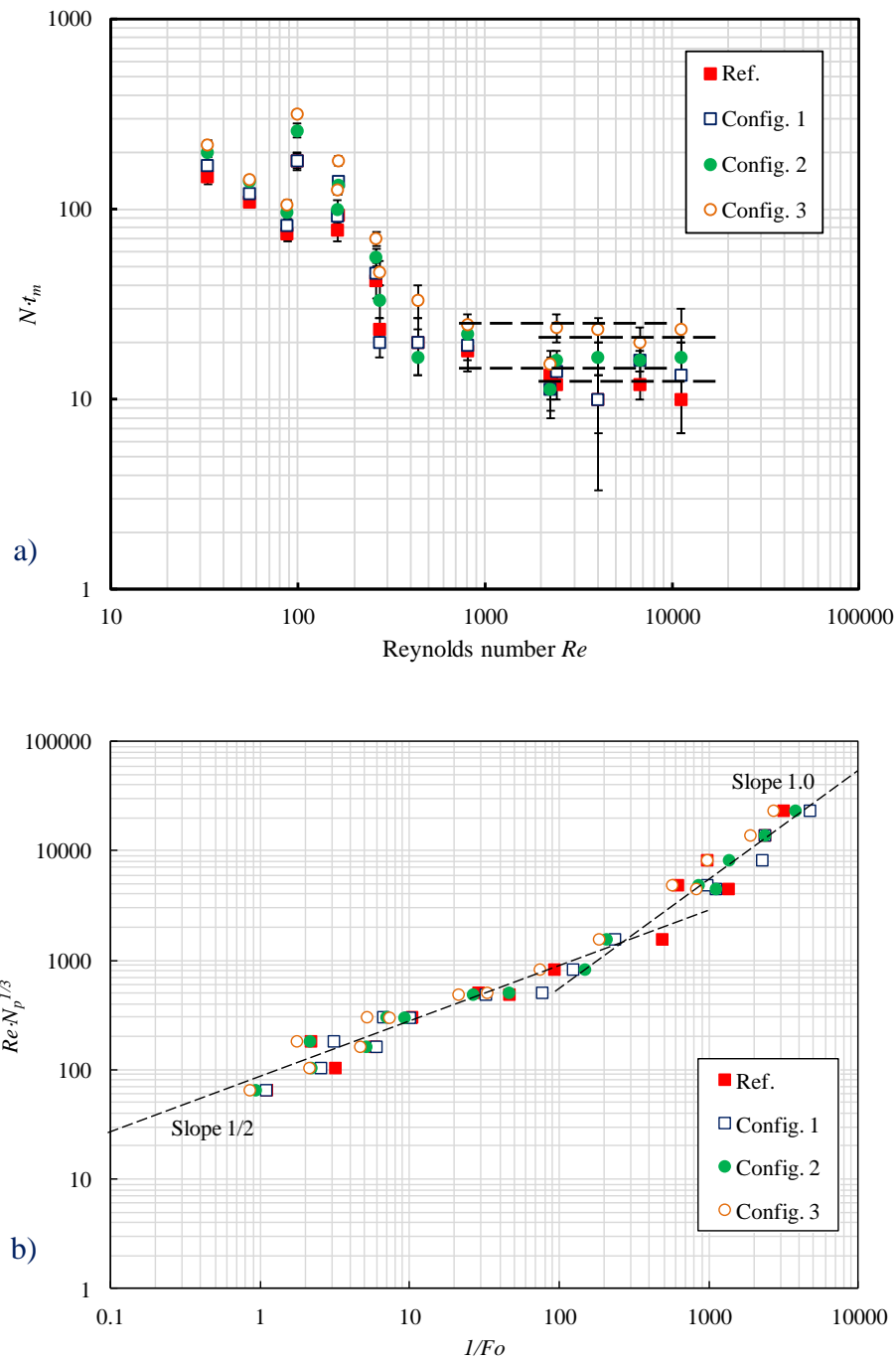
$$Fo = \frac{\mu t_m}{\rho T^2} \quad (5.9)$$

**Equations 5.8** and **5.9** can be generalized as follows:

$$N_p^{1/3} \cdot Re \cdot Fo^m = c \quad (5.10)$$

where  $c$  is a constant  $m$  an exponent that depend on the flow regime, with  $m = 1/2$  ( $c = 184$ ) and  $m = 1$  ( $c = 5.2$ ) under laminar and turbulent flow conditions, respectively (Vasconcelos *et al.*, 1996). Using torque measurements and  $N_p$  data from Chezeau and Vial (2019), the generalized plot of **Equation 5.10** is displayed in **Figure 5.6b** for the four configurations. As mentioned by Grenville and Nienow (2004), the transition emerges when  $1/Fo$  is about 1000 for a single-stage impeller and is observed at smaller  $1/Fo$  values in multi-stage impeller designs (Vasconcelos *et al.*, 1996). This conclusion agrees with **Figure 5.6b**, with two straight lines exhibiting slopes that comply with the  $1/2$  and  $1$  values. The constant  $c$  in the transition region in **Figure 5.6b** is, however, close to 100, which differs significantly from  $c = 184$ , but this can probably be explained by the use of a dual-impeller design. All the configurations exhibit the same trends, so that a master curve can be deduced in **Figure 5.6b** for each configuration, while  $Nt_m$  becomes always constant when turbulent flow is achieved ( $m = 1$ , and constant  $N_p$ ), with a higher value  $Nt_m = 23 \pm 5$  when the inter-impeller clearance is increased (configurations 2 and 3). Finally, these results highlight that mixing time data agree with the literature and that either experimental  $t_m$  values or **Equation 5.10** can be used for further comparison of the characteristic times of macromixing, mass transfer, and biochemical reaction. Besides, to avoid pH gradients,  $t_m$  values in **Table 5.3** and **Figure 5.3** show that laminar flow conditions should be avoided, and that transitional flow constitutes a trade-off for energy savings.

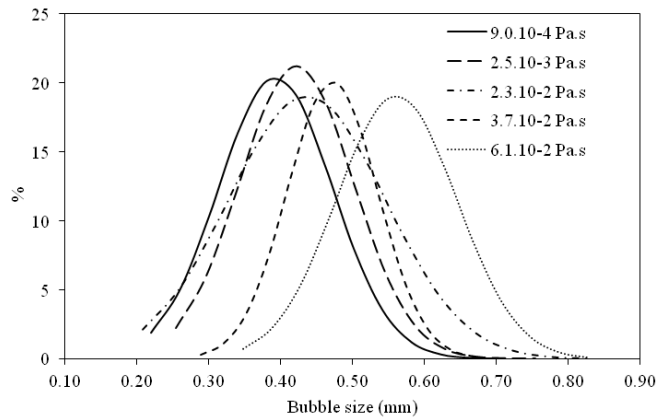




**Figure 5.6.** Dimensionless mixing time  $Nt_m$  versus  $Re$  (a)  $Re \cdot N_p^{1/3}$  plot versus  $1/Fo$  (b) for the four configurations. Error bars are based on triplicate experiments.

### 5.3.3 Analysis of liquid-to-gas mass transfer

First, bubble size was investigated as a function of rotation speed and fluid viscosity. Due to the effectiveness of the sparger, the influence of rotation speed was negligible in comparison to viscosity. Bubbles were always spherical and homogeneously dispersed, which may fit the dispersion encountered in dark fermentation. Bubble size distributions were nearly Gaussian and fitted using a normal distribution. **Figure 5.7** displays the fitted curves; the average bubble size increased as a function of the viscosity of the liquid phase. Indeed, the average diameter of the bubbles was 0.39, 0.42, 0.44, 0.47 and 0.55 mm for the medium viscosity of  $9.0 \cdot 10^{-4}$ ,  $2.5 \cdot 10^{-3}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-2}$ ,  $3.7 \cdot 10^{-2}$ , and  $6.1 \cdot 10^{-2}$  Pa.s, respectively. These results indicate that viscosity can impact the bubble size distribution and change the interfacial area  $a$ , even though surface tension was not significantly different, and may reduce  $k_L a$  when it increases.



**Figure 5.7.** Fitted bubble size distribution with different medium viscosity ( $N = 120$  rpm).

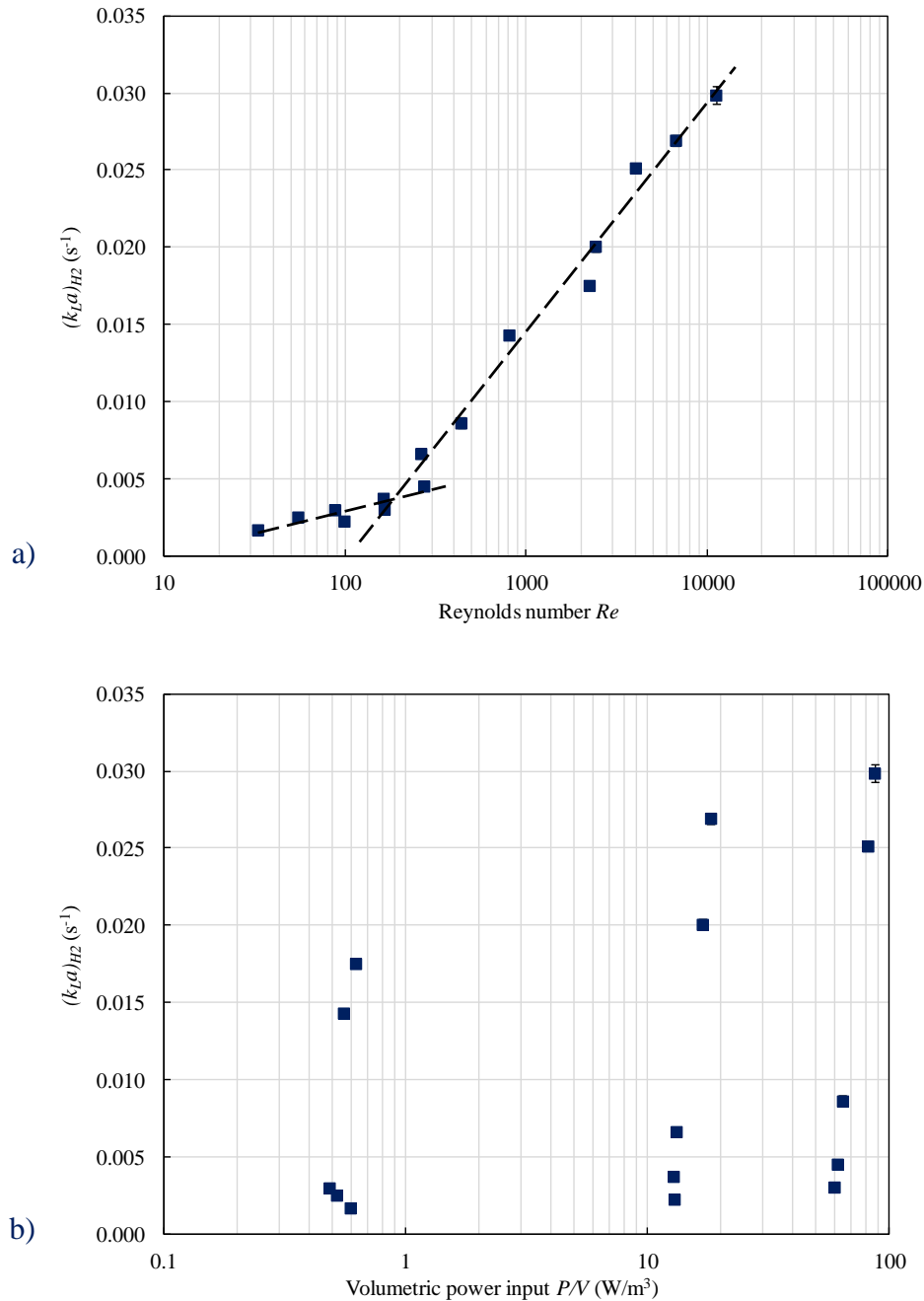
The  $(k_L a)_{H_2}$  estimation was derived from the experimental values of  $(k_L a)_{O_2}$  using the Higbie penetration model, as reported in the **section 5.2.4**. **Figure 5.8a** displays the evolution of  $(k_L a)_{H_2}$  as function of  $Re$ . As mixing time, but also hydrogen production potential,  $(k_L a)_{H_2}$  shows a continuous evolution *vs.*  $Re$  when both viscosity and rotation speed are changed, which is not the case as a function of power input (**Figure 5.8b**). This behavior clearly differs from aerobic fermenters in which  $k_L a$  is usually expressed as a function of  $P/V$  at constant gas velocity (Yawalkar *et al.*, 2008), which does not account for the effect of viscosity in the present work (**Figure 5.8b**). As it can be seen in **Figure 5.8a**, reported values were lower between  $6.1$ – $10.8 \cdot h^{-1}$  at  $Re < 100$ ; and hydrogen mass transfer increased steeply under transitional and turbulent flows to approach a maximum value of  $100 h^{-1}$  when  $Re$  reached  $1.1 \cdot 10^4$ . It must be

pointed out that this evolution of  $(k_L a)_{H_2}$  can be explained by the fact that from transitional to turbulent flow conditions, the formation of turbulent eddies improve more efficiently the mass transfer properties of the flow. Interestingly, as reported above in the **section 5.3.1**, the evolution of  $(k_L a)_{H_2}$  as a function of  $Re$  can be also described with two nearly linear trends in the semilog plot: the first one has a slight slope and is characteristic of the laminar-transitional regime, while the second one has a high slope and is characteristic of the transitional-turbulent regime. In practice,  $(k_L a)_{H_2}$  varied as  $Re^{0.65}$  and  $Re^{0.3}$  in the laminar-transitional and the turbulent flow regimes, respectively.

From a theoretical point of view,  $k_L a$  is a function of mixing conditions, viscosity and diffusivity, which is affected by viscosity. The Stokes-Einstein approximation is usually applied, which states that diffusivity is inversely proportional to viscosity. As  $k_L a$  depends on  $Re$  and the dimensionless Schmidt number, it becomes only the function of  $N$  and  $\mu$  in this work, assuming that the Stokes-Einstein equation is applied. Thus, one deduces that:

$$k_L a = cN^\alpha \mu^\beta \quad (5.11)$$

But it cannot be assumed *a priori* that  $\alpha = -\beta$ . Linear regression was therefore applied using **Equation 5.11** and the results showed that  $\alpha = 0.53$ ,  $\beta = -0.61$  when  $Re < 1000$  ( $R^2 > 0.95$ ), and  $\alpha = 0.32$ ,  $\beta = -0.23$  when  $Re > 1000$  ( $R^2 > 0.95$ ), which agrees roughly with the fact that  $(k_L a)_{H_2}$  is only a function of  $Re$  in this work.



**Figure 5.8.** Experimental volumetric mass transfer coefficient versus  $Re$  (a) and volumetric power input (b). Error bars are based on triplicate experiments.

The results from **Figure 5.8** can also be compared to the literature. As previously mentioned, direct measurements of  $(k_L a)_{H_2}$  were never reported before for the acidogenic fermentation process, but deduced as in this work or from mass balance. Thus, the values of this work are higher than those obtained in the conditions of dark fermentation by Zhang *et al.* (2013) and Trad *et al.* (2017b), who reported  $(k_L a)_{H_2}$  between 6.8–10.2 h<sup>-1</sup> and 3.2–6.7 h<sup>-1</sup>, respectively.

This can be explained, in part because of the better mixing conditions than in Zhang *et al.* (2013) who used magnetic stirring, as highlighted in **sections 5.3.1** and **5.3.2**, and because of the quality of the gas distribution which was far more homogeneous than in Trad *et al.* (2017b) due to the presence of baffles.

Finally, these results highlight that  $(k_L a)_{H_2}$  is only a function of  $Re$  that increases steeply in the transition and turbulent flow regimes. As expected, viscosity and agitation conditions exhibit a significant effect on  $k_L a$ . Agitation may be used to enhance mass transfer or counterbalance the effect of viscosity. It also emerges that laminar conditions lead to low  $k_L a$ , whereas gas-liquid mass transfer is strongly enhanced in transitional and turbulent flow regimes. A key result is also, as in **section 5.3.2** on mixing time, that transitional flow conditions may constitute a trade-off between the need for hydrogen mass transfer conditions and energy savings in the dark fermentation process.

#### 5.3.4 Relationship between hydrogen production, liquid-to-gas mass transfer and mixing

To investigate the relationship between hydrogen production potential, liquid-to-gas mass transfer and mixing; the dark fermentation results of Chezeau and Vial (2019) obtained in the same conditions of agitation speed and viscosity have been used on the basis of the reference configuration which provided the smallest  $t_m$  values. The main conclusion of their work is that the combined influence of agitation speed and viscosity in a stirred tank bioreactor in which acidogenic fermentation is operated must be expressed as function of the purely hydrodynamic dimensionless  $Re$ , and that an optimum can be found in the transitional regime. Using the Gompertz equation for analyzing the batch experiments, the cumulative hydrogen production  $H(t)$  can be expressed as:

$$H(t) = H_{max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{max} \cdot \exp(1)}{H_{max}} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5.12)$$

where  $H_{max}$  is the hydrogen production potential of the substrate in L,  $\lambda$  is the lag time in h and  $R_{max}$  the maximum hydrogen production rate in L/h. So, two characteristic reaction times can be deduced from **Equation 5.12**: the lag time  $\lambda$ , and a maximum specific  $H_2$  production rate  $R_{max}/V$ . These can thus be compared to the macromixing time  $t_m$  that characterizes the ability

to achieve homogeneous pH in the tank, and to the characteristic time of hydrogen mass transfer for desorption  $1/k_L a$ . The results are summarized in **Table 5.4**.

**Table 5.4.** Characteristic time scales and dimensionless parameters derived from this work.

$Re$	$N$ (rpm)	$\mu$ (Pa.s)	$t_m$ (s)	$N \cdot t_m$	$1/k_L a$ (s)	$\lambda$ (h)	$R_{max}$ (L/h)	$H_{max}$ (L)	$k_L a \cdot t_m$	$Da$
33	40	$6.1 \cdot 10^{-2}$	223	149	593	16.9	0.73	10.1	0.38	3.8
55	40	$3.7 \cdot 10^{-2}$	164	109	398	11.3	1.07	10.2	0.41	3.8
88	40	$2.3 \cdot 10^{-2}$	112	75	335	10.5	1.30	10.2	0.33	3.9
99	120	$6.1 \cdot 10^{-2}$	90	180	444	14.3	1.65	10.7	0.20	6.5
163	120	$3.7 \cdot 10^{-2}$	39	78	268	14.5	2.39	11.1	0.15	5.7
165	200	$6.1 \cdot 10^{-2}$	28	93	329	12.9	1.54	12.3	0.09	4.5
263	120	$2.3 \cdot 10^{-2}$	21	42	151	11.1	2.10	10.7	0.14	2.8
273	200	$3.7 \cdot 10^{-2}$	7	23	221	12.9	1.77	11.4	0.03	3.5
438	200	$2.3 \cdot 10^{-2}$	6	20	116	11.1	1.84	10.9	0.05	1.9
807	40	$2.5 \cdot 10^{-3}$	27	18	70	10.3	1.54	10.5	0.39	1.0
2240	40	$9.0 \cdot 10^{-4}$	18	12	57	10.7	2.32	8.9	0.32	1.2
2420	120	$2.5 \cdot 10^{-3}$	6	12	50	11.1	2.09	9.6	0.12	0.9
4033	200	$2.5 \cdot 10^{-3}$	3	10	40	10.5	1.51	10.2	0.08	0.5
6722	120	$9.0 \cdot 10^{-4}$	6	12	37	10.8	1.95	8.8	0.16	0.6
11204	200	$9.0 \cdot 10^{-4}$	3	10	33	10.3	1.37	8.0	0.09	0.4

First, **Table 5.4** shows that the lag time increases when viscosity increases at constant rotation speed and becomes nearly constant when  $Re$  is higher than 800, about 10 h, which seems to correspond to the minimum value. When  $Re < 800$ ,  $\lambda$  is higher, but cannot be described only by the evolution of  $Re$ , which highlights that not only diffusivity/viscosity, but also other parameters may be involved, such as the adaptation of the microorganism to a different chemical environment with a lower water activity. Then, **Figure 5.9a** describes the effect of  $Re$  on hydrogen production potential. This increases and peaks between  $Re > 100$  and  $Re < 200$ . But under turbulent flow conditions when  $Re > 1000$ , hydrogen production potential decrease steeply

to approach the minimum value of this work when  $Re$  is the highest ( $Re = 1.1 \cdot 10^4$ ). As it can be seen, turbulent conditions impair the dark fermentation process, which could be explained by a damaging effect of turbulent eddies on microorganism aggregates (Chezeau and Vial, 2019).

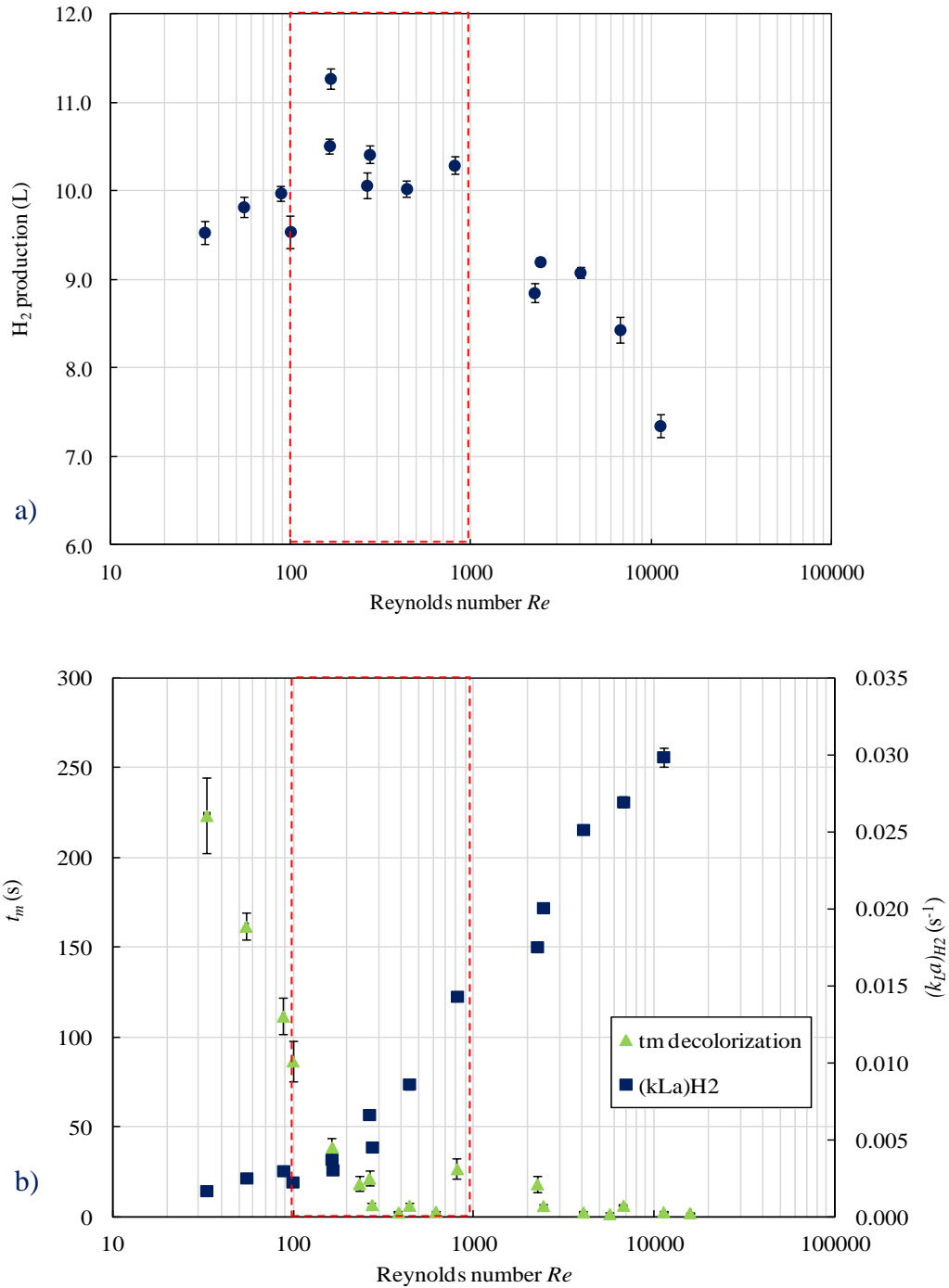


Figure 5.9. Experimental hydrogen production potential versus  $Re$  (a), and experimental volumetric mass transfer coefficient and mixing time versus  $Re$  (b). Error bars are based on triplicate experiments.

At the same time **Figure 5.9b** illustrates the experimental results of volumetric mass transfer of hydrogen and mixing time obtained with the chemical decolorization method as function of the  $Re$ . The dotted lines in the **Figures 5.9** highlight the area where maximum value of hydrogen production potential are reported, corresponding to transitional conditions. To compare the characteristic times of mixing, mass transfer, and reaction, two dimensionless numbers were defined:  $k_L a \cdot t_m$  which directly compares the mixing and mass transfer times, and the Damköhler number  $Da$  which compares the maximum hydrogen production rate  $\rho_{H_2} R_{max}/V$  to the maximum mass transfer rate  $k_L a \cdot C^*$ , both expressed in  $g_{H_2}/(L_{reactor} \cdot h)$  as follows:

$$Da = \frac{1}{\rho_{H_2}} \frac{R_{max}/V}{k_L a \cdot C^*} \quad (5.13)$$

where  $R_{max}$  ( $L_{H_2}/s$ ) is derived from **Equation 5.13** (data from **Table 5.4**),  $V$  the volume of the liquid phase in the bioreactor,  $C^*$  the solubility of hydrogen gas in water at 35°C (about 1.4 mg/L under atmospheric pressure), and  $\rho_{H_2}$  the hydrogen gas density deduced from ideal gas law.

**Figure 5.10** shows first that  $Da$  lies between 4–7 in the laminar flow regime, decreases in the transitional region and turbulent flow conditions, becoming lower than 1 when  $Re$  is between 1000 and 2000. Theoretically,  $Da \gg 1$  corresponds to fast reaction and kinetic limitation by mass transfer. This situation prevails when  $Re < 100$ . In practice, because  $R_{max}$  estimation in **Equation 5.13** is based on measurements in the gas phase, the theoretical consequence is that  $\rho_{H_2} R_{max}/V \leq k_L a \cdot C^*$ , so that the maximum  $Da$  value should be 1 in this work.  $Da > 1$  thus leads to the same conclusion as Zhang *et al.* (2013), despite they applied a rather different approach, *i.e.* that the supersaturation of  $H_2$  in the liquid phase prevails and that  $C^*$  is underestimated. When  $Re > 100$ ,  $Da$  decreases from 5 to about 0.4 which highlights that maximum reaction and mass transfer rates become rather close, so that mass transfer limitation progressively vanishes at increasing  $Re$ . However, it must be pointed out that  $R_{max}$  increases *vs.*  $Re$  in the laminar regime, while it decreases in turbulent flows (**Table 5.4**), whereas  $k_L a$  is always an increasing function of  $Re$ . The decrease in  $R_{max}$  and  $H_{max}$  when  $Re > 1000$  cannot therefore be attributed to a mass transfer limitation. The same conclusion can be drawn for mixing, using  $k_L a \cdot t_m$  (**Table 5.4**) which lies about 0.2 in turbulent flow. As noticed by Chezeau and Vial (2019), these decreases are observed when the Kolmogorov length scale approaches the size of biomass aggregates.



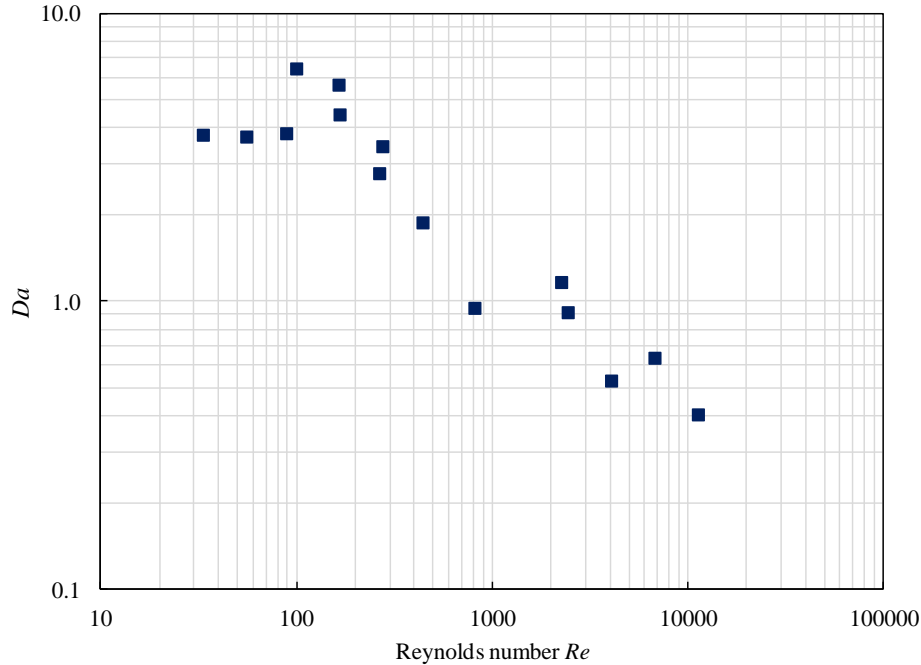


Figure 5.10. Damköhler number evolution versus Reynolds number. Error bars are based on triplicate experiments.

Table 5.4 also highlights that  $k_L a \cdot t_m$  ranges between 0.03 and 0.4, is maximum about 0.4 in laminar conditions, and minimized for  $Re$  between 100 and 500. So, ideal mixing in relation to liquid-to-gas mass transfer is better approached in the transition region than in other regimes. Moreover, it emerges that increasing  $Re$  increases biohydrogen production rate  $R_{max}$  when  $Re < 100$ , while  $H_{max}$  varies only slightly, because this enhances mass transfer rate without impairing the environmental condition of the culture. Conversely, the mechanical stress induced by turbulent eddies reduces  $H_{max}$  even when smaller  $t_m$ , or higher  $k_L a$  and  $R_{max}$  values are reported for  $Re > 1000$ , which confirms that microorganisms become less efficient.

As a conclusion, both in terms of yield and kinetics, the transitional flow region,  $100 < Re < 1000$ , provides the optimum conditions to operate the dark fermentation process in terms of mixing, mass transfer and reaction conditions because mass transfer is the limiting step in the laminar flow region and reaction rate is reached only owing to the supersaturation of dissolved hydrogen in the liquid phase. Conversely, turbulent stress clearly impairs biochemical processes in the turbulent flow region when mass transfer limitation has vanished. This implies that agitation conditions must be adjusted as a function of digestate viscosity to maintain optimum culture conditions, accounting for the variability of substrate composition vs. time.

## 5.4 Conclusions

In this work, experimental analysis of mixing time and liquid-to-gas mass transfer in relation to the hydrogen production potential have been conducted under different medium viscosity and agitation conditions in a mechanically-stirred tank reactor equipped with a dual-stage impeller. The following conclusions can be drawn. First, the comparison between the local conductimetric, chemical decolorization, and PLIF methods for the estimation of  $t_m$  showed that these methods provided close results, but that chemical decolorization may underestimate the mixing time, while PLIF appears as the best trade-off when mixing time becomes small. A master curve expressed as a function of  $Re$ ,  $N_p$  and  $Fo$  was defined, which agreed with literature data for  $30 < Re < 1.1 \cdot 10^4$ :  $N \cdot t_m$  vs.  $Re$  fell under laminar flow conditions and became constant when established turbulent flow was achieved. Inter-impeller clearance and tracer injection position influenced  $t_m$ , but the dual-impeller design enhanced mixing in the top region of the tank in comparison to a single-impeller design with the reference configuration, which made possible the addition of the alkaline solution close to the surface in the dark fermentation process with a pH probe located in the inter-impeller region for pH control. Then,  $(k_L a)_{H_2}$  appeared to be only a function of  $Re$  that increased steeply in the transition and turbulent flow regimes. Finally, Reynolds number seems able to reconcile the respective influence of rotation speed and viscosity in order to optimize the dark fermentation process, including mixing time, mass transfer and hydrogen production potential. From the comparison between the characteristic times of mass transfer, mixing and reaction, it arises that hydrogen production was limited by mass transfer under laminar flow, and that the steep decrease in hydrogen production in the turbulent flow regime did not derive from mass transfer rate or mixing time. As a result, the transitional flow region emerged as the optimum condition for dark fermentation, because the  $H_2$  production potential was maximized, the maximum production rate was enhanced, ideal mixing was approached for better pH control, and mass transfer limitation was reduced at the same time.

Concludingly, this work underlines the key role of agitation conditions and digestate viscosity, described univocally as a function of  $Re$ , on biohydrogen production potential, liquid-to-gas mass transfer and mixing rates, for the scale-up of the dark fermentation process. The consequence is that the change of digestate viscosity induced by the variability of the

composition of feed in fermentors must be accounted for and counterbalanced by a proper change of agitation conditions so as to maintain optimum biohydrogen production over time.

### **Acknowledgements**

LABEX IMobS<sup>3</sup> *Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions*, the French National Centre for Scientific Research (CNRS), Auvergne-Rhône-Alpes Regional Council and the European Funds of Regional Development (ERDF/FEDER) are gratefully acknowledged.

### **Nomenclature**

#### *List of symbols*

$C_1$	Off-bottom clearance (m)
$C_2, C_{2'}$	Inter-impeller clearance (m)
$C_3$	Distance between top impeller and free surface (m)
$C_S$	Distance between bottom of the shaft and bottom of the tank (m)
$D$	Impeller diameter (m)
$Da$	Damköhler number
$D_i$	Molecular diffusivity (m <sup>2</sup> /s)
$d_s$	Shaft diameter (m)
$Fo$	Fourier number
$H$	Cumulative hydrogen production (L)
$h$	Impeller height (m)
$H_L$	Liquid height in the bioreactor (m)
$H_{max}$	Hydrogen production potential of the substrate (L)
$k_L a$	Volumetric mass-transfer coefficient (h <sup>-1</sup> )
$N$	Rotation speed (rpm)

$N_P$	Power number
$P$	Power input (W)
$P_I, P_{II}$	Injection position of the tracer (m)
$Re$	Reynolds number
$R_{max}$	Maximum hydrogen production rate (L/h)
$T$	Bioreactor diameter (m)
$t$	Time (h)
$t_m$	Mixing time (h)
$V$	Bioreactor volume (m <sup>3</sup> )

*Greek letters*

$\lambda$	Lag time (h)
$\mu$	Dynamic viscosity (Pa.s)
$\rho$	Fluid density (kg/m <sup>3</sup> )

*Abbreviations*

<i>HSV</i>	Hue Saturation Value
<i>PLIF</i>	Planar Laser Induced Fluorescence
<i>VFAs</i>	Volatile Fatty Acids

## 5.5 References

- M.M. Alvarez, P.E. Arratia, F.J. Muzzio (2002). Laminar mixing in eccentric stirred tank systems. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 80, 546-557.
- G. Ascanio (2015). Mixing time in stirred vessels: A review of experimental techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 23, 1065-1076.
- G. Ascanio, S. Foucault, P.A. Tanguy (2004). Time-periodic mixing of shear-thinning fluids. *Chemical Engineering Research and Design*. 82, 1199-1203.
- J.R. Bastidas-Oyanedel, Z. Mohd-Zaki, R.J. Zeng, N. Bernet, S. Pratt, J.P. Steyer, D.J. Batstone (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*. 110, 503-509.
- S.Z. Baykara (2018). Hydrogen: A brief overview on its sources, production and environmental impact. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 10605-10614.

- I. Bouwmans, A. Barker, H.E.A. van Den Akker (1997). Blending liquids of differing viscosities and densities in stirred vessels. *Chemical Engineering Research and Design*. 75, 777–783.
- M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 6713-6733.
- A. Busciglio, G. Montante, A. Paglianti (2015). Flow field and homogenization time assessment in continuously-fed stirred tanks. *Chemical Engineering Research and Design*. 102, 42–56.
- F. Cabaret, S. Bonnot, L. Fradette, P.A. Tanguy (2007). Mixing time analysis using colorimetric methods and image processing. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 46, 5032-5042.
- M.C. Castro-Villalobos, J.L. Garcia-Morales, F.J. Fernandez (2012). By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 7077-7083.
- B. Chezeau, C. Vial (2019). Combined effects of digestate viscosity and agitation conditions on the fermentative biohydrogen production. *Biochemical Engineering Journal*. 142, 105-116.
- M.L. Collignon (2007). Etude du mélange par P.I.V. et P.L.I.F. dans un bioréacteur de culture cellulaire. (*In french*). <http://hdl.handle.net/2268/5008>.
- G. de Gioannis, M. Friargiu, E. Massi, A. Muntoni, A. Poletini, R. Pomi, D. Spiga (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 20930-20941.
- E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H.S. Lee (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 79, 656-668.
- A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudié, P.N.L. Lens, G. Esposito (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. 144, 73-95.
- M. Giona, A. Paglianti, S. Cerbelli, S. Pintus, A. Adrover (2002). Dispersion in stirred tank reactor: Asymptotic properties and mixing characterization. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 80, 580-590.
- R.K. Grenville, A.W. Nienow (2004). Blending of miscible liquids. *In Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice (1<sup>st</sup> edition) (chapter 9)*. Editor: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- R.R. Hemrajani, G.B. Tattersson (2004). Mechanically stirred vessels. *In Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice (1<sup>st</sup> edition) (chapter 6)*. Editor: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- K.S. Lee, T.S. Tseng, Y.W. Liu, Y.D. Hsiao (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15556-15562.
- J. Lindmark, E. Thorin, R. Bel Fdhila, E. Dahlquist (2014). Effect of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40, 1030-1047.
- B. Mandal, K. Nath, D. Das (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*. 28, 831-835.
- A.W. Nienow (1997). On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime. *Chemical Engineering Science*. 52, 2557-2565.

- A. Noblecourt, G. Christophe, C. Larroche, P. Fontanille (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*. 247, 864-870.
- J. Rodriguez, R. Kleerebezem, J.M. Lema, M.C. van Loosdrecht (2006). Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 93, 592-606.
- B. Ruggeri, T. Tommasi (2012). Efficiency and efficacy of pre-treatment and bioreaction for bio-H<sub>2</sub> energy production from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 6491-6502.
- F. Silva-Illanes, E. Tapia-Venegas, M.C. Schiappacasse, E. Trably, G. Ruiz-Filippi (2017). Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. *Energy*. 141, 358-367.
- K. Stamatopoulos, F. Alberini, H. Batchelor, M.J.H. Simmons (2016). Use of PLIF to assess the mixing performance of small volume USP 2 apparatus in shear thinning media. *Chemical Engineering Science*. 145, 1-9.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2017a) Experimental and numerical investigation of hydrodynamics and mixing in a dual-impeller mechanically-stirred digester. *Chemical Engineering Science*. 329, 142-155.
- Z. Trad, C. Vial, J.P. Fontaine, C. Larroche (2017b). Mixing and liquid-to-gas mass transfer under digester operating conditions. *Chemical Engineering Science*. 170, 606-627.
- J.M.T. Vasconcelos, J.M. Barata, S.S. Alves (1996). Transitional mixing in multiple-turbine agitated tanks. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*. 63, 53-58.
- L. Vega-Alvarado, B. Taboada, A. Hidalgo-Millan, G. Ascanio (2011). Image analysis method for the measurement of mixing times in stirred vessels. *Chemical Engineering and Technology*. 34, 859-866.
- A.A. Yawalkar, A.B.M. Heesink, G.F. Versteeg, V.G. Pangarkar (2008). Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tank reactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 80, 840-848.
- Y. Zhang, F. Zhang, M. Chen, P.N. Chu, J. Ding, R.J. Zeng (2013). Hydrogen supersaturation in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. *Applied Energy*. 109, 213-219.

## Bilan

---

L'objectif de ce chapitre était tout d'abord d'étudier le mélange et le transfert en hydrogène liquide-gaz  $(k_L a)_{H_2}$  en lien avec la production de biohydrogène. Ensuite, les temps de mélange  $t_m$  obtenus en fonction de la configuration du système d'agitation et de la position du système d'injection devaient être analysés. Les résultats de ce chapitre appellent les observations suivantes :

- ✓ Les trois méthodes d'estimation de  $t_m$  donnent des résultats proches, même si la technique conductimétrique a tendance à surestimer  $t_m$  dans le régime de transition.
- ✓ La configuration des mobiles d'agitation et la zone d'injection de la solution alcaline en cours de fermentation sont des paramètres à prendre en compte pour optimiser le procédé.
- ✓ La puissance dissipée par unité de volume ( $P/V$ ) ne peut pas être utilisée pour définir les conditions optimales de temps de mélange et de transfert de matière liquide-gaz.
- ✓ Le nombre adimensionnel de Reynolds ( $Re$ ) permet de décrire le procédé de fermentation sombre. Cela inclut la production de biohydrogène,  $t_m$  et  $(k_L a)_{H_2}$ .
- ✓ L'analyse des temps caractéristiques du procédé fait apparaître que la production de biohydrogène est limitée par le transfert de matière liquide-gaz en régime laminaire et que le régime de transition est le mode d'écoulement optimal pour conduire le procédé de fermentation sombre. Enfin, en écoulement turbulent, le mélange et le transfert de matière ne sont pas responsables de la diminution de la production de biohydrogène.

Les résultats de ce chapitre apportent des informations pertinentes pour la compréhension du procédé de fermentation sombre. De plus, ils vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle les interactions entre agrégats tourbillonnaires-agrégats bactériens en régime turbulent impacteraient négativement les performances de la voie fermentaire sombre. Néanmoins, l'analyse de l'hydrodynamique locale et de la turbulence est encore nécessaire pour définir les niveaux de stress auxquels peuvent être confrontées les bactéries en cours de fermentation. Cette étude sera développée dans le chapitre suivant.

# **Chapitre 6 : Caractérisation des composantes turbulentes de l'écoulement**

---



## Préambule

---

A partir des résultats des *Chapitres 4* et *5*, il est apparu que la description de l'hydrodynamique locale en régime turbulent était nécessaire pour caractériser les interactions entre agrégats tourbillonnaires et agrégats bactériens. Ainsi, les objectifs de ce *Chapitre 6* seront d'analyser l'écoulement, de mesurer finement les champs de vitesse et de caractériser localement les propriétés de l'écoulement turbulent que sont l'énergie cinétique turbulente  $k$  et sa vitesse de dissipation par unité de masse  $\varepsilon$  au sein du bioréacteur. Au final, les interactions agrégats tourbillonnaires-agrégats bactériens seront définies par l'estimation locale de l'échelle spatiale de Kolmogorov ( $\lambda_K$ ) par le biais de  $\varepsilon$  et l'estimation du rapport entre  $\lambda_K$  et la taille moyenne des agrégats bactériens pendant la culture. Cette étude mettra en œuvre l'utilisation d'une technique expérimentale et celle d'une méthode numérique que sont respectivement :

- ✓ La Vélocimétrie par Images de Particules (PIV) ;
- ✓ La Mécanique des Fluides Numérique (CFD).

Au sein de ce chapitre, il s'agira également de vérifier et de comparer les capacités de la PIV et de la CFD à calculer et à prédire convenablement les propriétés de l'écoulement au sein du bioréacteur agité mécaniquement. Concernant la PIV, il faudra aussi déterminer si la résolution spatiale ainsi que le nombre d'images sont suffisants, alors que pour la CFD, le choix du modèle de turbulence et la définition du maillage devront être particulièrement étudiés car la cuve agitée du bioréacteur opère dans une gamme de nombre de Reynolds qui peut s'étendre entre  $2,2 \cdot 10^3$  et  $1,1 \cdot 10^4$ , c'est-à-dire à la limite inférieure du régime turbulent.

Ce *Chapitre 6* a été soumis au *Chemical Engineering Journal*. De plus, les principaux résultats ont été présentés sous la forme d'une communication orale au cours du congrès mondial CHEMREACTOR-23 (23<sup>th</sup> International Conference on Chemical Reactors) qui s'est déroulé à Gand (Belgique) du 5 au 9 novembre 2018.

## Characterization of the local hydromechanical stress through experimental and numerical analysis of hydrodynamics under dark fermentation operating conditions

B. Chezeau<sup>1,2</sup>, A. Danican<sup>1,2</sup>, J.P. Fontaine<sup>1,2</sup>, Ch. Vial<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, LabEx IMobS<sup>3</sup>, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

### Abstract

In mechanically stirred tanks, turbulent flow conditions have already been shown to impair biohydrogen production through dark fermentation even when the dimensionless Reynolds number ( $Re$ ) is between  $10^3$  and  $10^4$ . The aim was, therefore, to investigate the local hydrodynamic conditions encountered by bacterial aggregates in a fully baffled 2-L bioreactor equipped with a double stage Rushton turbine in which dark fermentation had already been extensively studied. Both experimental and numerical tools (namely, Particle Image Velocimetry and Computational Fluid Dynamics) were applied to analyze the flow pattern and determine the main features of the turbulent flow. Experiments and simulations involved two levels of viscosity and three levels of agitation speed, corresponding to  $Re$  between  $2.2 \cdot 10^3$  to  $1.1 \cdot 10^4$  and power requirements  $P/V$  between 0.6 and 87 W/m<sup>3</sup>. A good agreement between simulated and experimental data was achieved, including velocity, turbulent kinetic energy and turbulent dissipation rate. Comparing the size of bacterial aggregates to Kolmogorov length scale, experimental and numerical results demonstrated that bacterial aggregates could be exposed to potentially damaging hydromechanical stress under turbulent flow in the vicinity of the impeller when  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  and that this region rapidly expanded to the whole bioreactor when  $Re$  increased, which could explain the rapid fall of biohydrogen production vs.  $Re$  in the turbulent flow regime.

**Keywords:** Biohydrogen; Dark fermentation; Turbulent flow; Hydromechanical stress; CFD; PIV.

## **6.1 Introduction**

The world energy consumption of fossil fuels is still rising, mainly because of the growth of global population (Rahman *et al.*, 2016). The international community nearly unanimously acknowledges that this critical situation harms the environment, and also exhausts too rapidly the limited fossil fuel reserves. Since a few decades, several international agreements and many national policies in the world have encouraged the development and use of clean renewable energy sources because these are able to reduce the release toxic of pollutants as well as greenhouse gas emissions, and to prevent climate change, while being turned towards a more sustainable future (Jarunglumlert *et al.*, 2018).

Hydrogen (H<sub>2</sub>) is one of the most promising alternative fuels for the near future because it can be used as a versatile energy carrier and its combustion produces only steam water as a by-product. In addition, it exhibits a high energy efficiency with a lower heating value of 120 kJ/kg (Eker and Erkul, 2018). Many processes and technologies have been developed to produce H<sub>2</sub>, including electrochemical, thermochemical and biological pathways. But every technology presents severe drawbacks, resulting from either scientific, technical, or economic issues. For example, the electrochemical and thermochemical processes are known to be very expensive; biological processes are kinetically slower, but their advantages are to be cheaper, simple to implement, while various organic solid waste (Chairattananokorn *et al.*, 2009, Feng *et al.*, 2010, Noblecourt *et al.*, 2018, Salem *et al.*, 2018) and wastewater (Li and Fang, 2007, Li *et al.*, 2012, Tawfik *et al.*, 2015, Estevam *et al.*, 2018) can be used as substrates. Dark fermentation (acidogenic fermentation), one of the biological processes able to produce hydrogen, is thus a promising way. It is an anaerobic process operated without light-source where organic substrates are converted into organic acids, solvents, carbon dioxide, and biohydrogen by heterotrophic and facultative anaerobes.

So, the implementation of the dark fermentation process at the industrial scale has gained interest in the last decade, but further work is still necessary to achieve process sustainability. Indeed, biohydrogen production can be carried out at higher rate and lower cost by playing on several factors, usually divided into two groups: the biotic and abiotic parameters. On the one hand, the biotic parameters mainly include the microbial community (Danko *et al.*, 2008) and the effects of its metabolites (Ciranna *et al.*, 2014). The abiotic parameters, on the other hand,

encompass the effect of the physicochemical properties such as pH (Zhao and Yu, 2008, de Gioannis *et al.*, 2014) and temperature (Lin *et al.*, 2008, Wang and Wan, 2008), the substrate concentration and type (Ginkel and Sung, 2001, Eker and Sarp, 2017), and the biohydrogen partial pressure (Junghare *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2012), but also the parameters related to bioreactor design. A lot of work can be found in the literature concerning the respective effects of pH, temperature, and substrate, but mixing, and gas-to-liquid mass transfer which derive from bioreactor design have been far less extensively studied (Trad *et al.*, 2016). Mixing efficiency is the key in order to achieve the homogenization of local concentrations of the nutrients and to avoid inhibition by organic acids and pH, but mixing can also improve heat transfer and liquid-solid mass transfer when granular or biofilm sludge is involved (Trad *et al.*, 2016, 2017a). At the same time, mixing must enhance liquid-to-gas mass transfer to promote fast biogas desorption, which prevents process inhibition due to H<sub>2</sub> supersaturation in the liquid phase (Zhang *et al.*, 2013), and avoids pH decrease resulting from the accumulation of dissolved CO<sub>2</sub> that could directly induce metabolic switch or inhibit the microbial activity (Rodriguez *et al.*, 2006). Various methods are available to promote biogas desorption: mechanical stirring is the most common, but the injection of a carrier gas such as nitrogen (Beckers *et al.*, 2015), or the use of a vacuum pressure controller connected to a pump mounted at the headspace to control the pressure in the bioreactor (Lee *et al.*, 2012) have also been reported. However, these techniques have not received general acceptance because nitrogen injection dilutes the biogas, which requires further costly purification, while vacuum pressure increases the risk of accidental admixing of oxygen in the bioreactor. But the main drawback of mechanical mixing is high power requirements, which must be limited to about  $P/V = 10 \text{ W/m}^3$  to maintain economic suitability of anaerobic processes (Lindmark *et al.*, 2014; Trad *et al.*, 2016). Among the possible strategies to enhance mixing, increasing agitation speed in mechanically-stirred fermenters is thus limited by economic aspects, so that the choice of the number and type of impellers (*i.e.* the off-bottom and the inter-impeller clearance in multistage impeller designs) must be optimized to find a trade-off between mixing efficiency and mechanical power input. All these design parameters exhibit a significant impact on the flow pattern in the bioreactor. Assessing the comparative efficiency of impeller designs usually requires the estimation of the volumetric power input, the 95% mixing time, the volumetric mass transfer coefficient, and in bioreactors, an estimation of the hydromechanical stress applied locally to the microorganisms (Lebranchu *et al.*, 2017).

To assess the hydromechanical stress encountered by microorganisms, two ways are available: experimental methods able to measure the hydrodynamic features of the flow can be used, such as Particle Image Velocimetry (PIV), but numerical tools such as Computational Fluid Dynamics (CFD) can also be applied to simulate the flow field. At the moment, only few studies applied these methods to the analysis of the hydrodynamics in bioreactors devoted to biohydrogen production. For example, PIV was used to analyze the central vortex shape in gas-liquid flows and the velocity field in single-phase or two-phase flows (Montante *et al.*, 2013, Montante and Paglianti, 2014, Trad *et al.*, 2017a, 2017b), the bubble size distribution (Chu *et al.*, 2016), the strain rate magnitude, and the turbulent kinetic energy  $k$  (Trad *et al.*, 2017a, 2017b). On the other hand, CFD was also used to estimate the mixing time (Trad *et al.*, 2017a), the velocity field of the liquid phase (Ding *et al.*, 2010, Niño-Navarro *et al.*, 2016, Trad *et al.*, 2017a, 2017b), the strain rate magnitude and the turbulent kinetic energy  $k$  (Ding *et al.*, 2010, Trad *et al.*, 2017a, 2017b), and the turbulent dissipation rate  $\varepsilon$  (Trad *et al.*, 2017b). The Kolmogorov length scale  $\lambda_K$  under which the viscous forces become predominant over inertial forces on the basis of Kolmogorov's theory of isotropic turbulence can also be deduced from the viscosity  $\mu$  and the density  $\rho$  of the fluid, and from  $\varepsilon$ , as follows:

$$\lambda_K = \left( \frac{\mu^3}{\rho^3 \varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (6.1)$$

Various methods have been proposed to assess the influence of hydromechanical stress on bacteria. These have been summarized by Collignon *et al.* (2010) for human cells, and they include, roughly, the comparison of  $\lambda_K$  with the characteristic size of microcarriers or granules in the bioreactor, the definition of a maximum volume-average or local value of  $\varepsilon$ , or of a maximum shear rate or strain rate magnitude above which microorganisms are significantly affected by hydromechanical stress.

In a recent work, Chezeau and Vial (2019) pointed out that hydrogen production potential was strongly impaired when turbulent flow conditions were established in a stirred tank using a dual-impeller design as soon as  $Re > 1000$ . Hydrogen production was shown to decrease steeply when the Reynolds number increased. To explain these trends, they compared the mean size of biomass granules ( $D_b$ ) measured using laser light scattering ( $D_b \approx 200 \mu\text{m}$ ) and showed that this

decrease was steeper when the average Kolmogorov length scale  $\langle \lambda_K \rangle$  derived from power input  $P/V$  reached  $\langle \lambda_K \rangle / D_b < 1$ , where:

$$\langle \lambda_K \rangle = \left( \frac{V}{P} \cdot \frac{\mu^3}{\rho^2} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (6.2)$$

They finally assumed that turbulent shear stress could potentially impair biohydrogen production, but this neglected the spatial distribution of turbulent features which can considerably vary within the tank (Wernersson and Trägårdh, 1999a, 1999b).

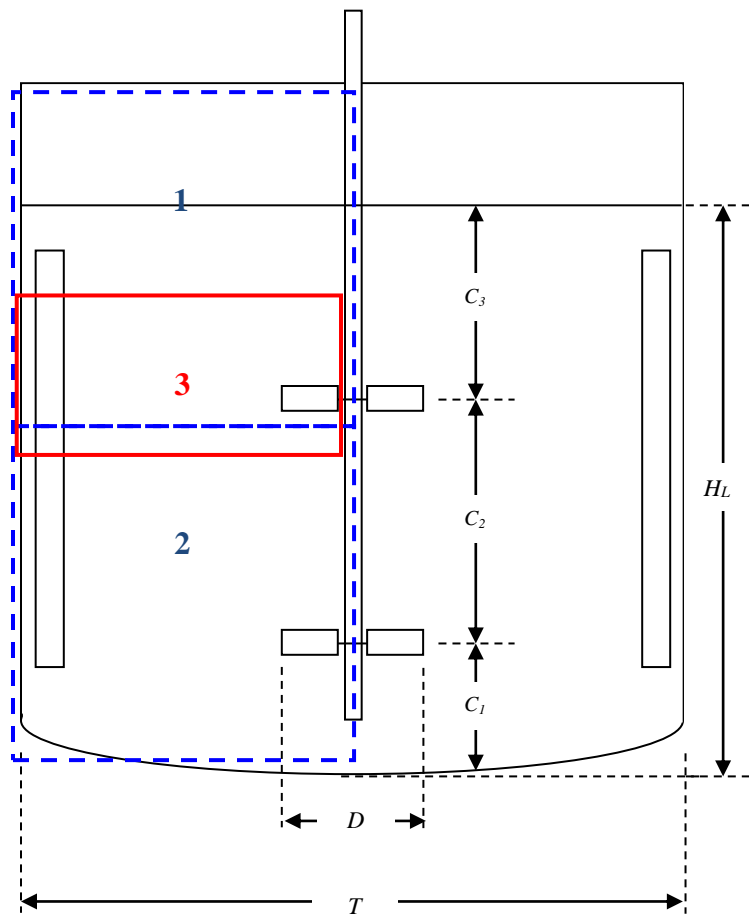
Therefore, the objective of this work is to investigate and evaluate both experimentally and numerically the local turbulent flow in the agitation and the mixing conditions of acidogenic fermentation, together with their evolution *vs. Re* in relation to the macroscopic evolution of biohydrogen production potential. Two techniques of two-component PIV (2D-2C-PIV), namely classical PIV and time-resolved PIV (TR-PIV) were used to reach either higher spatial, or temporal resolutions. In parallel, CFD simulations were driven using RANS (Reynolds-Averaged Navier-Stokes) equations with several variants of the  $k - \varepsilon$  turbulence model for closure. Finally, the spatial distributions of  $k$ ,  $\varepsilon$  and  $\lambda_K$  obtained by both methods were critically compared to experimental data and discussed in relation to their volume-average values and the evolution of biohydrogen production.

## 6.2 Materials and methods

### 6.2.1 Stirred tank bioreactor

All the experiments were conducted in a 2-L working volume reactor. This consisted of a transparent borosilicate glass, cylindrical, hemispherical-bottom and baffled tank. The tank diameter was  $T = 130$  mm and the clear liquid height was  $H_L = 160$  mm. This mechanically-stirred bioreactor was equipped with a dual-stage impeller device consisting in two six-blade Rushton disk turbines (RT) mounted on the shaft of the impeller (RT diameter  $D = 55$  mm). The off-bottom clearance  $C_1$ , the inter-impeller clearance  $C_2$ , and the distance between the top impeller and the free surface  $C_3$  were 25, 85 and 50 mm, respectively. This low  $C_1/D$  ratio was necessary to avoid the settling of biomass in the hemispherical region of the tank in the dark fermentation process, while the upper RT enhanced simultaneously mixing and liquid-to-gas

mass transfer at mid-height in the bioreactor and gas disengagement in the region of the free surface. A sketch of the experimental set-up is displayed in **Figure 6.1**. The impeller was driven clockwise using a variable-speed electric motor (Eurostar 60 Control, IKA®-Werke GmbH, Germany). Four longitudinal baffles (width  $T/10$ ) were mounted perpendicularly in the cylindrical section of tank walls. It is important to note that a part of the reactor was overlapped by the baffles and by two rings that maintained the baffles at the top and the bottom of the tank: so, a few regions of the tank could not be captured by PIV measurements, but the advantage was that the bioreactor geometry was identical both in PIV and culture experiments.



**Figure 6.1.** Geometry of the stirred tank and vertical planes observed by the camera in 2D-PIV measurements; regions 1 and 2 with classical PIV, and region 3 with TR-PIV.

The agitation and mixing conditions of acidogenic fermentation under established turbulent flow were derived from the work of Chezeau and Vial (2019) and are summarized in **Table 6.1**. These corresponded to a range of Reynolds number  $Re$  from  $2.2 \cdot 10^3$  to  $1.1 \cdot 10^4$  and of

power input  $P/V$  between 0.6 and 87 W/m<sup>3</sup> by varying the viscosity  $\mu$  and the rotation speed  $N$  of the impeller, respectively. Viscosity was changed to account for the variability of substrate properties in culture conditions by adding polyalkylene glycols (PAG) to distilled water because PAG could not be used as a substrate by the microbial consortium in the dark fermentation process.

**Table 6.1.** Experimental conditions (viscosity, rotation speed),  $Re$  number, and measured power input from Chezeau and Vial (2019).

Rotation speed $N$ (rpm)	Dynamic viscosity $\mu$ (Pa.s)	% PAG (v/v)	Reynolds number $Re$	Power input $P/V$ (W/m <sup>3</sup> )
40	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0	$2.2 \cdot 10^3$	0.6
120	$2.5 \cdot 10^{-3}$	5	$2.4 \cdot 10^3$	17
200	$2.5 \cdot 10^{-3}$	5	$4.0 \cdot 10^3$	82
120	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0	$6.7 \cdot 10^3$	18
200	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0	$1.1 \cdot 10^4$	87

### 6.2.2 PIV measurements

The local hydrodynamics was analyzed in the agitation and mixing conditions of acidogenic fermentation in the conditions of **Table 6.1**. Experiments were carried out in single-phase flow because the maximum biogas production rate reported in the cultures was 5 L/h, *i.e.* 0.042 vvm, which corresponded to a gas hold-up lower than 1%. The two-component Particle Image Velocimetry technique (2D-2C PIV) was applied. First, measurements were performed in the vertical plane using this classical PIV technique with an area of interest from the free surface to the bottom of the reactor. To increase spatial resolution, this area was divided in two regions (denoted 1 and 2 in **Figure 6.1**) in which images were recorded separately. A monochrome double-shutter CCD camera (QE-X270D, PCO AG, Germany) able to capture images pairs up to 6 Hz with a resolution of 1392×1040 pixels<sup>2</sup> equipped with a 23-FM-25-SP lens (Tamron, Japan) was used and controlled by the Camware<sup>®</sup> V.3.17 software (PCO AG, Germany). A Nd:YAG compact RayPower laser (2 W, emission wavelength 532 nm, from Dantec Dynamics SA, Denmark) was operated in the dual pulse mode to form the light sheet. The camera and the laser were computer-controlled and synchronized using the EG<sup>®</sup> 1  $\mu$ s device and the EG<sup>®</sup> V.3.47 software (RD-vision, France). At least 8,000 image pairs were recorded.



Then, experiments were conducted using the time-resolved PIV (TR-PIV) technique with an area of interest (denoted 3 in *Figure 6.1*) at the neighboring of the top impeller to increase both the spatial and temporal resolution of the method, and measure more accurately velocity and turbulence features in the selected area. A high-speed FPS 1000HD remote camera (*TSMCCL*, UK) able to capture images (1280×720 pixels<sup>2</sup>) at 1000 Hz was used with the same lens as above. The camera offered global shutter and 256 Go embedded memory. Continuous laser illumination was applied, and at least 16,000 images were recorded.

In both cases, the tank was immersed in a square vessel filled with distilled water for reducing the measurement errors due to optical distortion. The vertical laser plane was placed in front of the nearest baffle, passing through the shaft of the impeller. Cameras were placed perpendicularly to the laser plane for image recording. The seeding particles were silver-coated hollow glass spheres of 10 μm diameter and 1040 kg/m<sup>3</sup> density (*Dantec Dynamics SA*, Denmark) that were assumed to follow nearly perfectly the flow.

The two mean velocity components of the flow ( $u_r$  and  $u_z$ ) in the illuminated plane were estimated using the free software *PIVLab* (V.1.43) which is a free *Matlab*<sup>®</sup> toolbox (*The MathWorks*, USA) developed by Thielicke and Stamhuis (2014). Fast Fourier transform cross-correlation was applied for the analysis of image pairs, which were divided in several interrogation area (IA). The dimensions of the IA were 32 pixels<sup>2</sup> with 50% overlap for the first pass and 16 pixels<sup>2</sup> for the second pass; corresponding to a spatial resolution of the velocity fields of 1.1 and 0.45 mm for the images of the classical PIV and TR-PIV, respectively. The turbulent properties of the flow, *i.e.* the turbulent kinetic energy  $k$  and the turbulent kinetic energy dissipation rate  $\varepsilon$  were then derived.  $k$  is defined as the portion of kinetic energy due to the velocity fluctuations that provides an additional mixing mechanism due to turbulent dispersion (Gabriele *et al.*, 2009). This may be derived from the Root Mean Square (RMS) velocity field values in a cartesian geometry, as follows:

$$k = \frac{1}{2} \left( \overline{u'^2_x} + \overline{u'^2_y} + \overline{u'^2_z} \right) \quad (6.3)$$

In 2D-PIV, only two fluctuating components, *i.e.* the RMS velocity components,  $\overline{u'^2_r}$  and  $\overline{u'^2_z}$  can be obtained and  $k$  can be deduced using the assumption of statistical isotropy for turbulence and the RMS velocity field values in the plane derived from the experiments.

$$k = \frac{3}{4} \left( \overline{u'^2_r} + \overline{u'^2_z} \right) \quad (6.4)$$

The turbulent kinetic energy dissipation rate  $\varepsilon$  is a key parameter in stirred reactor and its values have strong influence on the performance of the process (Delafosse *et al.*, 2011). It is defined as the rate of viscous dissipation of mechanical energy in the turbulent motion and can be deduced from the turbulent velocity gradients, as follows:

$$\varepsilon = \frac{\mu}{\rho} \left\{ \begin{aligned} &2 \left( \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial y} \right)^2} + 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial z} \right)^2} \right. \\ &\left. + \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial z} \right)^2} + 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial z} \right)^2} + 2 \left( \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial y} \right) \left( \frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)} + \overline{\left( \frac{\partial u'_x}{\partial z} \right) \left( \frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)} + \overline{\left( \frac{\partial u'_y}{\partial z} \right) \left( \frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)} \right) \right\} \quad (6.5)$$

As previously described, the three velocity components are needed, while 2D-PIV measurements only provide two velocity components; so,  $\varepsilon$  could be deduced from PIV data using the assumption of isotropic turbulence, as follows:

$$\varepsilon = \frac{\mu}{\rho} \left\{ 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_r}{\partial r} \right)^2} + 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial z} \right)^2} + 3 \overline{\left( \frac{\partial u'_r}{\partial z} \right)^2} + 3 \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial r} \right)^2} + 2 \overline{\left( \frac{\partial u'_z}{\partial r} \frac{\partial u'_r}{\partial z} \right)} \right\} \quad (6.6)$$

The shortcoming of this approach is that the spatial resolution of the measurements should be close to the Kolmogorov length scale (about 100–200  $\mu\text{m}$ ), but a part of this work has been devoted to analyze how this experimental limitation can be circumvented through TR-PIV.

### 6.2.3 Computational simulations

Numerical simulations based on Computational Fluid Dynamics (CFD) were conducted to investigate the single-phase flow in the mechanically stirred tank as a function of rotation speed and liquid viscosity. The commercial software package *Phoenix*<sup>®</sup> from *CHAM Ltd.* (UK) is based on the volume of fluid method which converts partial differential equations to algebraic equations by discretizing them into mesh. The SIMPLEST algorithm was used to solve the RANS equations coupled to turbulence closure for a single-phase incompressible fluid. An Intel Core i7 PC computer (6-cores, 12 threads) was used for parallel computations.

A structured polar grid was defined using the cut-cell method in which the cells crossed by a solid wall received a specific numerical treatment. The Multiple Reference Frame (MRF)

method which is a useful approach to make a steady-state approximation for the fluid flows in baffled stirred tank was retained. The density and the size of the mesh are key factors that determine the accuracy of the solution; consequently, the analysis of the influence of mesh size was assessed by investigating the effect of the grid size between 150,000 and 1,200,000 cells. Several variants of the  $k - \varepsilon$  turbulence model were compared: namely, the Realizable (REAL), Chen-Kim (CK), Yakhot-Orszag (RNG), Murukami-Mochida-Kondo (MMK), and Kao-Lauder (KL)  $k - \varepsilon$  models, were tested to compare their ability to predict turbulent features at low  $Re$ . Initial conditions corresponded to a fluid at rest under gravity. Moreover, the following considerations were taken into account to specify the solution of the mathematical model: steady state, turbulent and isothermal conditions were assumed; atmospheric pressure, clockwise rotation of the impellers and Newtonian fluid set at a constant density corresponding to the fluid properties of the digestate at 35°C. Finally, conventional slip-allowed and no-slip conditions were applied at the free surface and the rigid surfaces (*i.e.* walls, shaft, impellers and baffles), respectively. The SIMPLEST solver was used to solve the algebraic equations over overall controlled volume. Simulations usually stopped after 8,000 to 16,000 iterations when residuals were lower than  $10^{-4}$  and monitored torque and velocity variables did not significantly change anymore over time. RANS equations gave access to the mean Reynolds-averaged velocity vector  $U = (u_r, u_\theta, u_z)$ , the turbulent kinetic energy  $k$ , the turbulent dissipation rate  $\varepsilon$ , the turbulent viscosity, and the pressure field.

#### 6.2.4 Hydromechanical stress through turbulent flow

Kolmogorov's theory of isotropic turbulence in which  $k$  is distributed between turbulent eddies of different sizes can be used to define the turbulent flow and the level of the associated hydromechanical stress which can potentially damage the microorganisms. The dissipation rate of the turbulent kinetic energy  $\varepsilon$  derived from 2D-PIV measurements and CFD simulations were used to estimate the Kolmogorov length scale  $\lambda_K$  according to **Equation 6.2**.  $\lambda_K/D_b$  reflecting the local ratio between the smallest turbulent eddies and the mean size of bacterial aggregates ( $D_b$ ) was calculated to define the regions in which bacterial aggregates can interact with turbulent eddies, causing potentially hydromechanical damages. This allows to delineate the regions of the mechanically stirred tank in which the bacterial growth and metabolism for biohydrogen production can be potentially impaired. For theoretical comparison, the characteristic sizes of the

distribution of bacterial aggregates were compared to the spatial distribution of  $\lambda_K$  values using the  $\lambda_K/D_b$  ratio. These are, namely,  $D_b = 200 \mu\text{m}$  close to the median size of bacterial aggregates,  $D_b = 100 \mu\text{m}$  close to their minimum size, and  $D_b = 50 \mu\text{m}$  which corresponds to the maximum size of the peak emerging in particle size distribution when bacterial aggregates were submitted to ultrasonic treatment (Chezeau and Vial, 2019).

## 6.3 Results and discussion

### 6.3.1 Assessment of the numerical and optical methods

#### 6.3.1.1 Validation of PIV measurements

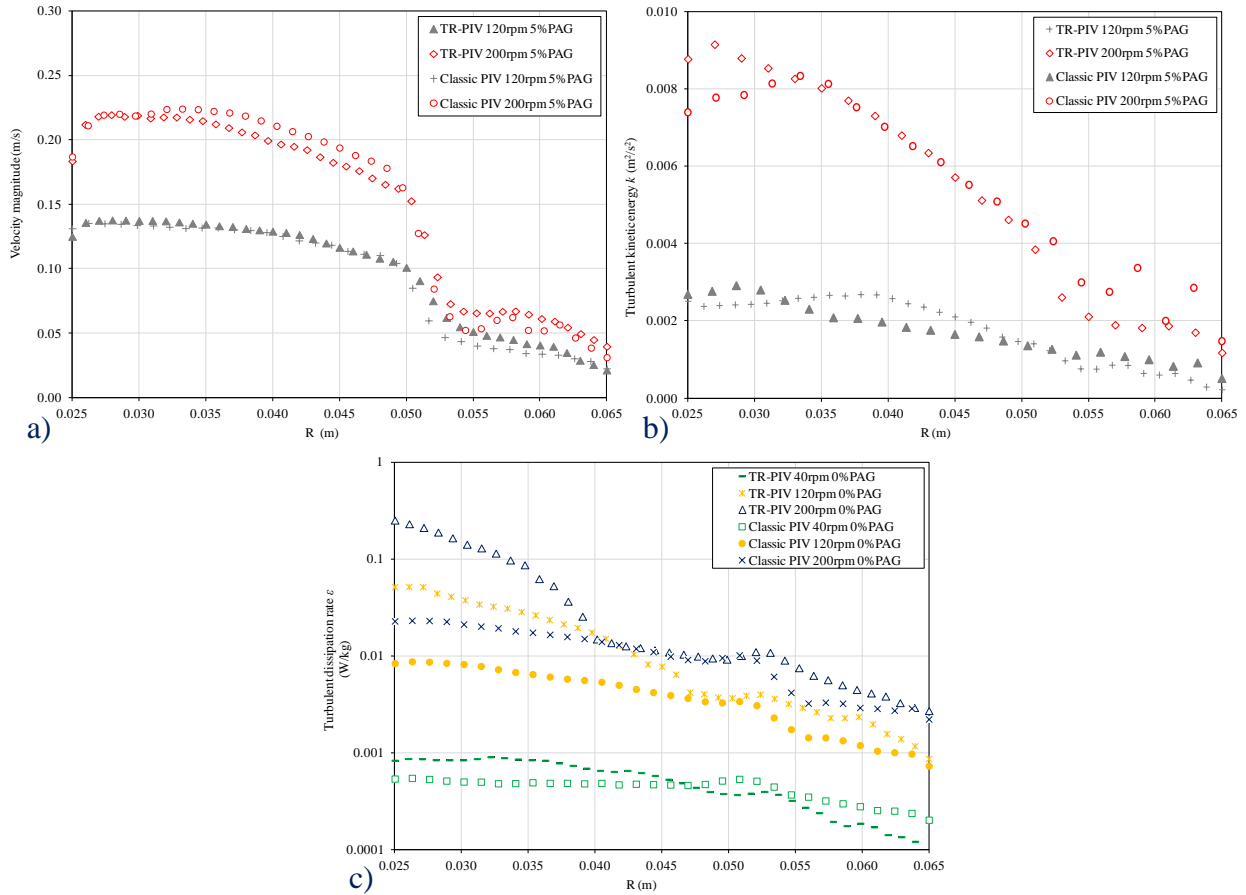
The accuracy of PIV data must be checked because the accurate estimation of turbulent features is a challenging task. First, data post-processing assumed isotropic turbulence, which is usually true only far from the impeller in mechanically stirred tanks (Escudié and Liné, 2006). Then, the spatial resolution of the velocity field should, theoretically, be smaller than the Kolmogorov length scale to prevent erroneous estimations of  $k$  and  $\varepsilon$ , but this can never be achieved because image recording and post-processing would be too costly (Collignon *et al.*, 2010). In practice, it must be ensured that the spatial resolution of the PIV measurements is sufficient to cover the main range of spatial scales of the spectrum of the turbulent kinetic energy that ranges from the integral length scale  $\Lambda$  to the Taylor microscale  $\lambda_{Taylor}$ . The order of magnitude of  $\Lambda$  was  $D/10$  (Hall *et al.*, 2005) and  $\lambda_{Taylor}$  was estimated from the fluctuating velocity component which can be approximated by:

$$\lambda_{Taylor} \approx \sqrt{\frac{10 \nu \Lambda}{1.1 \sqrt{u'^2}}} \quad (6.7)$$

In addition, the periodic flow component must be distinguished from turbulence in the fluctuating velocity field (Escudié and Liné, 2003). Thus, it is therefore important to make sure that the spatial and temporal resolutions provide access to reliable estimations of  $k$  and  $\varepsilon$ .

First, data obtained from classical PIV and TR-PIV are compared in **Figure 6.2**. These show a very good agreement on the radial profile of 2D mean velocity magnitude in the  $r - z$  plane (**Figure 6.2a**) and of turbulent kinetic energy  $k$  from **Equation 6.4** (**Figure 6.2b**) at mid-height of the top impeller for two values of rotation speed in the more viscous fluid. Differences

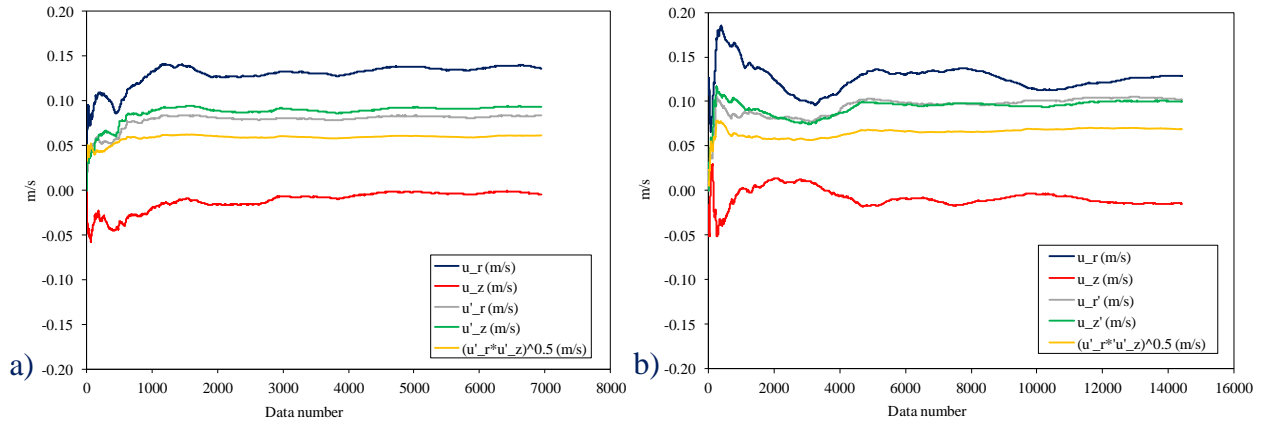
emerge, however, on the dissipation rate of turbulent kinetic energy  $\varepsilon$  from **Equation 6.6**: **Figure 6.2c** shows a good agreement near the wall, but discrepancies emerge closer to the impeller when rotation speed increases, which highlights that classical PIV may capture accurately turbulent features in the tank, except in the turbine flow discharge close to the impeller tip.



**Figure 6.2.** Comparison between classical PIV and TR-PIV data, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane: 2D velocity magnitude at two rotation speeds for the viscous fluid (5% PAG) (a); turbulent kinetic energy  $k$  at two rotation speeds for the viscous fluid (5% PAG) (b); turbulent dissipation rate  $\varepsilon$  at three rotation speeds for water (0% PAG) (c).

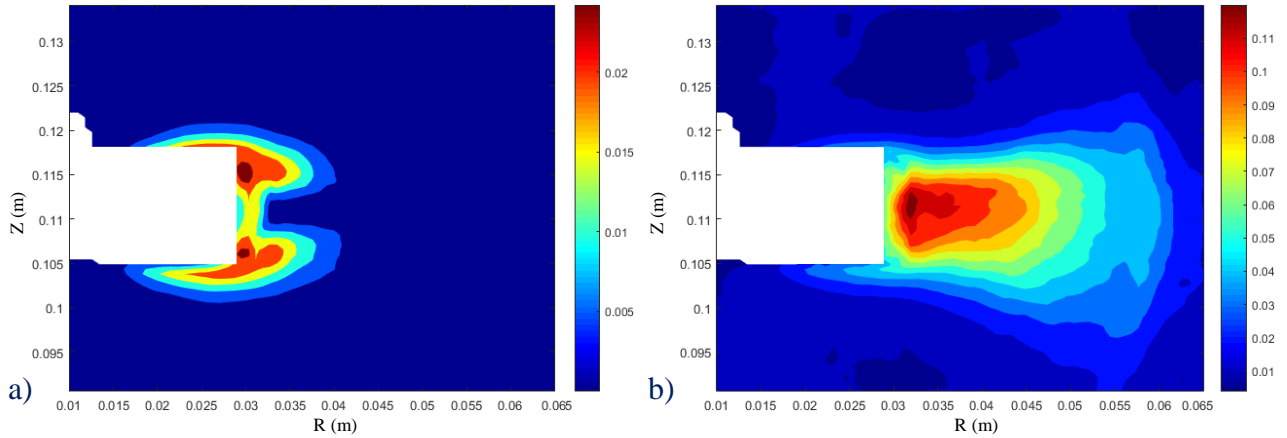
Typical examples of the statistical convergence of the data are displayed in **Figure 6.3**. These examples, not exactly at the same position, but in the same region just below the jet of the upper impeller, display that not only mean velocity components, but also RMS velocities tend to a constant value with the number of images treated for both devices. A key point in this figure is that the assumption of turbulence isotropy appears to be validated, as shown by the comparison between  $u'_r$ ,  $u'_z$ , and  $\sqrt{u'_r u'_z}$  in each subfigure. Surprisingly, the mean velocity components

needed more data to reach a stable or a slightly oscillating value than the three fluctuating components.



**Figure 6.3.** Comparison of statistical convergence between classical PIV (a) and TR-PIV data (b) based on the mean radial  $u_r$  and axial  $u_z$  mean velocity and on the turbulent terms of the stress tensor  $u'_r$ ,  $u'_z$ , and  $\sqrt{u'_r u'_z}$ .

The comparison between the apparent turbulent flow and the organized periodic motion of the impeller can be analyzed from **Figure 6.4** which displays the results of the triple decomposition between the mean, periodic and purely turbulent components of the total kinetic energy used by Escudié and Liné (2003). This figure shows that the organized contribution is important only close to the blade, as expected from the literature. The maximum local ratio between the organized and the total  $k$  value lies about 10%, so that the influence of the periodic flow on  $k$  and  $\varepsilon$  has been neglected for further calculations in this work. In addition, the values of the distribution of the ratio between the Taylor microscale estimated from the radial  $\overline{u'^2_r}$  and axial  $\overline{u'^2_z}$  velocity fluctuating component, and the spatial resolution of the 2D-PIV measurements were about 8 for the more viscous fluid, so always superior to 1 (**Equation 6.7**). This highlights that the spatial resolution of the 2D-PIV measurements provides access to reliable estimations of  $k$  and  $\varepsilon$  for the five turbulent flow conditions of **Table 6.1**.



**Figure 6.4.** Comparison between the kinetic energy contribution of periodic motion (a) and of the purely turbulent kinetic energy (b) ( $m^2/s^2$ ) from TR-PIV data in the  $r - z$  plane ( $N = 200$  rpm and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s).

As a conclusion, reliable velocity measurements have been obtained in the tank, allowing robust estimation of the turbulent features of the flow, except in the region of the bottom impeller where the ring maintaining the baffles prevents a precise observation of the discharge of the bottom turbine. CFD may therefore be helpful to analyze the flow in this region.

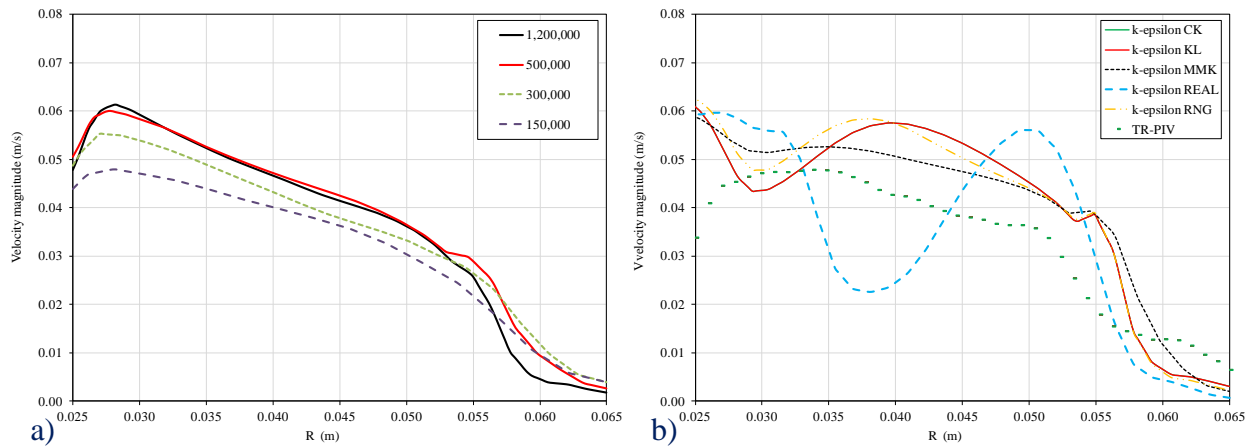
### 6.3.1.2 CFD simulations

The validation of CFD calculations involves the analysis of grid independency, and then the choice of a proper closure for turbulence modeling. These two key factors must be considered for the robustness of the flow field prediction. In this study, the Reynolds number corresponding to the experimental conditions varied between  $2.2 \cdot 10^3$  and  $1.1 \cdot 10^4$ . For this range of experimental conditions, turbulent flow prevails, as pointed out experimentally by Chezeau and Vial (2019) through decolorization experiments, but conventional turbulence models used in RANS simulations, such as the  $k - \varepsilon$  two-equation model may fail to predict accurately turbulence properties when  $Re$  is so close to the transition region.

**Table 6.2.** Tangential  $\theta$ , radial  $R$ , and axial  $Z$  number of cells in the grid.

$\theta$	$R$	$Z$	Approximate total number of cells
180	65	102	1,200,000
120	58	72	500,000
102	43	61	300,000
90	33	52	150,000

Concerning the influence of the mesh size for checking polar grid independency, four structured polar meshes from 150,000 to 1,200,000-cell grids were studied by varying the tangential  $\theta$ , radial  $R$  and axial  $Z$  number of cells (**Table 6.2**). As an illustration, the profile of the mean velocity in the  $r - z$  plane, estimated from radial  $u_r$  and axial  $u_z$  velocity components  $\sqrt{u_r^2 + u_z^2}$ , at mid-height of the upper impeller discharge ( $Z = 11$  cm) obtained with the Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  model is displayed in **Figure 6.5a** for the four grids just ahead of a baffle; the data corresponds to an impeller rotation speed of 40 rpm and a digestate viscosity of  $9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s ( $Re = 2.2 \cdot 10^3$ ). It emerges that underestimated velocity values were observed with 150,000 and 300,000 cells, while the values close to the impeller and in the bulk tend to stabilize above 500,000 cells. Grid independency was achieved with 1,200,000 and 500,000-cell grids; thus, the mesh size of 500,000 cells has been retained for simulations because it allowed smaller computation time. It must be pointed out that the 1,200,000-cell grid still provides different values from the 500,000-cell grid close to the baffle, as shown by **Figure 6.5a**, due to the presence of small vortices leading to small dead zones induced by the baffles that need finer grids to be resolved. In practice, this level of details is not necessary in this work and the grid with 500,000 cells has been used for further calculations. Same conclusions were made for all the closure models.



**Figure 6.5.** Comparison of the predicted 2D velocity magnitude, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane: as a function of grid size using Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  model ( $N = 40$  rpm and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s) (a); as a function of  $k - \varepsilon$  model variant ( $N = 40$  rpm,  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa.s, grid size = 500,000 cells) (b).



Further simulations were focused on the influence of the  $k - \varepsilon$  turbulence model under the same conditions of rotation speed, viscosity and grid size, which correspond to  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ , *i.e.* the condition at which the  $k - \varepsilon$  models are the most susceptible to fail. **Figure 6.5b** displays a comparison between the Realizable, Chen-Kim, RNG, MMK and Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  models for the same profile as in **Figure 6.5a**. As it can be seen, different trends are observed with the Realizable  $k - \varepsilon$  model with a minimum when  $R$  is about 0.0375 m, while the velocity values reported with the four other models exhibit a shape without any minimum. The comparison with data extracted from TR-PIV shows that this minimum is not observed. Consequently, a selection between the four last models had to be performed on the basis of the convergence (stabilization of the values), the residuals (numerical error) and the comparison between CFD data. From these criteria and **Figure 6.5b**, the Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  model was selected for further simulations because it had the advantage to better approach PIV data, and because it exhibited a reasonable computation time and rapid convergence. It must be pointed out that discrepancies between CFD simulations and experimental data could still be observed close to the baffle and very close to the impeller paddle because in these regions, the tangential contribution of the flow due to either the paddle rotation, or to the small dead zones induced by baffles became important, so that the loss-of-correlation due to out-of-plane motion in PIV measurements could not be neglected any more. However, except in these regions, **Figure 6.5b** highlights that the Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  turbulence model displays the best agreement between CFD and PIV data. This is confirmed by **Figure 6.6** which compares the mean velocity,  $k$  and  $\varepsilon$  radial profiles between CFD and PIV data for two values of  $Re$  ( $2.4 \cdot 10^3$  and  $6.7 \cdot 10^3$ , respectively); simulations and experiments are very close in terms of 2D velocity magnitude, except in the region of the baffle, as already mentioned. Similarly, the radial profiles of turbulent kinetic energy and of the turbulent dissipation rate observed by TR-PIV are correctly predicted, while classical PIV provides a smoother curve than CFD and even than TR-PIV for  $\varepsilon$  in the region of the impeller discharge. The Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  model has, therefore, been retained for further calculations in this work. Detailed comparison between simulations and experiments on turbulence features are reported in the next section.

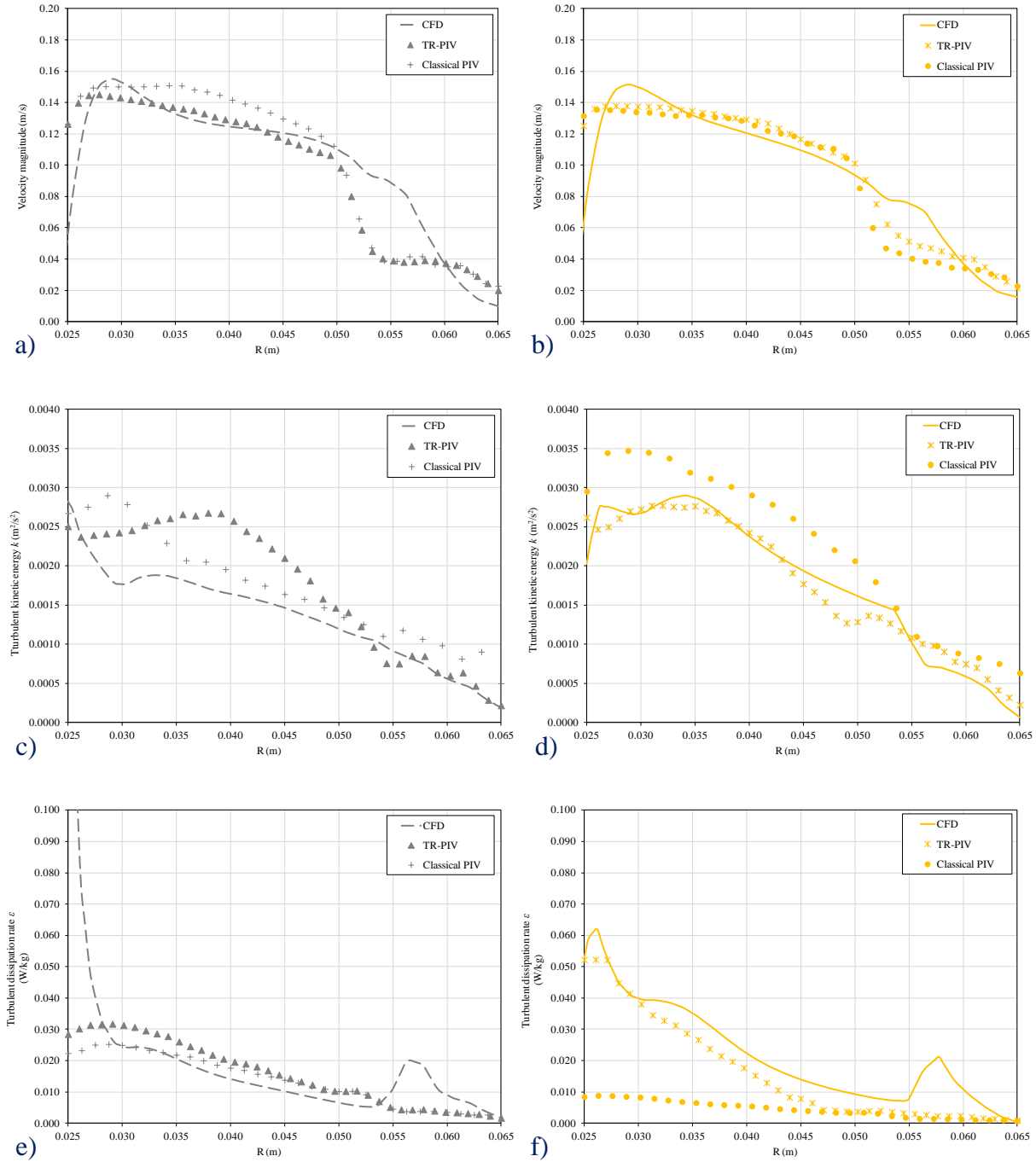


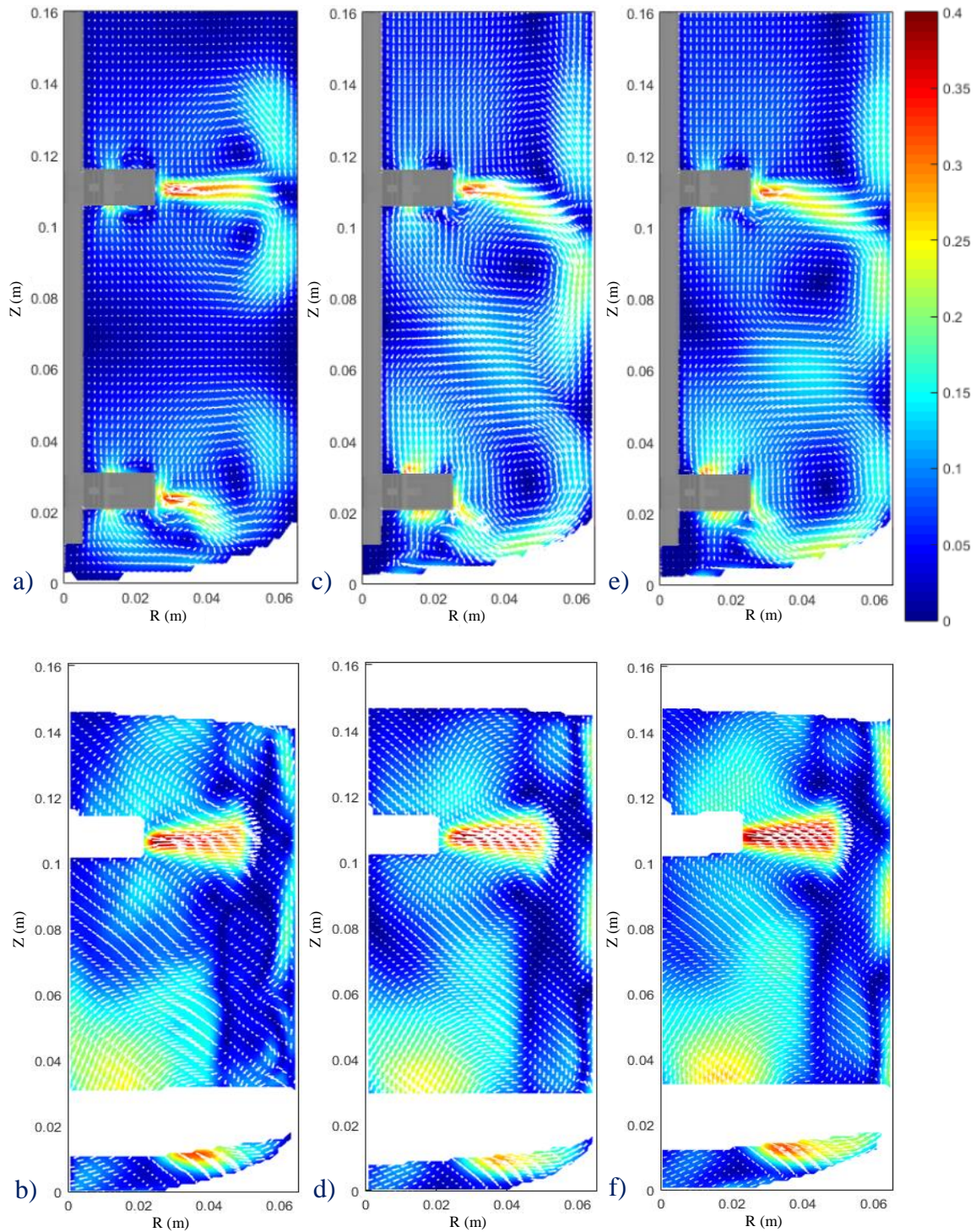
Figure 6.6. Comparison between CFD data, classical PIV and TR-PIV data, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane for  $N = 120$  rpm: 2D velocity magnitude (a: 0% PAG; b: 5% PAG); turbulent kinetic energy  $k$  (c: 0% PAG; d: 5% PAG); turbulent dissipation rate  $\epsilon$  (e: 0% PAG; f: 5% PAG).

### 6.3.2 Analysis of the flow field

#### 6.3.2.1 Flow macrostructures

Dual impellers based on two Rushton turbines of same diameter have already been studied in flat-bottomed baffled tanks and cover three main typical flow patterns: namely, the parallel, merging, and diverging flows (Micale *et al.*, 1999, Wernersson and Trägårdh, 1999a, 1999b). Similar results have been obtained in an unbaffled tank with a spherical bottom by Trad *et al.* (2017a) and the same trends are expected in this paper with a spherical-bottomed baffled stirred tank. The PIV and CFD normalized 2D velocity magnitude contours in the vertical  $r - z$  plane presented in **Figure 6.7** show that with  $C_1/H_L = 0.16$ , a diverging flow emerges; in this figure, data is normalized by the tip velocity  $u_{tip} = \pi ND$ . This is characterized by three contrarotative ring vortices from the bottom to the top of the tank close to the wall, including a double ring flow structure at the discharge of the top impeller which impinges the wall horizontally and is then divided into a descending and an ascending flow stream. Conversely, the lower impeller promotes only one ascending ring vortex near to the wall. Actually, a fourth region, below bottom impeller, should also be considered, which can be clearly seen both in CFD and PIV data in **Figure 6.7**. CFD simulations highlight that with increasing  $Re$  number from  $2.2 \cdot 10^3$  to  $4.0 \cdot 10^3$ , the discharge flow of the bottom turbine becomes more diverging, deviating from horizontal direction, and then reaches a stable direction at higher  $Re$ . The interaction between the descending recirculation loop of top impeller and the ascending recirculation loop of the bottom impeller also increases at the same time. This trend is, however, less marked in PIV data than in CFD. This kind of behavior results from the difference between the two techniques. Indeed, as previously highlighted, the velocity components used with the 2D-PIV technique are based on the time-average values extracted from the recording of 8,000 to 16,000 images, while the velocity components deduced from CFD simulations were estimated through stationary calculations by averaging the results from several positions of the turbine paddles relatively to the baffles. In addition, from PIV contour plots, a distinct effect of the baffle in the background appears in **Figure 6.7** in the low-velocity regions of loops, which cannot be seen in RANS CFD simulations. This stems probably from the RANS assumptions, especially when coupled to MRF approach, which filter out the temporal evolution of the flow and cannot capture secondary flow

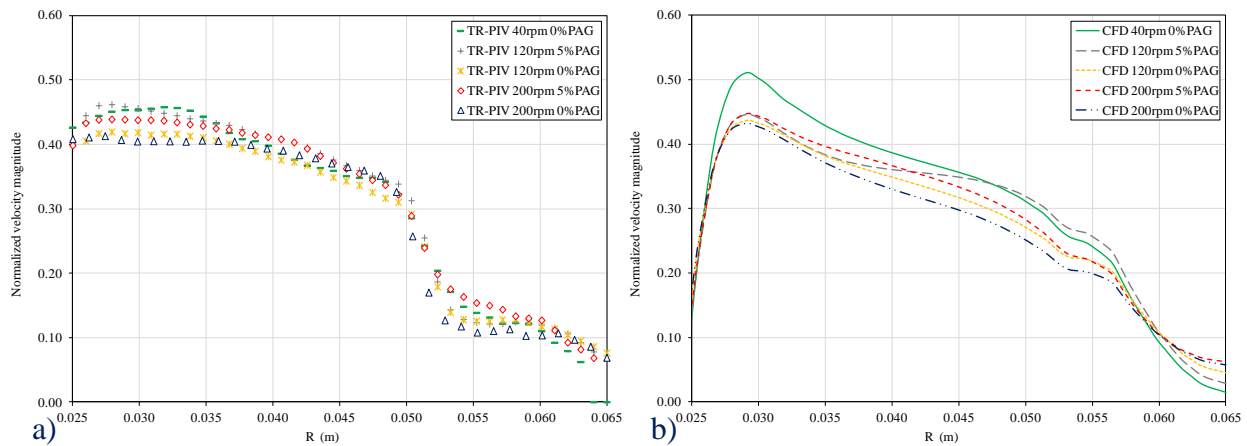
structures. But another possible reason may be the tangential component of the flow, unseen by 2D PIV, which could be non-negligible in these regions.



**Figure 6.7.** Comparison of the 2D normalized velocity magnitude contours between CFD (a, c, e) and classical PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f).



Contrary to the lower impeller, the flow in the region of the top impeller does not seem significantly affected by the increase in  $Re$ . This is clearly confirmed by **Figure 6.8a** that displays the profiles of the normalized velocity for the five  $Re$  values at mid-height of the turbine paddle in the same vertical plane as in **Figure 6.6**. The same conclusion can be made from **Figure 6.8b** that compares velocity profiles from the paddle tip to the wall at mid-height of the paddle, but when this is located at  $45^\circ$  from the baffle without averaging. Despite the experimental error, all the curves nearly superimpose both in **Figure 6.8a** measured with TR-PIV and in **Figure 6.8b** from CFD simulations that cover both the cases of time-average data in a fixed plane, and of MRF approach in a fixed geometry, respectively.

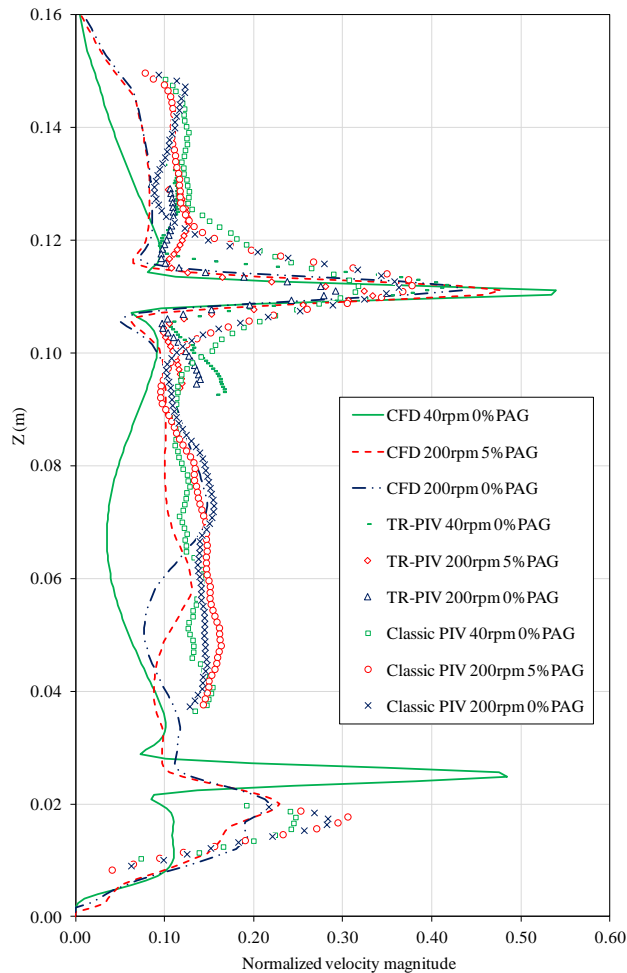


**Figure 6.8.** Comparison of 2D normalized velocity radial profiles in the  $r - z$  plane: at mid-height of the top impeller for time-average TR-PIV data (a); at mid-height of the top impeller at fixed angle between paddle and baffle for CFD data (b).

This conclusion is also supported by **Figure 6.9** which displays the axial profile of normalized 2D velocity. In this case, classical PIV, TR-PIV and CFD data are compared for three values of  $Re$  that cover the range studied in this work (from  $2.2 \cdot 10^3$  to  $1.1 \cdot 10^4$ ). A rough agreement is achieved, except that both PIV techniques slightly underestimate the maximum velocity in the region of the top impeller, and that classical PIV, due to the lower spatial resolution in comparison to TR-PIV, widens the velocity peak corresponding to the flow discharge of this turbine. In addition, despite distortion due to the spherical bottom of the tank, the experimental velocity profile close to the bottom impeller is fairly approximated by CFD, except when  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ . The two-peak profile predicted by CFD at the lowest  $Re$  value is typical of a flow in which there is no interaction between the upper and the lower impellers, whereas the other profiles highlight a diverging flow, as observed by Trad *et al.* (2017a). It must

be pointed out that when  $Re = 2.4 \cdot 10^3$ , the flow and the velocity profiles predicted by CFD are similar to higher  $Re$  values, which points out a limitation of the RANS CFD model in this region at very low  $Re$  number when the geometry is complex, *i.e.* close to the spherical bottom.

However, despite these discrepancies, it can be concluded that when  $2.4 \cdot 10^3 < Re < 1.1 \cdot 10^4$ , CFD and PIV data fairly agree in terms of mean flow properties; but when  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ , only the region of the upper impeller can be correctly fitted by CFD data. Considering that the Kao-Lauder  $k - \varepsilon$  model has been used in a range of low  $Re$  values in which its applicability was questionable, these results delineate the region of validity of this model and demonstrate that it can be applied for further estimation of turbulence features. Similarly, TR-PIV has been shown to better capture the flow properties close to the impeller tip and has been preferred to classical PIV to analyze the turbulent flow features in the next section.



**Figure 6.9.** Comparison of the axial profiles of normalized 2D velocity magnitude in the  $r - z$  plane ( $r = 3$  cm;  $r/R = 0.46$ ) from classical PIV data, TR-PIV data and CFD data for  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ ,  $4.0 \cdot 10^3$  and  $1.1 \cdot 10^4$ .

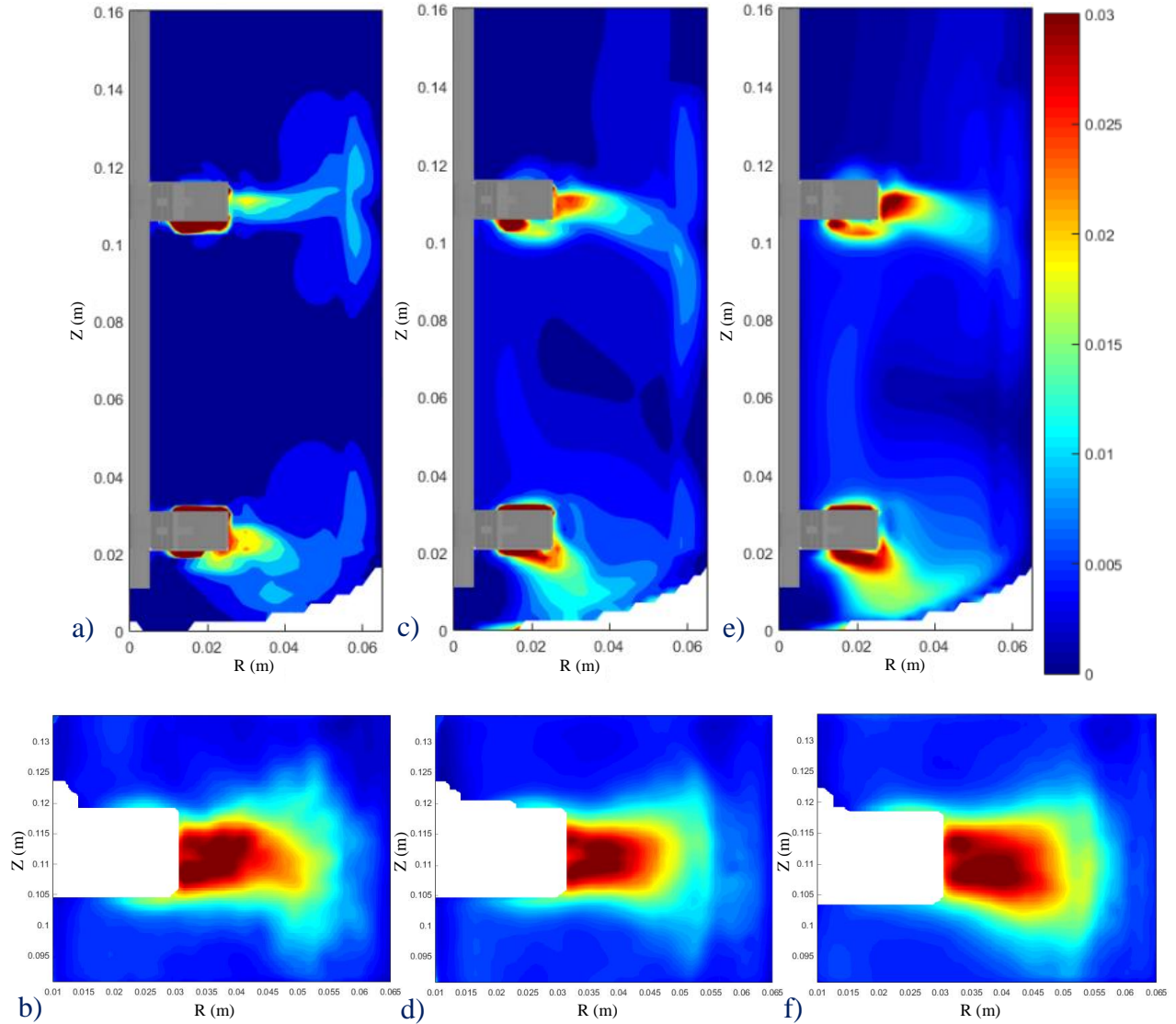
### 6.3.2.2 Turbulent properties of the flow

In order to estimate hydromechanical stress under turbulent flow conditions encountered during the process of biohydrogen production, the turbulence properties of the flow in the mechanically stirred bioreactor must be known because this stress is related to the spatial distribution of the turbulent kinetic energy  $k$  and its dissipation rate  $\varepsilon$ . As already mentioned, **Equation 6.4** and **Equation 6.6** can be used to derive  $k$  and  $\varepsilon$  from 2D-PIV velocity fields, through the assumption of isotropic turbulence, while  $k$  and  $\varepsilon$  obtained with CFD simulations may be used directly. In addition, the volume-average  $\varepsilon$  values,  $\langle \varepsilon \rangle$ , can be deduced from power input data expressed in  $\text{W/m}^3$  ( $P/V$ ) measured in a previous work (Chezeau and Vial, 2019), as follows:

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{P}{\rho V} \quad (6.8)$$

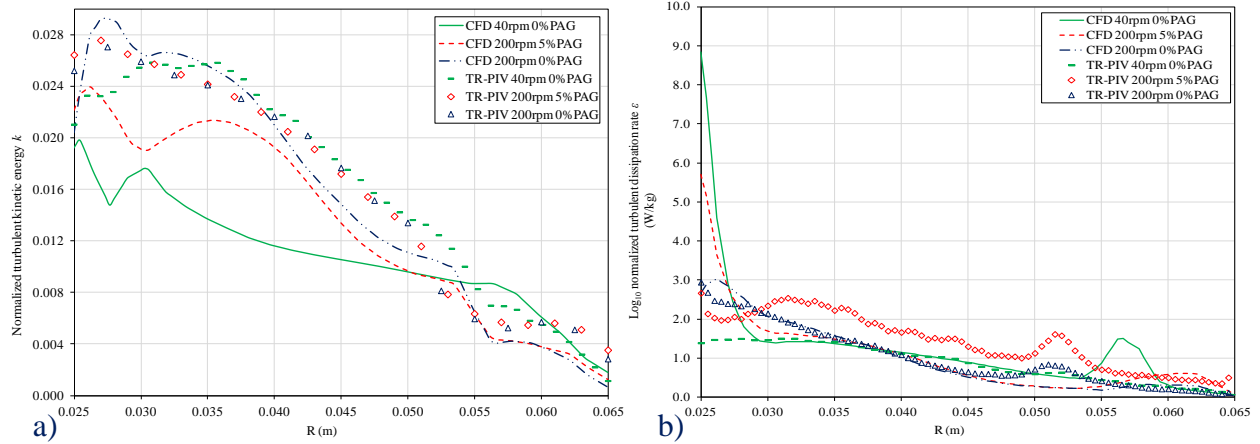
These have been appended in **Table 6.1**.

Concerning the spatial distribution of  $k$  deduced from CFD simulations and TR-PIV measurements (**Figure 6.10**), the values are far higher in the discharge impeller region than those in the bulk flow region, as expected (Wernersson and Trägårdh, 1999a, Trad *et al.*, 2017a, 2017b), even if this work investigates lower  $Re$  values than in the current literature. The  $k$  values normalized by  $u_{tip}^2$  remain, however, in the same range in the experiments and the simulations, with a peak about 0.03 with both methodologies close to the tip of the impeller and values above 0.01 in the discharge flow of the turbines, while they are below 0.005 in the bulk. For a more detailed comparison between PIV and CFD, normalized profiles have been plotted in **Figure 6.11a** for the upper impeller, highlighting the good agreement between experiments and simulations in the region of the top impeller, with higher discrepancy when  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ . In this last case, not only the interaction between the macrostructures seems underestimated, as shown in the previous section, but also the level of turbulent kinetic energy.



**Figure 6.10.** Comparison of the normalized turbulent kinetic energy  $k$  contours between CFD (a, c, e) and TR-PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f).

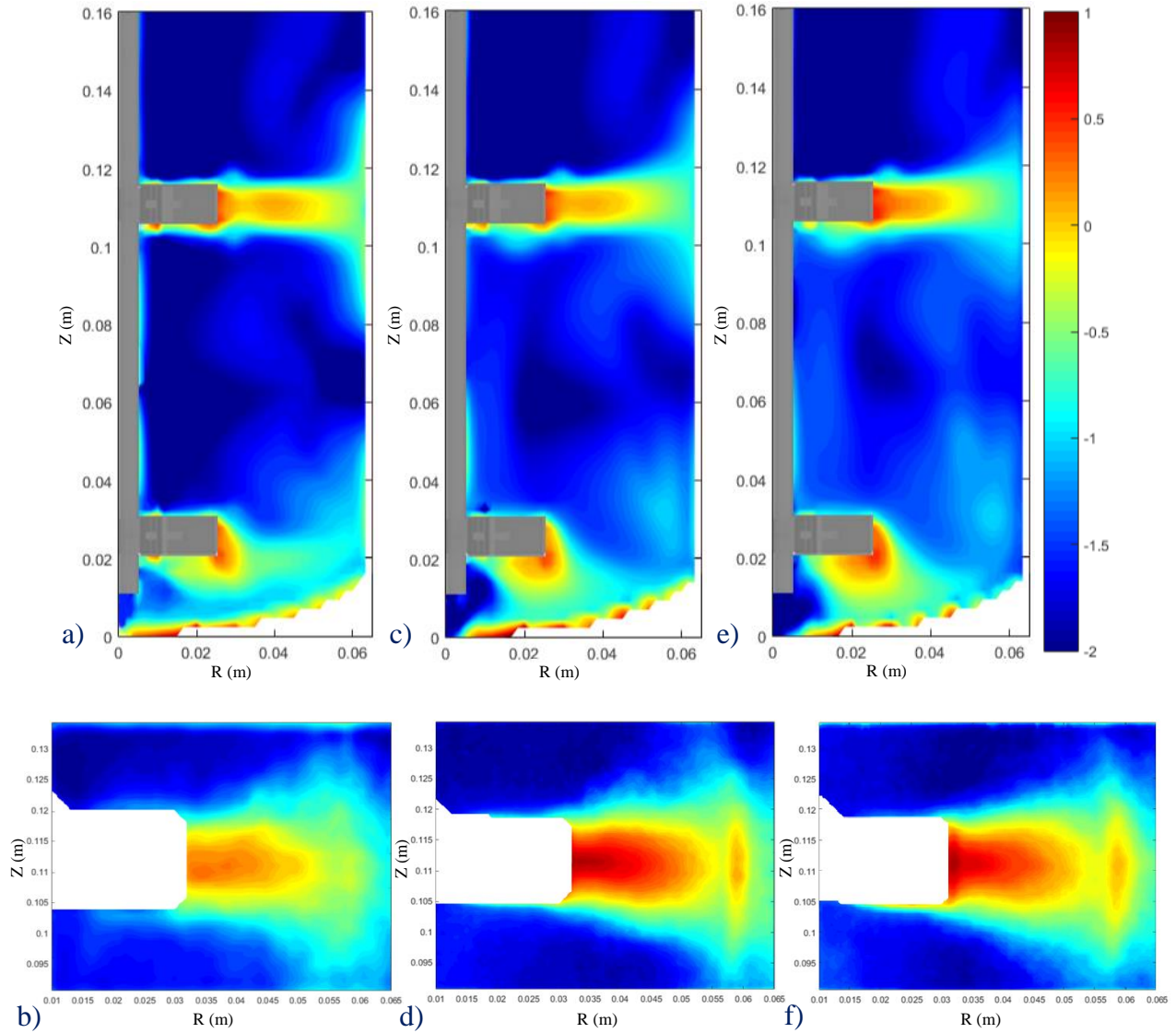




**Figure 6.11.** Comparison between CFD and TR-PIV data, based on the radial profiles at mid-height of the top impeller in the  $r - z$  plane: normalized turbulent kinetic energy  $k$  (a);  $\log_{10}$  of normalized turbulent dissipation rate  $\varepsilon$  (b) for  $Re = 2.2 \cdot 10^3$ ,  $4.0 \cdot 10^3$  and  $1.1 \cdot 10^4$ .

Concerning the spatial distribution of the dissipation rate of turbulent kinetic energy  $\varepsilon$ , it must be expressed in the log scale for the five turbulent flow conditions investigated in this study because this quantity varies between magnitude from  $10^{-5}$  to  $10 \text{ m}^2/\text{s}^3$  in CFD simulations and from  $10^{-3}$  to  $1 \text{ m}^2/\text{s}^3$  in PIV measurements. It must be pointed out that PIV data, due to size of the IA, cannot estimate values lower than  $10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}^3$ . Similarly, the highest values very close to the impeller cannot be captured by PIV, contrary to CFD where they can be grid-dependent in this region. However, predicted and measured normalized  $\varepsilon$  profiles in the flow discharge of the upper impeller,  $\varepsilon/\langle\varepsilon\rangle$ , with  $\langle\varepsilon\rangle$  from **Equation 6.8** and power input in **Table 6.1**, are very close, as illustrated by **Figure 6.11b** even if experimental and numerical errors due to derivation in **Equation 6.5** are accounted for. From CFD simulations (**Figure 6.12**), the spatial distributions of the normalized turbulent dissipation rate generated by the impellers at different  $N$  and  $\mu$  exhibit a similar shape and display the same order of magnitude in the region of the upper impeller where  $\varepsilon > 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}^3$ . In all configurations, the maximum values are observed at the impeller tip and in the impeller discharge stream, while minimum values are reported both in the inter-impeller region and above the upper impeller close to the axis, as expected (Wernersson and Trägårdh, 1999a, Trad *et al.*, 2017a, 2017b). Finally, both CFD and 2D-PIV can be considered as robust tools to estimate the turbulent kinetic energy dissipation rate  $\varepsilon$  close to the upper impeller. Thus, it can be assumed that CFD is enough accurate, *i.e.* similar to PIV, to deduce Kolmogorov length scale when this is susceptible to approach the size of bacterial aggregates, because this trend starts necessarily in the region of the impellers. In addition, CFD can provide data where PIV

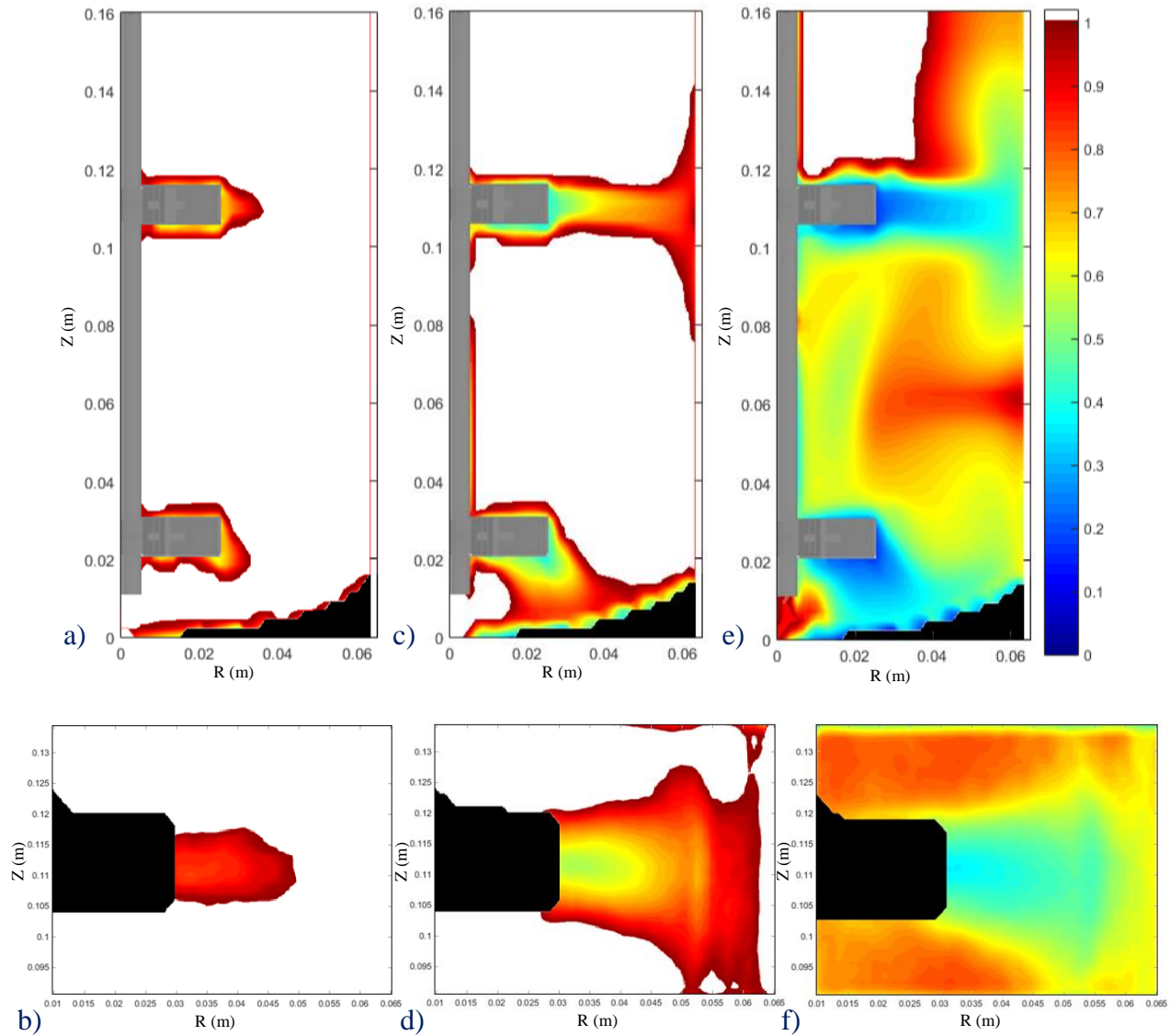
data cannot be captured, *e.g.* close to the lower impeller. As a result,  $\lambda_K$  value deduced from CFD has been used for further analysis in the next section.



**Figure 6.12.** Comparison of the  $\log_{10}$  normalized turbulent dissipation rate  $\epsilon$  contours between CFD (a, c, e) and TR-PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f).

### 6.3.3 Bacterial aggregates exposure to potentially damaging regions under turbulent conditions

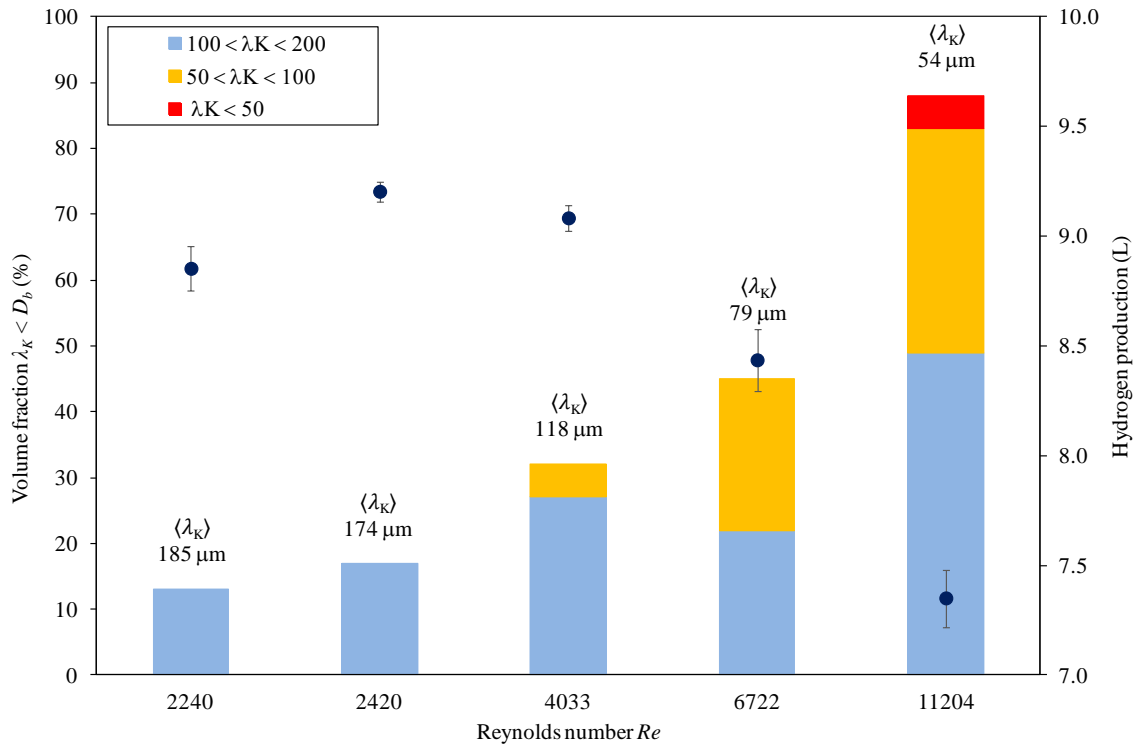
According to the Kolmogorov theory of isotropic turbulence, the turbulent kinetic energy in stirred tank bioreactors is distributed between turbulent eddies of various sizes ranging from few millimeters to about hundred micrometers. The Kolmogorov length scale  $\lambda_K$  represents the size of the smallest eddies of the turbulent flow which dissipate their kinetic energy by viscous heating before disappearing. To compare hydromechanical stresses and characterize bacterial aggregates exposure to potential damages for the five turbulent flows investigated in this study, statistics on the spatial distribution of  $\varepsilon$  from CFD simulations were used. In parallel, particle size analysis had been carried out using laser light scattering on the culture media. The results display a wide size distribution from less than 1  $\mu\text{m}$  to more than 300  $\mu\text{m}$  that measures all the particulate materials of the digestate. However, a peak emerges close to 200  $\mu\text{m}$  that can be attributed to bacterial aggregates because it is displaced towards smaller values when ultrasound treatment is applied. Thus,  $\lambda_K/D_b$  reflecting the local ratio between the smallest turbulent eddies and the mean size of microorganism aggregates ( $D_b$ ) was calculated in the  $r - z$  plane from CFD simulations. **Figure 6.13** presents a map of  $\lambda_K/D_b$  assuming  $D_b = 200 \mu\text{m}$ . According to this figure, the colored regions correspond to the point at which eddy size is inferior to the mean size of microorganism aggregates, *i.e.*  $\lambda_K/D_b < 1$ . As expected, potential damaging regions are encountered only near the impellers at low  $Re$ , and the  $\lambda_K/D_b$  ratio decreases as the Reynolds number increases in the tank, so that the regions where  $\lambda_K/D_b < 1$  expand to cover nearly the entire surface of the vertical plane when  $Re$  is  $1.1 \cdot 10^4$ . For comparison purpose, the ratio estimated from TR-PIV data has also been reported in **Figure 6.13**, highlighting the good agreement already mentioned between experiments and simulations in the region of the top impeller.



**Figure 6.13.** Comparison of the  $\lambda_K/D_b$  contours between CFD (a, c, e) and TR-PIV data (b, d, f) in the  $r - z$  plane for three  $Re$  numbers:  $Re = 2.2 \cdot 10^3$  (a, b);  $Re = 4.0 \cdot 10^3$  (c, d);  $Re = 1.1 \cdot 10^4$  (e, f).

To further analyze the interactions between microorganisms and turbulent eddies, the  $\lambda_K/D_b$  ratio was evaluated for the five flow conditions, varying the size of microorganism aggregates from 200 to 100  $\mu\text{m}$ , and finally to 50  $\mu\text{m}$ . The region between 100 and 200  $\mu\text{m}$  corresponds to the main range of the above-mentioned peak in the size distribution. The proportion of tank volume in the CFD simulations in which  $\lambda_K/D_b < 1$  is reported in [Table 6.3](#) for these three values of  $D_b$ , respectively. These are also displayed in [Figure 6.14](#) and confronted to biohydrogen production potential (Chezeau and Vial, 2019). This result highlights that the decrease in production potential arises when  $\lambda_K$  values lower than 100  $\mu\text{m}$  appear. Conversely, regions in which  $\lambda_K < 50 \mu\text{m}$  only emerge when  $Re$  is about  $10^4$  and so, cannot explain by

themselves, the decrease in biohydrogen production potential. A comparison between the distribution of  $\lambda_K$  values and  $\langle \lambda_K \rangle$  derived from power input in **Table 6.1** shows that about 40% of the tank volume exhibits  $\lambda_K$  values lower than 200  $\mu\text{m}$  when  $\langle \lambda_K \rangle$  is about 100  $\mu\text{m}$ , showing that the mean  $\lambda_K$  value derived by averaging local  $\lambda_K$  value and from torque measurements, respectively, do not fit. This agrees with the results from Delafosse (2008) in a stirred tank with only one Rushton turbine due to the contribution of regions far from the impeller flow discharge in which  $\langle \lambda_K \rangle$  clearly underestimated the spatial average value of  $\lambda_K$ . Finally, this highlights that the hydrogen production potential starts falling under turbulent flow conditions when  $120 \mu\text{m} < \langle \lambda_K \rangle < 170 \mu\text{m}$ , while it starts when  $\lambda_K$  values smaller than 100  $\mu\text{m}$  emerge. Thus, the comparison between the size of the bacterial aggregates and  $\langle \lambda_K \rangle$  constitutes a rough approximation of the intensity of interactions between microbial aggregates and turbulent eddies; so local measurements or CFD simulations are compulsory for a better estimation of turbulent properties because they can focus on the regions of the bioreactor where hydromechanical interaction can impair the process of biohydrogen production under turbulent flow by damaging the bacteria aggregates and increasing their need for maintenance.



**Figure 6.14.** Evolution of hydrogen production potential ( $\bullet$ ) as a function of  $\langle \lambda_K \rangle$  and the volume fraction where  $\lambda_K < D_b$  (size is in  $\mu\text{m}$ ).

**Table 6.3.** Volume fraction of the stirred tank in which  $\lambda_k/D_b < 1$  in the five turbulent flow conditions of this work from CFD simulations.

Rotation speed $N$ (rpm)	Dynamic viscosity $\mu$ (Pa.s)	Reynolds number $Re$	% volume $\lambda_k/D_b < 1$ $D_b = 200 \mu\text{m}$	% volume $\lambda_k/D_b < 1$ $D_b = 100 \mu\text{m}$	% volume $\lambda_k/D_b < 1$ $D_b = 50 \mu\text{m}$
40	$9.0 \cdot 10^{-4}$	$2.2 \cdot 10^3$	13	0	0
120	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^3$	17	0	0
200	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^3$	32	5	0
120	$9.0 \cdot 10^{-4}$	$6.7 \cdot 10^3$	45	23	0
200	$9.0 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^4$	88	39	5

## 6.4 Conclusions

In this study, the goal was to assess the exposure of microorganism aggregates to hydromechanical stress in a dual-stage mechanically-stirred bioreactor in the agitation and mixing conditions of the dark fermentation process, in order to explain why the biohydrogen production potential decreased under turbulent flow when  $Re$  increased. The methods applied consisted in measuring experimentally and predicting numerically the main features of the turbulent flow (namely, the turbulent kinetic energy  $k$ , the dissipation rate  $\varepsilon$ , and the Kolmogorov length scale  $\lambda_K$ ) in a range of  $Re$  number,  $2.2 \cdot 10^3 - 1.1 \cdot 10^4$  which had been seldom investigated in the literature. First, the methods were assessed. On the one hand, the respective influences of the  $k - \varepsilon$  turbulence model variant and of the mesh size on the predictions of the flow field were analyzed and the Kao-Launder  $k - \varepsilon$  model with a 500,000-cell grid were retained as a good trade-off in terms of accuracy and computation time. On the other hand, the accuracy of 2D-PIV data was evaluated according to the spatial resolution of the TR-PIV and classical PIV measurements. The two experimental techniques were able to provide reliable estimations of  $k$  and  $\varepsilon$ , even though only TR-PIV could provide an accurate estimation of  $\varepsilon$  close to the impeller tip, and PIV could not measure  $\varepsilon$  values lower than  $10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}^3$ . Finally, a good agreement between simulated and experimental data, including velocity magnitude,  $k$  and  $\varepsilon$  was achieved, even though RANS simulations were used and 3D estimations of  $k$  and  $\varepsilon$  were derived from 2D-PIV with the assumption of turbulence isotropy. Then, the Kolmogorov length scale was deduced from local  $\varepsilon$  values and confronted to the size of bacterial aggregates measured in culture media. The spatial distribution of the regions where the  $\lambda_K/D_b$  ratio was lower than 1 exhibited high



heterogeneity in the bioreactor, highlighting that power dissipation mainly proceeds in the region of the impellers and in their discharge flow. Despite the low power input (between 0.6 and 87 W/m<sup>3</sup>), the regions where  $\lambda_K < 200 \mu\text{m}$ , the size of the biggest aggregates, covered about 88% of the tank volume when  $Re = 1.1 \cdot 10^4$ , and the biohydrogen production potential was impaired when regions with  $\lambda_K < 100 \mu\text{m}$  appeared ( $Re = 4.0 \cdot 10^3$ ). Thus, these results confirm the assumption of Chezeau and Vial (2019) that explained the decrease in hydrogen yield and productivity in the dark fermentation process due to turbulence by the hydrodynamic interaction between bacterial aggregates and turbulent eddies. But this work also highlights the shortcomings of the estimation of the Kolmogorov length scale from power input, as  $\langle \lambda_K \rangle$  underestimates the volume-average value of  $\lambda_K$  and does not account for the spatial heterogeneity of eddy size.

Even though this work brings new information in the field of bioreactor hydrodynamics because it involves a dual-stage impeller at low- $Re$  turbulent conditions, and also because it directly confronts these results to fermentation experiments, many questions remain open, in particular on the exposure frequency of bacterial aggregates to hydrodynamic stress which is a key parameter to account for. This involves the analysis of the circulation of bacterial aggregates in the tank which is facing several issues. While unsteady RANS simulations or Large-Eddy-Simulation (LES) based on Smagorinsky model are powerful tools to describe this circulation, these are still far more computationally intensive, in particular LES which is usually presented as the best way to explore the temporal scales of the turbulent flow. In practice, the situation is not so clear for industrial bioreactors: for example, Haringa *et al.* (2018a, 2018b) have recently pointed the particular difficulty to predict accurately both mixing time and  $\varepsilon$  even using either sliding-mesh RANS approach or LES in dual-stage impeller stirred tanks. Thus, an alternative is to use an experimental way based on an optical trajectography or a PTV (Particle Tracking Velocimetry) device involving multiple particles with properties (size, density, *etc.*) that approach those of bacterial aggregates, but these methods are still to develop in the future.

## Acknowledgements

LABEX IMobS<sup>3</sup> *Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions*, the French National Centre for Scientific Research (CNRS), Auvergne-Rhône-Alpes Regional Council and the European Funds of Regional Development (ERDF/FEDER) are gratefully acknowledged.

## Nomenclature

### List of symbols

$C_1$	Off-bottom clearance (m)
$C_2$	Inter-impeller clearance (m)
$C_3$	Distance between top impeller and free surface (m)
$D$	Impeller diameter (m)
$D_b$	Bacterial aggregates size ( $\mu\text{m}$ )
$H_L$	Liquid height in the bioreactor (m)
$k$	Turbulent kinetic energy ( $\text{m}^2/\text{s}^2$ )
$N$	Rotation speed (rpm)
$P$	Power input (W)
$Re$	Reynolds number
$T$	Bioreactor diameter (m)
$V$	Bioreactor volume ( $\text{m}^3$ )

### Greek letters

$\varepsilon$	Dissipation rate of the turbulent kinetic energy (W/kg)
$\Lambda$	Integral length scale ( $\mu\text{m}$ )
$\lambda_k$	Kolmogorov length scale ( $\mu\text{m}$ )
$\lambda_{Taylor}$	Taylor microscale ( $\mu\text{m}$ )
$\mu$	Dynamic viscosity (Pa.s)
$\nu$	Kinematic viscosity ( $\text{m}^2/\text{s}$ )



$\rho$  Fluid density (kg/m<sup>3</sup>)

*Abbreviations*

*CFD* Computational Fluid Dynamics

*CK* Chen-Kim model

*IA* Interrogation Area

*KL* Kao-Lauder model

*LES* Large Eddy Simulation

*MMK* Murukami-Mochida-Kondo model

*MRF* Multiple Reference Frame

*PAG* Polyalkylene glycols

*PIV* Particle Image Velocimetry

*PTV* Particle Tracking Velocimetry

*RANS* Reynolds-Average Navier-Stokes equations

*REAL* Realizable model

*RMS* Root Mean Square

*RNG* Yakhot-Orszag model

*RT* Rushton disk turbine

*TR-PIV* Time-Resolved Particle Image Velocimetry

*2D-PIV* Two-Component Particle Image Velocimetry

## **6.5 References**

- L. Beckers, J. Masset, C. Hamilton, F. Delvigne, D. Toye, M. Crine, P. Thonart, S. Hilgsmann (2015). Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochemical Engineering Journal*. 98, 18-28.
- P. Chairattananokorn, P. Penthamkeerati, A. Reungsang, Y.C. Lo, W.B. Lu, J.S. Chang (2009). Production of biohydrogen from hydrolyzed bagasse with thermally preheated sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 7612-7617.
- B. Chezeau, C. Vial (2019). Combined effects of digestate viscosity and agitation conditions on the fermentative biohydrogen production. *Biochemical Engineering Journal*. 142, 105-116.

- C.Y. Chu, H. Lo, Z.F. Wang (2016). Hydrodynamic properties in a hydrogen production fermenter using sugary wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 4455-4465.
- A. Ciranna, R. Ferrari, V. Santala, M. Karp (2014). Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 6391-6401.
- M.L. Collignon, A. Delafosse, M. Crine, D. Toye (2010). Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors: Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. *Chemical Engineering Science*. 65, 5929-5941.
- A.S. Danko, A.A. Abreu, M.M. Alves (2008). Effect of arabinose concentration on dark fermentation hydrogen production using different mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 4527-4532.
- A. Delafosse (2008). Analyse et étude numérique des effets de mélange dans un bioréacteur. Université Toulouse. Thèse. (*In french*).
- A. Delafosse, M.L. Collignon, M. Crine, D. Toye (2011). Estimation of the turbulent kinetic energy dissipation rate from 2D-PIV measurements in a vessel stirred by an axial Mixel TTP impeller. *Chemical Engineering Science*. 66, 1728-1737.
- G. de Gioannis, M. Friargiu, E. Massi, A. Muntoni, A. Poletini, R. Pomi, D. Spiga (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 20930-20941.
- J. Ding, X. Wang, X.F. Zhou, N.Q. Ren, W.Q. Guo (2010). CFD optimization of continuous stirred-tank (CSTR) reactor for biohydrogen production. *Bioresource Technology*. 101, 7005-7013.
- S. Eker, B. Erkul (2018). Biohydrogen production by extracted fermentation from sugar beet. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 10645-10654.
- S. Eker, M. Sarp (2017). Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42, 2562-2568.
- R. Escudié, A. Liné (2003). Experimental analysis of hydrodynamics in a radially agitated tank. *AIChE Journal*. 49, 585-603.
- R. Escudié, A. Liné (2006). Analysis of turbulence anisotropy in a mixing tank. *Chemical Engineering Science*. 61, 2771-2779.
- A. Estevam, M.K. Arantes, C. Andrigheto, A. Fiorini, E.A. Da Silva, H.J. Alves (2018). Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumonia* isolated from the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 4276-4283.
- X. Feng, H. Wang, Y. Wang, X. Wang, J. Huang (2010). Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 3058-3064.
- A. Gabriele, A.W. Nienow, M.J.H. Simmons (2009). Use of angle resolved PIV to estimate local specific energy dissipation rates for up- and down-pumping pitched blade agitators in a stirred tank. *Chemical Engineering Science*. 64, 126-143.
- S.V. Ginkel, S. Sung, J.J. Lay (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*. 35, 4726-4730.
- C. Haringa, R. Vandewijer, R.F. Mudde (2018a). Inter-compartment interaction in multi-impeller mixing: Part I. Experiments and multiple reference frame CFD. *Chemical Engineering Research and Design*. 136, 870-885.

- C. Haringa, R. Vandewijer, R.F. Mudde (2018b). Inter-compartment interaction in multi-impeller mixing: Part II. Experiments, sliding mesh and Large Eddy Simulations. *Chemical Engineering Research and Design*. 136, 886-899.
- T. Jarunglumlert, C. Prommuak, N. Putmai, P. Pavasant (2018). Scaling-up bio-hydrogen production from food waste: Feasibilities and challenges. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 634-648.
- M. Junghare, S. Subudhi, B. Lal (2012). Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by new isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 3160-3168.
- A. Lebranchu, S. Delaunay, P. Marchal, F. Blanchard, S. Pacaud, M. Fick, E. Olmos (2017). Impact of shear stress and impeller design on the production of biogas in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*. 245, 1139-1147.
- K.S. Lee, T.S. Tseng, Y.W. Liu, Y.D. Hsiao (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15556-15562.
- C. Li, H.H. Fang (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 37, 1-39.
- Y.C. Li, Y.F. Liu, C.Y. Chu, P.L. Chang, C.W. Hsu, P.J. Lin, S.Y. Wu (2012). Techno-economic evaluation of biohydrogen production from wastewater and agricultural waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15704-15710.
- C.Y. Lin, C.C. Wu, C.H. Hung (2008). Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 43-50.
- J. Lindmark, E. Thorin, R. Bel Fdhila, E. Dahlquist (2014). Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40, 1030-1047.
- G. Micale, A. Brucato, F. Grisafi (1999). Prediction of flow fields in a dual-impeller stirred vessel. *AIChE Journal*. 45, 445-464.
- G. Montante, F. Magelli, A. Paglianti (2013). Fluid-dynamics characteristics of a vortex-ingesting stirred tank for biohydrogen production. *Chemical Engineering Research and Design*. 91, 2198-2208.
- G. Montante, A. Paglianti (2014). Hydrodynamics of a model stirred anaerobic digester. *Chemical Engineering Transactions*. 38, 49-54.
- C. Niño-Navarro, I. Chairez, L. Torres-Bustillos, J. Ramirez-Muñoz, E. Salgado-Manjarrez, E.I. Garcia-Peña (2016). Effect of fluid dynamics on enhanced biohydrogen production in a pilot stirred tank reactor: CFD simulation and experimental studies. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 14630-14640.
- A. Noblecourt, G. Christophe, C. Larroche, P. Fontanille (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*. 247, 864-870.
- S.N.A. Rahman, M.S. Masdar, M.I. Rosli, E.H. Majlan, T. Husaini, S.K. Kamarudin, W.R.W. Daud (2016). Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 66, 137-162.
- J. Rodriguez, R. Kleerebezem, J.M. Lema, M.C. van Loosdrecht (2006). Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. 93, 592-606.

- A.H. Salem, R. Brunstermann, T. Mietzel, R. Widmann (2018). Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 43, 4856-4865.
- A. Tawfik, M. El-Qelish, A. Salem (2015). Efficient anaerobic codigestion of municipal food waste and kitchen wastewater for bio-hydrogen production. *International Journal of Green Energy*. 12, 1301-1308.
- W. Thielicke, E.J. Stamhuis (2014). PIVlab – Towards user-friendly, affordable and accurate digital particle image velocimetry in MALAB. *Journal of Open Research Software*. 2.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable Energy*. 98, 264-282.
- Z. Trad, C. Vial, J.P. Fontaine, C. Larroche (2017a). Mixing and liquid-to-gas mass transfer under digester operating conditions. *Chemical Engineering Science*. 170, 606-627.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2017b). Experimental and numerical investigation of hydrodynamics and mixing in a dual-impeller mechanically-stirred digester. *Chemical Engineering Journal*. 329, 142-155.
- J.L. Wang, W. Wan (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 5392-5397.
- E.S. Wernersson, C. Tragardh (1999a). Scale-up of Rushton turbine-agitated tanks. *Chemical Engineering Science*. 54, 4245-4256.
- E.S. Wernersson, C. Tragardh (1999b). Turbulence characteristics in turbine-agitated tanks of different sizes and geometries. *Chemical Engineering Science*. 72, 97-107.
- Y. Zhang, F. Zhang, M. Chen, P.N. Chu, J. Ding, R.J. Zeng (2013). Hydrogen supersaturation in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. *Applied Energy*. 109, 213-219.
- Q.B. Zhao, H.Q. Yu (2008). Fermentative H<sub>2</sub> production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. *Bioresource Technology*. 99, 1353-1358.

## Bilan

---

Dans ce chapitre, les objectifs étaient de vérifier et de comparer les capacités de la PIV et de la CFD à calculer et à prédire précisément les propriétés de l'écoulement turbulent au sein du bioréacteur mécaniquement agité. Il fallait également analyser l'écoulement local, mesurer les champs de vitesse et caractériser ses propriétés turbulentes. Enfin, les interactions agrégats tourbillonnaires-agrégats bactériens ( $\lambda_K/D_b$ ) devaient être déterminées. Les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- ✓ La précision des mesures PIV est suffisante pour caractériser l'écoulement turbulent au sein du bioréacteur. De même, le modèle de turbulence Kao-Launder avec un maillage polaire composé de 500.000 cellules apparaît être un bon compromis en termes de précision et de temps de calcul.
- ✓ Les outils de Vélocimétrie par Images de Particules et de Mécanique des Fluides Numérique sont des outils pertinents lorsqu'il s'agit d'étudier et de caractériser l'écoulement turbulent au sein du bioréacteur.
- ✓ Les résultats obtenus par PIV et CFD sont assez proches, que cela soit pour les vitesses moyennes ou les composantes caractéristiques de l'écoulement turbulent ( $k$ ,  $\varepsilon$  et  $\lambda_K$ ).
- ✓ La distribution spatiale du rapport  $\lambda_K/D_b$  montre que les zones d'exposition dans lesquelles ce rapport est inférieur à 1 et donc dans lesquelles les interactions entre agrégats tourbillonnaires et microorganismes peuvent affecter les agrégats bactériens s'étendent rapidement de la région du mobile à l'ensemble du réacteur quand le nombre de Reynolds augmente. Le régime turbulent présente donc un effet néfaste dès les faibles nombres de Reynolds.

Les approches expérimentales et numériques utilisées pour la description de la turbulence et la définition des régions potentiellement stressantes pour les bactéries du consortium en cours de fermentation peuvent être utilisées pour définir les conditions optimales pour la production de biohydrogène. Les perspectives de ce travail seront maintenant de développer et d'adapter un

système de trajectographie optique pour déterminer les fréquences d'exposition des agrégats bactériens à ces zones potentiellement stressantes.



# **Chapitre 7 : Développement d'un modèle ADM1 modifié**

---



## Préambule

---

Le modèle ADM1 (*Anaerobic Digestion Model N°1*) a été développé par un groupe interdisciplinaire de l'IWA (*International Water Association*) afin de modéliser et de simuler la dégradation des substrats organiques des eaux usées du procédé de digestion anaérobie. Afin de modéliser la bioconversion de matière organique en biogaz, il s'appuie sur un bilan de DCO (Demande Chimique en Oxygène) en prenant en compte les différentes étapes de la dégradation du substrat organique. Actuellement, la prédiction de la production de biohydrogène par le modèle ADM1 n'est pas satisfaisante. En effet, certaines espèces intermédiaires (lactate) et des produits finaux (éthanol) de la réaction ne sont pas pris en considération dans le bilan de DCO. De plus, l'hypothèse classique du modèle ADM1 selon laquelle le digesteur est parfaitement agité ne correspond pas nécessairement aux conditions réelles de culture. Dans ce contexte, les objectifs de ce chapitre seront d'améliorer le modèle existant en implémentant le lactate et l'éthanol dans le bilan de DCO et en évaluant leur impact sur les capacités de prédiction du modèle. De surcroît, il semble nécessaire d'inclure des modèles de mélange alternatifs afin de vérifier l'importance de l'homogénéisation du digestat en cours de fermentation sur les cinétiques, en débutant par exemple par le modèle non-idéal classique qui décrit le bioréacteur comme une cascade de cellules parfaitement agitées. Ces travaux impliqueront :

- ✓ D'ajuster les paramètres cinétiques du modèle ADM1 modifié à partir des résultats de fermentations réelles en culture batch.
- ✓ De valider le modèle cinétique modifié en prenant en compte les ions lactates comme intermédiaires réactionnels et l'éthanol en tant que produit final de la réaction.
- ✓ De vérifier la validité du modèle modifié en culture continue, avec ou sans le modèle de mélange.

Ce **Chapitre 7** a été soumis à l'*International Journal of Hydrogen Energy*. De plus, les principaux résultats ont été présentés sous la forme d'une communication orale et d'un poster, au cours de la conférence mondiale WHEC 2018 (*22<sup>nd</sup> World Hydrogen Energy Conference*) qui s'est déroulée à Rio de Janeiro (Brésil) du 17 au 22 juin 2018.

## Validation of a modified ADM1 model supplemented by a mixing model for the simulation of biohydrogen production through dark fermentation process

B. Chezeau<sup>1,2</sup>, J.P. Fontaine<sup>1,2</sup>, Ch. Vial<sup>1,2</sup>, A. Noblecourt<sup>1,2</sup>, G. Christophe<sup>1,2</sup>, P. Fontanille<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, LabEx IMobS<sup>3</sup>, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

### Abstract

The aim was to assess the effectiveness of a developed modified Anaerobic Digestion Model N°1 (ADM1) for the dark fermentation process in batch and continuous cultures using glucose as the substrate with a microbial consortium from wastewater treatment plant as inoculums. The modified ADM1 model accounts for metabolic products such as lactate and ethanol that are crucial during the process of fermentative hydrogen production. It also includes the biokinetic model in a mixing model with a variable number of tank-in-series ( $N_{bac}$ ) in order to replace the current assumption of a perfectly-mixed digester for continuous cultures. Kinetic and stoichiometric parameters were calibrated using experimental data obtained from batch experiments in a 2-L digester. The simulations demonstrated that the modified ADM1 was able to fit satisfactorily the evolution of the concentration of the main metabolites and to predict the gas flow rate of batch cultures after calibration. Continuous cultures were carried out with hydrodynamic residence time (HRT) between 4 and 12 hours. The simulation of continuous culture predicted very accurately experimental data in terms of digestate composition and gas flow rate when  $N_{bac} = 1$  without any change in the biokinetic model deduced from batch cultures. The parametric study as a function of  $N_{bac}$  highlighted that digester washout occurred at lower HRT than experimentally observed when the mixing model included two or more consecutive tank-in-series of equal volume. Finally, this study highlights the key role of lactate, ethanol and mixing conditions on the modeling of dark fermentation process for scale-up purpose.

**Keywords:** ADM1; Tank-in-series; Mixing; Lactate; Ethanol.

## 7.1 Introduction

In the world of living organisms, hydrogen is mainly considered as a highly reactive biochemical intermediates which enable the effective transfer of electrons between microbial species. In the industrial world, hydrogen is used as a reducing agent in chemicals, petrochemicals and food industries processes because of its reactive nature (Willquist *et al.*, 2012); but also as an energy carrier in fuel cells. The use of hydrogen as an energy carrier generates real interests from the scientific community over the last decade. Indeed, the energy consumption of the current world is dominated by fossil fuels (oil, gas and coal). Fossil fuels used due to industrial development and human activities lead to environmental contamination, while contributing to climate change. Therefore, alternative energy sources are required to solve these problems, including hydrogen. Today, there is an alternative and eco-friendly way for the hydrogen production which does not derived from fossil fuels: the dark fermentation process (Agator *et al.*, 2008). It is an anaerobic process where organic waste can be broken down by microorganisms, resulting in the production of hydrogen, carbon dioxide and the co-production of metabolites. It is a well known process because it derives from the anaerobic digestion process; but scale-up remains an issue; thus, robust multiscale approaches are still needed that account simultaneously for the intracellular kinetics, the mass transfer phenomena at the cell and the bubble scales, and mixing issues at the reactor scale.

Up to know, the main objectives of the used of modeling of the dark fermentation process are to analyze, improve and predict biohydrogen production. For this purpose, some empirical kinetics models were used to predict the hydrogen production, the substrate consumption, the hydrogen producing bacteria growth (HPB) and the soluble metabolite formations. They derive directly from an analysis of experimental observations without theoretical analysis. Generally, the use of kinetic models can provide useful information for the design, analyses and operation of the dark fermentation process. For example, some researchers have used the modified Gompertz model developed by Zwietering *et al.* (1990) to describe the hydrogen production. It is a simple model used to fit the cumulative hydrogen production and to estimate the kinetic parameters of the lag time  $\lambda$  and the maximum hydrogen production rate  $R_m$  (Lay *et al.*, 1998) using different inoculums and substrates in batch tests. This model is expressed as follows:

$$H = P \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{me}}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7.1)$$

where  $H$  is the cumulative hydrogen production (L),  $P$  the maximum hydrogen production (L) and  $t$  the incubation time (h).

The use of this model is practical but it cannot predict the kinetics of substrate consumption and metabolites formation during hydrogen production, and it has the disadvantage to be unapplied in continuous systems. Moreover, some kinetic models were proposed to describe the effects of different factors (namely, pH, temperature, substrate concentration, inhibitor concentration, dilution rate) on the rates of hydrogen production, substrate consumption, HPB growth and soluble metabolite production.

In parallel, such researchers have used semi-mechanistic models. They are data-driven models based on experiments but they also combine a physical description of some mechanisms with the need to tune the adjustable parameters. They can combine empirical substructures with mechanistic relationships in hybrid models (Trad *et al.*, 2016). The most popular one used and modified to describe the dark fermentation process is the Anaerobic Digestion Model N°1 (ADM1). The ADM1 was developed by the task group of the International Water Association (IWA) for describing the anaerobic digestion process of a perfectly-mixed digester (Batstone *et al.*, 2002). It describes the processes involved in the bioconversion of organic substrates (disintegration, hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis) into methane, carbon dioxide and inerts with metabolic intermediates (propionic, acetic and butyric acids) (Satpathy *et al.*, 2016). However, some limitations have been identified that challenge the applicability of ADM1 to non-methanogenic systems (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2006, Antonopoulou *et al.*, 2012, Trad *et al.*, 2016).

The most limitation parameters of the standard ADM1 are the use of a constant stoichiometry to describe metabolites production from carbohydrates fermentation. Consequently, the stoichiometric and kinetic constants must be modified depending to the substrate, this requires a calibration of the model. Penumathsa *et al.* (2008) applied a modified version of ADM1 to continuous biohydrogen production systems using a variable stoichiometry approach derived from experimental information.

The model ADM1 does not account for lactate and ethanol formation. It is considered in the standard model that these metabolites are quickly degraded and so they have a minor role during the process of anaerobic digestion while they have a significant impact during the dark fermentation process. Concerning the anaerobic digestion process, Soda *et al.* (2011) have implemented lactate and ethanol in a modified ADM1 with the breakdown of organic waste. Then, Thamsiriroj *et al.* (2012) and Hinken *et al.* (2014) have used the lactate for the modeling of mono-digestion of grass silage and the anaerobic digestion of starch wastewater, respectively. Danielson (2014) developed a modified ADM1 by implementing the lactate at oxidized or fermented states for the modeling of methane production from horse manure. Finally, Satpathy *et al.* (2016) used a modified ADM1 by implementing the lactate for the modeling of methane production from organic substrate mixture (starch, casein and canola oil). As for the dark fermentation process, Peiris *et al.* (2006) were the first ones to implement simultaneously the lactate and the ethanol as intermediate products of the process in the ADM1. Afterward, Ntaikou *et al.* (2009) applied modified ADM1 by the implementation of ethanol, to describe the biohydrogen production from glucose in batch and continuous cultures by the bacterium *Ruminococcus albus*. Willquist *et al.* (2012) developed modified ADM1 by adding lactate as intermediary of the process for the biohydrogen production (mixture of hydrogen and methane) during the fermentation of starch from wheat by a pure culture of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Modified ADM1 was also used by Penumathsa *et al.* (2008) by adding lactate as intermediary to describe the dark fermentation of the sucrose in a continuous culture. Finally, Antonopoulou *et al.* (2012) used a modified ADM1 by adding lactate and ethanol to predict the biohydrogen production from sweet sorghum in batch cultures.

Moreover, the assumption of a perfectly-mixed digester does not usually fit the actual mixing behavior in large tanks. For example, the liquid-solid system is treated as pseudo-homogeneous and a separated gas-phase is considered, which neglects potential solid segregation and the presence of bubbles in the liquid-phase accounted only through a volumetric mass transfer coefficient.

Finally, the focus of this work was to evaluate the effects of the implementation of lactate and ethanol compounds into a modified ADM1 on the ability of the model to fit dark fermentation experiments. ADM1 was extended to include lactate as an intermediate of the

glucose degradation (formation and degradation pathways) and ethanol as a final product of the dark fermentation process. The parameters were calibrated from experimental results of glucose fermentation. The different kinetic parameters were validated against batch experiments performed with inoculums from wastewater treatment plant. Secondly, the biokinetic model was included in a mixing model based on tank-in-series in order to replace the current assumption of a perfectly-mixed digester by non-ideal mixing condition to simulate continuous cultures.

## 7.2 Materials and methods

### 7.2.1 Culture preparation

Batch experiments were carried out to calibrate the values of the parameters of the model and to verify the model predictions regarding the glucose consumption, the metabolites and hydrogen production.

#### 7.2.1.1 Microorganisms

Anaerobic sludge collected from wastewater treatment plant in Clermont-Ferrand (France) was used as a seed. The sludge was subjected to pre-treatment in the presence of sodium 2-bromoethanesulfonate by using a methodology adapted from Bullock and Kristiansen (1989). It allows the removing of *Archaea* bacteria responsible for methane production and hydrogen consumption. After the pre-treatment, the microbial consortium was inoculated in a nutrient medium 10% v/v (**section 7.2.1.2**) for 16 h at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 7.2.1.2 Medium culture

The nutrient medium used contained (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.86;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.22;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.22;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.13;  $\text{NaCl}$ , 0.81;  $\text{ZnSO}_4$ , 0.37;  $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.27;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.13;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.12;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.1 \cdot 10^{-2}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.1 \cdot 10^{-2}$ ;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.8 \cdot 10^{-2}$ ; Hemin from bovine,  $10^{-3}$ ; Biotine,  $2.0 \cdot 10^{-4}$ ; PABA,  $10^{-4}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.0 \cdot 10^{-5}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-5}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-6}$ . Glucose was the carbon source and the concentrations were 8 g/L and 60 g/L ( $64 \text{ kg COD/m}^3$ ) or 30 g/L ( $32 \text{ kg COD/m}^3$ ) for the nutrient medium used in the precultures and batch cultures, respectively. The nutrient medium was steam autoclaved at  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  and 1 bar for a batch time of 20 min.

#### 7.2.1.3 Inoculum preparation

The inoculums were prepared as follows. 10 mL of the consortium were transferred into a 90 mL preculture medium. The medium was inoculated with the consortium and incubated for 12 h at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . The incubation takes place in a rotary shaker with the agitation speed set at 120 rpm.

#### 7.2.1.4 Start-up and bioreactor culture

Batch cultures were carried out in triplicate in a 2-L double-jacket bioreactor. The working volume included 1.8 L of nutrient medium and 0.2 L of inoculum (added at the beginning of experiments). After autoclaving, the nutrient medium was flushed with  $\text{CO}_2$ , and L-cysteine was added to remove trace of oxygen. The pH was adjusted using 5 N-KOH and was controlled at  $6.00 \pm 0.05$  using a pH controller. The redox potential was followed with a redox probe. After addition of the inoculums, dark fermentation was performed at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  and a stirring rate of 120 rpm.

Continuous cultures were performed in a 2-L double-jacket bioreactor. The bioreactor was filled with 40 g/L (42.67 kg COD/m<sup>3</sup>) of glucose solution and the operating conditions were the same as the batch cultures. Following start-up, the dark fermentation process was switched to continuous mode and was operated at different hydrodynamic retention times (HRT) of 12, 8 and 4 h. The influent was composed of 20 g/L (21.33 kg COD/m<sup>3</sup>) of glucose and nutrient medium to prevent deficiency in iron and nitrogen sources. Indeed, iron is known to play a significant role in the synthesis of hydrogenase and other enzymes that are essential for the metabolism of microorganisms, so that an appropriate concentration of iron promotes hydrogen production. Several studies have shown that the *in vivo* activity of hydrogenase decreases with iron depletion (Wang and Wan, 2009, Dhar *et al.*, 2012). Concerning nitrogen, according to many authors, it is a very important component essential for the microorganism growth and for the nucleic acids, proteins and enzymes biosynthesis (Abdallah *et al.*, 2016).

## 7.2.2 Analytical methods

### 7.2.2.1 Gas flow rate and chemical analysis of biogas

The volumetric gas flow rate of biogas produced was measured using a drum-type gas-meter (TG05, Ritter, Germany). The measurements were recorded and processed by the *Rigamo*<sup>®</sup> software version 3.1 (Ritter, Germany). The chemical composition of the biogas collected from outlet stream was analyzed every 15 min using a micro gas chromatograph (Agilent 3000A, Agilent Technologies, USA), equipped with two analysis channels and a thermal conductivity detector. The first one was equipped with a molecular sieve (MS5A column) to determine the amount of H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>; argon was used as the carrier gas at a pressure of 2 bars. The operating temperatures of the injection port and the column were 80°C and 90°C, respectively. The second channel was equipped with a PoraPlot U column (Agilent Technologies, USA) to determine the amount of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S; hydrogen was used as the carrier gas at a pressure of 2 bars. The operating temperatures of the injection port and the column were 90°C and 60°C, respectively. The results were recorded and processed by the *Soprane*<sup>®</sup> software (SRA Instruments, France). By combining volumetric gas flow rate to chemical composition data, the molar hydrogen flow rate and hydrogen production rate could be deduced.

### 7.2.2.2 Chemical analyses of the liquid phase

In the liquid phase, samples of 5 mL were taken for chemical analysis. The concentration of by-products in the liquid phase (butyric acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid and ethanol) was measured using a high performance liquid chromatography (HPLC) device (1260 Infinity Quaternary LC system, Agilent Technology, USA). This apparatus consisted in two ion-exclusion columns connected in series (Rezex ROA 300X 7.8 mm, Phenomenex, USA). The mobile phase was a solution of 5 mM sulfuric acid in ultrapure water continuously degassed. The eluent flow rate was fixed at 0.7 mL/min using a quaternary pump (HP 1100 Series, Agilent Technologies, USA). The HPLC device was equipped with an automatic injector with fixed loop (Rheodyne valve, Agilent Technology, USA) that delivers 10 µL. By-product detection was done using a refractometer (HP 1100 series, Agilent Technologies, USA). The signals delivered by the sensor were processed by an integrator (HP 1100 series). The acquisition and integration of data were achieved through *ChemStation*<sup>®</sup> software (HP Chem, Agilent Technologies, USA). Prior to



analysis, each sample was deproteinized to prevent clogging of the column. For this purpose, 250  $\mu\text{L}$  of barium hydroxide solution ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 0.3 M) and 250  $\mu\text{L}$  of zinc sulfate solution ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5% w/v) were added to the samples. These compounds caused protein precipitation. After centrifugation (*Beckman Coulter*, USA) for 5 minutes at 9600 g, the supernatant was filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filter (*Chromafil*, Germany) and placed in vials.

### 7.2.3 Model description

#### 7.2.3.1 Structure of the model

All simulations were performed using the *Matlab*<sup>®</sup> software (*The MathWorks*, USA). In this study, the modified ADM1 model reflects the matrix of biochemical rate coefficient ( $v_{i,j}$ ) and kinetic rate equations ( $\rho_j$ ) proposed by Danielson (2014). Due to missing of ethanol formation, lactate formation and degradation processes in the model, these processes were implemented. The extension includes a modification of the sugar uptake (taking into account the formation of lactate and ethanol), the implementation of the lactate uptake (taking into account the formation of acetate and propionate), the addition of four new species ( $S_{lac}$ : total lactate,  $S_{lac-}$ : anionic form,  $X_{lac}$ : lactate degrading microorganisms and  $S_{eth}$ : ethanol); as well as the decay of lactate degrading microorganisms and acid-base equilibrium of lactic acid and lactate. Due to the large number of parameters, the Peterson matrix of the model includes only the processes and components modified from the original matrix (*Table 7.1*).

*Table 7.1. Peterson matrix after implementation of lactate and ethanol into ADM1.*

Component (kg COD/m <sup>3</sup> ) Process	$S_{su}$	$S_{lac}$	$S_{bu}$	$S_{pro}$	$S_{ac}$	$S_{eth}$	$S_{h2}$	$S_{IC}$	$S_{IN}$	$X_{su}$	$X_{lac}$	Rate (kg COD/m <sup>3</sup> /d)
<b>5 Uptake of sugar</b>	-1	$(1 - \frac{Y_{su}}{Y_{lac,su}})$	$(1 - \frac{Y_{su}}{Y_{bu,su}})$	$(1 - \frac{Y_{su}}{Y_{pro,su}})$	$(1 - \frac{Y_{su}}{Y_{ac,su}})$	$(1 - \frac{Y_{su}}{Y_{eth,su}})$	$(1 - \frac{Y_{su}}{Y_{h2,su}})$	$-\sum_{i=1-9,1-27} C_i V_{i,5}$	$(-Y_{su}) N_{bac}$	$Y_{su}$		$K_{m,su} \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} X_{su} I_{pH} I_{N,lim}$
<b>8 Uptake of lactate</b>		-1		$(1 - \frac{Y_{lac}}{Y_{pro,lac}})$	$(1 - \frac{Y_{lac}}{Y_{ac,lac}})$						$Y_{lac}$	$K_{m,lac} \frac{S_{lac}}{K_{s,lac} + S_{lac}} X_{lac} I_{pH} I_{N,lim}$
<b>27 Decay of <math>X_{lac}</math></b>											-1	$k_{dec,X_{lac}} X_{lac}$

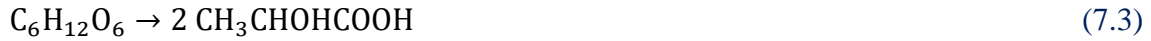
### 7.2.3.2 Lactate and ethanol formation

Lactate ( $S_{lac}$ ) and ethanol ( $S_{eth}$ ) were considered as byproducts of the sugar uptake during acidogenesis process. The reaction was governed by the monosaccharide degrading microorganisms ( $X_{su}$ ) at a sugar uptake rate  $K_{m,su}$  (**Equation 7.2**).

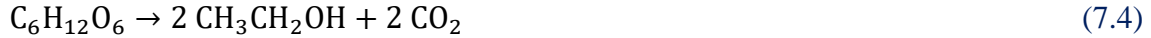
$$\rho_X = K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim} \quad (7.2)$$

where  $K_{m,su}$  is the Monod maximum specific uptake rate (kg COD\_S kg COD/X/d),  $K_{s,su}$  is the half saturation constant (kg COD\_S/m<sup>3</sup>),  $S_{su}$  is the concentration of monosaccharide (kg COD/m<sup>3</sup>) and  $I_{pH}$ ,  $I_{IN,lim}$  are pH inhibition and limitation of microorganism growth due to lack of inorganic nitrogen, respectively.

The specific conversion from glucose into lactate is defined according to **Equation 7.3**:



The specific conversion from glucose into ethanol is defined according to **Equation 7.4**:



In addition, stoichiometric coefficients describing the yields of lactate ( $f_{lac,su}$ ) and ethanol ( $f_{eth,su}$ ) production from glucose fermentation were used.

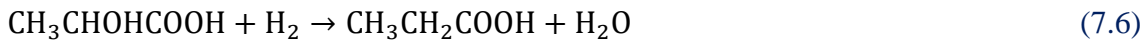
### 7.2.3.3 Lactate fermentation

Acetate ( $S_{ac}$ ) and propionate ( $S_{pro}$ ) were considered as byproducts of the lactate fermentation. It was governed by the lactate degrading microorganisms ( $X_{lac}$ ) at a lactate uptake rate  $K_{m,lac}$  (**Equation 7.5**).

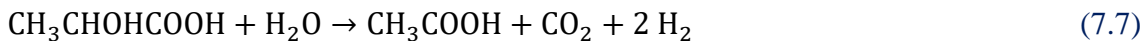
$$\rho_X = K_{m,lac} \cdot \frac{S_{lac}}{K_{s,lac} + S_{lac}} \cdot X_{lac} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim} \quad (7.5)$$

where  $K_{m,lac}$  is the Monod maximum specific uptake rate (kg COD\_S kg COD/X/d),  $K_{s,lac}$  is the half saturation constant (kg COD\_S/m<sup>3</sup>) and  $S_{lac}$  is the concentration of lactate (kg COD/m<sup>3</sup>).

The specific conversion from lactate into propionate is defined according to **Equation 7.6**:



The specific conversion from lactate into acetate is defined according to **Equation 7.7**:



In addition, stoichiometric coefficients describing the respective yields of propionate ( $f_{pro,lac}$ ) and acetate ( $f_{ac,lac}$ ) production from lactate fermentation were used.

#### 7.2.4 Model calibration

The parameter value set recommended by Batstone *et al.* (2002), Antonopoulou *et al.* (2012) and Danielson (2014) were used for preliminary model calibration. However, the respective yields corresponding to lactate production and fermentation, ethanol production processes had to be defined or adjusted to account for the new processes implemented in the modified ADM1 model (**Equations 7.2–7.7**), together with some of the parameters of glucose fermentation. Preliminary parametric analysis showed that only less than 15 parameters over 89 in the model had to be adjusted to fit the experimental data. Only one triplicated batch condition was used for model calibration, fitting glucose, lactate, acetate, propionate, butyrate and ethanol contents over time, biogas production, H<sub>2</sub> concentration in the gas phase and pH. Valerate and isovalerate concentrations were disregarded because these compounds were never detected in the experiments. An optimization procedure was applied using the experimental data set from the batch test with 64 kg COD/m<sup>3</sup> as the initial glucose concentration.

#### 7.2.5 Model validation

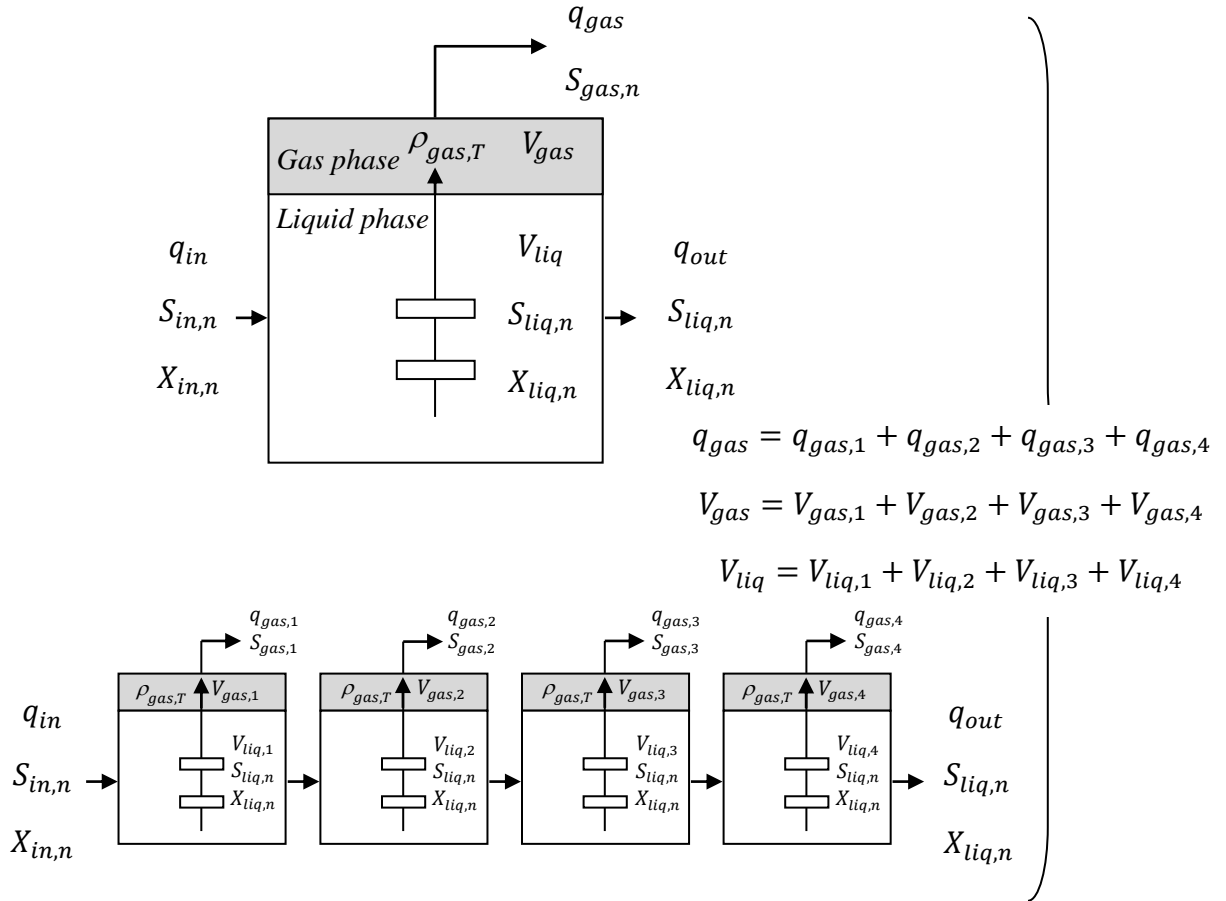
For model validation, the kinetic and stoichiometric parameters values calibrated with the batch test at the initial glucose concentration of 64 kg COD/m<sup>3</sup> were validated first using data from the batch test at the initial glucose concentration of 32 kg COD/m<sup>3</sup>. In this case, only the glucose concentration of the effluent changed. The same response variables were used for comparison purpose: namely, glucose, lactate, acetate, propionate, butyrate and ethanol contents over time, biogas production, H<sub>2</sub> concentration in the gas phase and pH. Then, the validation was

carried out using continuous cultures with several HRT and two other glucose loading charges (21.33 and 42.67 kg/m<sup>3</sup>) using the same methodology.

### 7.2.6 Mixing model based on tank-in-series

The standard ADM1 model was initially developed with the assumption of a perfectly-mixed tank, which may not be representative of the actual mixing conditions in a bioreactor. Indeed, the dark fermentation process requires pH control to avoid pH decrease because of the formation of volatile fatty acids. These are mainly acetic and butyric acids, leading to the inhibition of hydrogen production (Bundhoo and Mohee, 2016). Therefore, the addition of an alkaline product must be applied to maintain pH at the desired level. But this may also induce pH gradients in the tank which could in turn impact bacteria growth and activity. These trends are enhanced when real substrates exhibiting a complex rheological behavior are involved, because they induce a spatial distribution of viscosity and make the homogenization of the digestate rather difficult in the process (Ruggeri and Tommasi, 2012).

Consequently, the modified ADM1 was extended in this work to account for continuous cultures in non-ideal bioreactors using a tank-in-series model (**Figure 7.1**). This is able to describe mixing behavior from a perfectly-mixed digester (one tank) to a plug flow reactor (infinite number of tanks in series). It is, therefore, considered that the fluid from the inlet to the outlet in a real digester flows through a cascade of  $N_{bac}$  tank-in-series of same total volume, the sum of which is the digester volume. As a result, the ADM1 model was modified by taking into account the division of the digester in several tanks in series on the basis of **Figure 7.1**. In practice, the equations describing any process in the tank number  $i > 1$  (*i.e.* for  $1 < i \leq N_{bac}$ ) in the cascade is similar to that of this process in the conventional ADM1 model assuming ideal mixing ( $N_{bac} = 1$ ), except that the inlet concentration of the substrate  $n$  in tank  $i$ ,  $S_{in,n}^{(i)}$ , is equal to the outlet concentration of substrate  $n$  in tank  $i - 1$ ,  $S_{liq,n}^{(i-1)}$ , so that  $S_{in,n}^{(i)} = S_{liq,n}^{(i-1)}$  for  $i = 2$  to  $i = N_{bac}$ . This introduces non-ideal mixing conditions in the modeling of the dark fermentation process.



**Figure 7.1.** Schematic of a single perfectly-mixed tank digester and of a tank-in-series digester.  $q$  flow ( $m^3/d$ ),  $V$  volume ( $m^3$ ),  $S_{stream,i}$  concentration of soluble components ( $kg\ COD/m^3$ ),  $X_{stream,i}$  concentration of microorganism components ( $kg\ COD/m^3$ );  $i$  is the component index.

## 7.3 Results and discussion

### 7.3.1 Model calibration

The modified ADM1 model that accounts for ethanol and lactate was assessed against the data of the batch experiments with the initial glucose concentration of  $64\ kg\ COD/m^3$  to estimate the set of adjustable kinetic and stoichiometric parameters. Simulations based on calibrated parameters are confronted to experimental data in **Figure 7.2**. All the calibrated or default parameters values are displayed in **Table 7.2**. These values are compared with literature data in the next paragraph.

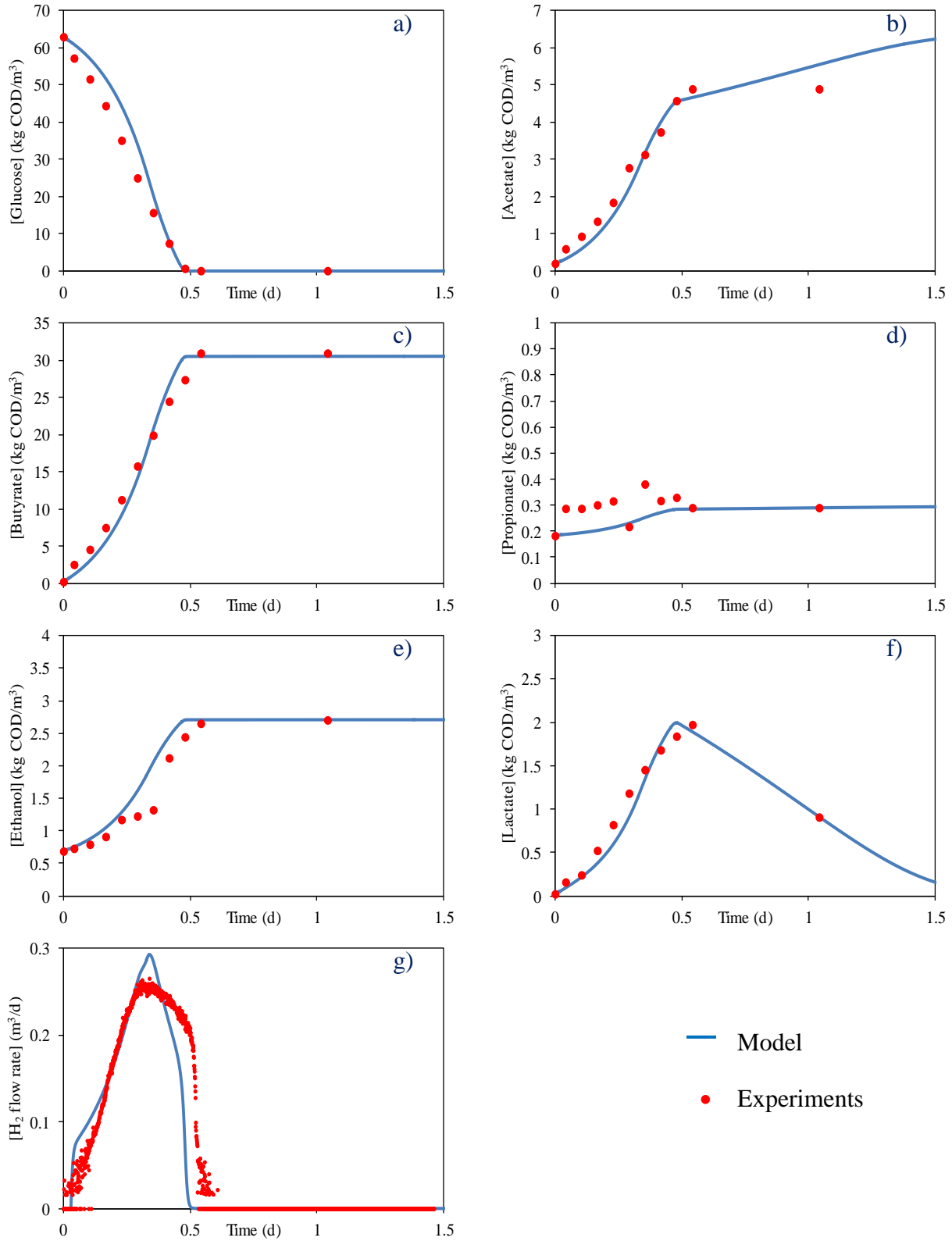


Figure 7.2. Comparison of experimental data used for calibration with the simulations: batch test at 64 kg COD/m<sup>3</sup> of glucose for glucose (a), acetate (b), butyrate (c), propionate (d), ethanol (e), lactate (f), H<sub>2</sub> flow rate (g).

**Table 7.2.** Stoichiometric and kinetic parameter values from glucose fermentation, lactate production and fermentation, and ethanol production processes.

Parameters/Variables	Values	Calibration/References
<b>Glucose fermentation</b>		
$K_{m,su}$ [kg COD/(kg COD/d)]	53	Calibration
$K_{s,su}$ [kg COD/m <sup>3</sup> ]	0.5	Batstone <i>et al.</i> (2002)
$Y_{su}$ [kg COD/kg COD]	0.1	Batstone <i>et al.</i> (2002)
$k_{dec,Xsu}$ [d <sup>-1</sup> ]	0.02	Batstone <i>et al.</i> (2002)
$f_{ac,su}$ [-]	0.0625	Calibration
$f_{bu,su}$ [-]	0.5354	Calibration
$f_{pro,su}$ [-]	0.0017	Calibration
$f_{h2,su}$ [-]	0.3138	Calibration
$f_{lac,su}$ [-]	0.0511	Calibration
$f_{eth,su}$ [-]	0.0355	Calibration
<b>Lactate production and fermentation</b>		
$K_{m,lac}$ [kg COD/(kg COD/d)]	21	Calibration
$K_{s,lac}$ [kg COD/m <sup>3</sup> ]	0.5	Antonopoulou <i>et al.</i> (2012)
$Y_{lac}$ [kg COD/kg COD]	0.1	Antonopoulou <i>et al.</i> (2012)
$k_{dec,Xlac}$ [d <sup>-1</sup> ]	0.02	Antonopoulou <i>et al.</i> (2012)
$K_{A/B,lac}$ [(m <sup>-1</sup> /d)]	$1.10^{+10}$	Danielson (2014)
$K_{a,lac}$ [M]	$10^{-3.86}$	Danielson (2014)
$C_{lac}$ [kmol C/kg COD]	0.03125	Carbon content of lactate
$f_{lac,su}$ [-]	0.0511	Calibration
$f_{ac,lac}$ [-]	0.995	Calibration
$f_{pro,lac}$ [-]	0.005	Calibration
<b>Ethanol production</b>		
$C_{eth}$ [kmol C/kg COD]	0.02083	Carbon content of ethanol
$f_{eth,su}$ [-]	0.0355	Calibration

### 7.3.1.1 Sugar consumption

The Monod maximum specific uptake rate for sugars consumption ( $K_{m,su}$ ) was set to 53 kg COD/(kg COD)/d, while the value proposed by Batstone *et al.* (2002) was 30 kg COD/(kg COD)/d. This change provided an ideal fit with the experimental data; indeed, it appears that the bacteria of the consortium consumed the glucose rapidly compared to the values of  $K_{m,su}$  reported by the literature. Otherwise, the half saturation of sugar  $K_{s,su}$ , the yield of

biomass on carbohydrates  $Y_{su}$  and the first-order decay rate for the sugar degrading microorganisms  $k_{dec,X_{su}}$  values reported by Batstone *et al.* (2002) could be used for describing the process of sugar consumption with any change.

The stoichiometric parameters describing the yields of acetate ( $f_{ac,su} = 0.0625$ ), butyrate ( $f_{bu,su} = 0.5354$ ), propionate ( $f_{pro,su} = 0.0017$ ), lactate ( $f_{lac,su} = 0.0511$ ), ethanol ( $f_{eth,su} = 0.0355$ ) and  $H_2$  ( $f_{h_2,su} = 0.3138$ ) production from sugar consumption were set according to the metabolic product distribution of the batch experiments.

### 7.3.1.2 Lactate fermentation

The Monod maximum specific uptake rate for lactate degradation ( $K_{m,lac}$ ) was set to 21 kg COD/(kg COD/d), while the value proposed by Antonopoulou *et al.* (2012) was about 11 kg COD/(kg COD/d). The half saturation of lactate  $K_{s,lac}$ , the yield of biomass on lactate  $Y_{lac}$  and the first-order decay rate for the lactate degrading microorganisms  $k_{dec,X_{lac}}$  values reported by Antonopoulou *et al.* (2012) were used for describing the process of lactate degradation. As described earlier, it was considered that lactate was converted into acetate and propionate by the lactate degrading microorganisms. Propionate being produced in a few amount during the process, it was assumed to set the stoichiometric yields of acetate and propionate on lactate to  $f_{ac,lac} = 0.995$  and  $f_{pro,lac} = 0.005$ , respectively.

### 7.3.2 Model validation

**Figure 7.3** displays the experimental data at the initial glucose concentration of 32 kg COD/m<sup>3</sup>, which are confronted to predicted results using the model derived after calibration involving experiments at 64 kg COD/m<sup>3</sup>. With an initial glucose content of 32 kg COD/m<sup>3</sup>, the dark fermentation experiments were characterized by a faster consumption of the glucose and in parallel a faster production of the main metabolites of the reaction (butyrate, acetate, propionate, ethanol and lactate) and of biogas  $H_2$  in comparison to **Figure 7.2**.



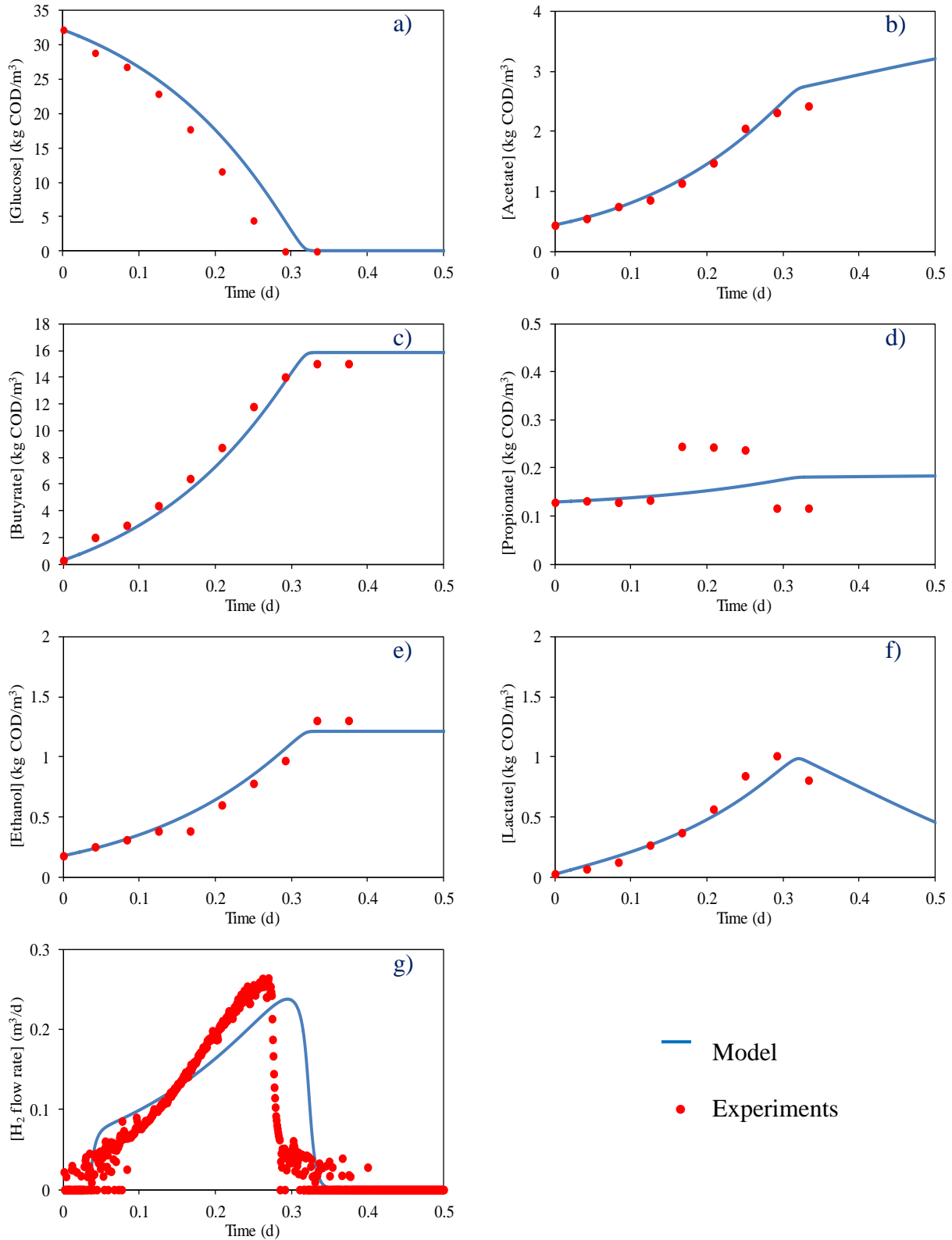


Figure 7.3. Comparison of experimental data used for calibration with the simulations: batch test at 32 kg COD/m<sup>3</sup> of glucose for glucose (a), acetate (b), butyrate (c), propionate (d), ethanol (e), lactate (f), H<sub>2</sub> flow rate (g).

However, for all the batch cultures, the metabolites produced in the largest quantities were butyrate with final values of 31 kg COD/m<sup>3</sup> and 15 COD/m<sup>3</sup>, and acetate with final values of 4.9 kg COD/m<sup>3</sup> and 2.4 COD/m<sup>3</sup> at the initial glucose concentration of 64 kg COD/m<sup>3</sup> and 32 kg COD/m<sup>3</sup>, respectively. Similarly, propionate was produced in small quantity in all the batch cultures with final values below 0.4 kg COD/m<sup>3</sup>, while ethanol was produced at 2.7 kg COD/m<sup>3</sup> and 1.3 kg COD/m<sup>3</sup> at the initial glucose concentration of 64 kg COD/m<sup>3</sup> and 32 kg COD/m<sup>3</sup>, respectively. It is interesting to note that lactate fermentation starts when the glucose is totally consumed, as already observed by Trad *et al.* (2015), resulting in a decrease in the lactate concentration and a fall in hydrogen production. More generally, these results show the importance of the implementation of the lactate formation and fermentation processes, as well as of the ethanol formation process in the modified model ADM1.

The comparison between experimental and predicted data show that the biokinetic model was correctly calibrated using only the replications of batch assays at one initial glucose concentration, resulting in a good correlation between the glucose consumption and the production of the metabolites and hydrogen for both batch cultures. Roughly, reaction time was divided by a factor 2, and the same stood for metabolite content and cumulated hydrogen production when initial glucose content was halved. As a conclusion, these results show that the modified model is able to simulate the different batch tests accurately.

### 7.3.3 Continuous culture

After successful model calibration and validation with the batch experiments, the modified model was extended with the mixing model based on tank-in-series for the continuous experiment. For that purpose, a continuous assay was operated under different HRT values. This experiment was conducted consecutively for 1.05 days in the batch mode with 42.67 kg COD/m<sup>3</sup>, 3.34 days in the continuous mode at an HRT of 12 h, 1.46 days in the continuous mode at an HRT of 8 h and 1 day in the continuous mode at an HRT of 4 h. The loading charge was composed of 21.33 kg COD/m<sup>3</sup> of glucose. The model defined in **section 7.2.3** was applied to continuous cultures using the calibration derived from batch assays, *i.e.* the kinetic and stoichiometric parameters values previously validated and reported in **Table 7.2**. As the continuous experiments with different HRT were carried out consecutively, the initial glucose concentration when HRT was changed remained close to zero to nearly achieve a total consumption of the substrate.

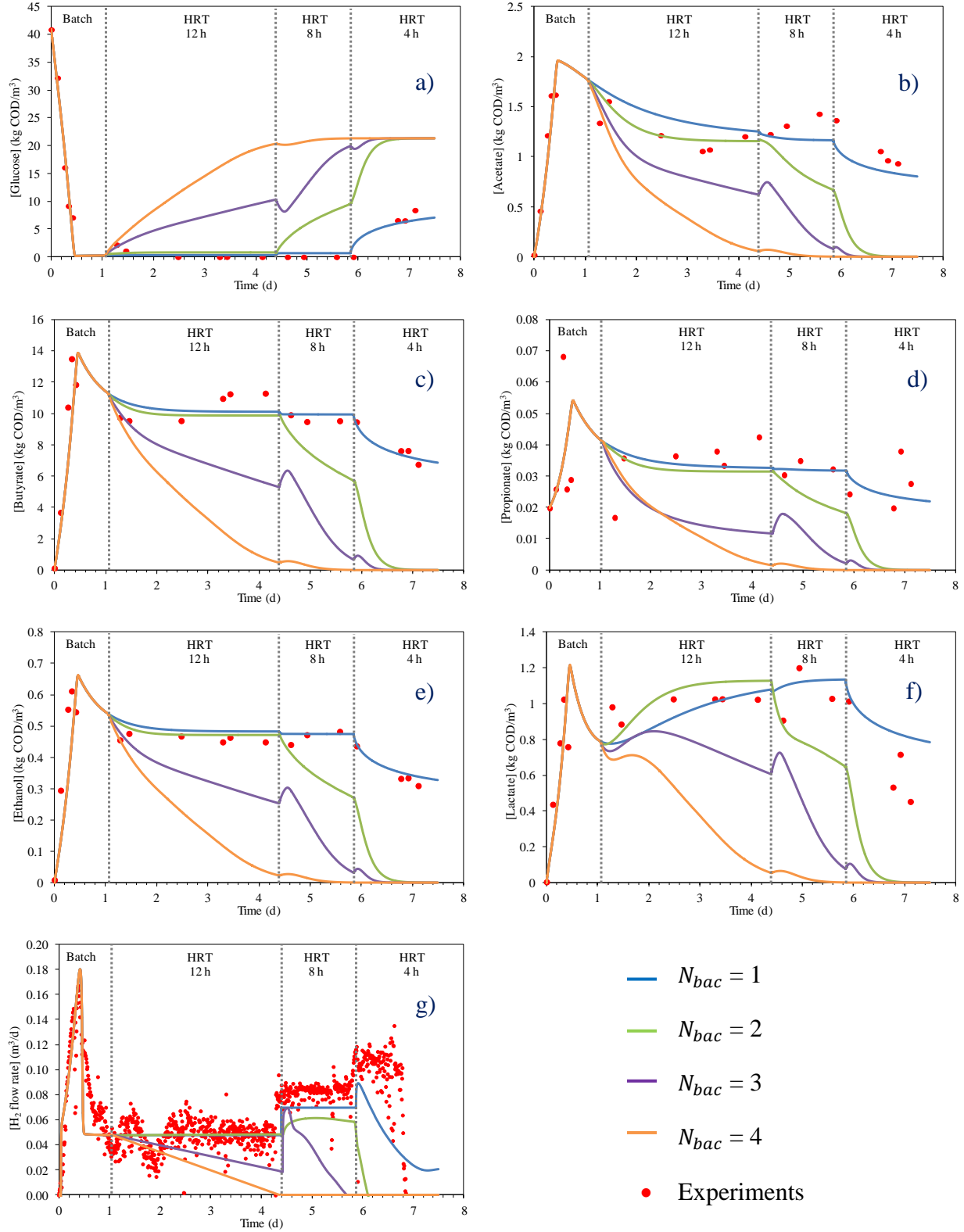
### 7.3.3.1 Performances of the continuous culture

#### 7.3.3.1.1 Hydrogen production

**Figure 7.4** shows the experimental results for biohydrogen and metabolite production. The start-up of the experiment with a batch culture allowed the acclimation and the development of the bacteria of the consortium. For this purpose, the initial glucose concentration was set to 42.67 kg COD/m<sup>3</sup>. The batch culture was characterized by a dynamic increase in biohydrogen production with a maximal H<sub>2</sub> flow rate of 0.18 m<sup>3</sup>/d; then, the flow rate decreased to 0.05 m<sup>3</sup>/d because of the total consumption of the glucose by the microbial consortium. The first HRT value was set to 12 h during 3.34 days for the continuous culture. Steady-state conditions were reached at this HRT after one day under these conditions and biohydrogen flow rate remained about 0.05 m<sup>3</sup>/d. The shift of HRT to 8 h during 1.46 days was characterized by a sharp increase in the biohydrogen flow rate to 0.08 m<sup>3</sup>/d and the steady-state was achieved very rapidly. At the same time, it should be noted that for the HRT of 12 h and 8 h, the glucose conversion rate was about 100%. At a HRT of 4 h, an increase of the biohydrogen flow rate to 0.010 m<sup>3</sup>/d was detected, but after one day under these conditions of culture, a steep decrease of the biohydrogen flow rate to 0 was observed. This decrease in flow rate was accompanied by an increase of the glucose concentration. This is the proof of a washout of the digester; the dilution rate is upper than the growth rate of the bacteria consuming the glucose. Thus, bacteria were gradually released from the digester and the biological activity was stopped inside the tank.

#### 7.3.3.1.2 Metabolite production

Biohydrogen production was accompanied by the production of several metabolites, as under batch cultures. At the beginning of the batch culture, the concentrations of butyrate, acetate, lactate and ethanol increased significantly with maximal values of 13.5, 1.6, 1.0 and 0.6 kg COD/m<sup>3</sup>, respectively. The propionate concentration remained relatively low, as under batch cultures, with a value of 0.04 kg COD/m<sup>3</sup>. The continuous cultures with HRT of 12 h and 8 h was characterized by a steady-state with concentrations about 11.0, 1.3, 1.0 and 0.5 kg COD/m<sup>3</sup> for butyrate, acetate, lactate and ethanol, respectively. The shift of HRT to 4 h was further accompanied by a decrease of the metabolite concentrations before washout.



**Figure 7.4.** Experimental data and simulations ( $N_{bac} = 1, 2, 3$  and  $4$ , respectively) from continuous cultures at HRT of 4, 8 and 12 h, respectively, for glucose (a), acetate (b), butyrate (c), propionate (d), ethanol (e), lactate (f), H<sub>2</sub> flow rate (g).

### 7.3.3.2 Simulation of continuous digester using the perfect mixing assumption

**Figure 7.4** illustrates the results of the simulations for biohydrogen and metabolite production compared with the experimental data. Simulations were driven using the modified model ADM1, considering the digester as a perfectly stirred tank; consequently  $N_{bac} = 1$ .

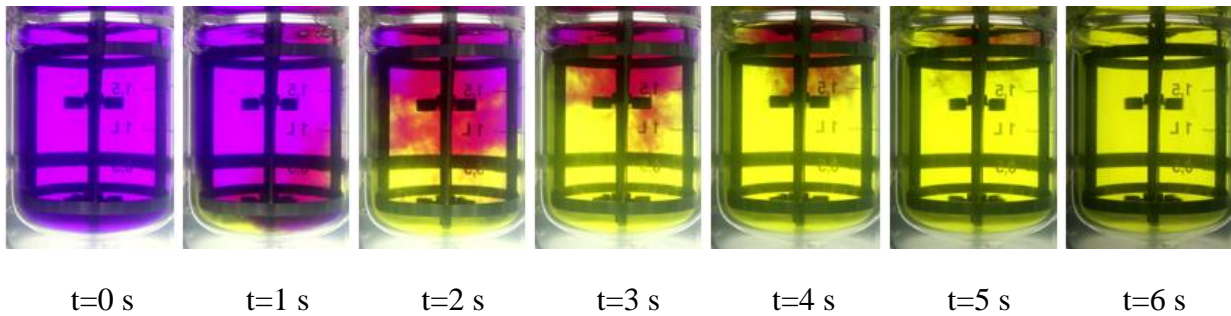
As can be seen from the results in batch and in continuous cultures at HRT of 12 h, 8 h and 4 h, respectively, the biohydrogen production and all the metabolite concentrations were correctly fitted by the model. In particular, the steady state conditions for both HRT of 12 h and 8 h were accurately predicted. A shift of HRT to 4 h in the model was accompanied by a decrease in biohydrogen and metabolite concentrations, as well as by an increase in the glucose concentration detected in the culture; as a result, the washout of the digester was also predicted by the model. It was observed, however, at a HRT of 8 h that the predicted hydrogen flow rate was slightly lower than measured. In addition, washout was predicted to occur more rapidly than observed in **Figure 7.4**. Nevertheless, the model was able to capture the main trends of the experimental results, resulting in a good agreement between experimental and predicted glucose consumption and production of metabolites and hydrogen for the continuous culture, while the same kinetic and stoichiometric parameters were used in the batch and the continuous cultures despite the changes of HRT.

The simulations show that the modified model ADM1 with  $N_{bac} = 1$  adequately fits experimental data. These results are not surprising, considering the flow conditions applied to the digestate which are reflected by the dimensionless Reynolds number ( $Re$ ).  $Re$  for a conventionally stirred tank is defined as:

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu} \quad (7.8)$$

where  $\rho$  is the density of the fluid ( $\text{kg/m}^3$ ),  $N$  the impeller rotational speed ( $\text{s}^{-1}$ ),  $D$  the diameter of the two impellers used (m), and  $\mu$  the fluid dynamic viscosity (Pa/s). Reynolds number is a dimensionless parameter which represents the ratio of the inertial to the viscous forces. With Rushton turbines, the transition from laminar to transitional flow occurs when  $Re$  is less than 100, and the tank is highly turbulent when  $Re$  is superior to 1000 (Hemrajani and Tatterson, 2004). In this work, the rheological properties of the fluid are those of a Newtonian fluid with a

measured dynamic viscosity of  $9.0 \cdot 10^{-4}$  Pa/s at the temperature of  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , which is rather close to pure water viscosity. The stirring speed being 120 rpm ( $2 \text{ s}^{-1}$ ), the Reynolds number deduced from **Equation 7.8** was  $6.7 \cdot 10^3$ ; consequently, the flow was highly turbulent. Finally, the mixing time deduced from the chemical decolorization method is  $6.3 \pm 0.6 \text{ s}$  (**Figure 7.5**), which can be considered as a fast mixing process in comparison to the characteristic times of the biological reactions. Thus, concentration, as well as pH homogenization in the digester resulting from the addition of alkaline solution for pH control was fast despite the addition of the influent in continuous culture, so that the bioreactor could be considered as perfectly stirred.



**Figure 7.5.** Illustration of the chemical decolorization experiments to determine the mixing time in the digester at  $N = 120 \text{ rpm}$  and  $\mu = 9.0 \cdot 10^{-4} \text{ Pa/s}$ .

### 7.3.3.3 Simulation of continuous digester using the non-ideal mixing assumption

Simulations were driven with the modified model ADM1 using the non-ideal mixing model, *i.e.* by considering the digester divided in two ( $N_{bac} = 2$ ), three ( $N_{bac} = 3$ ) or four ( $N_{bac} = 4$ ) tank-in-series of equal volume. Consequently, the total volume of the digester was always  $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ . **Figure 7.4** displays simulated data for biohydrogen and metabolite production compared to the experiments. All the concentrations of soluble and microorganism components of the ADM1 model at the beginning of continuous cultures at different HRT are summarized in the **Table 7.3** as a function of the number of tank-in-series in the mixing model.

**Table 7.3.** Concentration of soluble and microorganism components at the beginning of different HRT depending to the number of tank-in-series.

Culture mode	Number of BAC	Time (d)	Concentration (kg COD/m <sup>3</sup> )								
			$S_{su}$	$S_{bu}$	$S_{ac}$	$S_{pro}$	$S_{lac}$	$S_{eth}$	$S_{h2}$	$X_{su}$	$X_{lac}$
<b>Batch</b>	1	0	42.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.10
<b>HRT - 12h</b>	$N_{bac}$	1.05	0.24	11.30	1.77	0.04	0.79	0.54	0.06	2.42	0.07
<b>HRT - 8 h</b>	1	4.39	0.31	10.13	1.25	0.03	1.08	0.48	0.07	2.08	0.01
	2		0.80	9.89	1.16	0.03	1.13	0.47	0.07	2.04	0.01
	3		10.31	5.31	0.62	0.01	0.61	0.25	0.06	1.10	0.00
	4		20.35	0.47	0.06	0.00	0.05	0.02	0.00	0.10	0.00
<b>HRT - 4 h</b>	1	5.85	0.67	9.95	1.17	0.03	1.13	0.47	0.09	2.05	0.00
	2		9.50	5.70	0.67	0.02	0.65	0.27	0.09	1.18	0.00
	3		19.95	0.67	0.08	0.00	0.08	0.03	0.00	0.41	0.00
	4		21.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

When the number of tank-in-series is 2, the volume of each tank is  $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ . As can be seen from **Figure 7.4**, at an HRT of 12 h the estimated biohydrogen and metabolite production were close to the experimental values. In this case, the metabolite and microorganism concentrations as well as the hydrogen flow rate and concentration were close to those obtained with a perfectly mixed tank. But, when HRT was reduced to 8 h, glucose consumption and hydrogen production were underestimated, leading to higher discrepancies between experiments and simulations for all the soluble and particulate variables in **Figure 7.4**, even though the model accurately predicted first a slight increase in hydrogen flow rate from  $0.050 \text{ m}^3/\text{d}$  to  $0.058 \text{ m}^3/\text{d}$  due to the change of HRT. This was, however, followed by a small decrease to  $0.055 \text{ m}^3/\text{d}$  and steady state conditions were not achieved. When HRT was shifted to 4 h, the model predicted a fast and total washout of the digester, far more rapidly than observed in the experiments. Consequently, the simulation of the continuous culture when the mixing model included 2 consecutive tank-in-series of equal volume correctly predicted experimental when HRT was equal or greater than 12 h, showing that the mixing model does not interfere with the biokinetic model in this case; conversely, simulations and experiments departed from each other when HRT was 8 h or lower in **Figure 7.4**.

When  $N_{bac}$  was increased to 3 or 4, **Figure 7.4** shows that the discrepancies between experimental and predicted data increased and were observed at higher HRT. For example, washout was predicted even when HRT was 12 h if  $N_{bac} = 4$ , and the curves highlight that the same conclusion could be drawn with  $N_{bac} = 3$ , even if the evolution was slower. Thus, the output glucose concentration approached the inlet value, *i.e.* 21.33 kg COD/m<sup>3</sup>, and a decrease to values close to 0 of the respective concentrations of acetate, butyrate, propionate, lactate and ethanol was observed.

In summary, the parametric analysis with the modified ADM1 extended with the mixing model based on tank-in-series revealed that non-ideal mixing in the digester represented by  $N_{bac} = 2, 3$  and 4, led to a faster washout of the digester. These results highlight the key role of mixing conditions on the modeling of dark fermentation. This is particularly true for the use of complex substrates which have been considered in recent dark fermentative studies (Ghimire *et al.*, 2015) that include the agricultural residues like lignocellulosic biomasses, *e.g.* corn stalks (Wang *et al.*, 2010), wheat straw (Pawar *et al.*, 2013), rice straw (Liu *et al.*, 2014), *etc.*, the agro-industrial waste like those from food processing industries, *e.g.* olive mill wastewater and cheese whey (Kapdan and Kargi, 2006), bread (Han *et al.*, 2016), solid baby foods (Alexandropoulou *et al.*, 2017), *etc.*, and the organic fraction of municipal solid waste (Elsamadony and Tawfik, 2015), even though this list is not exhaustive. These complex substrates present a wide range of viscosity and different rheological behaviors, which can therefore, make the homogenization of the digestate difficult. In the present work, the model was calibrated with  $N_{bac} = 1$ , and the viscosity of the medium was nearly the same in batch and continuous cultures, with a very short mixing time (about 6–7 s). So, the conclusion that the assumption of perfect mixing better predicts the continuous cultures is not surprising. But the use of the mixing model based on tank-in-series remains very attractive for the simulation of dark fermentation with complex substrates, leading to lower  $Re$  number and even non-Newtonian behavior, and for scale-up purpose in this case.

## 7.4 Conclusions

The aim of the present work was to develop a modified ADM1 model for biohydrogen production that accounted for the key metabolites of dark fermentation, in particular ethanol and lactate anions which were disregarded in ADM1, but also to include this biokinetic model in a



non-ideal mixing model based on tank-in-series in order to replace the current assumption of a perfectly-mixed digester. The calibration of this model was based on replicated batch cultures in a 2-L digester at 35°C and pH 6.0 using glucose as the substrate to focus on hydrogen and the main metabolites (acetate, butyrate, propionate, lactate and ethanol). The calibration was validated using batch cultures at a different glucose concentration. Finally, continuous cultures were simulated using this calibration at hydrodynamic residence time (HRT) between 4 and 12 hours.

The simulations demonstrated that the model, after calibration of the kinetic and stoichiometric parameters of glucose and lactate uptake, was able to fit the evolution of the concentrations of acetate, butyrate, propionate, lactate and ethanol and to predict the gas flow rate and composition in batch cultures. Finally, the modified model could predict very accurately experimental data from continuous cultures in terms of gas and digestate compositions and gas flow rate when  $N_{bac} = 1$  was applied without any further change in the biokinetic model deduced from batch cultures. The parametric study with the mixing model based on tank-in-series highlighted that digester washout occurred too soon when the mixing model included 2, 3 and 4 consecutive tank-in-series of equal volume, but it must be reminded that calibration was carried out with  $N_{bac} = 1$  and that mixing time in the tank was very short due to the low viscosity of glucose culture media, which can differ from actual digestate viscosity. Concludingly, these results highlight the key role of lactate, ethanol and mixing conditions on the modeling of dark fermentation process for scale-up purpose. Thus, the perspectives involve continuous cultures with glucose as the substrate in more viscous media to validate the non-ideal mixing model when  $Re$  decreases and mixing time increases, as a two-zone model is expected to better describe the actual mixing conditions in the digester in this case.

### **Acknowledgements**

LABEX IMobS<sup>3</sup> *Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions*, the French National Centre for Scientific Research (CNRS), Auvergne-Rhône-Alpes Regional Council and the European Funds of Regional Development (ERDF/FEDER) are gratefully acknowledged.

## Nomenclature

### List of symbols

$C_i$	Carbon content of component $i$ (kmole C/kg COD)
$D$	Impeller diameter (m)
$f_{product,substrate}$	Yield of product on substrate
$H$	Cumulative hydrogen production (L)
$I_{IN,lim}$	Inorganic nitrogen limitation inhibition
$I_{pH}$	pH inhibition
$k_{dec}$	First order decay rate ( $d^{-1}$ )
$K_{A/B,i}$	Acid-base kinetic parameter of component $i$ ( $m^{-1}/d$ )
$K_{a,i}$	Acid-base equilibrium of component $i$ (M)
$K_{m,i}$	Monod maximum specific uptake rate of component $i$ kg COD/(kg COD)/d
$K_{s,i}$	Half saturation value of component $i$ (kg COD/ $m^3$ )
$N$	Rotation speed (rpm)
$N_{bac}$	Number of tank-in-series
$P$	Maximum hydrogen production (L)
$q$	Flow rate ( $m^3/d$ )
$Re$	Reynolds number
$R_m$	Maximum hydrogen production rate (L/h)
$S_i$	Concentration of soluble component $i$ (kg COD/ $m^3$ )
$t$	Incubation time (h)
$V$	Bioreactor volume ( $m^3$ )

$v_{i,j}$  Rate coefficient for component  $i$  on process  $j$  (kg COD/m<sup>3</sup>)

$X_i$  Concentration of particulate component  $i$  (kg COD/m<sup>3</sup>)

$Y_i$  Yield of biomass on component  $i$  (kg COD/kg COD)

*Greek letters*

$\lambda$  lag time (h)

$\mu$  Dynamic viscosity (Pa.s)

$\rho$  Fluid density (kg/m<sup>3</sup>)

$\rho_j$  Kinetic rate of process  $j$  (kg COD/m<sup>3</sup>/d)

*Abbreviations*

*ADM1* Anaerobic Digestion model N°1

*HPB* Hydrogen Producing Bacteria

*HPLC* High-Performance Liquid Chromatography

*HRT* Hydrodynamic Residence Time

*IWA* International Water Association

## 7.5 References

- R. Abdallah, H. Djelal, A. Amrane, W. Sayed, F. Fourcade, T. Labasque, F. Geneste, S. Taha, D. Floner (2016). Dark fermentative hydrogen production by anaerobic sludge growing on glucose and ammonium resulting from nitrate electroreduction. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 5445-5455.
- J.M. Agator, J. Chéron, C. Ngô, G. Trap (2008). Hydrogène : Energie de demain ? Editor: Omniscience. France. (*In french*).
- M. Alexandropoulou, G. Antonopoulou, E. Trably, H. Carrere, G. Lyberatos (2018). Continuous biohydrogen production from a food industry waste: Influence of operational parameters and microbial community analysis. *Journal of Cleaner Production*. 174, 1054-1063.
- G. Antonopoulou, H.N. Gavala, I.V. Skiadas, G. Lyberatos (2012). Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 191-208.
- D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M. Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin (2002). Anaerobic Digestion Model N°. 1 (ADM1), Scientific and Technical Report N°. 13. Editor: IWA Publishing. London, UK.

- J.D. Bullock, B. Kristiansen (1989). Basic Biotechnology. Editor: J.D. Bullock, B. Kristiansen. Academic Press, Saunders College Publishing/Harcourt Brace. London, UK.
- M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41, 6713-6733.
- O. Danielson (2014). Modeling and simulation of anaerobic manure digestion into biogas. Chalmers University of Technology. Master.
- B.R. Dhar, E. Elbeshbishy, G. Nakhla (2012). Influence of iron on sulfide inhibition in dark biohydrogen fermentation. *Bioresource Technology*. 126, 123-130.
- M. Elsamadony, A. Tawfik (2015). Potential of biohydrogen production from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) using pilot-scale dry anaerobic reactor. *Bioresource Technology*. 196, 9-16.
- A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. 144, 73-95.
- W. Han, J. Huang, H. Zhao, Y. Li (2016). Continuous biohydrogen production from waste bread by anaerobic sludge. *Bioresource Technology*. 212, 1-5.
- R.R. Hemrajani, G.B. Tattersson (2004). Mechanically stirred vessels. In *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice* (1<sup>st</sup> edition) (chapter 6). Editor: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- L. Hinken, M. Huber, D. Weichgrebe, K.H. Rosenwinkel (2014). Modified ADM1 for modeling an UASB reactor laboratory plant treating starch wastewater and synthetic substrate load tests. *Water Research*. 64, 82-93.
- I.K. Kapdan, F. Kagi (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 569-582.
- R. Kleerebezem, M.C.M. van Loosdrecht (2006). Critical analysis of some concepts proposed in ADM1. *Water Science and Technology*. 4, 51-57.
- J.J. Lay, Y.Y. Li, T. Noike (1998). Mathematical model for methane production from landfill bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*. 24, 730-736.
- C.M. Liu, S.Y. Wu, C.Y. Chu, Y.P. Chou (2014). Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39, 19317-19322.
- I. Ntaikou, H.N. Gavala, G. Lyberatos (2009). Modeling of fermentative hydrogen production from the bacterium *Ruminococcus albus*: Definition of metabolism and kinetics during growth on glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 3697-3709.
- S.S. Pawar, V.N. Nkemka, A.A. Zeidan, M. Murto, E.W.J. van Niel (2013). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* followed by biogas production in a two-step uncoupled process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 9121-9130.
- B.R.H. Peiris, P.G. Rathnasiri, J.E. Johansen, A. Kuhn, R. Bakke (2006). ADM1 simulations of hydrogen production. *Water Science and Technology*. 53, 129-137.
- B.K.V. Penumathsa, G.C. Premier, G. Kyazze, R. Dinsdale, A.J. Guwy, S. Esteves, J. Rodriguez (2008). ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach. *Water Research*. 42, 4379-4385.

- B. Ruggeri, T. Tommasi (2012). Efficiency and efficacy of pre-treatment and bioreactors for bio-H<sub>2</sub> energy production from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 6491-6502.
- P. Satpathy, P. Biernacki, F. Uhlenhut, H. Cypionka, S. Steinigeweg (2016). Modelling anaerobic digestion in a biogas reactor: ADM1 model development with lactate as an intermediate. *Journal of Environmental Science and Health*. 51, 1216-1225.
- S. Soda, K. Wada, M. Okuda, M. Ike (2011). Application of modified ADM1 to long-term experiments for methane/hydrogen production from model organic waste. *Water Practice and Technology*. 6.
- T. Thamsiriroj, A.S. Nizami, J.D. Muphy (2012). Why does mono-digestion of grass silage fail in long term operation ? *Applied Energy*. 95, 64-76.
- Z. Trad, J. Akimbomi, C. Vial, C. Larroche, M.J. Taherzadeh, J.P. Fontaine (2015). Development of a submerged anaerobic membrane bioreactor for concurrent extraction of volatile fatty acids and biohydrogen production. *Bioresource Technology*. 196, 290-300.
- Z. Trad, J.P. Fontaine, C. Larroche, C. Vial (2016). Multiscale mixing analysis and modeling of biohydrogen production by dark fermentation. *Renewable Energy*. 98, 264-282.
- J. Wang, W. Wan (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 799-811.
- Y. Wang, H. Wang, X. Feng, X. Wang, J. Huang (2010). Biohydrogen production from cornstalk wastes by anaerobic fermentation with activated sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 3092-3099.
- K. Willquist, V. Nkongendem Nkemka, H. Svensson, S. Pawar, M. Ljunggren, H. Karlsson, M. Murto, C. Hulteberg, E.W.J. van Niel, G. Liden (2012). Design of a novel biohythane process with high H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production rates. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 17749-17762.
- M.H. Zwietering, I. Jongenburger, F.M. Rombouts, K. van't Riet (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology*. 56, 1875-1881.

## Bilan

---

Les objectifs de ce chapitre étaient de modéliser et de simuler la production de biohydrogène par l'intermédiaire d'un modèle de type ADM1. Pour cela, il s'agissait dans un premier temps de réviser le modèle cinétique, puis de modifier le modèle de mélange afin d'évaluer son impact sur la simulation du procédé de fermentation sombre. Ainsi, au vu des résultats de ce chapitre, il appert que :

✓ L'implémentation du lactate en tant qu'intermédiaire réactionnel et de l'éthanol en tant que produit final de la fermentation est bénéfique sur la capacité du modèle à prédire le comportement du bioréacteur. Cela permet, entre autres, de respecter le bilan DCO, en bon accord avec les résultats des cultures. Aussi, après calibration du modèle cinétique, les évolutions temporelles de la consommation en glucose, des concentrations en acétate, en butyrate, en propionate, en lactate et en éthanol, ainsi que le débit et la production de biohydrogène sont quasiment parfaitement simulées au cours de toutes les cultures batch.

✓ Le modèle cinétique modifié permet également de simuler la production de biohydrogène par voie fermentaire sombre en culture continue avec trois temps de séjour hydrauliques différents.

✓ L'utilisation du modèle de mélange met en exergue que si l'hydrodynamique globale du bioréacteur correspond à une cascade de cellules parfaitement agitée en série ou fait apparaître des zones mortes, cela favorisera irrémédiablement le lessivage du bioréacteur dans le cas d'un procédé continu et conduira donc à un arrêt de la production de biohydrogène.

Finalement, le développement de ce modèle ADM1 modifié est une première étape réussie avant l'établissement d'un modèle plus robuste. En effet, les perspectives de ce chapitre seront de compléter le modèle afin qu'il soit extrapolable et capable de simuler le procédé de fermentation sombre en fonction de la viscosité du digestat et des conditions d'agitation.



# **Chapitre 8 : Conclusions générales et perspectives**

---



Dans le cadre de la transition énergétique, l'hydrogène renouvelable biosourcé regroupe plusieurs atouts indéniables. Sa production est basée sur des procédés soutenables d'un point de vue environnemental et est indépendante des énergies fossiles. De plus, il constitue une véritable opportunité de valorisation des déchets organiques et de la biomasse puisqu'il peut être utilisé à des fins énergétiques sous forme directe ou sous forme de vecteur énergétique. Parmi la gamme étendue de procédés permettant la production de biohydrogène, la voie fermentaire sombre est une voie potentiellement intéressante. Cependant, les connaissances actuelles des performances du procédé au travers de l'effet des paramètres biotiques et abiotiques ne permettent pas de le développer au stade industriel. De plus, l'approche « bioraffinerie » dont l'objectif est de valoriser la totalité de la matière organique convertie à des fins qui ne sont pas uniquement énergétiques, doit être développée pour l'attractivité et le futur du procédé comme brique technologique.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes attachés à étudier l'influence de la viscosité du digestat et des conditions d'agitation au sein d'un bioréacteur sur les performances de production en biohydrogène, ceci dans le but d'améliorer les connaissances propres au procédé de fermentation sombre, mais aussi afin de faire progresser les méthodes d'optimisation de sa conduite opérationnelle. Ainsi, au travers de « l'approche biologique » et de « l'approche dynamique des fluides », nous avons pu définir plusieurs postulats à partir des résultats obtenus dans les **Chapitres 4 à 7**.

Le **Chapitre 4** avait pour cible de conduire différentes cultures batch dans un bioréacteur de 2-L dans le but de vérifier l'influence de la viscosité du digestat et du mélange induit par agitation mécanique sur les performances du procédé de fermentation sombre (production et rendement en biohydrogène). Dans l'intention de définir une grandeur physique capable de rendre compte des effets conjugués de ces deux paramètres abiotiques, les résultats des fermentations avaient été comparés en fonction de la puissance dissipée par unité de volume ( $P/V$ ), du nombre adimensionnel de Reynolds ( $Re$ ), et de l'échelle spatiale de Kolmogorov en régime turbulent ( $\lambda_K$ ). Malgré la large gamme de  $P/V$  qui a été étudiée autour de la valeur cible, allant de 0,5 à 90 W/m<sup>3</sup>, la puissance dissipée par unité de volume ne peut pas être utilisée pour définir les conditions optimales de production en biohydrogène, notamment parce qu'elle ne tient pas compte de la viscosité du digestat. A l'inverse, le nombre de Reynolds qui reflète

l'hydrodynamique du bioréacteur, réconcilie les effets conjugués de la viscosité du digestat et de l'agitation mécanique sur les performances des cultures batch. De plus, les valeurs de Reynolds étudiées s'étendent du régime laminaire ( $Re = 30$ ) au régime turbulent ( $Re = 1,1 \cdot 10^4$ ). Ainsi, le régime laminaire ( $Re < 100$ ) est caractérisé par une légère augmentation de la production en biohydrogène, les meilleures performances sont observées dans le régime de transition ( $Re$  150–200), et l'écoulement turbulent ( $Re > 1000$ ) est marqué par une baisse significative de la production. Les concentrations finales en acétate et en butyrate retrouvées dans le digestat font également apparaître que le régime d'écoulement a une influence sur les voies métaboliques empruntées pendant la fermentation. A ce titre, les concentrations finales en butyrate sont significativement modifiées, ce qui explique les résultats de production en biohydrogène des cultures batch. Enfin, les mesures de la taille moyenne des agrégats bactériens au sein du digestat combinées à l'expression de l'échelle spatiale de Kolmogorov tendent à montrer que les performances du procédé de fermentation sombre sont détériorées lorsque la taille moyenne des agrégats tourbillonnaires de l'écoulement turbulent avoisine la taille moyenne des agrégats bactériens ( $\lambda_K < 200 \mu\text{m}$ ). Les résultats des fermentations ont donc mis en lumière par une approche originale les effets de la viscosité du digestat et des conditions d'agitation. En conséquence, les performances du procédé semblent pouvoir être optimisées en fonction du nombre de Reynolds.

Une fois l'influence de la viscosité du digestat et du mélange induit par agitation mécanique sur les performances biologiques du procédé de fermentation sombre examinée, nous nous sommes attachés à analyser l'efficacité du mélange dans les mêmes conditions expérimentales, au travers du temps de mélange  $t_m$  et du transfert de matière en hydrogène liquide-gaz  $(k_L a)_{H_2}$  dans le **Chapitre 5**. L'étude de  $t_m$  a été menée par le biais de trois techniques (conductimétrie, décoloration chimique, Fluorescence Induite par Nappe Laser) tandis que le transfert de matière  $(k_L a)_{H_2}$  a été estimé à partir de la méthode de désoxygénation/oxygénation. Tout d'abord, les résultats expérimentaux ont démontré que les trois techniques de détermination du temps de mélange conduisaient à des résultats relativement proches, à l'exception de ceux recueillis par la méthode conductimétrique en régime de transition. Concernant la comparaison des temps de mélange obtenus en fonction de la configuration des mobiles d'agitation et de la localisation du point d'injection des traceurs, il s'est avéré que ces

deux paramètres avaient une influence significative sur les résultats et donc qu'ils devaient être pris en compte pour l'optimisation du mélange au sein du bioréacteur. Comme précédemment,  $t_m$  et  $(k_L a)_{H_2}$  ont pu être exprimés en fonction de la nature du régime d'écoulement par l'intermédiaire du nombre de Reynolds. Ainsi, il appert que le mélange et le transfert de matière sont plus rapides lorsque le régime d'écoulement est turbulent alors que le régime laminaire fait apparaître les valeurs les plus élevées de  $t_m$  et les plus faibles de  $(k_L a)_{H_2}$ . De même, l'analyse des temps caractéristiques du procédé et l'expression du nombre de Damköhler démontre que les performances du procédé de fermentation sombre sont limitées par le transfert de matière en régime laminaire, ce qui n'est pas le cas du régime turbulent. En effet, les baisses significatives de production en biohydrogène observées en écoulement turbulent ne peuvent pas résulter d'un mélange ou d'un transfert de matière trop lent. Enfin, le régime de transition émerge comme l'écoulement optimal pour conduire le procédé de fermentation sombre car la production en biohydrogène est maximisée, les conditions de mélange permettent de minimiser les gradients locaux de pH, et on s'éloigne de la limitation par le transfert de matière liquide-gaz. Ce travail pointe d'autant plus le rôle clé des paramètres abiotiques. Ainsi, en fonction de la viscosité du digestat et des intrants en cours de fermentation, les conditions d'agitation doivent être contrôlées pour maintenir une production de biohydrogène optimale au cours du temps. Il est également ressorti de ces résultats qu'une analyse de l'hydrodynamique locale était nécessaire pour mieux définir les interactions agrégats tourbillonnaires-agrégats bactériens dans l'écoulement turbulent.

Le *Chapitre 6* s'est concentré sur la description de l'hydrodynamique locale du régime turbulent ( $Re\ 2,2 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$ ) ainsi que sur l'estimation locale de l'énergie cinétique turbulente  $k$ , de sa vitesse de dissipation par unité de masse  $\varepsilon$ , et de l'échelle spatiale de Kolmogorov  $\lambda_K$  au sein du bioréacteur. Pour se faire, des outils expérimentaux (PIV) et numériques (CFD) ont été utilisés. Du point de vue de la méthode numérique, des choix de modélisation ont été effectués, incluant l'approche MRF, le modèle RANS de type  $k - \varepsilon$  de Kao-Lauder et la taille du maillage de 500.000 cellules. Concernant la méthode expérimentale, les influences de la résolution des images ainsi que de la technique PIV employée (PIV classique et PIV résolue en temps) ont été étudiées. Les résultats des mesures et des simulations ont permis de confirmer que les deux méthodes permettaient de décrire convenablement les macrostructures de l'écoulement turbulent. Les boucles de recirculation en sortie des deux mobiles d'agitation permettent de faire circuler la totalité des substrats organiques, des métabolites solubles et des bactéries dans l'ensemble du

bioréacteur. Les mesures et simulations des champs de vitesses, ainsi que l'estimation des propriétés caractéristiques de l'écoulement turbulent ( $k$  et  $\varepsilon$ ) sont en bon accord. A partir de l'estimation de la vitesse de dissipation de l'énergie cinétique turbulente, les valeurs locales de l'échelle spatiale de Kolmogorov ont été estimées. La distribution spatiale du rapport  $\lambda_K/D_b$  a montré que les zones d'exposition dans lesquelles ce rapport est inférieur à 1 et donc dans lesquelles les interactions entre agrégats tourbillonnaires et microorganismes peuvent affecter les agrégats bactériens s'étendent rapidement de la région du mobile à l'ensemble du réacteur quand le nombre de Reynolds augmente jusqu'à  $1,1 \cdot 10^4$ . Toutefois, l'existence de régions dans lesquelles ce rapport approche 1 ou devient inférieur à 1 même lorsque l'on est proche de la région de transition démontre que le régime turbulent est globalement néfaste pour la fermentation sombre, même aux nombres de Reynolds les plus faibles. Dans l'ensemble, ce travail démontre aussi l'intérêt d'utiliser des méthodes expérimentales ou numériques pour caractériser l'écoulement turbulent, lesquelles peuvent également constituer des outils puissants pour déterminer les zones potentiellement stressantes pour les bactéries du consortium, par exemple avec d'autres systèmes d'agitation moins cisailants que les turbines Rushton.

Après avoir vérifié et caractérisé les effets spécifiques des deux paramètres abiotiques sur la production en biohydrogène au travers de « *l'approche biologique* » et de « *l'approche dynamique des fluides* », nous avons développé un modèle de type ADM1 dans le **Chapitre 7**. Les modifications apportées au modèle cinétique existant, par l'implémentation du lactate en tant qu'intermédiaire réactionnel et de l'éthanol en tant que produit final de la voie fermentaire sombre, permettent de simuler la consommation de glucose, la production de biohydrogène et des principaux métabolites solubles du digestat (acétate, butyrate, propionate, lactate et éthanol) pour des systèmes en mode batch ou continu. La confrontation des résultats expérimentaux et des simulations a confirmé que les modifications du bilan DCO du modèle cinétique étaient indispensables pour simuler la production de biohydrogène de notre procédé. Avec la modification du modèle de mélange, le bioréacteur a été assimilé successivement à deux, trois ou quatre cellules parfaitement agitées en série. A partir de là, l'importance de l'homogénéisation du digestat en cours de fermentations en mode continu a été vérifiée. Une mauvaise homogénéisation du digestat, des intrants, des bactéries et des métabolites conduit à un lessivage du bioréacteur et donc à un arrêt de la production de biohydrogène.

De manière générale les objectifs de cette thèse de doctorat ont été atteints. Les différentes études ont démontré l'importance des effets de la viscosité du digestat et des conditions d'agitation au sein d'un bioréacteur sur les résultats et les performances du procédé de fermentation sombre. En plus d'une meilleure compréhension de ces deux paramètres abiotiques, la mise en évidence de l'importance du régime d'écoulement et du nombre de Reynolds pour optimiser les performances de production en biohydrogène, de transfert de matière et de vitesse de mélange constitue une réelle avancée pour le contrôle et le pilotage du procédé. Toutefois, au vu des résultats obtenus, plusieurs perspectives spécifiques peuvent être définies pour la suite de ces travaux :

- ✓ Il s'agira tout d'abord de mettre en œuvre le procédé de fermentation sombre avec un digestat au comportement rhéologique non-Newtonien afin de se rapprocher des conditions de cultures rencontrées avec certains substrats organiques complexes. De même, dans de telles conditions, il s'agirait dans un premier temps d'étudier les capacités des techniques et méthodes utilisées dans nos travaux à caractériser le temps de mélange (conductimétrie, décoloration chimique, PLIF), le transfert de matière liquide-gaz et l'écoulement au sein du bioréacteur (PIV et CFD), puis dans un deuxième temps de généraliser au cas non-Newtonien l'influence du nombre de Reynolds. L'analyse numérique de l'écoulement de plusieurs fluides non-Newtoniens fait d'ailleurs actuellement l'objet des travaux de doctorat d'Amaury Danican au sein de l'axe *GePEB* de l'*Institut Pascal* de Clermont-Ferrand.

- ✓ Il s'agira ensuite de développer et d'adapter un dispositif de trajectographie optique qui fait également l'objet de travaux dans le laboratoire. Cet outil devra permettre de déterminer les vitesses moyennes en 3D au sein du bioréacteur, mais aussi de définir les fréquences d'exposition des agrégats bactériens aux régions potentiellement stressantes lorsque l'écoulement du fluide est turbulent.

- ✓ Aussi, il serait intéressant de pouvoir caractériser la communauté bactérienne du consortium en fonction des conditions d'écoulement du digestat. Une approche fondée sur la biologie moléculaire combinant SSCP (polymorphisme de conformation des simples brins) et analyse par PCR (amplification en chaîne par polymérase) quantitative permettrait de vérifier si le régime turbulent a un impact sur le développement de certaines populations bactériennes.

✓ Finalement, les modifications apportées au modèle ADM1 concernant le modèle cinétique et le modèle de mélange devront permettre de définir une méthodologie plus robuste d'optimisation du procédé de fermentation sombre par extension du modèle existant en prenant en compte les deux paramètres abiotiques que sont la viscosité du digestat et les conditions d'agitation sur le mélange et le transfert de matière.