



**HAL**  
open science

## L'ensilage de résidus agro-industriels avant digestion anaérobie: Une solution pour le stockage longue durée

Marie-Lou Hillion, Michel Torrijos, Eric Trably, B. Louchard, Y. Leblanc,  
Jean-Philippe Steyer, Renaud Escudié

### ► To cite this version:

Marie-Lou Hillion, Michel Torrijos, Eric Trably, B. Louchard, Y. Leblanc, et al.. L'ensilage de résidus agro-industriels avant digestion anaérobie: Une solution pour le stockage longue durée. Journées de la Méthanisation: Applications Agricoles et Industrielles, Moletta Méthanisation. FRA., Dec 2016, Chambéry, France. hal-01607957

**HAL Id: hal-01607957**

**<https://hal.science/hal-01607957>**

Submitted on 3 Jun 2020

**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.

# L'Ensilage de résidus agro-industriels avant digestion anaérobie: Une solution pour le stockage longue durée

M-L Hillion<sup>(1,2)</sup>, M. Torrijos<sup>(1)</sup>, E. Trably<sup>(1)</sup>, B. Louchard<sup>(2)</sup>, Y. Leblanc<sup>(2)</sup>, J-P Steyer<sup>(1)</sup>, R. Escudie<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> INRA-LBE, UR0050 Laboratoire de Biotechnologie de L'environnement, 102 Avenue des Etangs F-11100 Narbonne France

<sup>(2)</sup> Vol-V Biomasse : Groupe Vol-V, 45 impasse du Petit Pont, 76230 Inseauville France

**Contact:** Marie-Lou Hillion, PhD, +33 6 82 61 56 52, [marie-lou.hillion@supagro.inra.fr](mailto:marie-lou.hillion@supagro.inra.fr)

**Mots clés:** Prétraitement, ensilage, digestion anaérobie, résidus lignocellulosique, déchets agro-industriels

## Contexte

Dans le contexte actuel de valorisation des déchets, d'augmentation de la part des énergies renouvelables et de réduction des émissions de gaz à effet de serre, la digestion anaérobie (AD) ou méthanisation est un procédé qui connaît un intérêt croissant. La méthanisation est un processus biologique permettant la dégradation des déchets organiques en biogaz stockable et valorisable sous forme de gaz naturel, chaleur, électricité ou biocarburant [1]. Les déchets utilisés sont souvent choisis en fonction de leurs potentiels énergétiques et disponibilité. Ainsi, les résidus de cultures sont intéressants en raison de leur abondance et de leur faible coût. La relativement faible biodégradabilité de ces matières lignocellulosiques doit cependant être prise en considération [2]. De la même manière, les déchets agro-industriels sont intéressants du fait de leur dégradation rapide et de leur potentiel méthane élevé [3]. Cependant, la conservation de ces déchets souvent saisonniers est problématique lorsque l'on considère que l'alimentation des méthaniseurs est réalisée en continu tout au long de l'année. La préservation des déchets saisonniers est une préoccupation majeure. Pour cette raison, le co-ensilage de ces deux types de substrats semble être une solution de stockage innovante. Le procédé d'ensilage est basé sur une fermentation lactique en anaérobiose. Les bactéries lactiques (LAB) dégradent les sucres solubles en acide lactique. La production d'acide induit alors une chute de pH du mélange (< 4,5), qui inhibe les micro-organismes et ainsi préserve le substrat [4]. Cependant, le processus d'ensilage est assez difficile à appliquer sur les déchets agro-industriels du fait de leur forte teneur en eau [5]. L'utilisation d'un co-substrat ayant une forte teneur en matière sèche, tel que la paille de blé, peut être une solution prometteuse et innovante.

## Objectifs de la recherche

Le mélange de substrat cité ci-dessus semble idéal à l'ensilage puisque les déchets saisonniers fournissent les sucres solubles nécessaires au processus microbiologiques, tandis que les résidus de cultures procurent un effet structurant en raison de leur forte teneur en matière sèche [6]. L'objectif technique est de maintenir le potentiel méthane des déchets agro-industriels lors du stockage tout en prétraitant les résidus lignocellulosiques du fait de l'acidification [7].

## Matériel & méthodes

### Substrats

Les substrats utilisés sont les feuilles de betterave (en tant que déchet d'agro-industrie) et la paille de blé (en tant que résidus de culture). Leur composition physico-chimique a été déterminée à l'aide des analyses de Matières Sèches (MS), Matières Volatiles (MV) et potentiel méthane (BMP). Le pH et les concentrations en métabolites et sucres ont également été mesurés pour les feuilles de betterave.

## Réalisation de l'ensilage

L'ensilage a été effectué à l'échelle laboratoire en batch. Pour cela, les quantités de substrat ont été ajustées afin d'atteindre une teneur finale en matière sèche de 35%. Ainsi, 157,6±0,3g de paille de blé et 42,3±0,1g de feuilles de betteraves ont été mélangés. Le mélange a ensuite été introduit dans 50 poches plastiques mises sous vide (200g/sac) puis stockées à l'obscurité et à température ambiante (Photo 1). Trois poches ont été analysées à 9 temps de stockage différents: 0, 2, 7, 14, 21, 30, 60, 120 et 180 jours. Les analyses ont été effectuées en triplicat.

## Méthodes d'analyse

Analyses réalisées afin de mesurer la production de biogaz et suivre l'évolution de la composition du mélange :

- En premier lieu, avant l'ouverture des poches, la quantité de biogaz produite a été estimée à l'aide d'une éprouvette renversée. La composition du biogaz a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer Clarus®580). Après l'injection de 200 µl de biogaz, la colonne capillaire R-Q sépare le CO<sub>2</sub> des autres gaz. Ensuite, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub> sont séparés sur une colonne capillaire Rt-Molsieve 5Å. L'injecteur est à 250°C, le détecteur à conductivité thermique à 150°C et le gaz vecteur est de l'argon (350 kPa à 34 mL/min).
- Après homogénéisation du mélange, la phase solide a également été analysée. La teneur en MS a été mesurée par séchage d'un échantillon d'environ 5g durant 48 heures à 105°C et la teneur en MV par calcination à 550°C durant 3 heures.
- Les communautés microbiennes ont été analysées par séquençage de l'ADNr 16S (MiSeq).
- Le potentiel méthane (BMP) a été déterminé selon la méthode utilisée par Motte et al. [8]. Il a également été déterminé par spectroscopie proche infrarouge (NIRS) [9].

La composition de la phase soluble a également été caractérisée. Les éléments solubles ont été extraits par dilution de l'ensilage à 10-15%MS, suivie d'une centrifugation.

- Le pH a été mesuré directement sur le surnageant.
- Les acides gras volatils (AGV) ont été quantifiés avec un chromatographe en phase gazeuse Perkin Clarus VARIAN 580 (PerkinElmer®, Waltham, États-Unis), le détecteur FID est à 280°C et le gaz vecteur est l'azote (6 mL/min).
- Pour l'analyse des métabolites et des sucres, la phase soluble est filtrée à 0,2 µm puis injectée dans un chromatographe liquide haute performance (HPLC) équipé d'une colonne Aminex 4PX-87H (Biorad) à 45°C. L'éluant est de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005M, 0,3 mL/min)

## **Résultats et discussion**

### Caractéristiques des substrats

Le Tableau 1 résume les principales caractéristiques physico-chimiques des substrats. Les feuilles de betteraves possèdent une forte teneur en eau et une forte concentration en sucres solubles tandis que la paille de blé a une forte teneur en solides et en composants lignocellulosiques. A noter, les feuilles de betterave contiennent initialement non seulement des sucres solubles (12,62 g glucose/kgMS; 5,81 g xylose/kgMS; 3,34 g arabinose/kgMS), mais aussi des métabolites (37,04 g lactate/kgMS; 30,31 g acétate/kgMS). La présence de lactate indique qu'une fermentation a déjà commencé avant le début de l'expérience.

**Tableau 1: Caractéristiques des substrats ensilés**

		Feuilles de betteraves	Paille de blé			Feuilles de betteraves
<b>MV</b>	%	16,77	89,8	<b>Lactate</b>	g/kg MS	37,04
<b>MS</b>	%	11,60	86,5	<b>Acétate</b>	g/kg MS	30,31

<b>pH</b>		5,37		<b>Propionate</b>	g/kg MS	6,36
<b>BMP</b>	ml CH <sub>4</sub> /g MV	280±35	250	<b>Butyrate</b>	g/kg MS	2,82
<b>Fractions Van Soest</b>	Soluble à l'eau		12.22%	<b>Succinate</b>	g/kg MS	2,59
	Soluble au NDF		4.8%	<b>Ethanol</b>	g/kg MS	2,31
	Hémicelluloses		29.0%	<b>Glucose</b>	g/kg MS	12,62
	Cellulose		45.1%	<b>Xylose</b>	g/kg MS	5,81
	Lignine		7.9%	<b>Arabinose</b>	g/kg MS	3,34
	Cendre		0%			

### Evolution du mélange ensilé

Pour chaque temps d'analyse, les résultats correspondant aux trois poches sont très similaires. La Figure 1 présente la composition en éléments solubles au début et à la fin du temps de stockage (soit 0 et 180 jours). Les sucres solubles ont été consommés durant le temps de stockage et différentes voies métaboliques ont clairement été identifiées par la production de plusieurs composés (Figure 1).

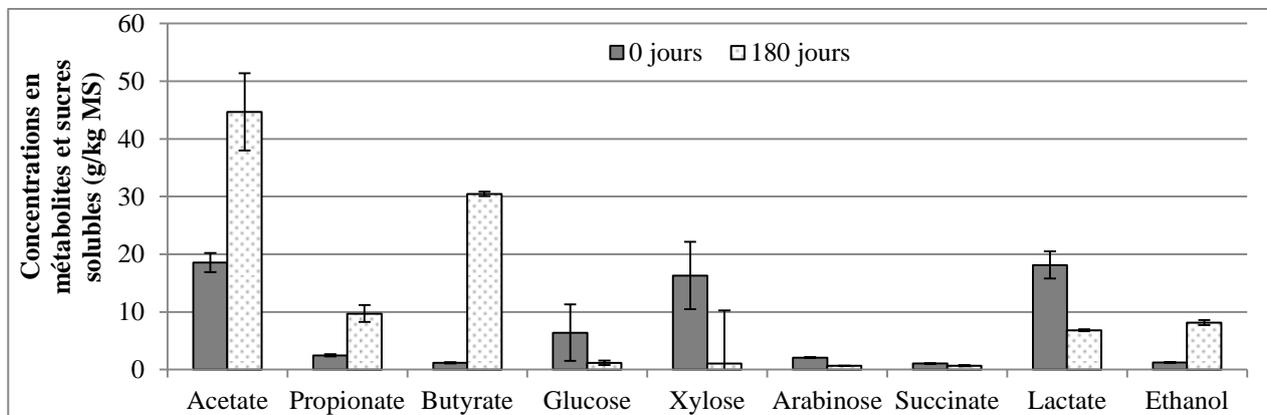
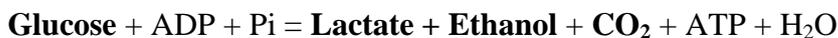
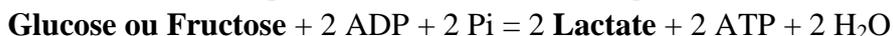


Figure 1: Evolution de la concentration en sucres et métabolites solubles dans les poches d'ensilage de paille de blé et feuilles de betteraves de 0 à 180 jours

Au cours des 14 premiers jours, une diminution du pH a été observée avec une consommation simultanée de sucres solubles (xylose, glucose, fructose et arabinose) et une production de lactate (jusqu'à 35,82 g/kgMS), d'acétate, d'éthanol et de CO<sub>2</sub> (Figure 2)[10]. Durant cette première phase, la fermentation lactique attendue lors d'un ensilage a lieu [11]:



On constate ensuite une consommation du lactate et une production de butyrate, ce qui explique la teneur élevée en butyrate (30,46g/kgMS) et la faible teneur en lactate (6,83 g/kgMS) après 180 jours d'ensilage. La production de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>, ainsi que l'augmentation du pH de 5,04 à 5,25 [12] indiquent clairement que le lactate a été le principal précurseur de la voie butyrique [11]:



Enfin, de 120 à 180 jours de stockage, tandis que la fermentation butyrique a lieu, la quantité de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub> se stabilise. Cela suggère une consommation de ces deux gaz par homo-acétogénèse. Ceci explique les grandes quantités d'acétate (44,67g/kgMS) en fin d'expérience.



Des traces de méthane ont aussi été trouvées à la fin du temps de stockage.

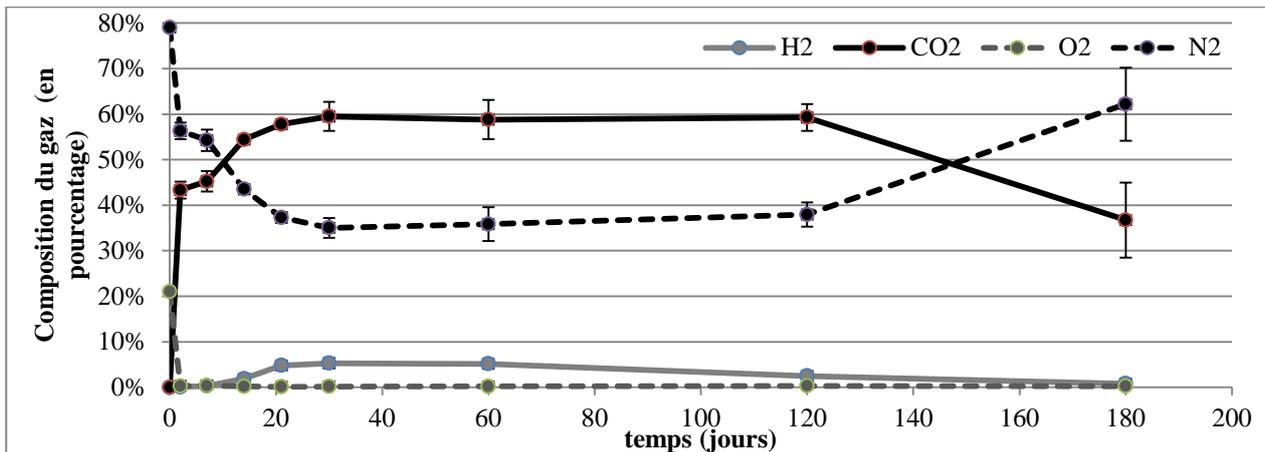


Figure 2 : Evolution de la composition du gaz à l'intérieur des poches d'ensilage durant le temps de stockage

Fait intéressant, la caractérisation de la communauté microbienne par séquençage haut débit confirme la succession de ces voies métaboliques. En effet, une transition entre les bactéries lactiques, liée à *Lactobacillus* sp. et les bactéries productrices d'acide butyrique, du genre *Leuconostoc* est clairement observée.

Ces résultats montrent que, selon les métabolites présents dans le mélange et les conditions biologiques (pH, anaérobiose ...), différentes voies métaboliques peuvent se produire en même temps. En amont de l'expérience, durant le transport des déchets frais, une fermentation a eu lieu, ce qui a partiellement consommé les sucres. Ainsi, la quantité de sucres restants (30g Sucre soluble/kgMS, environ 3%) n'est pas suffisante pour permettre à la fermentation lactique d'abaisser le pH à 4,5 et ainsi d'inhiber la croissance microbienne [4]. L'activité des micro-organismes n'ayant pas été inhibée, cela a provoqué une succession d'autres voies telles que la fermentation butyrique ou acétique qui pourrait être nuisible pour un stockage supérieur à 180 jours [12]. Ces résultats sont en accord avec la recherche présentée par Yang et al. [14], qui étudiaient la paille de blé ensilée avec différentes teneur en glucides solubles afin de déterminer la teneur optimale pour réaliser un ensilage stable. Yang et al. [14] ont conclu qu'une teneur en sucre initiale de 7% MS est nécessaire pour abaisser suffisamment et stabiliser le pH lors de l'ensilage.

Dans le contexte d'une application industrielle de ce mode de stockage, le biogaz ne pourrait pas être récupéré et pourrait représenter une perte potentielle d'énergie. Cependant, sur la base des présentes expériences, après 180 jours de stockage, seulement 38,7 ml de H<sub>2</sub> et 0,1 ml de CH<sub>4</sub> ont été produits au maximum ce qui ne représentent que 1,1% du potentiel méthane attendu. Le potentiel méthane a été mesuré et aucune différence significative entre les mélanges ensilés n'a été observée quel que soit le temps de stockage (230,3±16.2mlCH<sub>4</sub>/MS). En conséquence, l'ensilage d'un mélange de paille de blé avec des feuilles de betterave dans de bonnes proportions est convainquant et constitue une solution prometteuse et pertinente pour stocker les déchets frais sur le long terme avant méthanisation.

Basé sur un travail expérimental à long terme, cette étude permet une meilleure compréhension du processus de fermentation, avec une succession de voies métaboliques et une accumulation de butyrate et d'acétate à la fin du stockage. Des expériences sont en cours pour évaluer l'effet de substrats, ayant des caractéristiques différentes (teneur en sucre, teneur en matière sèche, l'inoculation initiale avec LAB), sur les voies métaboliques et l'ensilage à long terme.

## Bibliographie

- [1] K. C. Surendra, D. Takara, A. G. Hashimoto, and S. K. Khanal, "Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 31, pp. 846–859, Mar. 2014.
- [2] X. Zhao, L. Zhang, and D. Liu, "Biomass recalcitrance . Part I : the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose," *Biofuels Bioprod. Biorefining*, pp. 465–482, 2012.
- [3] C. Asquer, A. Pistis, and E. A. Scano, "Characterization of fruit and vegetable wastes as a single substrate for the anaerobic digestion," *Environ. Eng. Manag. J.*, vol. 12, no. November, pp. 89–92, 2013.
- [4] M. Ambye-Jensen, S. T. Thomsen, Z. Kádár, and A. S. Meyer, "Ensiling of wheat straw decreases the required temperature in hydrothermal pretreatment.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, p. 116, Jan. 2013.
- [5] J. W. Piltz and A. G. Kaiser, "Principles of silage preservation," *Dairy Aust. New South Wales Dep. Prim. Ind.*, p. pp 25 – 56, 2004.
- [6] Q. Chen, M. N. Marshall, S. M. Geib, M. Tien, and T. L. Richard, "Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover.," *Bioresour. Technol.*, vol. 117, pp. 186–92, Aug. 2012.
- [7] Y. Qu, W. Jiang, G. Yin, C. Wei, and J. Bao, "Effects of Feeding Corn-lablab Bean Mixture Silages on Nutrient Apparent Digestibility and Performance of Dairy Cows," *Asian-Australasian Assoc. Anim. Prod. Soc.*, vol. 26, no. 4, pp. 509–516, 2013.
- [8] J.-C. Motte, R. Escudié, N. Beaufils, J.-P. Steyer, N. Bernet, J.-P. Delgenès, and C. Dumas, "Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion," *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 695–701, Jan. 2014.
- [9] M. Lesteur, E. Latrille, V. B. Maurel, J. M. Roger, C. Gonzalez, G. Junqua, and J. P. Steyer, "Bioresource Technology First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 3, pp. 2280–2288, 2011.
- [10] K. Khalid, "An overview of lactic acid bacteria," *Int. J. Biosci.*, vol. 1, no. 3, pp. 1–13, 2011.
- [11] J. Wilkinson, K. Bolsen, and C. Lin, "History of Silage," *Am. So*, no. 42, 2003.
- [12] G. Pahlow, E. M. Richard, and F. Driehuis, "Microbiology of Ensiling," *Am. So*, no. 42, 2003.
- [13] E. Latrille, E. Trably, and C. Larroche, *Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre*. 2011.
- [14] H. Y. Yang, X. F. Wang, J. Bin Liu, L. J. Gao, M. Ishii, Y. Igarashi, and Z. J. Cui, "Effects of water-soluble carbohydrate content on silage fermentation of wheat straw.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 101, no. 3, pp. 232–7, Mar. 2006.