HAL
open science

Méthanisation de marc de raisin. Caractérisation et optimisation du procédé et des prétraitements.

Jean El Achkar

To cite this version:

Jean El Achkar. Méthanisation de marc de raisin. Caractérisation et optimisation du procédé et des prétraitements.. Génie des procédés. Université de Bretagne Sud, 2017. Français. NNT : 2017LORIS459 . tel-01868544

HAL Id: tel-01868544

https://theses.hal.science/tel-01868544v1

Submitted on 5 Sep 2018

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.

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir les titres de docteur de

L'Université Saint Joseph de Beyrouth

Spécialité : Sciences de la vie

ET DE

L'Université de Bretagne Sud

Spécialité : Sciences pour l'ingénieur

Méthanisation de marc de raisin. Caractérisation et optimisation du procédé et des prétraitements

Présentée par

Jean El Achkar

Date de soutenance : 30 mai 2017

Devant le jury composé de :

Pr. Maher Abboud	Président
Pr. Mervat El Hoz	Rapporteur
Dr. Thierry Ribeiro	Rapporteur
Pr. Nicolas Louka	Examinateur
Pr. Richard Maroun	Directeur de thèse
Pr. Jean-Louis Lanoisellé	Directeur de thèse
Dr. Zeina Hobaika	Codirectrice de thèse
Dr. Thomas Lendormi	Codirecteur de thèse
Dr. Dominique Salameh	Invité
M. Robin Richa	Invité

Psaumes 121
5 L'Éternel est celui qui te garde, L'Éternel est ton ombre à ta main droite.
6 Pendant le jour le soleil ne te frappera point, Ni la lune pendant la nuit.
7 L'Éternel te gardera de tout mal, Il gardera ton âme ;
8 L'Éternel gardera ton départ et ton arrivée, Dès maintenant et à jamais.

À mon Dieu Éternel

À mon cher Liban

À ma famille

Je vous dédie cette thèse.

Remerciements

Il y a dans la vie des instants de bonheur qu'aucun mot ne peut décrire. Un des moments les plus émouvants pour moi est le jour où j'entreprends d'adresser ces remerciements. Une grande pensée à tous ceux qui m'ont accompagné et apporté du soutien, de la joie et de l'aide précieuse lors de cette inoubliable aventure qu'est une thèse…

Je tiens, en tout premier lieu, à adresser mes remerciements à tous les membres qui ont accepté de faire partie du jury de thèse. J'exprime ma reconnaissance au Pr Maher Abboud, de l'Université Saint Joseph de Beyrouth, pour avoir accepté d'en être le président. Pr Mervat El Hoz, de l'Université de Balamand, et Dr Thierry Ribeiro de l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, vous m'avez fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse et je vous en remercie vivement. Je souhaite également remercier Pr Nicolas Louka, de l'Université Saint Joseph de Beyrouth, qui a accepté d'être examinateur de ce travail. Dernier merci au Dr Dominique Salameh et M. Robin Richa pour accepter d'être membres de ce jury.

Mes plus sincères remerciements s'adressent à mes directeurs et codirecteurs de thèse. Je désire exprimer ma grande reconnaissance au Pr Richard Maroun, doyen de la faculté des sciences de l'USJ, qui m'a confié ce passionnant sujet de thèse. Sans votre vision et vos actions optimistes, ce beau projet n'aurait jamais vu le jour. Grand merci pour votre investissement à toute épreuve et pour vos qualités humaines ; je suis très fier d'avoir été votre étudiant. Je vous remercie également pour l'encouragement perpétuel de la recherche au sein de notre faculté visant des niveaux scientifiques toujours à la hauteur.

Grand merci pour la pédagogie et les conseils pertinents du Pr Jean Louis Lanoisellé qui m'a accompagné dans ces dernières années et qui a stimulé mes réflexions scientifiques tout en m'accordant confiance et autonomie dès mes premiers pas dans le monde de la méthanisation. Je vous remercie pour le partage de votre expertise, et pour votre accueil avec bienveillance à Pontivy qui m'a offert la possibilité de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Dr Zeina Hobaika, il m'est difficile de trouver les mots pour vous remercier ; vous m'avez encadré pendant plus de cinq ans, depuis mon Master et jusqu'à présent. Votre présence a tellement embelli cette aventure unique avec un zeste féminin mémorable. Dans une équipe toute masculine, vous avez été pour moi l'étincelle qui rayonne et illumine les moments difficiles rencontrés. Je vous remercie profondément pour votre présence continue, votre suivi scientifique sérieux et pertinent ainsi que votre engagement à mes côtés durant cette thèse.

Enfin, Dr Thomas Lendormi, je vous remercie pleinement pour votre disponibilité et votre encadrement proche et précieux, tout au long de mon séjour en France, ce qui m'a permis de bien profiter de votre considérable expérience en méthanisation. Milles merci de m'avoir formé avec rigueur, ferveur et patience, à ce domaine qui m'a été totalement nouveau. Je n'oublierai jamais nos discussions scientifiques au bureau, dans les couloirs de l'IUT et dans la fameuse salle des bioréacteurs.

Ce projet s'est déroulé dans une ambiance productive et chaleureuse au sein de la faculté des sciences de l'USJ. Je voudrais alors remercier Pr Nicolas Louka pour sa contribution fructueuse à ce travail, ses conseils scientifiques et son suivi continu lors de ma formation doctorale. Merci aussi au Dr Dominique Salameh pour sa participation enrichissante aux réunions de notre équipe et au Pr Maher Abboud pour son enthousiasme et son aide particulière dans la partie relative à la simulation des effets de la température sur la production de méthane.

Merci à Léa et à ces 8 ans universitaires que nous avons passé ensemble. Une pensée également à Helga et Hilda pour votre aide et votre amabilité.

Grand Merci à tous les collègues français qui m'ont accompagné jusqu'au bout et qui m'ont soutenu. Je remercie chaleureusement tous les membres du site de Pontivy. Merci à Anne, Claire S., Claire C., Magalie, Véronique, Virginie, Emmanuelle, Adeline, Servane, Marie-Christine, Stéphanie, Corinne, Alex, Marie, Lubana, Laurent, André, Yves, Nicolas, Kristen et Xiaojun. Un remerciement particulier à Gaëlle, pour son soutien, sa bonne humeur et son sourire contagieux. Amr, que de beaux souvenirs gravés dans ma mémoire ! Je suis ravi que tu aies croisé mon chemin et je te souhaite un futur prospère parce que tu le mérites amplement.

Je tiens aussi à remercier le conseil de la recherche de l'Université Saint-Joseph, le CNRS libanais, l'Institut Français au Liban et l'association Arcenciel pour avoir financé ce projet de thèse. Merci au programme LIRA pour l'encouragement et pour le prix accordé.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille. Un énorme MERCI ne suffit pas pour des personnes qui revêtent tout simplement les grâces du ciel. Qu'aurais-je fait si vous n'étiez pas là ? Assurément rien. Merci à mes parents, à Henri et Saydeh, la lumière de mes yeux. J'espère que vous restez toujours fiers de votre dernier-né. Merci pour votre amour indescriptible et vos prières qui me soutiennent et me guident tous les jours. Je remercie du fond du cœur mes sœurs et frères ; merci à Amine, Marie, Frida, Violette, Henriette, Mireille, Jocelyne et Charbel. Joe, grand merci d'être toujours là. Merci pour le support et l'encouragement continu. Merci

également à mes adorables nièces et mes admirables neveux. Tout simplement, je vous aime tous !

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce parcours exceptionnel…

Une ultime pensée pour toi, mon bon Dieu, qui a accompagné toujours mon chemin. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Résumé

La digestion anaérobie représente un élément clé dans la dynamique de développement durable contribuant à la valorisation verte des déchets organiques sous forme de biogaz et d'engrais. Dans le cadre de ce travail de thèse franco-libanais, nous cherchons à valoriser le marc de raisin, déchet majeur et principal sous-produit issu de la viniculture, par la digestion anaérobie, afin de générer de l'énergie dite verte sous forme de méthane. Dans un premier temps, le potentiel méthane du marc de raisin est démontré, validant notre biomasse végétale comme source potentielle d'énergie. Des informations détaillées sur les productions maximales de méthane à partir du marc entier, des pulpes et des pépins, séparément, sont obtenues en mode batch à 37 °C. La faisabilité technique du procédé est alors validée suite à une extrapolation au mode continu. De plus, des essais d'acclimatation du digesteur continu à la température moyenne de la vallée de la Bekaa (25 °C) permettent de simuler et d'adapter le système au milieu libanais. D'autre part, nous avons mené une caractérisation bio-physico-chimique de différents cépages de marcs de raisins en provenance de différentes régions viticoles. La diversité du contenu lignocellulosique et du potentiel méthanogène des substrats choisis a été mise en évidence. Une corrélation négative existe, en particulier, entre le potentiel méthane et les teneurs en lignine et en cellulose. Afin d'intensifier la production de méthane, le dimensionnement des digesteurs anaérobies en mode continu est optimisé en déterminant un optimum de fonctionnement pour une charge appliquée de 3,7 kg DCO m^{-3} j^{-1} et un temps de séjour de 20 jours. Enfin, nous évaluons les effets d'une variété de prétraitements (congélation, traitement alcalin, traitement acide, ultrasons et champs électriques pulsés) sur la production de méthane et sur la biodégradabilité des fractions. Le couplage du traitement alcalin à 10% NaOH avec la congélation à -20 °C s'avère être le meilleur procédé d'intensification.

Mots clés

Digestion anaérobie, marc de raisin, potentiel méthanogène, biodégradabilité, mode batch, digesteur continu, fractions lignocellulosiques, intensification du procédé, prétraitements.

Abstract

Anaerobic digestion is considered to be a crucial part of a sustainable development strategy, contributing to the green valorization of organic waste as biogas and fertilizers. As part of this doctoral thesis, we explored the valorization of grape pomace, the major waste and main by-product of winemaking, by anaerobic digestion, to generate green energy in the form of methane. Firstly, the methane potential of grape pomace is demonstrated, validating our vegetal biomass as a potential source of energy. Detailed information on the maximum production of methane from whole pomace, pulps and seeds are obtained in batch mode at 37 °C. The technical feasibility of the process is then validated following an extrapolation to the continuous mode. Moreover, the acclimation of the continuous digester at the average temperature of the Beqaa valley (25 °C) allowed to simulate and adapt the current system to the Lebanese environment. On another note, we carried out a bio-physico-chemical characterization of different grape varieties from different wine-growing areas. The diversity of the lignocellulosic content and the methane potential of the selected substrates was highlighted. A negative correlation exists, in particular, between the methane potential and the lignin and cellulose fractions. In order to intensify methane production, we conducted an optimization of anaerobic digesters dimensioning in continuous mode by determining an optimum of operation for an applied load of 3.7 kg COD m^{-3} d^{-1} and a residence time of 20 days. Finally, we evaluated the effects of a variety of pretreatments (freezing, alkaline treatment, acid treatment, ultrasounds and pulsed electric fields) on the methane production and the biodegradability of lignocellulosic fractions. The coupling of the alkaline treatment using 10% NaOH with freezing at -20 °C seems to be the best intensification process.

Keywords

Anaerobic digestion, grape pomace, methane potential, biodegradability, batch mode, continuous digester, lignocellulosic fractions, process intensification, pretreatments.

Abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

ACV : Analyse de Cycle de Vie

AD : Anaerobic Digestion

ADF : Acid Detergent Fiber

ADL : Acid Detergent Lignin

AGV : Acides Gras Volatils

AGLC : Acides Gras à Longues Chaînes

AMPTS : Automatic Methane Potential Test System

APOH : Bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène

AVT : Acidité Volatile Totale

BMP : Biochemical Methane Potential

CDR : Conseil pour le Développement et la Reconstruction

CEP : Champs Électriques Pulsés

COD : Chemical Oxygen Demand

COA : Charge Organique Appliquée

CSTR : Continuous Stirred Tank Reactor

DCO : Demande Chimique en Oxygène

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GNV : Gaz Naturel pour Véhicules

GP : Grape Pomace

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

HRT : Hydraulic Retention Time

IFV : Institut Français du Vin de la Vigne

LIRA : Lebanese Industrial Research Achievement

MB : Matière Brute

MO : Matière Organique

MS : Matière Sèche

Mtep : Million de tonnes équivalent pétrole

MV : Matière Volatile

NDF : Neutral Detergent Fiber

NL : Normal Liter

Nm^3 : Normal cubic meter

OIV : International Organization of Vine and wine

OLR : Organic Loading Rate

PC : Principal Component

PCI : Pouvoir Calorifique Inférieur

PCR : Polymerase Chain Reaction

RMSPE : Root Mean Square Percentage Error

STEP : Boues des stations d'épuration

TAC : Titre Alcalimétrique Complet

TS : Total Solids

TSH : Temps de Séjour Hydraulique

TVA : Total Volatile Acidity

UASB : Upflow Anaerobic Sludge Blanket

US : Ultrasons

VS : Volatile Solids

Z : Indice de désintégration

Liste des figures

Figure I. 1 : Évolution des tonnages de déchets traités en France, selon la nature du traitement (ADEME, 2015) 23

Figure I. 2 : Situation des déchets au Liban. (a) Composition, (b) Estimation de production, (c) Destination finale (SWEEP-NET, 2014) 24

Figure I. 3 : Étapes générales de la vinification en rouge (adaptée de la Vinification du vin rouge de Bourgogne) 28

Figure I. 4 : Structure de la cellulose 30

Figure I. 5 : Représentation schématique des zones cristallines et amorphes de la cellulose .. 30

Figure I. 6 : Principaux glucides constituant les hémicelluloses 31

Figure I. 7 : Alcools précurseurs de la lignine 31

Figure I. 8 : Valorisation des marcs de raisins et principaux usages (adaptée de Institut Français de la Vigne et du Vin, 2013) 33

Figure I. 9 : Gravure présentant Volta collectant du méthane dans les marais d'Angera (Lombardie, Italie) (Ferry, 1994) 34

Figure I. 10 : Principaux processus de dégradation de la matière organique. B1 = Bactéries hydrolytiques ; B2 = Bactéries acidogènes ; B3a = Bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (APOH) ; B3b = Bactéries homoacétogènes ; B4a = Bactéries méthanogènes hydrogénotrophes ; B4b = Bactéries méthanogènes acétotrophes ; B5 = Bactéries sulfato-réductrices ; B6 = Bactéries dénitrificatrices. 36

Figure I. 11 : Schéma d'un digesteur parfaitement mélangé : a) mécaniquement par pâles, b) par compression et recirculation du biogaz, c) par recirculation du milieu. A : alimentation, S : sortie, G : biogaz 43

Figure I. 12 : Schéma d'un digesteur à pales avec un axe longitudinal 44

Figure I. 13 : Schéma d'un digesteur à lit fixe : a) à flux descendant, b) à flux ascendant. A : alimentation, S : sortie, G : biogaz 44

Figure I. 14 : Schéma de principe d'un réacteur à lit fluidisé (a) à flux ascendant, (b) à flux descendant, (c) à lit turbulé inverse. G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation du liquide. P : pompe de recirculation du gaz 45

Figure I. 15 : Schéma de principe d'un réacteur à lit de boues à flux ascendant (UASB : Up-flow Anaerobic Sludge Blanket). G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation 46

Figure I. 16 : Répartition des différentes technologies de méthanisation en fonction des secteurs de développement (Girault, R., 2011) 47

Figure I. 17 : Effets des prétraitements sur la production de méthane mesurée par les tests BMP : (A) production du méthane sans prétraitement, (B) augmentation de la production de méthane après prétraitement et (C) accélération de la cinétique de production après prétraitement (Montgomery et Bochmann, 2014) 52

Figure I. 18 : Description schématique du phénomène d'électroporation des membranes cellulaires 58

Figure II. 1 : Les différents cépages de marcs de raisins utilisés, a) Cabernet Sauvignon-France, b) Merlot, c) Chardonnay, d) Pinot noir, e) Marselan, f) Syrah, g) Cabernet Sauvignon-Liban, h) Cabernet Franc 2014, i) Cabernet Franc 2013, j) Chenin blanc et k) marc ensilé 63

Figure II. 2 : Fractionnement de Van-Soest. NDF = Neutral Detergent Fiber ; ADF = Acid Detergent Fiber ; ADL = Acid Detergent Lignin ; Résidu 550 °C = résidu obtenu par calcination 67

Figure II. 3 : Système AMPTS II : unité d'incubation (a), unité de fixation du CO_2 (b), unité de mesure du volume de CH_4 (c) et système de contrôle et acquisition (d) 68

Figure II. 4 : Soulèvement d'un clapet suite à l'accumulation d'un volume précis de méthane 69

Figure II. 5 : Représentation schématique du montage expérimental (Guillaume et Lendormi, 2013) 74

Figure II. 6 : Système des digesteurs en mode continu : unité d'incubation (a), unité de fixation du CO_2 (b) et unité de mesure du volume de CH_4 (c) 76

Figure II. 7 : Courbe théorique établissant la relation entre la charge organique appliquée, la productivité et le taux de dégradation lors de la digestion anaérobie d'un substrat donné (Guillaume et Lendormi, 2013) 77

Figure II. 8 : Bac à ultrasons 81

Figure II. 9 : Système de traitement CEP, générateur haute tension (a), oscilloscope (b), générateur d'impulsions (c), modulateur (d), boite de mise à la terre (e), chambre de traitement (f) et impédance-mètre (g)..... 82

Figure II. 10 : Bouteilles contenant du marc de raisin avec des solutions à différentes concentrations en NaOH, après 24h de traitement. NaOH 0% (a), NaOH 6% (b) et NaOH 10% (c) 84

Figure III. 1 : Suivi du pH et du ratio AVT/TAC au cours des expérimentations, pour les différentes températures testées 108

Figure III. 2 : Productions journalières de biogaz et taux de méthane au cours des expérimentations pour les différentes températures..... 109

Figure III. 3 : Courbe montrant la variation de k_T en fonction des différentes températures d'expérimentations 111

Figure V. 1 : Courbe expérimentale établissant la relation entre la charge organique appliquée, la production de méthane et le taux de dégradation lors de la digestion anaérobie du marc raisin 140

Figure VII. 1 : Unité de méthanisation en mode batch montée au sein de la faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth 184

Figure VII. 2 : Dégagement des bulles de gaz à l'intérieur des digesteurs durant la digestion anaérobie du marc de raisin..... 185

Figure VII. 3 : Production cumulée de méthane normalisée à la masse de matières sèches injectée en fonction du temps. Les courbes correspondent à un modèle du premier ordre. Les barres représentent l'écart-type moyen des échantillons. 186

Liste des tableaux

Tableau II. 1 : Cépages de marcs de raisins, collecte et origines. 62

Tableau II. 2 : Paramètres de fonctionnement des digesteurs anaérobies. 78

Table des matières

Remerciements **3**
Résumé **6**
Abstract **7**
Abréviations **8**
Liste des figures **10**
Liste des tableaux **13**
Table des matières **14**
Projet de thèse **20**

I. Chapitre I : Synthèse bibliographique **23**
I.1. Gestion des déchets organiques : problématiques et enjeux **23**
I.1.1. État des lieux en France et au Liban 23
I.1.2. Vers des sources d'énergie verte 24
I.2. Sous-produits issus de la vinification : cas des marcs de raisins **26**
I.2.1. Activité viti-vinicole en France et au Liban 26
I.2.2. De la viticulture aux marcs de raisins 27
I.2.2.1. Étapes générales de la vinification 27
I.2.2.2. Marc de raisin, sous-produit de la viticulture 29
I.2.2.3. Polymères de la matrice lignocellulosique 29
I.2.2.3.1. Cellulose 29
I.2.2.3.2. Hémicelluloses 30
I.2.2.3.3. Lignine 31
I.2.2.3.4. Extractibles 31
I.2.3. Valorisation des marcs de raisins 32
I.3. Production d'énergie verte par digestion anaérobie **33**
I.3.1. Historique et aspects généraux 33
I.3.2. Voies biochimiques 34
I.3.2.1. Hydrolyse 34
I.3.2.2. Acidogenèse 35
I.3.2.3. Acétogenèse 35
I.3.2.4. Méthanogenèse 35
I.3.2.5. Autres réactions 36
I.3.3. Paramètres de régulation et indicateurs de suivi 37
I.3.3.1. Température 37
I.3.3.2. pH 37

I.3.3.3. Alcalinité 37
I.3.3.4. Acides gras volatils 37
I.3.3.5. Granulométrie 38
I.3.3.6. Agitation 38
I.3.4. Conversion de la matière organique en méthane 38
I.3.4.1. Demande chimique en oxygène 38
I.3.4.2. Potentiel méthanogène et biodégradabilité anaérobie 40
I.3.4.3. Cinétique chimique 41
I.3.4.4. Principaux inhibiteurs 41
I.3.5. Bioréacteurs de méthanisation 42
I.3.5.1. Modes d'alimentation et arrangement des réacteurs anaérobies 42
I.3.5.1.1. Mode discontinu ou batch 42
I.3.5.1.2. Mode continu 42
I.3.5.1.3. Mode semi-continu 42
I.3.5.2. Technologies des réacteurs continus 43
I.3.5.2.1. Réacteurs à cellules libres : 43
I.3.5.2.1.1. Réacteurs parfaitement mélangés : 43
I.3.5.2.1.2. Réacteurs à écoulement piston 43
I.3.5.2.2. Réacteurs à biofilm ou granules 44
I.3.5.2.2.1. Réacteurs à lit fixe 44
I.3.5.2.2.2. Réacteurs à lit mobile 45
I.3.5.2.2.3. Réacteurs UASB 45
I.3.5.2.3. Réacteurs en une étape ou deux étapes 46
I.3.5.3. Paramètres opérationnels des digesteurs 47
I.3.5.3.1. Charge organique appliquée 47
I.3.5.3.2. Temps de séjour hydraulique 47
I.3.5.3.3. Volume utile 48
I.3.5.3.4. Température 48
I.3.5.4. Démarrage des digesteurs anaérobies 48
I.3.5.4.1. Inoculation 49
I.3.5.4.2. Montée en charge 49
I.3.6. Voies d'utilisation des produits de la méthanisation 50
I.3.6.1. Biogaz 50
I.3.6.2. Fraction liquide du digesteur 50
I.3.6.3. Fraction solide du digestat 50

I.4. Optimisation de la production de méthane par divers prétraitements 51
I.4.1. Prétraitements thermiques 52
I.4.2. Prétraitements chimiques 54
I.4.2.1. Traitement alcalin 54
I.4.2.2. Traitement acide 55
I.4.3. Prétraitements mécaniques 55
I.4.3.1. Broyage 55
I.4.3.2. Ultrasons 56
I.4.3.3. Champs électriques pulsés (CEP) 57
I.5. Conclusion et positionnement du sujet 59

II. Chapitre II : Matériels et méthodes 62
II.1. Matrice des substrats, origine et composition 62
II.1.1. Échantillonnage 62
II.1.1.1. Cépages de marcs de raisins 62
II.1.1.2. Inoculum 64
II.1.2. Caractéristiques bio-physico-chimiques des substrats 64
II.1.2.1. Matières sèches (MS) 64
II.1.2.2. Matières volatiles (MV) 64
II.1.2.3. Demande chimique en oxygène (DCO) 65
II.1.2.4. Dosage de l'azote et du phosphore 65
II.1.2.5. Granulométrie 65
II.1.2.6. Fractionnement biochimique par la méthode de Van-Soest 66
II.1.2.7. Dosage des polyphénols totaux 67
II.1.2.8. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) 67
II.2. Procédé de méthanisation en mode batch du marc de raisin 68
II.2.1. Description et principe de fonctionnement de l'AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) 68
II.2.2. Calcul de normalisation du gaz 70
II.2.3. Inoculum et ratio substrat/inoculum 71
II.2.4. Modélisation cinétique de la production de méthane 72
II.3. Procédé de méthanisation en mode continu du marc de raisin 73
II.3.1. Digesteur CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) de 12 L 73
II.3.1.1. Description et principe de fonctionnement 73
II.3.1.2. Conditions expérimentales des études réalisées dans ce digesteur 74

II.3.1.2.1. Caractérisation de la production de méthane du marc de raisin à 37 °C 74
II.3.1.2.2. Acclimatation du pilote à 25 °C 75
II.3.2. Digesteurs de 2 L 76
II.3.2.1. Description et principe de fonctionnement 76
II.3.2.2. Conditions expérimentales des études réalisées dans ces digesteurs 76
II.3.2.2.1. Évaluation des effets du temps de séjour hydraulique (TSH) sur la productivité des réacteurs 76
II.3.2.2.2. Évaluation des effets du traitement alcalin sur la production de méthane en continu 79
II.3.3. Méthodes analytiques de suivi des digesteurs 79
II.3.3.1. Détermination du Titre Alcalimétrique Complet (TAC) et de l'Acidité Volatile Totale (AVT) 79
II.3.3.2. Évaluation de la biodégradabilité des fractions lignocellulosiques 80
II.4. Prétraitements du marc de raisin 80
II.4.1. Prétraitements physiques 80
II.4.1.1. Congélation 80
II.4.1.2. Traitement aux ultrasons 81
II.4.1.3. Traitement CEP 82
II.4.2. Prétraitements chimiques 83
II.4.2.1. Traitement avec de la soude, de l'ammoniaque et de l'acide chlorhydrique 83
II.5. Analyses statistiques des données 84
II.5.1. Coefficient de corrélations linéaires 84
II.5.2. Analyse en Composantes Principales (ACP) 84

III. Chapitre III : Méthanisation de marc de raisin : caractérisation biochimique des fractions et production de méthane dans des digesteurs discontinus et continus 87
III.1. Avant-propos 87
III.2. Full paper: "Anaerobic digestion of grape pomace: biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters" 89
III.3. Acclimatation du pilote à la température moyenne de la plaine de la Bekaa .. 108
III.3.1. Suivi des paramètres physico-chimiques et de la production de gaz 108
III.3.2. Modèle de simulation pour la méthanisation du marc de raisin 109

IV. Chapitre IV : Digestion anaérobie de neuf variétés de marcs de raisins : corrélation entre composition biochimique et production de méthane 115

IV.1. Avant-propos **115**

IV.2. Full paper: "Anaerobic digestion of nine varieties of grape pomace: correlation between biochemical composition and methane production" **117**

V. Chapitre V : Optimisation des paramètres opérationnels de la digestion anaérobie de marc de raisin **138**

V.1. Avant-propos **138**

V.2. Full paper: "Continuous anaerobic digestion of grape pomace: Effect of the hydraulic retention time (HRT) on process performance and fibers degradability" **141**

VI. Chapitre VI : Influence de divers prétraitements sur les fractions lignocellulosiques et la production de méthane du marc de raisin **159**

VI.1. Avant-propos **159**

VI.2. Full paper: "Influence of several pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace » **162**

VII. Chapitre VII : Transfert technologique **184**

VIII. Chapitre VIII : Conclusions générales et perspectives **188**

Références bibliographiques **193**

Projet de thèse

Depuis de nombreuses années, la production de déchets organiques est en augmentation constante en raison de pratiques d'élevage, d'industrialisation, de procédés de traitement et de collecte des déchets de plus en plus intenses. La gestion de ces déchets est devenue un enjeu environnemental majeur. Elle est ainsi de plus en plus orientée vers la valorisation et le recyclage. Pour répondre à ces enjeux environnementaux, des procédés biologiques de traitement et de valorisation sont mis en œuvre, notamment la méthanisation (digestion anaérobie).

La production de méthane par digestion anaérobie est considérée comme l'une des voies contribuant à la réduction de notre dépendance vis-à-vis des énergies fossiles. Elle se présente comme une approche prometteuse et puissante pour l'exploitation durable des ressources organiques naturelles, envisageant ainsi un avenir bioéconomique.

D'autre part, la vitiviniculture est considérée de nos jours comme l'une des activités agricoles les plus importantes à l'échelle mondiale, en particulier en France et au Liban. Cependant, les déchets et les coproduits générés par ce secteur, s'accumulent en quantité importante tout au long de l'année. Ceci ouvre ainsi la voie à des moyens de gestion, de traitement et de valorisation nombreux et variés.

Dans le cadre de ce travail de thèse franco-libanais, nous nous intéressons à explorer la valorisation du marc de raisin, déchet majeur et principal sous-produit de la vinification, par la digestion anaérobie, afin de générer de l'énergie dite verte sous forme de méthane.

Le plan de travail de cette thèse est articulé autour de 4 objectifs principaux :

Nous visons dans un premier temps analyser le procédé de méthanisation de marc de raisin dans un digesteur parfaitement mélangé (CSTR) à 37 °C afin de mieux comprendre la faisabilité technique du procédé à une échelle industrielle. Des essais d'acclimatation du digesteur de 37 °C à la température moyenne de la vallée de la Bekaa (25 °C) sont envisagés en vue de simuler et adapter le système aux milieux libanais.

Le deuxième objectif consiste à accomplir une caractérisation bio-physico-chimique de différents cépages de marcs de raisins en provenance de différentes régions viticoles. Cette

caractérisation sera suivie d'une détermination de la biodégradabilité anaérobie de chaque cépage et des potentiels méthanogènes correspondants. Enfin, les corrélations possibles entre les fractions biochimiques et les potentiels méthanogènes seront évaluées et largement étudiées.

Afin d'optimiser le processus en mode continu, nous nous intéressons à évaluer les effets de la charge organique appliquée et du temps de séjour hydraulique sur la productivité du digesteur. Les conditions qui permettent à la fois d'assurer un taux de dégradation optimal du marc de raisin et une productivité optimale de méthane sont à déterminer.

L'intensification de la production de méthane est indispensable pour compléter le schéma d'optimisation. Nous cherchons alors à mettre en œuvre différents prétraitements chimiques ou mécaniques en amont de la digestion anaérobie du marc de raisin. Les effets correspondants sur la production de méthane et sur la biodégradabilité des fractions lignocellulosiques sont évalués.

Enfin, la valorisation au Liban de coproduits industriels ne peut se parfaire sans un transfert technologique d'expertise au sein de la communauté. Dans ce but, nous mettrons en place une première unité de méthanisation en mode batch, au sein de la faculté des sciences. Ainsi, nous contribuerons à la dynamique établie au sein de la faculté visant un développement durable sur l'ensemble de la chaîne de valeur des coproduits industriels. La production d'énergie à partir de déchets organiques étant l'ultime objectif de ce travail de recherche, pour une société verte au niveau de l'environnement et de l'économie.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Gestion des déchets organiques : problématiques et enjeux

I.1.1. État des lieux en France et au Liban

La production de déchets organiques en France représente environ 47 millions de tonnes (ADEME, 2015). En fait, d'après l'article L. 541-1 du code français de l'environnement, un déchet est défini comme étant "tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon".

De nos jours, plusieurs filières principales de gestion des déchets sont mises en place en France : le tri pour le recyclage, les traitements biologiques (compostage et méthanisation), les traitements thermiques (principalement l'incinération) et le stockage. L'évolution de la réglementation et la prise de conscience écologique ont favorisé l'augmentation des taux de recyclage, du compostage et de la méthanisation des déchets, tout en diminuant les quantités stockées en décharge (Figure 1).

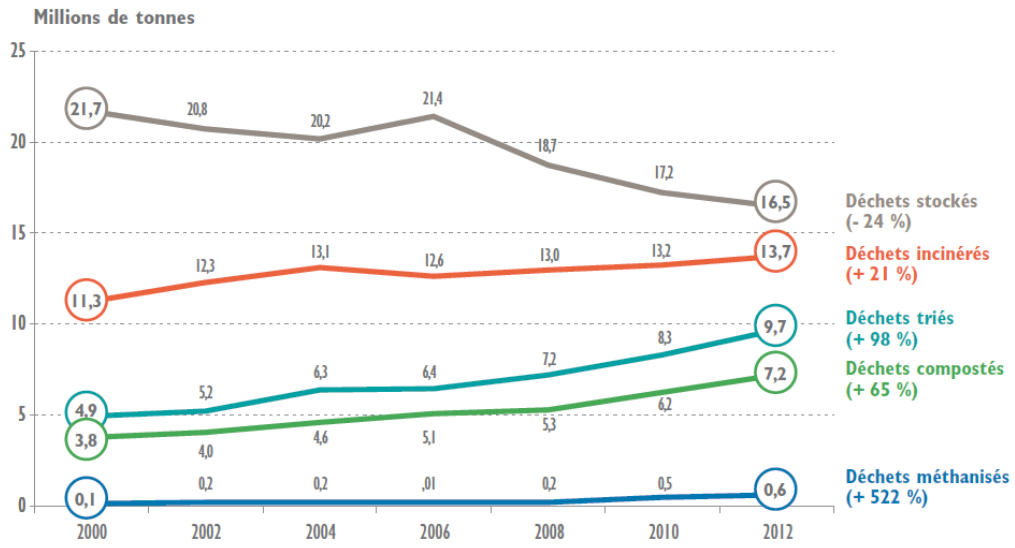

Figure I. 1 : Évolution des tonnages de déchets traités en France, selon la nature du traitement (ADEME, 2015)

Malheureusement, la situation au Liban est loin du schéma français, marquant une crise dans l'histoire du pays. En fait, le problème des déchets solides au Liban demeure une préoccupation majeure avec l'absence d'une solution à long terme. La croissance

démographique, le rétrécissement des superficies et l'absence de stratégies et/ou politiques nationales ont provoqué une crise majeure dans le pays. Jusqu'à nouvel ordre, et en l'absence de consensus sur les questions clés liées à la gestion des déchets, le gouvernement libanais comptait sur les mesures d'intervention d'urgence. Avec presque 5 millions d'habitants, le Liban génère environ 2,04 millions de tonnes de déchets par an (SWEEP-NET, 2014) ; plus que la moitié (53 %) étant composée de déchets organiques (Figure 2a). Une augmentation rapide de la production des déchets est prévue ; elle atteindrait 2,9 millions de tonnes vers 2035 (Figure 2b). D'autre part, on estime aujourd'hui que 48% des tonnes produites sont mises en décharge, 29% sont jetées dans des terrains vagues alors que les 23% restantes sont récupérées pour le tri et le compostage (Figure 2c) (SWEEP-NET, 2014).

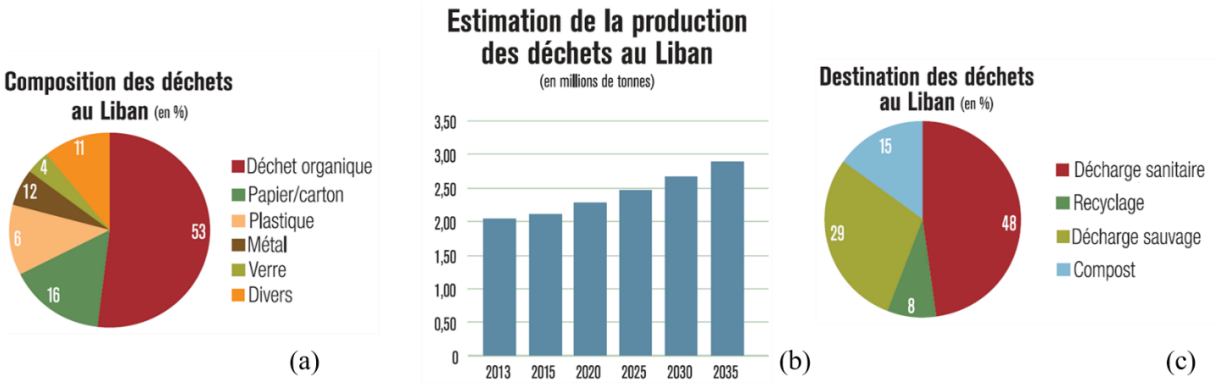

Figure I. 2 : Situation des déchets au Liban. (a) Composition, (b) Estimation de production, (c) Destination finale (SWEEP-NET, 2014)

I.1.2. Vers des sources d'énergie verte

De nos jours, la demande énergétique ne cesse de croître, à l'échelle mondiale : de 5 000 Mtep en 1970, elle est passée à 12 000 Mtep en 2010. En raison de la croissance démographique et économique, elle pourrait plus que doubler d'ici 2050 par rapport au niveau de 2010 (MIEEN, 2012). Les énergies fossiles, en tête desquelles se place le pétrole, suivi du gaz naturel et du charbon, comptent maintenant pour plus de 80% de l'offre (MIEEN, 2012). Cela soulève la question de la durabilité d'une telle dépendance, compte tenu de la limitation des ressources et des difficultés inhérentes à leur exploitation. En outre, le défi du changement climatique impose la réduction des émissions carbonées à l'échelle planétaire au plus vite. Ces enjeux ont fait l'objet du protocole de Kyoto mis à jour en 2012, visant à réduire les émissions mondiales de gaz à effet de serre, et plus récemment de la 21ème conférence des parties (COP21) tenue à Paris en décembre 2015.

Dans ce cadre-là, la valorisation des déchets organiques permet la transition énergétique à partir de combustibles fossiles vers des sources d'énergie verte. De plus, la méthanisation est une des technologies vertes les plus encouragées. En effet, elle permet la production de biogaz qui peut être récupéré sous différentes formes (électricité, chaleur, injection dans le réseau de gaz naturel). Par ailleurs, le digestat, produit solide de la méthanisation, offre également une alternative aux engrais minéraux dont la synthèse est consommatrice d'énergie et de ressources chimiques (Moletta, 2015).

En plus de son rôle apparent dans la transition vers des énergies renouvelables, la méthanisation permet des réductions excédentaires dans les émissions de gaz à effet de serre, ce qui en fait une technologie unique. Par conséquent, elle fournit une bonne réduction des équivalents de dioxyde de carbone par unité d'énergie produite. Le méthane est un gaz à effet de serre puissant avec un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone. Ainsi, lorsque le biogaz capturé est brûlé, le méthane est converti en dioxyde de carbone et en eau, ce qui empêche ses émissions fugitives dans l'atmosphère et réduit son impact environnemental négatif (Bracmort, 2011).

Compte tenu des ressources énergétiques valorisables grâce à cette filière, estimées à 15 Mtep (MIEEN, 2012), l'énergie produite par méthanisation en France pourrait éventuellement représenter 17% de la quantité d'énergies renouvelables à atteindre à l'horizon 2030 ; le biogaz étant désormais une ressource énergétique incontournable.

En ce qui concerne le Liban, le Conseil pour le Développement et la Reconstruction (CDR) prévoit l'exploitation de plusieurs usines de traitement de déchets. Ce projet nécessite dans un premier temps de mener une étude de qualification et de quantification des déchets produits, et dans un deuxième temps de proposer et d'implémenter des solutions de traitement respectueuses de l'environnement, telles que la méthanisation. Cette dernière génèrera, une fois intégrée dans les fermes, les usines et les municipalités libanaises, la production décentralisée d'électricité à partir du biogaz produit. De plus, elle offre aux localités libanaises la possibilité de participer à la diminution des polluants atmosphériques émis et surtout d'initier une politique nationale, encore inexistante, en termes de développement durable.

Dans le cadre de cette collaboration franco-libanaise, nous avons choisi comme point de départ, de concentrer nos efforts sur les déchets issus de la vinification et en particulier le marc de raisin pour une valorisation énergétique par méthanisation.

I.2. Sous-produits issus de la vinification : cas des marcs de raisins

I.2.1. Activité viti-vinicole en France et au Liban

Le raisin est parmi les fruits les plus cultivés dans le monde. Selon une estimation rapportée par l'organisation internationale de la vigne et du vin, sa production globale a totalisé 75 millions de tonnes en 2014, pour une production de vin affichant 271 millions hectolitres (9-10 millions de tonnes) (OIV, 2015). Cette activité est développée dans de nombreux pays et, à partir de 2014, 46 états deviennent membres de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.

La France a toujours été considérée comme l'un des principaux producteurs de vin, à l'échelle mondiale. La diversité du climat, associée à une large variété géologique de terroirs, ont renforcé la culture nationale de la vigne et la production de grands vins. En 2014 et 2015, La France a occupé la première et la deuxième place des pays producteurs de vin dans le monde, respectivement. En fait, en 2015 et avec 47,4 millions d'hectolitres de vins produits, elle cède sa place de leader dans la production mondiale pour l'Italie qui a enregistré une production totale de 48,9 millions d'hectolitres (Les synthèses de FranceAgriMer, 2016).

Le vignoble français est réparti sur 80 départements et comprend 16 grands vignobles. Parmi les grands terroirs, citons les régions de Bordeaux, de la Bourgogne, du Rhône, de la Champagne et de la Loire. Sur plus de 200 cépages, une dizaine représente plus des deux tiers de la surface plantée en vignes. Les cépages principaux de raisins rouges sont le Pinot noir, le Merlot, le Carignan, le Cabernet Sauvignon, le Grenache et le Syrah. Parmi les cépages de raisins blancs on trouve le Chardonnay, l'Ugni et le Chenin (Bilan de l'Institut Français du Vin et de la Vigne).

D'autre part, le Liban dispose d'un milieu naturel favorable à la production de raisin à haut potentiel œnologique. En effet, les conditions pédologiques, climatiques et parasitaires sont très favorables à la culture de la vigne qui représente la quatrième production fruitière du pays (FAOSTAT, 2014). Aujourd'hui, la viticulture au Liban demeure une activité économique à part entière, tant pour la production de raisin de table que pour la production de raisin de cuve destiné à la réalisation de vin et d'arak. La production libanaise de raisins a été estimée à 87 130 tonnes en 2013 (FAOSTAT, 2014) ; avec une surface cultivée pour la production de raisins de cuve de 2000 ha, résultant en une production annuelle d'environ sept millions de bouteilles de

vin (Union Vinicole du Liban). En effet, le nombre de producteurs de vins a remarquablement augmenté, passant de 5 en 1998 à plus de 30 en 2014 (Lebanon wine regions, 2014).

Les terroirs viticoles se situent à Batroun, Kfifane, Majdel Maouche, Jezzine et Bekaa. Cependant, il convient de noter que la majorité des raisins destinés à la production de vin est cultivée à la Bekaa Ouest et les hauteurs de Zahlé. Plusieurs cépages de raisins rouges sont produits parmi lesquels nous citons le Cabernet Franc, le Cabernet Sauvignon, le Syrah, le Marselan, le Cinsault, le Grenache et le Tempranillo. En outre, parmi les cépages de raisins blancs on trouve le Chardonnay, le Sauvignon Blanc, le Muscat, l'Obeideh et le Viognier (Union Vinicole du Liban).

I.2.2. De la viticulture aux marcs de raisins

I.2.2.1. Étapes générales de la vinification

La vinification est l'ensemble des techniques utilisées pour transformer le raisin en vin. La vinification « en rouge » pour produire du vin rouge sera détaillée par la suite (Figure 3).

Ce procédé commence par la vendange, étape stratégique pour la détermination de la qualité du vin. Elle est décidée en se basant sur l'équilibre entre le taux de sucres et l'acidité des baies de raisin (suivi de la maturité technologique), ainsi que sur le taux maximal de composés phénoliques extractibles (suivi de la maturité phénolique). L'égrappage sépare les baies de raisin de leurs grappes en éliminant les rafles (éraflage) et en écrasant les raisins afin de libérer la pulpe et le jus, appelé moût (foulage). Le moût et les parties solides sont mises en cuves pour le processus de macération et par suite l'ensemble est mélangé (encuvage et pigeage). Le « chapeau de marc » (constitué de parties solides) est enfoncé dans le moût qui est pompé à son tour et réintroduit par le haut (remontage). Cette étape permet l'introduction de l'oxygène de l'air dans le moût afin de faciliter l'extraction des anthocyanes et des tanins ainsi que d'accroître la macération. Ensuite, la fermentation alcoolique transforme les sucres en alcool éthylique sous l'action des levures fermentaires (*Saccharomyces cerevisiae*). Cette étape qui dure en moyenne 4 à 10 jours, s'accompagne de dégagement carbonique et d'une augmentation de la température de la cuve.

Ultérieurement, le vin est écoulé par gravité (vin de goutte) dans une autre cuve (écoulage et décuvage). Le marc (ensemble des parties solides du raisin) est récupéré afin d'être pressé (pressurage). C'est le « vin de presse » plus riche en couleur et en tanins. Le vin de goutte et le vin de presse sont maintenant assemblés avant l'élevage ; cet ensemble a un aspect trouble. Les

particules les plus lourdes (les bourbes et les lies) se déposent au fond de la cuve et seront éliminées (débourbage). Le vin devenu clair est mis dans les fûts pour la fermentation malolactique qui transforme l'acide malique en acide lactique tout en diminuant l'acidité du vin. Ce dernier est soutiré afin d'éliminer tous les dépôts solides restants. Par ailleurs, le SO_2 est ajouté de façon à favoriser la solubilisation des tannins, inhiber les enzymes provoquant l'oxydation et protéger le vin des levures et des bactéries (sulfitage). Pour une évolution structurelle et aromatique, le vin est conservé pour plusieurs mois. L'élevage permet ainsi l'échange à travers (transfert de dioxygène) et avec le bois (transfert de molécules). Par suite, il est soutiré à nouveau en cuve. Les vins issus d'une même ou de plusieurs parcelles sont assemblés afin de préparer les cuvées à la mise en bouteilles. Si nécessaire, une colle protéique, minérale ou synthétique est rajoutée pour entraîner les particules en suspension vers le fond. Finalement, avant d'être mis en bouteille, le vin est parfois filtré pour le rendre limpide et brillant.

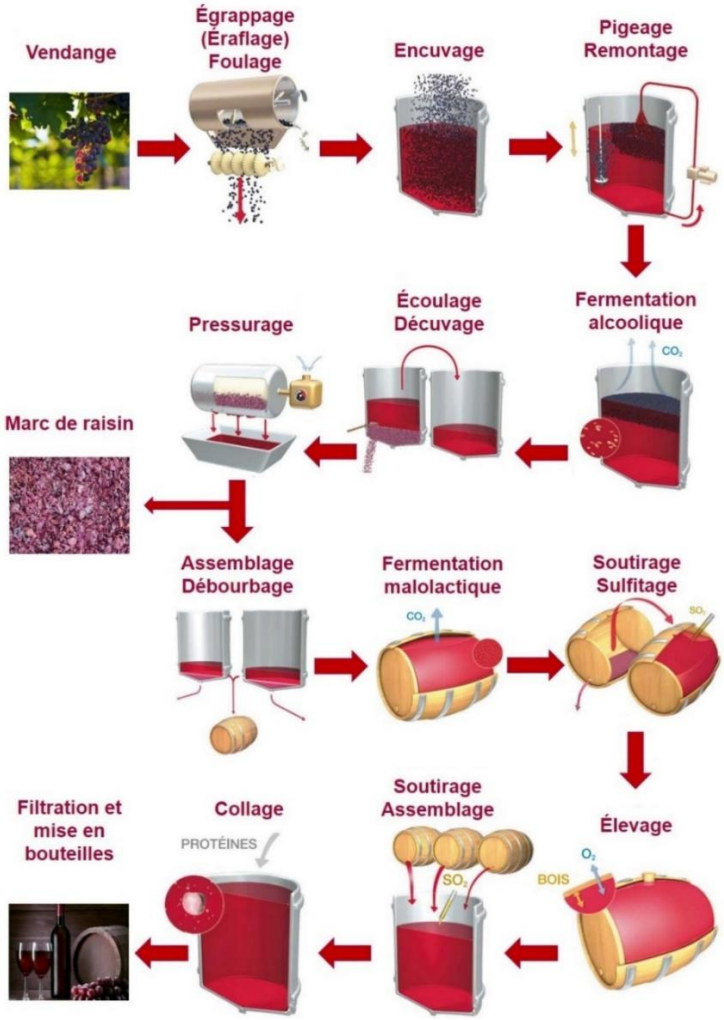

Figure I. 3 : Étapes générales de la vinification en rouge (adaptée de la Vinification du vin rouge de Bourgogne)

I.2.2.2. Marc de raisin, sous-produit de la viticulture

Les marcs de raisins, les bourbes et les lies de fermentation sont les sous-produits dérivés de la vinification. Les bourbes sont les résidus issus du stockage des moûts de raisins. Les lies sont principalement formées de levures et de particules solides accumulées au fond des contenants de fermentation ou de stockage (Pérez-Serradilla et de Castro, 2008). Dans ce travail, nous nous intéressons en particulier au marc de raisin, déchet majeur (62 % des déchets totaux) et principal sous-produit de la vinification (Schieber et al., 2001).

Les marcs de raisins sont constitués essentiellement de pellicules, de pépins et de rafles, restant après l'étape de pressurage des raisins blancs ou rouges (Crespo et Brazinha, 2010). Ils constituent environ 20% du poids des raisins utilisés pour la vinification, ce qui génère presque 9 millions de tonnes par an (Laufenberg et al., 2003). En France, la production annuelle de marc de raisin est actuellement d'environ 700 000 tonnes et sa collecte est organisée pour le transport depuis les exploitations viticoles vers les distilleries. La production annuelle au Liban est estimée à 1600 tonnes. Ce chiffre semble relativement faible mais il convient de noter que cette quantité est majoritairement localisée dans la plaine de la Bekaa (50% issus de deux grands producteurs viticoles). De plus, la valorisation de ce coproduit est inexistante dans le pays.

I.2.2.3. Polymères de la matrice lignocellulosique

Une description de la structure des polysaccharides composant les cultures lignocellulosiques, en particulier les marcs de raisins, est nécessaire pour comprendre les obstacles à leur méthanisation. Les parois cellulaires de ces cultures consistent en un assemblage de fibres de cellulose dont la cohésion est assurée par un ciment organique, la lignine. Le troisième composant majeur de la paroi est un polysaccharide ramifié ; les hémicelluloses. Enfin, les composants non structuraux sont dénommés extractibles.

I.2.2.3.1. Cellulose

La cellulose correspond à un polymère linéaire constitué d'unités β-D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β-1,4-glycosidique (Figure 4). Le degré de polymérisation moyen de la cellulose, correspondant au nombre de motifs de β-D-glucopyranose, est de l'ordre de 10 000.

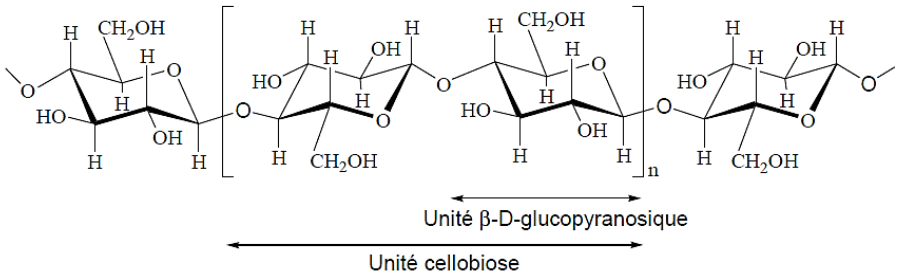

Figure I. 4 : Structure de la cellulose

Le chevauchement de ces molécules entre elles par des liaisons hydrogènes crée des microfibrilles dans lesquelles certaines régions sont hautement ou moins ordonnées (régions cristallines vs régions amorphes) (Figure 5) (Emsley et Stevens, 1994; Klemm et al., 2005). Les microfibrilles de cellulose sont imbriquées dans une matrice d'hémicelluloses et de lignine, le tout constituant la paroi cellulaire.

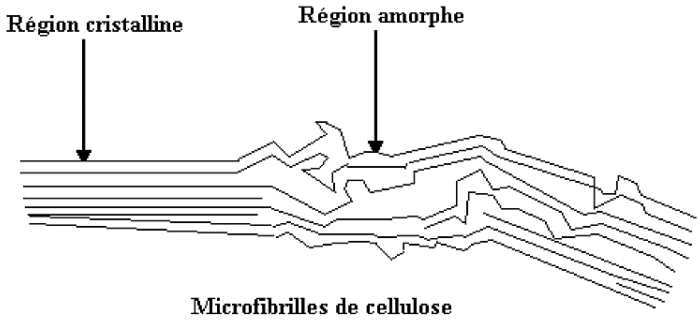

Figure I. 5 : Représentation schématique des zones cristallines et amorphes de la cellulose

I.2.2.3.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses assurent un rôle structural dans les plantes lignocellulosiques comme lien entre les différentes microfibrilles de la paroi cellulaire. Elles sont capables de développer des liaisons hydrogène avec la cellulose et peuvent être liées de manière covalente à la lignine (Fang et al., 2000 ; Zu-shan et Paszner, 2009). Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides constitués de cinq sucres monomères principaux : le L-arabinose, le D-glucose, le D-xylose, le D-mannose, le D-galactose (Figure 6). Dans leur état natif, elles sont de nature amorphe non cristallisable et sont des polymères ramifiés de faible poids moléculaire (avec un degré de polymérisation de l'ordre de la centaine) ce qui facilite leur hydrolyse (Sun et al., 1996).

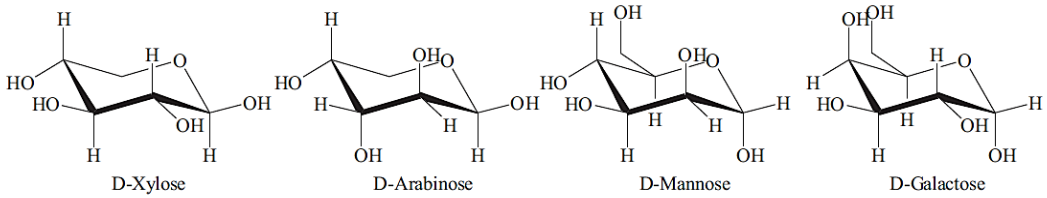

Figure I. 6 : Principaux glucides constituant les hémicelluloses

I.2.2.3.3. Lignine

La lignine représente la fraction non saccharidique la plus importante des fibres dans les plantes lignocellulosiques. C'est un polymère polyphénolique amorphe formé par le couplage aléatoire de trois unités de phénylpropanoïdes principales (Figure 7) : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Buranov and Mazza, 2008).

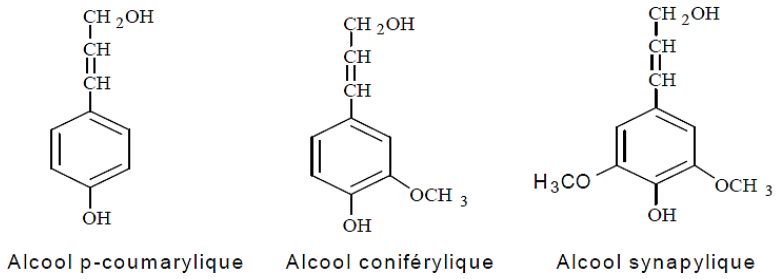

Figure I. 7 : Alcools précurseurs de la lignine

Les nombreuses fonctions hydroxyles présentes confèrent à la lignine une grande réactivité. Par contre, leur accessibilité est limitée par la structure complexe du réseau moléculaire et par la distribution de ce polymère parmi les autres constituants de la paroi cellulaire (Boerjan et al., 2003). En fait, de nombreuses interactions moléculaires sont établies par la lignine via des liaisons de faible énergie, telles que les liaisons hydrogène, ou de forte affinité telles que les liaisons covalentes avec les hémicelluloses (Buranov et Mazza, 2008). De plus, dans les cultures herbacées, les acides hydroxycynnamiques (acides p-coumarique et férulique) sont fixés à la lignine et aux hémicelluloses par l'intermédiaire de liaisons esters et éthers formant ainsi des complexes lignine-carbohydrates rigides (Baucher et al., 1998 ; Sun et al., 2002). En raison de cette particularité chimique, il est difficile d'extraire la lignine sous sa forme pure. Notons que plusieurs équipes de recherche ont montré qu'elle n'est pas biodégradable en milieu anaérobie (Jimenez et al., 1990 ; Kirk et Farrell, 1987).

I.2.2.3.4. Extractibles

Les extractibles sont des composés situés dans la partie non lignocellulosique. Ils comprennent les polyphénols, les huiles, les terpènes, les glycérides, les cires, les protéines et

les sucres. Il est important de noter que des teneurs élevées en polyphénols sont généralement reconnues comme inhibitrices de la croissance bactérienne et sont susceptibles d'entraver la bonne conduite du procédé de méthanisation (Kayembe, 2013 ; Obied et al., 2013).

I.2.3. Valorisation des marcs de raisins

Pendant des décennies, la valorisation des marcs de raisins a été minime, avec de grandes quantités abandonnées dans les terrains. En effet, les vendanges sont réalisées sur une période très courte, ce qui amplifie la concentration des sous-produits générés dans la zone de décharge. Ceci peut être préjudiciable à l'environnement, en raison de l'accumulation de composés phénoliques et de tanins qui abaissent le pH du marc provoquant ainsi une résistance accrue à sa dégradation biologique (Bustamante et al., 2008). Actuellement, le marc est utilisé comme amendements et engrais organiques (Alipour et Rouzbehan, 2007 ; Ferrer et al., 2001). Son contenu phénolique, richement bioactif, est extrait pour ses propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antimutagènes et anticancéreuses (Álvarez et al., 2012 ; El Darra et al., 2013, 2012 ; Rajha et al., 2014 ; Ruberto et al., 2007). D'autres voies d'utilisation sont également possibles, notamment pour la production de tartrate de chaux, d'alcool, d'huile, de colorants naturels, etc. (Figure 8).

Les méthodes de valorisation actuelles du marc de raisin sont insatisfaisantes et ne peuvent absorber qu'une faible proportion des déchets générés (Dwyer et al., 2014). Dans ce travail, l'attention scientifique est accordée à la valorisation de ce coproduit vinicole par méthanisation afin de générer de l'énergie, dite verte, sous forme de méthane. En 2010, la production de biogaz de certains marcs de raisins en provenance d'Italie a été évaluée. Les résultats expérimentaux ont mis en évidence leur potentiel énergétique important (Dinuccio et al., 2010). En 2012, une recherche a été menée pour développer un modèle d'équilibre thermodynamique de la digestion anaérobie du marc de raisin qui prédira la production du biogaz et sa composition. Les résultats de simulation montrent qu'il est possible d'obtenir environ 94 kWh par tonne de ce déchet, couvrant jusqu'à 45% des besoins énergétiques du procédé de vinification (Cáceres et al., 2012). D'autre part, l'Institut Français du Vin de la Vigne (IFV) a organisé une étude expérimentale nationale sur les techniques de valorisation de ces sous-produits, y compris la digestion anaérobie. Les résultats ont montré une variabilité de la production de biogaz en fonction de nombreux facteurs tels que la couleur, l'origine et la méthode de stockage des raisins (Lempereur, 2014).

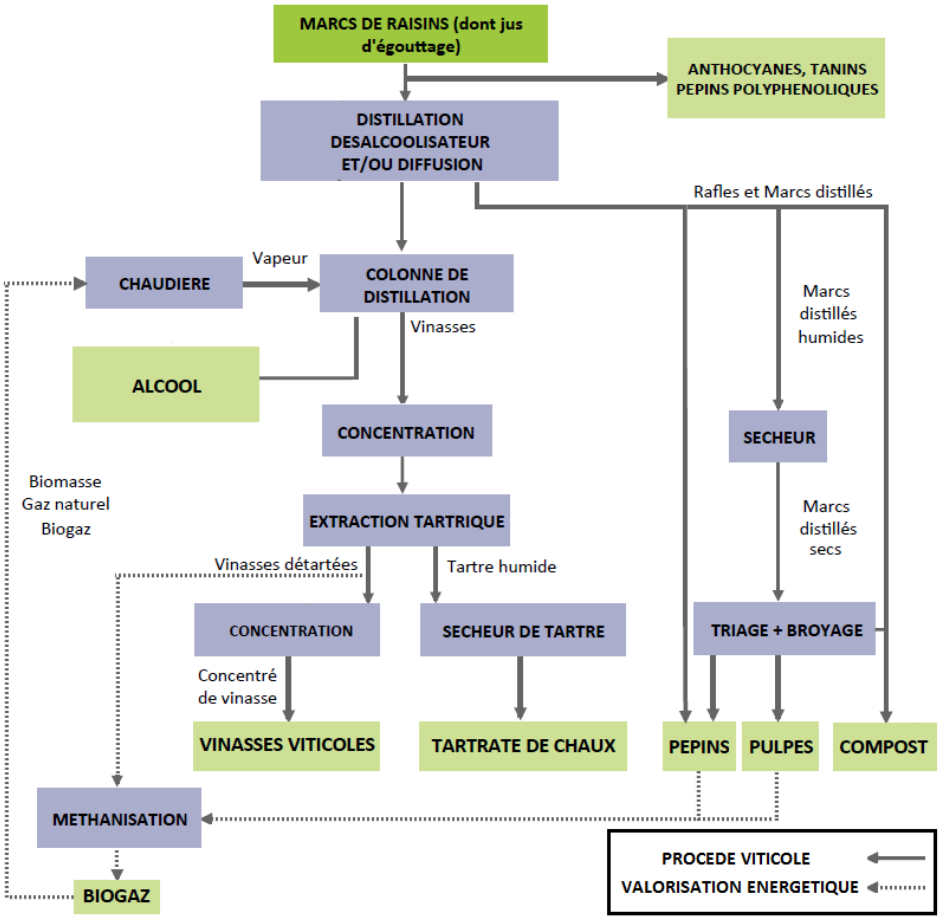

Figure I. 8 : Valorisation des marcs de raisins et principaux usages (adaptée de Institut Français de la Vigne et du Vin, 2013)

I.3. Production d'énergie verte par digestion anaérobie

I.3.1. Historique et aspects généraux

L'histoire de la digestion anaérobie a commencé en 1682 avec Robert Boyle et Denis Papin qui ont découvert que la décomposition des cadavres d'animaux et des plantes produisait un gaz (Ranalli, 2007). En 1776, Alessandro Volta a décrit « l'air inflammable des marais, un air qui brûle très lentement avec une belle flamme bleue » et a mis en avant les conséquences d'un ensemble complexe de réactions chimiques sur la matière organique dans les milieux pauvres en oxygène (Figure 9). Entre 1804 et 1810, Dalton, Henry et Davy ont découvert la composition chimique du méthane et ont affirmé ainsi que ce gaz était semblable au gaz de marais découvert par Volta. En 1884, Gayon, étudiant auprès de Pasteur, a produit 100 litres de méthane par m^3 de fumier par fermentation à une température de 35 ºC. Il a aussi mis en évidence la capacité de ce gaz à produire de la chaleur et de la lumière.

Figure I. 9 : Gravure présentant Volta collectant du méthane dans les marais d'Angera (Lombardie, Italie) (Ferry, 1994)

La digestion anaérobie est en effet un phénomène complexe qui se réalise spontanément dans les écosystèmes naturels, où la matière organique est présente dans un milieu anaérobie, comme les marais, les lacs, les rizières, les sédiments lacustres et marins, le sol, l'intestin de mammifères, le tractus intestinal de certains termites, etc. (Servant, 1991). De nos jours, la maîtrise de ce processus reste un défi majeur dans différents domaines industriels, afin de résoudre les problèmes environnementaux actuels tels que l'élimination des déchets organiques, tout en produisant de l'énergie renouvelable sous forme de méthane. Pour mieux contrôler cette technologie, il est indispensable de connaître ses différentes étapes et les principaux acteurs impliqués.

I.3.2. Voies biochimiques

La digestion anaérobie est divisée en plusieurs étapes biochimiques successives (Figure 10) qui impliquent différentes communautés bactériennes, dans des conditions bien spécifiques (Moletta, 2015).

I.3.2.1. Hydrolyse

L'hydrolyse est la première étape de conversion qui consiste à dépolymériser la matière organique par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaires produites par des bactéries hydrolytiques (Moletta, 2015). Les produits qui résultent de cette étape dépendent des substrats initiaux. A titre d'exemples, l'hydrolyse des protéines libère des polypeptides et des acides aminés alors que celle des lipides génère du glycérol, des acides gras volatils (AGV) et des acides gras à longues chaînes (AGLC) (Vidal et al., 2000). La cellulose et les hémicelluloses sont généralement hydrolysées en leurs monosaccharides constitutifs (glucose, fructose,

arabinose, …). La lignine est plus ou moins réfractaire puisqu'elle est résistante à la dégradation microbienne dans des conditions anaérobies (Jimenez et al., 1990). Cette première phase de la dégradation est souvent considérée comme l'étape cinétiquement limitante de l'intégralité du processus (Eastman et Ferguson, 1981 ; Pavlostathis et Giraldo-Gomez, 1991 ; Veeken et Hamelers, 1999).

I.3.2.2. Acidogenèse

L'acidogenèse correspond à la conversion intracellulaire des produits solubles d'hydrolyse en composés tels que l'eau, le dihydrogène, le dioxyde de carbone, les alcools, l'ammoniac et les acides gras volatils (AGV). Les sept principales espèces d'AGV sont les acides formique, acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique. En cas de surcharge organique, les bactéries anaérobies acidogènes ont la capacité de se développer et de produire plus d'AGV. Ces derniers ont une action inhibitrice sur les micro-organismes acétogènes et méthanogènes et peuvent donc provoquer l'arrêt du processus (Moletta, 2015).

I.3.2.3. Acétogenèse

L'acétogenèse est l'ensemble des réactions qui conduit à la production d'acétate. Cette étape est réalisée par deux groupes microbiens consommant respectivement le CO_2 et les AGV. Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (APOH) convertissent les acides gras volatils de hauts poids moléculaires et les acides gras à longues chaînes, en acétate, dioxyde de carbone et hydrogène. Les bactéries homoacétogènes produisent de l'acétate par la réduction du dioxyde de carbone. Les réactions opérées par les APOH sont thermodynamiquement impossibles dans les conditions standards (variation d'enthalpie libre positive). Elles ont lieu si l'hydrogène produit est consommé conjointement à sa production. Ainsi, une syntrophie étroite avec d'autres micro-organismes, particulièrement les méthanogènes, est nécessaire (Moletta, 2015).

I.3.2.4. Méthanogenèse

Au cours de la méthanogenèse, dernière étape du processus, les molécules à 1 ou 2 atomes de carbone sont converties en méthane (Ferry, 1994). Deux voies métaboliques permettent la production de méthane, à partir de l'acétate et du couple CO_2/H_2. Les microorganismes responsables sont anaérobies stricts et appartiennent au domaine des Archées (Moletta, 2015). Les méthanogènes hydrogénotrophes réduisent le dioxyde de carbone, les carbonates et les bicarbonates avec le dihydrogène pour former du méthane et de l'eau. Les

méthanogènes acétotrophes convertissent l'acétate en dioxyde de carbone et en méthane. En digesteur anaérobie, la voie acétotrophe est à l'origine de 65 à 70% du méthane produit (Pavlostathis et Giraldo-Gomez, 1991).

I.3.2.5. Autres réactions

Dans des conditions anaérobies et en présence de sulfates et/ou de nitrates, deux autres processus de respiration impliquant de nouveaux groupes bactériens peuvent avoir lieu (Moletta, 2015). Les bactéries sulfato-réductrices, sont capables d'oxyder des acides gras (dont l'acétate), des alcools, ou l'hydrogène, en utilisant les sulfates SO_4^{2-} et tout en produisant l'acétate, le dioxyde de carbone et les formes réduites du soufre soit HS^- et H_2S. D'autre part, les bactéries dénitrifiantes, peuvent réduire les nitrates NO_3^- afin d'oxyder les mêmes types de substrats que les précédents organismes et de générer des produits associés aux formes réduites du nitrate tels que NO_2^-, NO, N_2O, NH_3 et N_2.

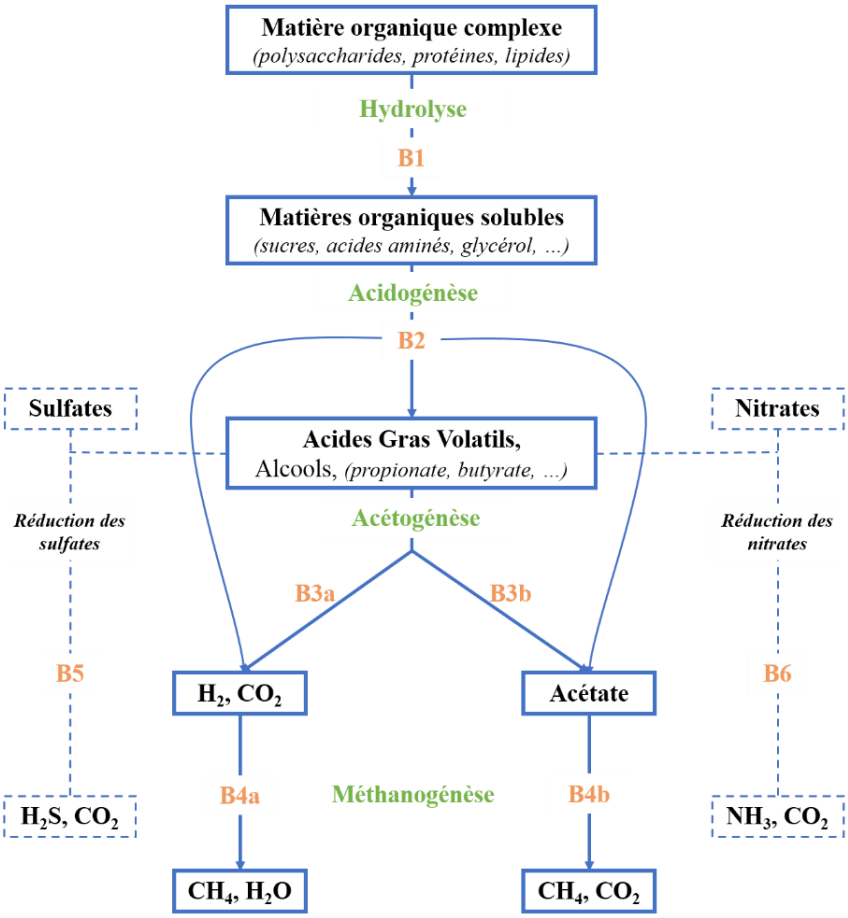

Figure I. 10 : Principaux processus de dégradation de la matière organique. B1 = Bactéries hydrolytiques ; B2 = Bactéries acidogènes ; B3a = Bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (APOH) ; B3b = Bactéries homoacétogènes ; B4a = Bactéries méthanogènes hydrogénotrophes ; B4b = Bactéries méthanogènes acétotrophes ; B5 = Bactéries sulfato-réductrices ; B6 = Bactéries dénitrificatrices.

I.3.3. Paramètres de régulation et indicateurs de suivi

I.3.3.1. Température

La température est un facteur primordial dans la digestion anaérobie en raison de son impact sur la cinétique, la thermodynamique des réactions et la croissance des microorganismes (Veeken et Hamelers, 1999). En effet, plus elle augmente, plus les réactions chimiques s'accélèrent et plus la croissance microbienne augmente. Cependant, pour tout microorganisme, il existe une température minimale (T_{min}) au-dessus de laquelle la croissance est possible, une température de croissance optimale (T_{opt}) et une température maximale (T_{max}) au-dessus de laquelle toute croissance est inhibée. Ces trois températures sont appelées températures cardinales d'un microorganisme (Madigan et al., 2010).

Il existe trois types de digestion anaérobie : la digestion psychrophile (5 à 20 °C), la digestion mésophile (20 à 45 °C) et la digestion thermophile (45 à 60 °C). Des températures optimales existent, en particulier dans les zones mésophiles (autour de 37 °C) et thermophiles (autour de 55 °C).

I.3.3.2. pH

La plage de pH optimale pour la digestion anaérobie se situe autour de la neutralité, entre 6,5 et 8,5 (Moletta, 2015). Le pH a un effet direct sur le fonctionnement du système par la modification des équilibres chimiques des acides et bases faibles, notamment les acides gras volatils (AGV) et l'azote ammoniacal dont la forme non ionisée (NH_3) peut inhiber la méthanisation. Il est donc impératif de le suivre et, si nécessaire, de contrôler ses teneurs par l'ajout de soude ou de bicarbonate de sodium.

I.3.3.3. Alcalinité

L'alcalinité (TAC, Titre Alcalimétrique complet) mesure le pouvoir tampon dans un digesteur anaérobie et donc sa capacité à maintenir un pH stable. Ce paramètre, lié principalement à la présence de CO_2 dissous nécessaire pour la croissance des bactéries autotrophes, doit être maintenu au-dessus de 2 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ pour éviter des chutes drastiques de pH.

I.3.3.4. Acides gras volatils

Les acides gras volatils (AGV) sont les intermédiaires les plus importants de la digestion anaérobie. Leur accumulation dans le digesteur traduit un dysfonctionnement de la

méthanisation qui s'accompagne d'une baisse du pH et d'une augmentation de la concentration en hydrogène pouvant mener à une inhibition de la méthanogenèse. Pour un bon déroulement d'un procédé de digestion anaérobie, la concentration en acides volatils (AVT, Acidité Volatile Totale), doit être inférieure à 2 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ afin d'empêcher une inhibition des bactéries méthanogènes (Yadvika et al., 2004). L'un des critères permettant de confirmer la stabilité des bioréacteurs anaérobies est le rapport AVT/TAC qui doit être inférieur à 0,4 (Callaghan et al., 2002).

I.3.3.5. Granulométrie

La granulométrie des intrants a une influence sur la production de biogaz (Kivaisi et Eliapenda, 1994). En fait, la taille des particules ne doit pas être trop importante, sinon, il serait difficile pour les microorganismes d'effectuer la digestion, ce qui diminue la production de gaz. On a découvert que sur cinq tailles différentes (0,088, 0,4, 1, 6 et 30 mm), le volume maximal de biogaz était produit à partir des substrats ayant une taille comprise entre 0,088 et 0,4 mm (Sharma et al., 1988).

I.3.3.6. Agitation

L'agitation favorise le contact entre le substrat et les microorganismes en facilitant la dépolymérisation et la solubilisation des particules. En effet, des résultats antérieurs ont montré qu'une bonne agitation favorise l'acclimatation de la biomasse et limite également divers problèmes dans les digesteurs comme le moussage, la flottation et la super-saturation de certains gaz qui peuvent former des précipités (CO_2) ou agir comme inhibiteurs de réactions (H_2S et H_2) (Guillaume et Lendormi, 2015).

I.3.4. Conversion de la matière organique en méthane

I.3.4.1. Demande chimique en oxygène

Au cours de la digestion anaérobie, la conversion de la matière organique (MO) peut être simplifiée selon l'équation suivante (Tchobanoglous et al., 1993) :

$$MO + H_2O \xrightarrow{\mu} n_\mu + MO_{récalcitrante} + CO_2 + CH_4 + gaz_{divers}$$

Une partie de la matière organique (MO) est utilisée par les microorganismes (μ) pour synthétiser une nouvelle biomasse (n_μ). Il convient de noter que sur la fraction de matière

organique convertie, 5 à 10 % en masse se retrouve sous la forme de biomasse microbienne (le reste, donc, sous forme de biogaz). Ce chiffre est à comparer à celui obtenu par des traitements aérobies, dans lesquels 50 % de la matière organique dégradée est convertie en biomasse (Moletta, 2015). La partie de la MO non biodégradable est nommée récalcitrante ($MO_{récalcitrante}$). Le biogaz formé est constitué de méthane combustible (50 à 75 %), de dioxyde de carbone (25 à 45 %) et de différents gaz à l'état de trace (NH_3, H_2S, CO, ...).

La mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) est souvent utilisée pour caractériser la matière organique. La production théorique maximale de méthane est une grandeur associée à la DCO. En considérant une dégradation totale, la quantité de biogaz formée par digestion anaérobie de matières organiques (de la forme $C_nH_aO_b$) peut être déterminée de manière théorique, grâce à l'équation de Buswell (Buswell et Mueller, 1952).

$$C_nH_aO_b + \left(n - \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) H_2O \longrightarrow \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) CH_4 + \left(\frac{n}{2} - \frac{a}{8} + \frac{b}{4}\right) CO_2$$

Cette équation bilan, à laquelle sont parfois ajoutés « d » atomes d'azote à la molécule organique et « dNH_3 » aux produits, a été équilibrée en considérant une conversion totale de la matière organique en CH_4 et CO_2 en conditions anaérobies, soit en présence d'H_2O uniquement. A l'aide de cette équation bilan et en connaissant la composition élémentaire de la matière organique considérée, il est donc possible d'estimer le potentiel théorique maximal de production de biogaz.

Par ailleurs, la DCO est, par définition, la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation de ce même composé organique selon la formule :

$$C_nH_aO_b + \left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) O_2 \longrightarrow n\, CO_2 + \frac{a}{2} H_2O$$

Il est bien à noter qu'il existe une proportionnalité entre la quantité de méthane produite par la digestion anaérobie d'un composé et la quantité d'oxygène nécessaire à son oxydation totale :

$$\frac{n_{CH_4}}{n_{O_2}} = \frac{\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}}{n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2}} = \frac{1}{2}$$

Cette proportionnalité permet donc de définir un rendement théorique maximal en méthane de 0,35 $Nm^3 \cdot kg\ DCO^{-1}$ (Moletta, 2015). Ce ratio est souvent utilisé pour établir les bilans de fonctionnement des digesteurs de méthanisation.

I.3.4.2. Potentiel méthanogène et biodégradabilité anaérobie

L'estimation théorique du méthane produit ne prend pas en compte la consommation des matières organiques pour le métabolisme microbien et la possibilité d'avoir certains composés récalcitrants ou non bio-disponibles pour la dégradation. Pour cela, des tests permettent de déterminer le potentiel méthanogène des matières organiques (BMP, Biochemical Methane Potential), c'est-à-dire la quantité maximale de méthane qu'elles sont susceptibles de produire. Une variabilité importante est parfois observée dans la littérature pour le BMP d'un même substrat en raison notamment des différences de conditions expérimentales et d'inoculum utilisé (Angelidaki et Sanders, 2004 ; De Vrieze et al., 2015 ; Raposo et al., 2012).

Ces tests sont réalisés en mode batch et consistent à suivre la production de biogaz ou de méthane d'un mélange substrat-inoculum (source de microorganismes anaérobies) au cours du temps. Le mélange est introduit dans un flacon hermétique, mis en conditions anaérobies et incubé à la température désirée. La valeur nette de production de méthane des substrats est obtenue en soustrayant la production endogène de l'inoculum seul.

De nombreux facteurs peuvent influencer les résultats de ces tests parmi lesquels on peut citer : la concentration en substrat, le ratio inoculum/substrat, l'origine de l'inoculum et le dispositif expérimental de suivi (Liu et al., 2009 ; Wang et al., 2015). Les tests sont poursuivis jusqu'à ce que la production de biogaz soit arrêtée. Toutefois, les durées de tests varient de 12 à 87 jours selon les laboratoires avec une majorité de protocoles se déroulant sur une durée de 25 à 40 jours (Raposo et al., 2011).

Le potentiel méthanogène est calculé en divisant le volume de méthane produit par la quantité de DCO injectée ($Nm^3\ CH_4 \cdot kg\ DCO^{-1}$), dans des conditions normales de température et de pression (0 °C, 1013 hPa). La biodégradabilité anaérobie des substrats (%) peut également être déterminée en divisant le potentiel méthanogène par le rendement théorique maximal en CH_4 qui est de 0,35 $Nm^3\ CH_4 \cdot kg\ DCO^{-1}$ (Buffière et al., 2006).

I.3.4.3. Cinétique chimique

La réaction d'hydrolyse des macromolécules est généralement considérée comme la réaction limitant le processus global de biodégradation en anaérobie (Pavlostathis et Giraldo-Gomez, 1991). Ainsi, le potentiel méthanogène peut être utilisé pour déterminer la constante globale d'hydrolyse k_h. En termes descriptifs, cette étape réactionnelle est typiquement simplifiée et réduite à une cinétique de premier ordre (Bilgili et al., 2009 ; Eastman et Ferguson, 1981). Dans ce cas, il sera possible d'écrire l'équation suivante :

$$V_{CH_4}(t) = V_{CH_{4,max}} \times [1 - \exp(-k_h \times t)]$$

Avec V_{CH4} (t), le volume de méthane produit au cours du temps ($Nm^3 \cdot kg\ DCO_{initiale}^{-1}$) ; $V_{CH4,max}$, le volume maximal de méthane ($Nm^3 \cdot kg\ DCO_{initiale}^{-1}$) et k_h, la constante d'hydrolyse (j^{-1}).

D'autre part, l'équation de Gompertz modifiée a été utilisée afin d'analyser les productions cumulées de méthane, et plus particulièrement celles présentant des phases de latence au début (Lo et al., 2010). Elle a été développée à l'origine pour analyser les courbes de croissance bactérienne et a été modifiée par la suite afin de décrire la production cumulée de méthane dans une culture en batch. Elle s'exprime selon :

$$V_{CH_4}(t) = V_{CH_{4,max}} \times \exp\left\{-exp\left[\frac{R_m \times e}{V_{CH_{4,max}}}(\lambda - 1) + 1\right]\right\}$$

Avec λ, le temps de latence (j) ; R_m, la vitesse maximale de production de méthane ($Nm^3 \cdot kg\ DCO^{-1} \cdot j^{-1}$) et e, l'exponentiel de 1.

I.3.4.4. Principaux inhibiteurs

Les AGV sont les inhibiteurs les plus couramment rencontrés dans les digesteurs comme mentionné précédemment. L'effet toxique des acides gras à longue chaîne peut également être rapporté lors de la digestion anaérobie des lipides (Hwu et al., 1998). Dans le cas des composés inorganiques toxiques, il existe plusieurs cations tels que le sodium (Na^+), le potassium (K^+), les métaux lourds (Cu, Ni, Zn, Pb), l'ammoniac (NH_3) et le sulfure d'hydrogène (H_2S) (Moletta, 2015). Ces deux derniers sont souvent générés au cours de la digestion anaérobie de déchets riches en protéines ou en sulfates et leurs effets ont été largement étudiés. L'azote réduit, sous forme ammoniacale, devient inhibiteur de la méthanisation au-delà de quelques grammes par litre (Hansen et al., 1998). Le sulfure d'hydrogène est le produit de la réduction du sulfate par

les bactéries sulfato-réductrices qui entrent en compétition avec les *Archaea* méthanogènes pour la consommation d'hydrogène. Cette concurrence est régie par le rapport DCO / SO_4^- de l'effluent. Pour un ratio supérieur à 2,7, la méthanogenèse est privilégiée et quand il est inférieur à 1,7 c'est le métabolisme des bactéries sulfato-réductrices qui sera favorisé (Choi et Rim, 1991). La présence d'H_2S conduit également à des problèmes de corrosion qui nécessitent un prétraitement du biogaz avant son utilisation. D'autre part, les composés organiques (phénols, organo-halogénés, amides, amines, nitriles, cétones, acides gras, etc.), les désinfectants, les antibiotiques dans les effluents d'élevage et les pesticides dans les résidus de cultures, sont autant de composés toxiques pour la microflore méthanogène qui sera inhibée d'une manière irréversible par leur présence (Chen et al., 2008).

I.3.5. Bioréacteurs de méthanisation

I.3.5.1. Modes d'alimentation et arrangement des réacteurs anaérobies

I.3.5.1.1. Mode discontinu ou batch

Lors du mode discontinu, le réacteur hermétiquement fermé est initialement rempli avec de la matière organique à traiter et ensemencé avec de l'inoculum. La réaction se déroule sans échange de matière avec l'extérieur et se poursuivit jusqu'à l'épuisement du substrat à dégrader. À la fin de la digestion, le réacteur est vidangé et un nouveau cycle peut alors débuter. Ce mode est généralement utilisé pour la détermination du potentiel méthanogène des déchets.

I.3.5.1.2. Mode continu

Le fonctionnement en mode continu est le plus courant à l'échelle industrielle. Les réacteurs continus sont alimentés en permanence à un régime dit « nominal », qui correspond généralement à un débit de matière constant. En parallèle, une quantité égale de digestat est retirée du réacteur qui conservera ainsi son volume utile. Cette technologie est idéale pour les installations de grandes tailles. Ce mode de fonctionnement est simple et adapté généralement au traitement des effluents fortement chargés en matières organiques (déchets agricoles, boues urbaines, …).

I.3.5.1.3. Mode semi-continu

Ce mode de fonctionnement appelé également fed-batch ou mode discontinu séquentiel (SBR, Sequencing Batch Reactor) est un mode hybride entre le continu et le discontinu. Il consiste à appliquer, dans un digesteur, des cycles alternant le remplissage, la réaction et la vidange.

L'avantage est de retenir tout ou une partie des microorganismes dans le réacteur pour le cycle suivant. Ce mode est bien adapté aux petites installations de méthanisation.

I.3.5.2. Technologies des réacteurs continus

Comme la majorité des bioréacteurs industriels fonctionnent en mode continu, les sections suivantes concernent uniquement cette famille de réacteurs.

I.3.5.2.1. Réacteurs à cellules libres :

Dans les réacteurs à cellules libres, les microorganismes se trouvent sous forme libre ou en suspension. Ces réacteurs ont été qualifiés de « première génération ».

I.3.5.2.1.1. Réacteurs parfaitement mélangés :

Les réacteurs parfaitement mélangés sont appelés également CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) (Figure 11). Leur contenu est maintenu homogène par brassage mécanique régulier ou par recirculation du biogaz ou du liquide ce qui favorise le contact entre la biomasse et le substrat à traiter. Une viscosité suffisamment basse est nécessaire pour permettre un mélange efficace dans l'ensemble du digesteur et pour assurer une bonne digestion de la matière organique biodisponible (Moletta, 2015). Cependant, un mélange incomplet favorise l'accumulation de matière particulaire ce qui diminue à long terme le volume utile du digesteur et réduit par conséquent les performances du procédé. Il convient de noter que ces réacteurs sont les plus répandus en France et les plus utilisés actuellement dans le secteur industriel (Béline, 2013).

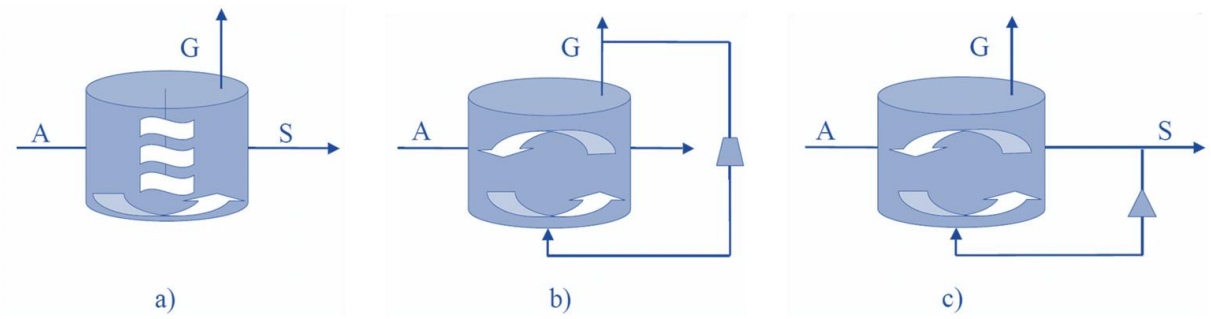

Figure I. 11 : Schéma d'un digesteur parfaitement mélangé : a) mécaniquement par pâles, b) par compression et recirculation du biogaz, c) par recirculation du milieu. A : alimentation, S : sortie, G : biogaz

I.3.5.2.1.2. Réacteurs à écoulement piston

À l'inverse des réacteurs précédents, le flux piston nécessite un état de la matière suffisamment visqueux pour conserver ses caractéristiques (Moletta, 2015). Dans un réacteur piston horizontal, les systèmes d'agitation principalement utilisés sont la recirculation du

digestat par une pompe extérieure, la recirculation du biogaz sous pression et les pales avec un axe longitudinal ou transversal (Figure 12). Dans un réacteur piston vertical, une recirculation du bas vers le haut permet un effet de mélange et une inoculation du déchet à traiter.

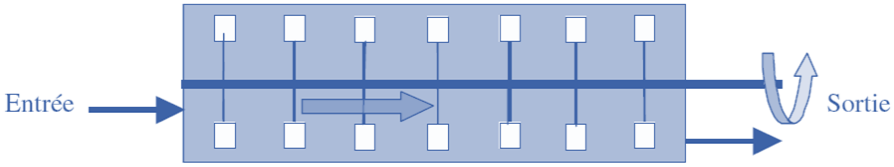

Figure I. 12 : Schéma d'un digesteur à pales avec un axe longitudinal

I.3.5.2.2. Réacteurs à biofilm ou granules

Un biofilm est constitué d'une matrice de polymères biologiques qui contient un groupe de microorganismes pouvant se développer sur un support mobile ou fixe. Les espèces composant le biofilm adhèrent les unes aux autres et forment donc des granules. La biomasse est ainsi bien attachée ce qui facilite l'application d'importants débits sans risque de lessivage bactérien. Ces réacteurs sont alors plus robustes face à des chocs hydrauliques que les réacteurs à cultures libres.

I.3.5.2.2.1. Réacteurs à lit fixe

Le support utilisé dans ces réacteurs est un garnissage, qui peut avoir une structure ordonnée ou peut être placé en vrac (Figure 13). Ces réacteurs sont utilisés pour la méthanisation de rejets liquides contenant principalement des matières organiques solubles. Cependant, un risque de colmatage peut être rencontré en raison des matières particulaires présentes (Cresson, R., 2006).

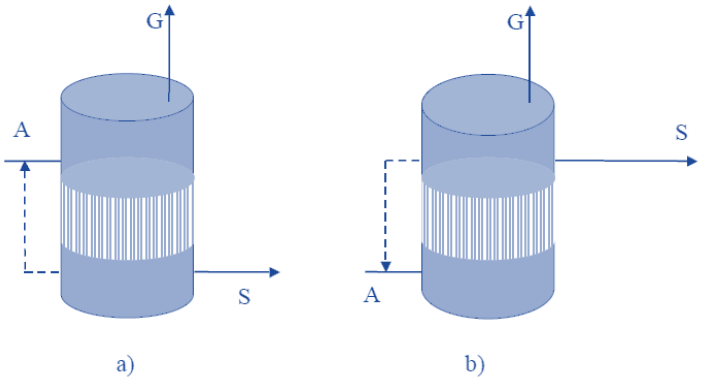

Figure I. 13 : Schéma d'un digesteur à lit fixe : a) à flux descendant, b) à flux ascendant. A : alimentation, S : sortie, G : biogaz

I.3.5.2.2.2. Réacteurs à lit mobile

Ces réacteurs ont été développés pour combiner les avantages des réacteurs à biomasse fixée (taux de rétention de la biomasse élevés autorisant de grands débits d'alimentation) et de ceux à cellules libres (moindre sensibilité au colmatage et bonne homogénéité du milieu) (Michaud et al., 2003). Le support est un matériau granulaire ou un ensemble d'éléments mobiles spécifiques, mis en mouvement soit par un flux de liquide, soit par le biogaz. Les modèles généralement utilisés sont les réacteurs à lit fluidisés ascendants (Heijnen et al., 1989) ou descendants (Garcia-Calderon et al., 1998), et les lits turbulés (Figure 14) (Buffière et al., 2000). Cependant, comme dans le cas des réacteurs à lit fixe, la biomasse peut se retrouver piégée entre les supports (Hall et al., 1992).

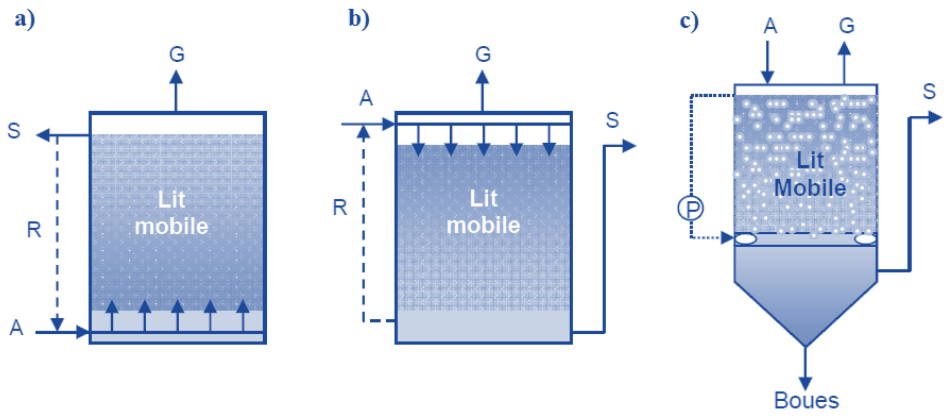

Figure I. 14 : Schéma de principe d'un réacteur à lit fluidisé (a) à flux ascendant, (b) à flux descendant, (c) à lit turbulé inverse. G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation du liquide. P : pompe de recirculation du gaz

I.3.5.2.2.3. Réacteurs UASB

Les réacteurs à lit de boues granulaires, également connus sous le nom d'UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) sont développés depuis presque 30 ans (De Baere, 2006 ; Lettinga, 1995). Ils consistent à faire passer l'effluent à traiter à travers un lit de boues, au-dessus duquel se forme une séparation entre les boues et le liquide (Figure 15). Les microorganismes forment des flocs et la décantation a lieu dans le digesteur. Cette technologie convient aux effluents qui sont rapidement biodégradables et contiennent peu de matières particulaires. Bien que les problèmes d'hydrodynamique, de transfert de masse et de mélange du milieu dans un réacteur UASB soient largement compris, le contrôle du développement du biofilm reste un défi majeur (Nicolella et al., 2000). Soulignons que la granulation est un phénomène lent qui se traduit par une longue période de démarrage (environ 6 mois) si des boues inadéquates sont utilisées comme inoculum. De plus, la formation d'une boue granulaire

est pratiquement impossible avec certains types d'effluents et une dé-granulation peut être souvent observée (Lettinga, 1995 ; Seghezzo et al., 1998).

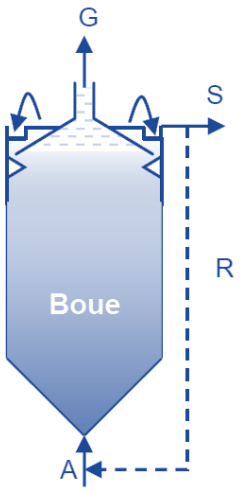

Figure I. 15 : Schéma de principe d'un réacteur à lit de boues à flux ascendant (UASB : Up-flow Anaerobic Sludge Blanket). G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation

I.3.5.2.3. Réacteurs en une étape ou deux étapes

Dans les procédés précédents dits « à une étape », toutes les réactions ont lieu dans le même réacteur. Or, en cas de surcharge organique, l'acidogenèse génèrerait les acides à une vitesse plus importante que la capacité des bactéries méthanogènes à les éliminer. Ceci est principalement dû aux différences dans les conditions optimales de croissance des bactéries acidogènes et des méthanogènes. En fait, il a été montré que le taux de croissance des méthanogènes est nettement inférieur à celui des acidogènes (Ghosh et Pohland, 1974). Pour y remédier, le principe de l'approche en deux étapes consiste à effectuer dans un premier réacteur la phase d'hydrolyse et d'acidogenèse qui rejoindra alors un second réacteur, dans lequel se dérouleront l'acétogenèse et la méthanogenèse (Tomei et al., 2016 ; Zahller et al., 2007). Le temps de séjour dans le réacteur d'acidogénèse étant plus court, il présente en général un volume plus petit que le second réacteur dédié à la méthanogenèse (Moletta, 2015). La méthanisation en deux étapes est choisie dans le cas de substrats rapidement fermentescibles, facilement disparus lors de l'acidogenèse, tels que les sucres et autres.

La répartition des différentes technologies de méthanisation en fonction des domaines d'application est présentée en Figure 16. Il est bien évident que les technologies de type CSTR sont appliquées de manière quasi exclusive dans le domaine agricole et dans le traitement des boues d'épuration. Ces réacteurs apparaissent ainsi les mieux adaptés au contexte de notre étude, qui vise à traiter les marcs de raisins comme déchets agricoles.

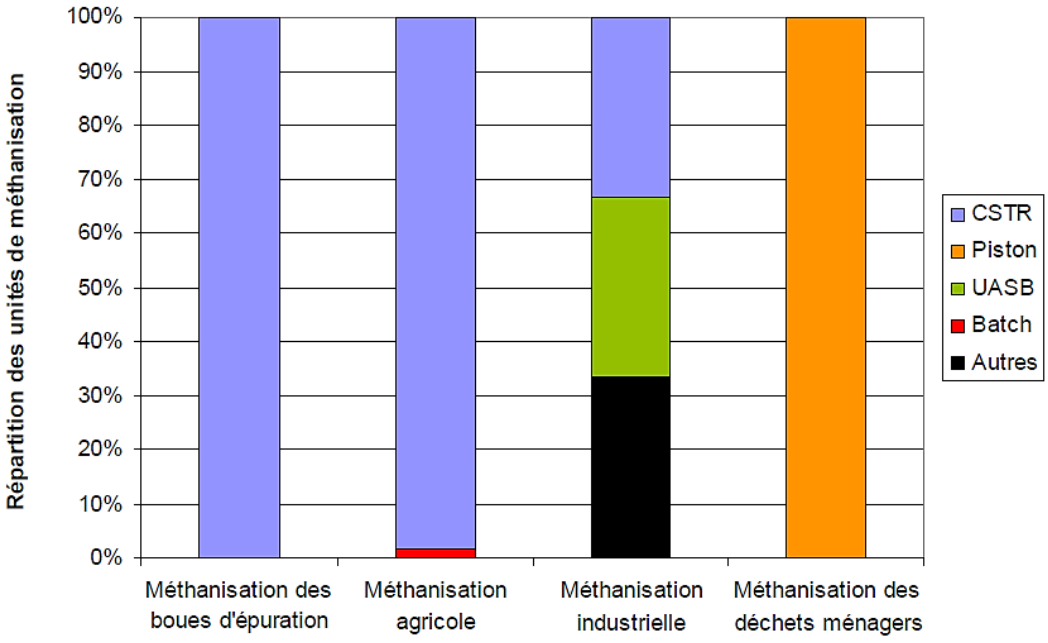

Figure I. 16 : Répartition des différentes technologies de méthanisation en fonction des secteurs de développement (Girault, R., 2011)

I.3.5.3. Paramètres opérationnels des digesteurs

I.3.5.3.1. Charge organique appliquée

La charge organique appliquée est le flux des intrants ramené à l'unité de volume du réacteur. Elle s'exprime souvent en kg DCO par m^3 du réacteur et par jour. Il convient de noter qu'une grande charge appliquée permet une croissance élevée des microorganismes et une importante production de biogaz, mais elle exerce également une pression sur les microorganismes ce qui peut conduire à un effondrement du processus dû à l'accumulation d'acides.

I.3.5.3.2. Temps de séjour hydraulique

Le respect du temps de séjour hydraulique (TSH) est un paramètre essentiel dans le dimensionnement des installations de méthanisation. Il correspond au temps requis pour que les microorganismes anaérobies dégradent les composés biodégradables avec un rendement satisfaisant. Il est calculé en divisant le volume utile du digesteur par le volume de digestat extrait.

Le TSH doit être plus long que la durée du cycle de croissance des populations bactériennes. Le non-respect de cette contrainte entraîne leur diminution progressive dans le réacteur ; on parlera alors de lessivage bactérien (Hess, J., 2007).

En outre, le TSH affecte l'efficacité des digesteurs anaérobies, à l'égard de la dégradation de la matière organique et la production de gaz (Mata-Alvarez, 2002). Un temps de séjour plus long nécessite habituellement un plus grand volume de digesteur, en même temps qu'il augmente le potentiel d'acclimatation de la flore bactérienne et minimise les effets dus à la toxicité. Au contraire, un temps plus court permet l'utilisation d'un digesteur de taille réduite, avec moins de capitaux financiers et d'espace, mais entraîne aussi un plus grand risque de lessivage bactérien et donc un dysfonctionnement du digesteur (Yadvika et al., 2004).

I.3.5.3.3. Volume utile

L'un des principaux paramètres de dimensionnement d'un digesteur anaérobie est le volume utile. Ce volume est souvent affecté par l'accumulation de mousses et de particules solides liée à la présence de matières inorganiques et éventuellement un déficit d'agitation (Mata-Alvarez, 2002).

I.3.5.3.4. Température

À l'échelle industrielle, différentes stratégies sont utilisées considérant la température (Moletta, 2015). Le fonctionnement à température ambiante permet une économie importante au niveau des investissements, mais n'assure pas la durabilité du fonctionnement de l'installation durant l'année surtout dans les zones froides. Le fonctionnement en mode mésophile est le plus utilisé dans la pratique, compromis entre les dépenses énergétiques dues aux apports d'énergie thermique et surtout pour sa grande stabilité. Finalement, les températures élevées du mode thermophile, permettent d'augmenter la vitesse d'hydrolyse par rapport au mode mésophile et de lui confier un caractère plus hygiénisant par rapport aux germes pathogènes. Néanmoins, le mode thermophile est connu être moins stable, à cause des risques de production rapide d'AGV et d'hydrogène lors de l'étape d'hydrolyse et d'acidogenèse, qui peuvent entraîner l'inhibition du système.

I.3.5.4. Démarrage des digesteurs anaérobies

La phase de démarrage du digesteur, souvent longue et difficile, comprend l'inoculation par un écosystème anaérobie méthanogène suivie d'une montée en charge jusqu'à atteindre la charge organique nominale. En effet, ce démarrage doit se dérouler dans des conditions bien maîtrisées afin de maintenir l'équilibre complexe entre les différentes populations microbiennes et pour obtenir ainsi un système stable et robuste (Weiland et Rozzi, 1991). Dans le cas des digesteurs à forte charge organique, cette phase varie généralement entre 2 et 9 mois (Lauwers

et al., 1989), jusqu'à 12 mois (Bull et al., 1983) ou plus pour les digesteurs fonctionnant en mode thermophile (Puñal et al., 2000). La réduction de la durée de démarrage semble nécessaire pour augmenter la compétitivité de ces digesteurs.

I.3.5.4.1. Inoculation

L'inoculation consiste à introduire dans le réacteur une flore microbienne adaptée et efficace en termes de dégradation de la matière organique. L'idéal est d'utiliser un inoculum provenant d'un réacteur traitant le même type d'intrants et dans les mêmes conditions, en particulier la température (Moletta, 2015). Dans la pratique, il est possible d'utiliser un inoculum mésophile pour démarrer un digesteur anaérobie thermophile traitant des effluents liquides (Van Lier et al., 1992) ou des déchets solides (Griffin et al., 1998 ; Poggi-Varaldo et al., 1997). L'utilisation de boues anaérobies de stations urbaines à haute diversité microbienne est souvent préconisée par les chercheurs (Cresson, R., 2006). En moyenne, une période d'acclimatation de 1 à 3 semaines est suffisante, mais certaines études ont été conduites sur des périodes plus longues, de 2 mois à 3 mois (Austermann-Haun et Rosenwinkel, 1997).

I.3.5.4.2. Montée en charge

Cette phase suit l'étape d'inoculation et s'achève lorsque le digesteur atteint sa charge organique nominale et des performances épuratoires stabilisées. Une montée trop rapide entraîne une surcharge organique pouvant aller jusqu'à l'arrêt de l'installation, tandis qu'une montée trop lente se traduit par une faible croissance des microorganismes et une durée de démarrage très longue. Généralement, deux types de démarrages sont réalisés (Cresson, R., 2006 ; Moletta, 2015). Le premier est effectué selon la stratégie de l'épuration maximale. Il est fondé sur une augmentation par paliers de la charge appliquée en fonction du rendement épuratoire. Cette stratégie est souvent accompagnée d'une montée en charge par paliers de 5 à 30% par rapport à la charge précédente, lorsque le rendement épuratoire atteint un seuil minimal de 80 %. Le deuxième démarrage s'effectue selon la stratégie basée sur une augmentation exponentielle de la charge organique par accroissement de la concentration de l'alimentation mais à TSH constant. Cette technique de montée en charge est plus rapide que la première, mais elle est plus risquée en raison d'une accumulation plus importante des AGV durant le démarrage. Ce type de stratégie « agressive » nécessite une surveillance plus étroite que la première stratégie.

I.3.6. Voies d'utilisation des produits de la méthanisation

I.3.6.1. Biogaz

La valeur énergétique du biogaz produit pendant la digestion anaérobie est directement proportionnelle à sa concentration en méthane dont le PCI (pouvoir calorifique inférieur) est de 9,94 $kWh \cdot Nm^{-3}$. Cette nouvelle source d'énergie renouvelable a attiré l'attention des industriels et des communautés en raison de l'augmentation significative des coûts du pétrole et du gaz naturel. Outre la production directe de chaleur et d'électricité, de nouvelles possibilités de valorisation du biogaz ont progressivement émergé, notamment son utilisation dans les réseaux de distribution de gaz naturel et l'approvisionnement en GNV (gaz naturel pour véhicules). Il est donc nécessaire de traiter et de purifier, ou même d'enrichir le biogaz afin de le rendre compatible avec ces nouvelles modes de valorisation (Moletta, 2015).

I.3.6.2. Fraction liquide du digesteur

Certaines études signalent que la fraction liquide peut servir comme source nutritive en aquaculture et comme inoculum lors du démarrage des digesteurs anaérobies (Shih, 1993). Elle peut également avoir des propriétés insecticides contre les insectes suceurs de diverses cultures annuelles (Chanakya et al., 2007). Il convient de noter qu'elle est maintenant utilisée pour la dilution des intrants à l'entrée des digesteurs (Moletta, 2015).

I.3.6.3. Fraction solide du digestat

A la fin du procédé de méthanisation, la fraction solide du digestat récupéré dans les digesteurs peut être transformée en compost après maturation aérobie, ou utilisée comme substrat pour la production de lombricompost et de champignons comestibles (Chanakya et al., 2007 ; Lacour et al., 2011). D'autre part, après une étape de stabilisation aérobie, la fraction solide peut également être utilisée comme amendement organique fertilisant des sols agricoles. Cela permet la réduction des risques d'eutrophisation des eaux de surface et des eaux souterraines liés généralement à l'utilisation excessive d'engrais chimiques (Moletta, 2015 ; Schröder et al., 2008).

I.4. Optimisation de la production de méthane par divers prétraitements

L'intensification du procédé de méthanisation est essentielle afin d'augmenter les rendements de conversion en biogaz et de surmonter les limites de la biodégradation en anaérobie, en particulier dans le cas de substrats lentement ou difficilement biodégradables tels que les déchets solides (ordures ménagères, déchets d'abattoirs, cultures lignocellulosiques, etc.) (Moletta, 2015).

En effet, l'étape d'hydrolyse généralement considérée comme limitante du processus global de la biodégradation en absence d'oxygène (Pavlostathis et Giraldo-Gomez, 1991), peut être accélérée ou même remplacée par une hydrolyse physico-chimique ou biologique. L'objectif des traitements est donc de rendre le substrat traité plus facilement biodégradable. Il peut s'agir de traitements thermiques, chimiques (en milieu acide ou basique), mécaniques (en particulier de broyage, d'ultrasons et de champs électriques pulsés) ou biologiques (enzymatiques et fongiques) (Carlsson et al., 2012 ; Carrère et al., 2016 ; Kondusamy et Kalamdhad, 2014 ; Monlau et al., 2012 ; Yadvika et al., 2004 ; Yang et al., 2015).

Les objectifs des traitements doivent être adaptés selon chaque substrat étudié. Les principales modifications qui peuvent être induites sont :

- L'hydrolyse physique ou chimique des composés ;
- La solubilisation de la matière organique ;
- La désintégration cellulaire ;
- La réduction de la taille des particules et l'augmentation de leur surface ce qui augmente leur accessibilité aux microorganismes et aux enzymes extracellulaires ;
- La délignification, la solubilisation des hémicelluloses et la réduction de la cristallinité de la cellulose, dans le cas des biomasses lignocellulosiques ;
- L'hygiénisation, dans le cas des déchets d'abattoir.

Ces modifications induites génèrent deux effets différents sur la production de méthane (Figure 17). Elles peuvent soit augmenter sa production totale (courbe B, T3), soit améliorer la vitesse de sa production (courbe C, T1), en d'autres termes, augmenter la constante d'hydrolyse (k_h). Les comparaisons au niveau de temps du processus (T1, T2, et T3) mettent en évidence ces deux effets sachant que T2 représente le temps du processus sans prétraitements (courbe A) (Montgomery et Bochmann, 2014).

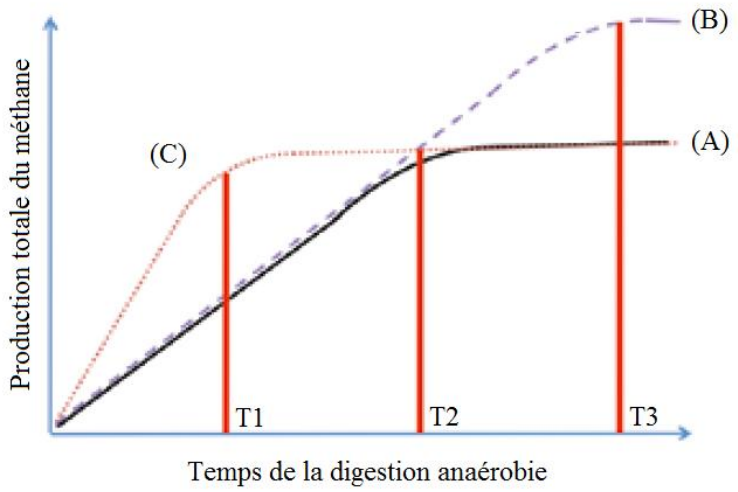

Figure I. 17 : Effets des prétraitements sur la production de méthane mesurée par les tests BMP : (A) production du méthane sans prétraitement, (B) augmentation de la production de méthane après prétraitement et (C) accélération de la cinétique de production après prétraitement (Montgomery et Bochmann, 2014)

Ainsi, les traitements de la biomasse peuvent être appliqués comme prétraitements en amont de la digestion anaérobie ou comme post-traitements avec recirculation des intrants lors d'un procédé anaérobie en deux étapes. Dans ce dernier cas, les déchets sont traités dans un premier digesteur, ce qui permet une première hydrolyse de la matière facilement biodégradable. À la sortie, avant d'atteindre le second réacteur, les post-traitements seront ainsi appliqués à des quantités inférieures de matière, ce qui est avantageux si le coût du procédé est proportionnel à la quantité de substrat traité. Cependant, la majorité des équipes de recherches et des industriels s'intéressent en particulier aux traitements en amont de la digestion anaérobie (Moletta, 2015). Les prétraitements présentant un intérêt particulier pour notre étude seront détaillés dans la section suivante.

I.4.1. Prétraitements thermiques

Dès le début des années 1970, le traitement thermique a été appliqué aux boues des stations d'épuration (STEP) (Haug et al., 1978). La température optimale rapportée par la plupart des études est comprise entre 160 et 180 °C et les principaux effets engendrés sont la solubilisation de la matière particulaire et l'hydrolyse des molécules. Une température de 170 °C appliquée pendant 30 minutes sur des boues activées et des boues de STEP a augmenté, à titre exemple, la production de biogaz d'une moyenne de 60% (Bougrier et al., 2006). Les mêmes conditions appliquées aux boues secondaires ont permis l'amélioration de la production de biogaz de près de 80% (Donoso-Bravo et al., 2010). Au contraire, pour des traitements à des températures supérieures à 190 °C, plusieurs équipes de recherche ont observé une diminution

de la biodégradabilité des boues (Moletta, 2015 ; Pinnekamp, 1989). Ceci est expliqué par la formation de composés récalcitrants, en particulier des produits des réactions de Maillard. En effet, à haute température et en présence d'eau, la réaction des sucres avec les acides aminés conduit à la formation de mélanoïdines, composés difficilement biodégradables (Bougrier et al., 2008).

En parallèle, le prétraitement thermique a été appliqué sur divers résidus tels que les fractions fermentescibles des ordures ménagères, les déchets de cantine, les sous-produits animaux, les déchets graisseux et les cultures lignocellulosiques (Carlsson et al., 2012 ; Mosier et al., 2005 ; Schieder et al., 2000). Dans ces cas, les températures appliquées varient généralement entre 100 et 200 °C, sous des pressions de 2 à 4 MPa. Citons particulièrement le traitement de la paille de blé à une température de 121 °C pendant une heure, qui augmente la production de biogaz d'environ 50% (Bolado-Rodríguez et al., 2016). L'hydrolyse thermique peut être également associée à une détente rapide ce qui conduit à une déstructuration plus importante de la biomasse et rentre ainsi sous l'appellation d'explosion à la vapeur (Han et al., 2010 ; Liu et al., 2002 ; Vogt et al., 2002). Cependant, il est important de noter que jusqu'à présent, les effets du traitement thermique sont évalués à l'échelle du laboratoire et que les applications industrielles existent uniquement pour les ordures ménagères et les déchets de cantine (Moletta, 2015).

En effet, les hautes températures utilisées lors de ces traitements entraînent une très forte consommation d'énergie thermique. Par conséquent, en raison du manque d'application de ce traitement à l'échelle industrielle sur les cultures lignocellulosiques et compte tenu de son coût énergétique très élevé, il n'a pas été testé et évalué dans notre étude.

La congélation peut être considérée comme une autre méthode de prétraitement thermique en amont de la digestion anaérobie. La rupture des cellules peut être réalisée à basse température du fait de la formation intracellulaire de cristaux de glace causant des lésions aux membranes cellulaires (Thomashow, 1998 ; Webb et al., 1996). De plus, les estimations de l'énergie requise pour chauffer les déchets organiques à 150 °C et pour congeler cette même quantité à -20 °C, ont montré que le prétraitement par congélation consomme environ 3 fois moins d'énergie que le prétraitement thermique (Stabnikova et al., 2008). Les effets des températures de -80 °C sur la digestion anaérobie ont également été évalués. Une congélation des fractions organiques de déchets ménagers à -80 °C pendant 6 heures, suivie d'une décongélation à 55 °C pendant 30 minutes, a permis une augmentation de la production de biogaz de 56% (Ma et al., 2011). Dans notre étude, les effets de la congélation à -20 °C et à -

80 °C sur la production de méthane du marc de raisin sont évalués et décrits dans les chapitres suivants.

I.4.2. Prétraitements chimiques

I.4.2.1. Traitement alcalin

Les cultures lignocellulosiques ont une teneur élevée en polysaccharides difficilement biodégradables en anaérobie. Cependant, le prétraitement alcalin est connu pour être efficace dans l'altération et la modification de cette structure complexe. Son principal impact sur la biomasse lignocellulosique est la saponification des esters portés par les hémicelluloses (Datta, 1981). En fait, ces esters relient les hémicelluloses (associées à la cellulose) aux unités acétyles et hydroxy-cinnamiques présentes dans la lignine (Xu, 2010). Leur saponification entraîne ainsi un gonflement de la biomasse et l'augmentation de la taille des pores. Par conséquent, le transport des enzymes permettant l'hydrolyse des polysaccharides est favorisé. Les substrats lignocellulosiques peuvent donc être mieux digérés en milieu anaérobie même si une partie de la lignine est encore présente.

Montrons quelques illustrations :

Le traitement de la paille de blé à la soude concentrée (1 mol/L) (Pavlostathis et Gossett, 1985) provoque une forte augmentation de la production de méthane (187 Nm^3 CH_4/tonne de Matières Volatiles (MV) sans prétraitement contre 372 Nm^3 CH_4/tonne de MV après prétraitement). A noter que ce prétraitement est associé à une forte consommation de soude, ce qui peut remettre en cause son application industrielle.

A contrario, il a été montré qu'une libération de phénols dérivés de la lignine, suite à un traitement alcalin puissant, peut être une source d'inhibition pour la méthanogenèse, affectant négativement la production de méthane (Fedorak et Hrudey, 1984).

Des résultats encourageants ont été obtenus même avec des concentrations en soude plus faibles (de 1 à 10%), mais nécessitant des temps de contact plus longs : de 12h à 24h (Sambusiti et al., 2012). A titre d'exemples, le traitement de la paille de riz avec une concentration en soude de 1% pour 3 heures à 20 °C, augmente la production de méthane de 34% (Shetty et al., 2017). Des tiges de maïs traitées avec une concentration en soude de 5% pour 24 heures à 20 °C, montrent une augmentation de la production de méthane de 37% (Zhu et al., 2010). De plus, le traitement des plantes de blé avec une concentration en soude de 8% pour 1 heure à 25 °C, affiche une production de méthane accrue d'environ 47% (Taherdanak et Zilouei, 2014).

Par conséquent, un des objectifs de cette étude est d'évaluer les effets des concentrations alcalines croissantes (0%, 6% et 10% NaOH et NH_3) sur la digestion anaérobie du marc de raisin.

I.4.2.2. Traitement acide

Le prétraitement acide (avec de l'HCl, H_2SO_4, H_3PO_4 ou HNO_3) est convenable pour les substrats lignocellulosiques, non seulement parce qu'il peut altérer la structure rigide de la biomasse, mais aussi parce que les microorganismes hydrolytiques sont capables de s'acclimater à des conditions acides (Carrère et al., 2016 ; Mussoline et al., 2013). La réaction principale qui se produit pendant ce prétraitement est l'hydrolyse des hémicelluloses ainsi que des parties amorphes des fibres de cellulose (selon la concentration d'acide) (Zhang et al., 2007). Au contraire, la lignine est très faiblement solubilisée, elle se condense et précipite (Hendriks et Zeeman, 2009 ; Mata-Alvarez, 2002).

Le traitement de la bagasse de canne à sucre avec une concentration en HCl de 1M pour 30 jours à 25 °C, a augmenté la production de méthane de 31% (Kivaisi et Eliapenda, 1994). Les mêmes conditions appliquées sur des fibres de noix de coco ont provoqué une augmentation de la production de méthane d'environ 74% (Kivaisi et Eliapenda, 1994). D'autre part, le traitement des plantes de maïs avec 2% HCl pour 24 heures à 20 °C, n'a pas montré d'effets sur la production de méthane qui a demeuré constante (Pakarinen et al., 2011).

Il convient de noter qu'un prétraitement avec de fortes concentrations en acides peut entraîner la production de quelques inhibiteurs, comme le furfural et l'hydroxyméthylfurfural (Ariunbaatar et al., 2014 ; Modenbach et Nokes, 2012). Par conséquent, un tel prétraitement est évité et le prétraitement avec des acides dilués est désormais favorisé. D'autres inconvénients associés au prétraitement acide incluent la perte de sucres fermentescibles due à la dégradation accrue des substrats complexes, le coût élevé des réactifs acides et le coût supplémentaire pour neutraliser les conditions acides avant le démarrage du procédé (Kumar et Murthy, 2011 ; Modenbach et Nokes, 2012 ; Taherzadeh et Karimi, 2008). Dans ce projet de recherche, nous étudions les effets de concentrations acides croissantes (0%, 6% et 10% HCl) sur la production de méthane du marc de raisin.

I.4.3. Prétraitements mécaniques

I.4.3.1. Broyage

L'objectif primaire du broyage est la réduction de la taille des particules solides qui se traduit par une augmentation de la surface disponible et représente une option pour augmenter le rendement et la cinétique des processus anaérobies (Montgomery et Bochmann, 2014). En effet, la surface spécifique de réaction entre les microorganismes et leurs substrats est un paramètre incontournable à prendre en considération pour un bon déroulement de la digestion anaérobie (Mshandete et al., 2006 ; Ward et al., 2008). Dans le cas de substrats lignocellulosiques, le broyage peut également mener à une diminution de la cristallinité et du degré de polymérisation de la cellulose (Taherzadeh et Karimi, 2008). Un autre avantage est la diminution de la viscosité de la charge appliquée dans les digesteurs ce qui facilite l'agitation et assure ainsi une homogénéité du mélange.

Plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la réduction de la taille des particules par le broyage, la solubilisation de la DCO et l'amélioration de la biodégradabilité à partir de substrats lignocellulosiques (Wang et al., 1999). L'ampleur de l'effet observé dépend de la nature et des caractéristiques du substrat étudié (Carlsson et al., 2012). A titre d'exemples, le broyage n'a pas montré d'impact sur la production de méthane à partir d'un mélange de pommes, de carottes, de pommes de terre et de viande ; ces substrats présentent une forte biodégradabilité initiale (de 88% à 95%) (Moletta, 2015). Par contre, il a amélioré la production de biogaz des graines de tournesol, du foin et des feuilles d'érable d'environ 20% ; ces substrats présentant une faible biodégradabilité initiale en raison de leur forte teneur en cellulose et lignine (Palmowski et Müller, 2000).

I.4.3.2. Ultrasons

Lors d'un traitement par ultrasons ou sonication, les ondes de pression, se propageant à travers un milieu liquide, libèrent de grandes quantités d'énergie provoquant ainsi la formation de bulles de cavitation. Une fois la pression locale dans la phase liquide devient inférieure à la pression de cavitation, il y a formation de petites bulles qui grossissent, vibrent et s'implosent violemment lorsqu'elles atteignent une taille critique. Une grande quantité d'énergie mécanique est alors libérée sous forme de vagues d'expansion et de compression (Kim et al., 2003). Ces vagues provoquent des phénomènes de forts cisaillements au sein du liquide. Ceci permet une déstructuration de la matière à une échelle plus fine que le broyage (Elliott et Mahmood, 2007). Des fréquences de sonication élevées (500 - 1000 kHz) favorisent la formation des radicaux libres et du peroxyde d'hydrogène en raison de la dissociation de l'eau (Ariunbaatar et al., 2014). Alors qu'avec des fréquences faibles (20 - 40 kHz), les bulles de cavitation sont plus grandes, ce qui entraîne des phénomènes de cisaillement plus marqués (Tiehm et al., 2001).

Les ultrasons de faibles fréquences sont couplés à la digestion anaérobie, principalement pour le traitement des boues d'épuration (Moletta, 2015). Comme exemple, des ultrasons d'une puissance de 30 kWh · m^{-3} appliqués sur des boues secondaires ont amélioré la production de biogaz de 42% (Pérez-Elvira et al., 2009). Récemment, plusieurs équipes de recherche ont étudié les effets de la sonication sur la méthanisation des déchets solides : la sonication de la paille de maïs et du fumier bovin en codigestion, en appliquant une énergie de 285 kJ · kg MS^{-1}, augmente le potentiel de biogaz d'environ 70% (Zou et al., 2016). La sonication du fumier bovin, des déchets alimentaires et de la glycérine brute en codigestion, en utilisant une énergie de 520 kJ · kg MS^{-1}, permet l'amélioration de la production de biogaz de 120% (Ormaechea et al., 2016).

I.4.3.3. Champs électriques pulsés (CEP)

Ce processus est basé sur le phénomène d'électroporation induit par l'application d'un champ électrique pulsé à un échantillon biologique placé entre deux électrodes. Suite à l'application d'impulsions de courte durée, les instabilités locales produites conduisent à la formation de pores au niveau de la membrane cellulaire (Ho and Mittal, 1996 ; Zimmermann, 1986). Ces pores peuvent être réversibles ou irréversibles en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué ($kV.cm^{-1}$) et du temps d'application (Zimmermann et al., 1976).

Le modèle de Zimmermann est souvent utilisé pour expliquer la théorie de l'électroporation (Zimmermann, 1986). Ce modèle présume que l'exposition de la cellule vivante à un champ électrique provoque une polarisation au niveau de sa membrane lipidique qui se comporte alors à l'image d'un condensateur (Figure 18). Comme les plaques d'un condensateur sont de charges inverses, elles s'attirent en créant une compression électromécanique réduisant l'épaisseur de la membrane. Il s'agit donc d'une électrostriction de la bicouche membranaire qui réagit selon une pression inverse provoquant la perforation mécanique de la membrane.

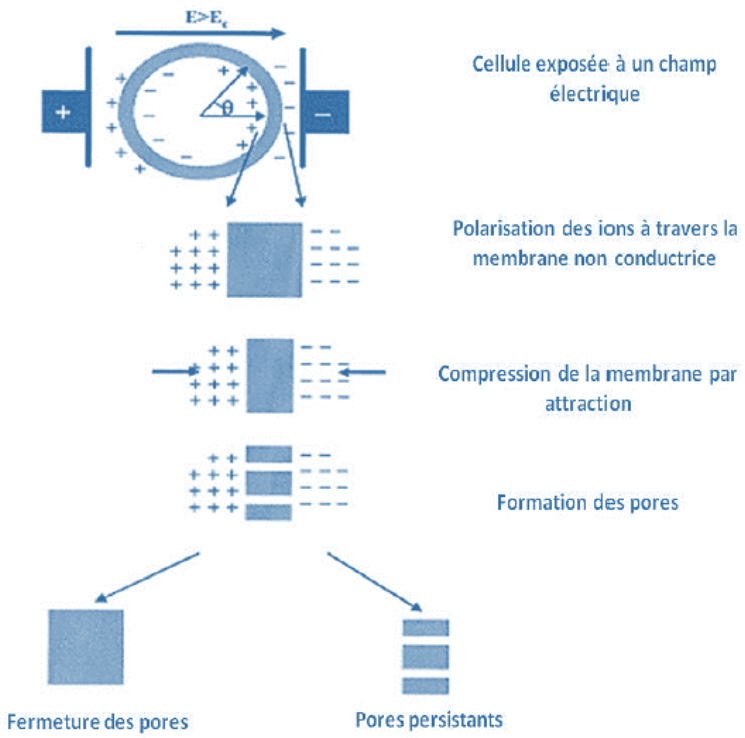

Figure I. 18 : Description schématique du phénomène d'électroporation des membranes cellulaires

La technologie des champs électriques pulsés gagne de l'intérêt scientifique en raison de sa capacité à améliorer les procédés conventionnels utilisés dans les industries agroalimentaires (Lebovka et al., 2016 ; Vorobiev et Lebovka, 2009). Elle est également appliquée au niveau industriel pour intensifier l'extraction des composés phénoliques des raisins lors du procédé de vinification (Darra et al., 2013 ; Darra et al., 2016). Cette technologie a été récemment utilisée comme prétraitement en amont de la méthanisation (Kopplow et al., 2004 ; Lindmark et al., 2014) ; plus de 80% des études ont été menées sur des boues (Carlsson et al., 2012). Ainsi, l'application des champs électriques pulsés sur des boues activées, avec un apport énergétique de 34 kWh·m^{-3}, renforce le potentiel de biogaz de 33% (Lee et Rittmann, 2011). Une autre application sur du lisier de porc avec un apport énergétique de 10,5 kWh·m^{-3} entraîne une augmentation de la production de biogaz de 100% (Salerno et al., 2009). Une biomasse algale traitée par électroporation avec un apport d'énergie de 35 kWh·m^{-3} montre une amélioration du potentiel méthanogène d'environ 110% (Garoma et Shackelford, 2014).

I.5. Conclusion et positionnement du sujet

La demande énergétique, à l'échelle mondiale, est en croissance continue. Elle est comblée par les énergies fossiles telles que le pétrole, le gaz naturel et le charbon. Ces ressources sont limitées et présentent un impact négatif sur l'environnement. C'est pourquoi dans la dynamique de développement durable, la digestion anaérobie est désormais un moyen attrayant pour produire de l'énergie verte et pour le traitement des déchets organiques, dans la perspective d'un avenir vert bioéconomique.

Dans le cadre de ce travail de thèse franco-libanais, nous concentrons nos efforts sur les déchets issus de la vitiviniculture, considérée de nos jours comme l'une des activités agricoles les plus importantes à l'échelle mondiale, en particulier en France et au Liban. Nous nous intéressons à la valorisation du marc de raisin, déchet majeur et principal coproduit de la vinification, par méthanisation, apportant des éclairages nouveaux sur ce sujet d'intérêt en cours d'expansion.

Nous visons dans un premier temps vérifier la pertinence de cette technologie en tant qu'approche de valorisation verte du marc de raisin. Nous cherchons alors à caractériser biochimiquement notre substrat et à évaluer la production maximale de méthane dans des digesteurs en mode batch. Les données recueillies sont indispensables à la compréhension et à l'utilisation de ces substrats dans les digesteurs en digestion seule ou en codigestion.

Afin de mieux comprendre la faisabilité technique du procédé à une échelle industrielle, une extrapolation au mode continu en utilisant un digesteur (CSTR) à 37 °C est envisagée. Nous pensons, en effet, que ce type d'étude est incontournable lorsque l'on s'intéresse au procédé de méthanisation dans une perspective d'exploitation industrielle, comme c'est le cas pour ce travail. L'acclimatation de ce digesteur, à la température moyenne de la vallée de la Bekaa (25 °C), est souhaitable pour une meilleure adaptation au milieu libanais.

Dans un second temps, nous menons une étude inter-cépages en vue d'établir les corrélations possibles entre la composition biochimique de notre biomasse et la production de méthane. Au fondement de cette partie du travail, complétement originale, nous nous sommes interrogés sur les aspects éventuellement bactériostatiques des polyphénols issus du raisin et sur leurs impacts potentiels sur les performances de la digestion anaérobie. Les cépages sélectionnés ayant des teneurs en polyphénols très différentes, leur étude comparée nous permet d'envisager d'apporter une réponse à la question posée ci-avant.

Afin d'optimiser davantage le procédé en mode continu, nous nous intéressons à évaluer les effets du temps de séjour hydraulique sur la productivité du digesteur et son fonctionnement à long terme. Une zone optimale de fonctionnement ainsi qu'une zone critique sont à déterminer.

L'intensification du procédé est indispensable pour boucler le schéma d'optimisation. Compte-tenu de la teneur en composés lignocellulosiques des marcs de raisins et des approches de déconstruction de ces molécules décrites dans la littérature, nous cherchons alors à mettre en œuvre différents prétraitements chimiques et physiques en amont de la digestion anaérobie et à évaluer leurs effets correspondants sur la production de méthane et sur la dégradation des fractions lignocellulosiques. Dans ce contexte, nous nous autorisons également une incartade vers des pistes peu explorées en évaluant le potentiel de la technologie des champs électriques pulsés.

Enfin, la valorisation de ce travail de thèse, notamment au Liban, ne peut se compléter que par un transfert technologique au sein de la communauté. Une première initiative est ainsi menée par le montage de la première unité de méthanisation en mode batch au sein de la faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II. Chapitre II : Matériels et méthodes

Ce chapitre présentera les matériels et méthodes expérimentales adoptés au cours de ce travail. Il détaillera ainsi :

- L'origine des marcs de raisins et celui de l'inoculum,

- Les techniques analytiques classiques (matières sèches, matières volatiles, …) et spécifiques (fractionnement par le protocole de Van-Soest, dosage des polyphénols totaux, …),

- La technique de détermination de la production maximale de méthane en mode batch (test BMP),

- La méthanisation du marc de raisin en mode continu (dans un digesteur de 12 L parfaitement mélangé et dans des digesteurs de 2 L),

- Les divers prétraitements chimiques et physiques appliqués en amont de la digestion anaérobie de notre substrat.

II.1. Matrice des substrats, origine et composition

II.1.1. Échantillonnage

II.1.1.1. Cépages de marcs de raisins

Des marcs de raisins, issus de différentes régions vinicoles libanaises et françaises, ont été récupérés afin de réaliser les expérimentations de méthanisation (Tableau 1). Les raisins (*Vitis Vinifera*) ont été soigneusement récoltés à maturité au cours des vendanges 2013, 2014 et 2015. Des échantillons de marcs de raisins, d'environ 5 kg de chaque cépage, ont été prélevés immédiatement après l'opération de pressage des raisins puis transportés au laboratoire. A l'arrivée, les rafles ont été retirées manuellement de la matière première qui a ensuite été stockée à +6 °C jusqu'à utilisation.

Tableau II. 1 : Cépages de marcs de raisins, collecte et origines.

Cépage	Temps de collecte	Géo-coordonnées	Altitude (m)	Fournisseur	Région et pays
Cabernet Sauvignon Merlot	Octobre 2014	45° 19' 15.913'' N 0° 57' 19.053'' W	6	Société civile pour exploitations agricoles (SCEA Birot et Fils, Gaillan en Médoc)	Bordeaux, France

Chardonnay Pinot noir	Octobre 2014	49° 2’ 15.023’’ N 3° 57’ 5.672’’ E	78	Société civile pour commercialisation de produits de vinification (Sofralab, Magenta)	Champagne, France
Marselan Syrah Cabernet Sauvignon	Septembre 2014	33° 49’ 35.245’’ N 35° 53’ 33.405’’ E	909	Société vinicole (Château KSARA)	Beqaa, Liban
Cabernet Franc Chenin blanc	Octobre 2013 et 2014 Octobre 2015	47° 12’ 25.949’’ N 0° 25’ 51.392’’ W	59	Société vinicole (Domaine Des Acacias)	Tigné, Pays de la Loire, France
Marc ensilé	Mai 2014	47° 16’ 1.927’’ N 0° 30’ 12.769’’ W	28	Distilleries agricoles et industrielles : UAPL (Union Agricole Pays De Loire). Après le pressurage des raisins, le marc a été distillé, épépiné, ensilé pendant sept mois puis récupéré	Thouarcé, Pays de la Loire, France

Les différentes variétés de marc de raisin listées dans le tableau ci-dessus sont représentées sur la Figure 1.

Figure II. 1 : Les différents cépages de marcs de raisins utilisés, a) Cabernet Sauvignon-France, b) Merlot, c) Chardonnay, d) Pinot noir, e) Marselan, f) Syrah, g) Cabernet Sauvignon-Liban, h) Cabernet Franc 2014, i) Cabernet Franc 2013, j) Chenin blanc et k) marc ensilé

II.1.1.2. Inoculum

L'inoculum utilisé dans ce travail provient de l'installation de traitement des eaux usées de Saint-Brieuc en France, opérant sous des conditions mésophiles. Cette station reçoit approximativement 150 m^3 d'un mélange de boues (primaires, biologiques et graisses) par jour. Après sa récupération, l'inoculum a été tamisé avec un tamis de 500 µm afin d'éliminer les grandes particules, d'assurer une meilleure homogénéité et d'améliorer la reproductibilité des expérimentations. Celui-ci a été soumis à une période de jeûne d'environ une semaine avant le début des essais, afin d'éliminer une grande partie du substrat biodégradable résiduel et de faciliter l'évaluation de la biodégradation du substrat étudié.

II.1.2. Caractéristiques bio-physico-chimiques des substrats

II.1.2.1. Matières sèches (MS)

Les matières sèches (MS) correspondent aux composés résiduels après séchage jusqu'à atteindre une masse constante selon la norme NF ISO 11465. Cette teneur est déterminée par méthode gravimétrique dans une étuve (Modèle 600, Memmert, Allemagne) à 105 ± 1 °C. Un échantillon de masse connue ($m_{échantillon}$) est déposé dans une coupelle préalablement tarée (m_{vide}). L'ensemble est introduit dans l'étuve pour séchage, puis est refroidi en dessiccateur et pesé. La teneur en MS ($g \cdot Kg^{-1}$) est déterminée selon l'équation suivante [Eq. 1] :

$$MS = \frac{m_{105\,°C} - m_{vide}}{m_{échantillon}} \quad [Eq. 1]$$

m_{vide} est la masse, en grammes, de la coupelle vide,
$m_{105\,°C}$ est la masse, en grammes, de la coupelle et du résidu sec,
$m_{échantillon}$ est la masse, en kilogrammes, de l'échantillon.

II.1.2.2. Matières volatiles (MV)

La teneur en matières volatiles (MV) est déterminée après une étape de calcination du résidu sec obtenu, dans un four à moufle à 550 °C (Controller B170, Nabertherm, Allemagne) pendant 4 heures, selon la norme NT U 44-160. La teneur en MV ($g \cdot Kg^{-1}$) est déterminée suivant l'équation [Eq. 2] :

$$MV = \frac{m_{105\,°C} - m_{550\,°C}}{m_{échantillon}} \quad [Eq. 2]$$

$m_{550\,°C}$ est la masse, en grammes, du creuset et du résidu calciné,

$m_{105\,°C}$ est la masse, en grammes, du creuset et du résidu sec,

$m_{échantillon}$ est la masse, en kilogrammes, de l'échantillon.

II.1.2.3. Demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO représente la consommation d'oxygène nécessaire pour oxyder complétement la matière organique du substrat. Elle est exprimée en gramme d'oxygène par gramme de matière brute (MB). Le marc de raisin a été préalablement broyé au moyen d'un mixer (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, États-Unis), dans un volume total de 0,8 L d'eau, pendant 10 min et avec une vitesse de 22 000 tr·min^{-1}. La détermination de la DCO est effectuée dans des tubes de test DCO commerciaux (Spectroquant 0,5-10 g·L^{-1}, Merck, Darmstadt, Allemagne) contenant du dichromate de potassium et l'échantillon à analyser. Les tubes sont placés dans un four (Spectroquant TR 320, Merck, Darmstadt, Allemagne) à 150 °C pendant 2 heures. Il est considéré que toute la matière organique est oxydée par la solution sulfurique chaude de dichromate de potassium avec du sulfate d'argent comme catalyseur. La DCO est déterminée en mg O_2·L^{-1} par photométrie grâce à un spectrophotomètre (Spectroquant Nova 60 Photometer, Merck, Darmstadt, Allemagne). Cette méthode correspond à DIN ISO 15705 et est analogue à EPA 410.04.

II.1.2.4. Dosage de l'azote et du phosphore

Le marc de raisin a été broyé comme décrit dans le paragraphe précédent. La détermination de la teneur en azote total (N) est effectuée dans des tubes de test commerciaux (Spectroquant 10-150 mg N·L^{-1}, Merck, Darmstadt, Allemagne), selon une méthode analogue à DIN 38405-9. La détermination de la teneur en phosphore total (P) est réalisée dans des tubes de test commerciaux (Spectroquant 0,5-25,0 mg P·L^{-1}, Merck, Darmstadt, Allemagne), selon une méthode analogue à DIN EN ISO 6878.

II.1.2.5. Granulométrie

La granulométrie est l'étude de la distribution de la taille des particules dans une solution aqueuse. Dans notre étude, la granulométrie du marc de raisin a été déterminée après son broyage avec de l'eau. Les échantillons à analyser ont été dilués et dispersés dans une cellule agitée avant le début des mesures. La taille de ces particules en suspension a ainsi été déterminée dans un granulomètre par diffusion de la lumière laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Royaume-Uni). La distribution de taille est exprimée en *termes* de *volume* de *sphères*

équivalentes (plage de 0,02 à 2000 µm).

II.1.2.6. Fractionnement biochimique par la méthode de Van-Soest

Parmi les différentes méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux dans les biomasses lignocellulosiques, la méthode de « Van-Soest » est celle présentant le meilleur compromis entre les données obtenues sur la nature de ces polysaccharides et le temps d'analyse requis pour aboutir à ces informations (Godin et al., 2011). Elle permet le fractionnement des fibres de la biomasse lignocellulosique par des extractions chimiques successives et quantifie par gravimétrie les fibres insolubles sèches récupérées après filtration (Mertens, 2002; Van Soest et al., 1991, 1985).

En premier lieu, cette méthode permet l'extraction de la fraction soluble (contenant des hydrates de carbone non structuraux, des pectines, des mucilages, des tanins solubles à pH neutre, des lipides et des protéines solubles) avec une solution détergente neutre en excès, agissant sur l'échantillon sec pendant 1 h à 100 °C, avec un pH de 7 ± 0,05. Cette solution est composée de Phosphate disodique (4,5 $g \cdot L^{-1}$), de tétraborate de sodium (6,81 $g \cdot L^{-1}$), d'α-amylase (0,25 $g \cdot L^{-1}$), d'EDTA de sodium (18,6 $g \cdot L^{-1}$), de lauryle sulfate de sodium (30 $g \cdot L^{-1}$) et de sulfite de sodium (5 $g \cdot L^{-1}$). La fraction extraite est ensuite séparée des fibres insolubles au détergent neutre (NDF) par filtration (Figure 2). Séquentiellement à l'action du détergent neutre, une solution en excès de détergent acide (20 $g \cdot L^{-1}$ de bromure de triméthylcétyl-ammonium et 98 $g \cdot L^{-1}$ de H_2SO_4) agissant 1 heure à 100 °C permet l'extraction de l'hémicellulose. La fraction extraite est séparée des fibres insolubles au détergent acide (ADF) par filtration. Quant à la cellulose, elle est extraite en traitant la fraction ADF à l'acide sulfurique (1317 $g \cdot L^{-1}$) pendant 3 h à température ambiante. Le résidu de filtration, nommé ADL, correspond à la lignine associée aux éléments inorganiques. Les teneurs en hémicelluloses et en celluloses ont été calculées comme la différence entre les fractions NDF et ADF, et les fractions ADF et ADL, respectivement. La teneur en lignine est égale à la différence entre la fraction ADL et la teneur en matières minérales déterminée après calcination à 550 °C (Figure 2). Tous les produits utilisés dans cette méthode ont été fournis par (Merck, Allemagne). Pour chaque substrat, trois à six échantillons ont été analysés.

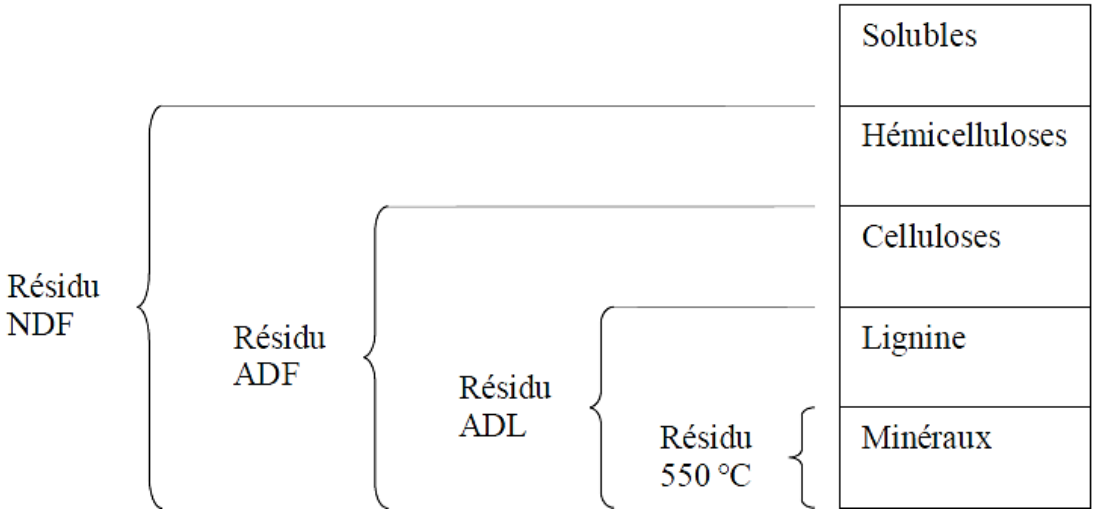

Figure II. 2 : Fractionnement de Van-Soest. NDF = Neutral Detergent Fiber ; ADF = Acid Detergent Fiber ; ADL = Acid Detergent Lignin ; Résidu 550 °C = résidu obtenu par calcination

II.1.2.7. Dosage des polyphénols totaux

Le procédé d'extraction solide-liquide des polyphénols a été réalisé avec un ratio massique solide-liquide de 1/10, dans un solvant éthanol/eau à 70%, à 50 °C et pendant 3 heures. La teneur en composés phénoliques totaux est ensuite déterminée par le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Allemagne) (Singleton et al., 1999). En pratique, 200 µL d'extrait ont été mélangés à 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu (dilué dix fois). Ensuite, 800 µL de carbonate de sodium sont rajoutés (75 $g \cdot L^{-1}$) et le mélange est incubé pendant 10 minutes à 60 °C puis refroidi à température ambiante. L'absorbance à 750 nm est ensuite mesurée par le spectrophotomètre UV/Vis (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, Massachusetts, États-Unis). Le standard utilisé pour le traçage des courbes d'étalonnages est l'acide gallique. Les teneurs en composés phénoliques totaux sont exprimées en concentration par mg d'équivalent d'acide gallique par rapport à la matière sèche (MS) initiale (g GAE $kg \cdot MS^{-1}$).

II.1.2.8. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

La quantification des composés phénoliques a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Avant l'analyse, les extraits des marcs de raisins sont purifiés par filtration à travers des membranes de polyéthersulfone de 0,2 µm. Un appareil de Chromatographie en phase liquide (KNAUER, Berlin, Allemagne) couplé à un détecteur à réseau de diodes est utilisé. Les analyses sont effectuées sur une colonne C18 Spherisorb ODS-2

(5 µm, 250 x 4,6 mm), avec un débit de 1 mL·min^{-1}, un volume d'injection de 20 µL et une détection à des longueurs d'onde de 280 et 320 nm. L'éluant A est de l'acide formique à 2% et l'éluant B est formé de 69% de méthanol, 29% d'eau pour HPLC et de 2% d'acide formique. L'identification des composés phénoliques est basée sur la comparaison des temps de rétention des pics détectés avec ceux des composés standards. Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel ChromGate (version 2.8.). La quantification est réalisée en intégrant l'aire des pics grâce aux courbes d'étalonnages des standards. Les résultats sont exprimés en mg·kg^{-1}.

II.2. Procédé de méthanisation en mode batch du marc de raisin

II.2.1. Description et principe de fonctionnement de l'AMPTS (Automatic Methane Potential Test System)

La mesure du potentiel méthanogène (BMP, Biochemical Methane Potential) permet de déterminer la biodégradabilité « anaérobie » de la matière organique et la production maximale de méthane associée, dans des conditions dites optimales. Le système de mesure utilisé dans ce travail est l'AMPTS-II (Automatic Methane Potential Test System, Bioprocess Control, Lund, Suède) (Figure 3). Cet équipement analytique permet de suivre et d'enregistrer de faibles volumes de méthane produits, à l'échelle du laboratoire.

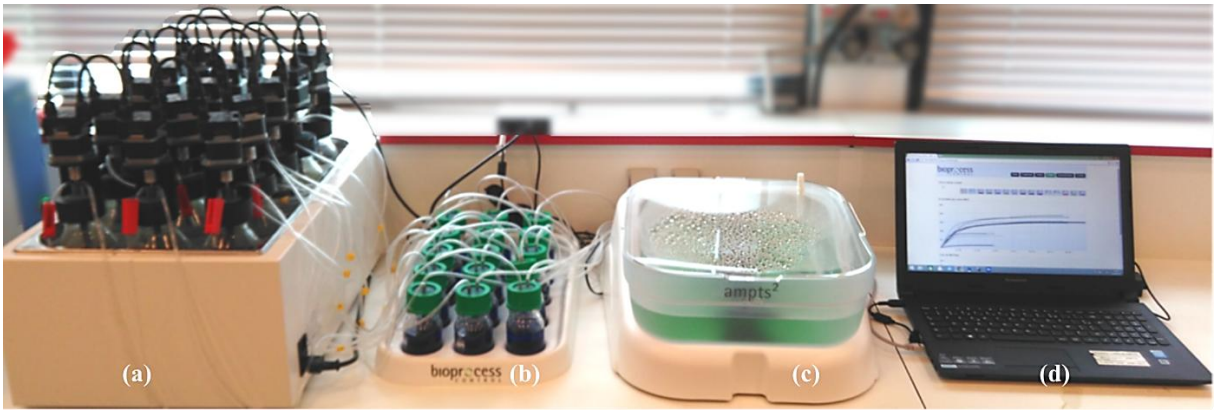

Figure II. 3 : Système AMPTS II : unité d'incubation (a), unité de fixation du CO_2 (b), unité de mesure du volume de CH_4 (c) et système de contrôle et acquisition (d)

Le système est composé de quatre unités principales :

Unité de digestion anaérobie :

L'unité d'incubation est un bain marie thermostaté (37 °C) qui peut contenir jusqu'à 15 bioréacteurs standards en verre borosilicatée de 0,5 L (Figure 3, a). Chaque bioréacteur est

équipé d'un agitateur rotatif mis en marche de façon séquentielle et destiné à assurer un mélange suffisant du média (substrat et inoculum).

Unité de capture du CO_2 :

Le biogaz produit dans chaque réacteur passe par un tube reliant l'unité d'incubation à l'unité de fixation du CO_2 (Figure 3, b). Cette dernière est constituée de bouteilles contenant une solution alcaline (80 mL de NaOH à 120 $g \cdot L^{-1}$) et de la thymolphthaléine comme indicateur de pH pour contrôler visuellement la capacité de fixation du CO_2 en gardant un pH supérieur à 10. Ce dernier présent dans le biogaz est ainsi retenu par interaction chimique avec l'hydroxyde de sodium (efficacité de la capture supérieure à 98%).

Unité de mesure du volume de méthane produit :

Le volume de CH_4 libéré est mesuré par un appareil de mesure du volume de gaz qui est un bassin rempli d'eau contenant 15 clapets immergés (Figure 3, c). Chaque clapet reçoit le CH_4 en provenance d'un bioréacteur (plage de mesure : 0,01 à 200 $L \cdot j^{-1}$). Le méthane arrive sous ces clapets qui se soulèvent quand un volume précis est accumulé (Figure 4) et une impulsion électrique est alors enregistrée par le système d'acquisition (répétabilité des mesures de 1%). Des capteurs de pression et de température sont incorporés pour la correction en ligne des résultats qui seront présentés ensuite en conditions normalisées.

Logiciel :

Un interface utilisateur via serveur web est intégré pour le paramétrage et l'accès aux données. Le volume de méthane produit est représenté graphiquement et l'évolution de sa production cumulée est suivie en temps réel pendant toute la période d'incubation (Figure 3, d). Les résultats expérimentaux sont au format tableur standard ce qui réduit les temps de manipulation des données.

Figure II. 4 : Soulèvement d'un clapet suite à l'accumulation d'un volume précis de méthane

Les bioréacteurs sont incubés à 37 °C jusqu'à ce que la production de biogaz cesse. Tous les tests ont été réalisés en *triplicata* et la valeur nette de production de méthane est obtenue en soustrayant la production endogène des bioréacteurs contenant l'inoculum seul. À la fin des essais, le pH est mesuré pour vérifier que l'arrêt de la production de méthane est dû à l'épuisement de la biomasse et non pas à l'acidification du milieu.

Le potentiel méthanogène a été calculé en divisant le volume de méthane produit par la quantité de DCO injectée ($Nm^3 \cdot kg\ DCO^{-1}$). La biodégradabilité (%) a été déterminée en divisant le potentiel méthanogène par le rendement théorique maximal en CH_4 qui est de $0{,}35 \cdot 10^{-3}\ Nm^3 \cdot kg\ DCO^{-1}$, dans des conditions normales de température et de pression (0 °C, 1013 hPa) (Buffière et al., 2008).

II.2.2. Calcul de normalisation du gaz

Les valeurs enregistrées dans le tableur généré par l'AMPTS-II sont normalisées aux conditions standards : température de 0 °C, pression de 1 atm et gaz sec. La normalisation a été effectuée en appliquant l'équation suivante $[Eq.3]$:

$$V_0 = f_{T,P} \times f_w \times V_{bulle} \qquad [Eq.3]$$

Où V_0 est le volume normalisé (NL), $f_{T,P}$ est le facteur considérant la température et la pression de gaz, f_w est le facteur permettant de retrancher la teneur en eau dans le gaz, et V_{bulle} (L) est le volume enregistré pour un soulèvement de clapet.

Pour décrire les caractéristiques physiques du gaz dans les gammes de température et de pression utilisées, le facteur considérant la température et la pression $f_{T,P}$ a été calculé en utilisant la loi des gaz parfaits selon l'équation [Eq. 4] :

$$f_{T,P} = \frac{T_0}{T_{gaz}} \times \frac{p_{gaz}}{p_0} = \frac{273{,}15}{t_{gaz} + 273{,}15} \times \frac{(p_{gaz} + 0{,}6)}{101{,}32} \qquad [Eq.4]$$

Où T_0 et p_0 sont la température standard (273,15 K ou 0 °C) et la pression standard (101,32 kPa ou 1 atm), T_{gaz}, t_{gaz}, et p_{gaz}, représentent les températures en K ou °C et la pression de gaz générée dans le bioréacteur en conditions ambiantes.

Ces valeurs obtenues par les capteurs internes de température et de pression de l'AMPTS II sont mises à jour après chaque soulèvement de clapet. La pression du gaz est la somme de la

pression mesurée (exprimée en kPa) et d'un facteur constant de 0,6 correspondant à la pression exercée par la colonne d'eau d'environ 6 cm située au-dessus des clapets.

L'équation d'Antoine a été utilisée pour calculer le facteur considérant la teneur en eau dans le gaz f_w. Elle permet une bonne approximation de la pression de vapeur autour la pression atmosphérique et dans l'intervalle de température de 0 à 100 °C. f_w est calculé selon l'équation [Eq. 5] :

$$f_w = 1 - \frac{p_{vap}}{p_{gaz}} = 1 - \frac{10^{8,1962 - \frac{1730,63}{233,426 + t_{gaz}}}}{10 \times (p_{gaz} + 0,6)} \qquad [Eq. 5]$$

Selon la loi des gaz parfaits, la pression de vapeur est supposée proportionnelle au volume de gaz. La fraction volumique d'eau est ainsi équivalente à la fraction de pression obtenue par le rapport de la pression de vapeur d'eau sur la pression totale. En conséquence, la fraction de gaz sec peut être calculée en éliminant la fraction d'eau du gaz humide.

En conclusion, la production de gaz est enregistrée et normalisée en continu par l'AMPTS II avec compensation de température et de pression en temps réel, selon l'équation [Eq. 6] :

$$V_{0,i} = \frac{273,15}{t_{gaz,i} + 273,15} \times \frac{(p_{gaz,i} + 0,6)}{101,32} \times \left(1 - \frac{10^{8,1962 - \frac{1730,63}{233,426 + t_{gaz,i}}}}{10 \times (p_{gaz,i} + 0,6)}\right) \times V_{bulle} \; [Eq. 6]$$

Le volume accumulé reporté par l'AMPTS II est calculé en additionnant le volume de gaz pour chaque soulèvement de clapet. Chaque volume ajouté est ajusté pour la pression, la température, et la vapeur d'eau selon l'équation [Eq. 7] :

$$V_{acc,i} = V_{acc,i-1} + \frac{273,15}{t_{gaz,i} + 273,15} \times \frac{(p_{gaz,i} + 0,6)}{101,32} \times \left(1 - \frac{10^{8,1962 - \frac{1730,63}{233,426 + t_{gaz,i}}}}{10 \times (p_{gaz,i} + 0,6)}\right) \times V_{bulle} \; [Eq. 7]$$

II.2.3. Inoculum et ratio substrat/inoculum

L'ajout d'un inoculum d'ensemencement, lors du démarrage de ces tests, met à disposition une biomasse microbienne active favorisant ainsi un état d'équilibre de l'ensemble du processus de digestion anaérobie. Une description détaillée de l'inoculum utilisé dans notre étude est fournie dans le paragraphe 1.1.2.

Théoriquement, le rapport inoculum / substrat n'affecte que la cinétique de production de méthane et non son rendement final, qui ne dépend que de la teneur en matière organique. Cependant, il a été largement rapporté qu'un ratio trop élevé d'inoculum / substrat pourrait empêcher l'induction enzymatique de la biodégradation, alors qu'un ratio trop faible pourrait être toxique pour les microorganismes (Liu et al., 2009 ; Neves et al., 2004).

Dans notre étude, l'inoculum et le substrat ont été ajoutés aux bouteilles selon un rapport (g DCO inoculum / g DCO substrat) de 3/1. En effet, dans une étude récente, il a été démontré que les conditions optimales pour obtenir un rendement maximal en méthane sont un fonctionnement à température de 37 °C et un rapport inoculum / substrat de 3/1 (Gyenge et al., 2014).

II.2.4. Modélisation cinétique de la production de méthane

Le test BMP peut être utilisé pour estimer la constante d'hydrolyse globale k_h. Dans notre étude, un modèle cinétique de premier ordre a été utilisé.

$$V_{CH_4}(t) = V_{CH_{4,max}} \times [1 - \exp(-k_h \times t)] \quad [Eq. 8]$$

Avec V_{CH_4} (t), le volume de méthane produit au cours du temps ($Nm^3\ kg{\cdot}DCO_{initiale}^{-1}$) ; $V_{CH_4,max}$, le volume maximal de méthane ($Nm^3\ kg{\cdot}DCO_{initiale}^{-1}$) et k_h, la constante d'hydrolyse (j^{-1}).

L'ajustement des paires de données expérimentales (V_{CH_4}, t) par régression non linéaire a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, Californie, États-Unis) qui permet le calcul de la constante cinétique apparente k et du coefficient de détermination R^2. De plus, afin de valider le modèle choisi, l'erreur de prédiction de la racine carrée moyenne (RMSPE) a été calculée comme indiqué par l'équation suivante [Eq. 9] (El-Mashad, 2013) :

$$RMSPE = \sqrt{\sum_{n=1}^{n} \frac{(V_e - V_m)^2}{n}} \quad [Eq. 9]$$

Avec V_e le volume de méthane prédit ; V_m, le volume expérimental mesuré et n, le nombre des mesures.

La valeur de RMSPE représente l'écart entre la production expérimentale de méthane et celle estimée. De plus, l'analyse de la variance de Kruskal-Wallis (ajustement du chi-carré) a été

réalisée pour évaluer les différences statistiques entre les courbes expérimentales et celles prédites ou modélisées.

II.3. Procédé de méthanisation en mode continu du marc de raisin

II.3.1. Digesteur CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) de 12 L

II.3.1.1. Description et principe de fonctionnement

Le pilote de méthanisation, représenté sur la figure 5, est un réacteur vertical tubulaire en verre de type parfaitement mélangé (CSTR, Continuous Stirred Tank Reactor) ayant un volume utile de 12,5 L. L'outil est automatisé grâce à un automate programmable de la société Perrax (Perrax, Union, France) qui permet la collecte des données concernant les conditions de fonctionnement, la modification du programme si nécessaire et la mise en marche automatique des pompes péristaltiques. La régulation de température à 37 °C est réalisée par une circulation d'eau chaude dans la double enveloppe du digesteur. Afin de maintenir un même volume de réaction et ainsi un temps de séjour stable, une masse précise du digestat a été drainée et la même masse de marc de raisin a été alimentée manuellement dans le réacteur via une vanne de prélèvement, à l'aide d'une seringue en plastique de 100 mL. Pour cela, une balance Mettler Toledo (Viroflay, France) permet la mesure en continue de la masse du digesteur. La production de biogaz a été enregistrée et surveillée quotidiennement à l'aide d'un compteur de gaz (Type MGC-1 PMMA, Ritter, Allemagne) ayant une plage de mesure comprise entre 1 mL et 1 L par heure. Un clapet anti-retour prévient les perturbations de la mesure du biogaz liées aux injections manuelles et aux extractions. La détermination de la teneur en méthane a été effectuée en utilisant une solution de NaOH 6M comme unité de fixation du CO_2, placée entre deux compteurs de gaz en série. De plus, un analyseur de gaz infra-rouge ADC LFG 20 (Scientific Equipment, Garches, France) a permis de quantifier les teneurs en CO_2, CH_4 et O_2 du biogaz présent dans l'espace libre du réacteur.

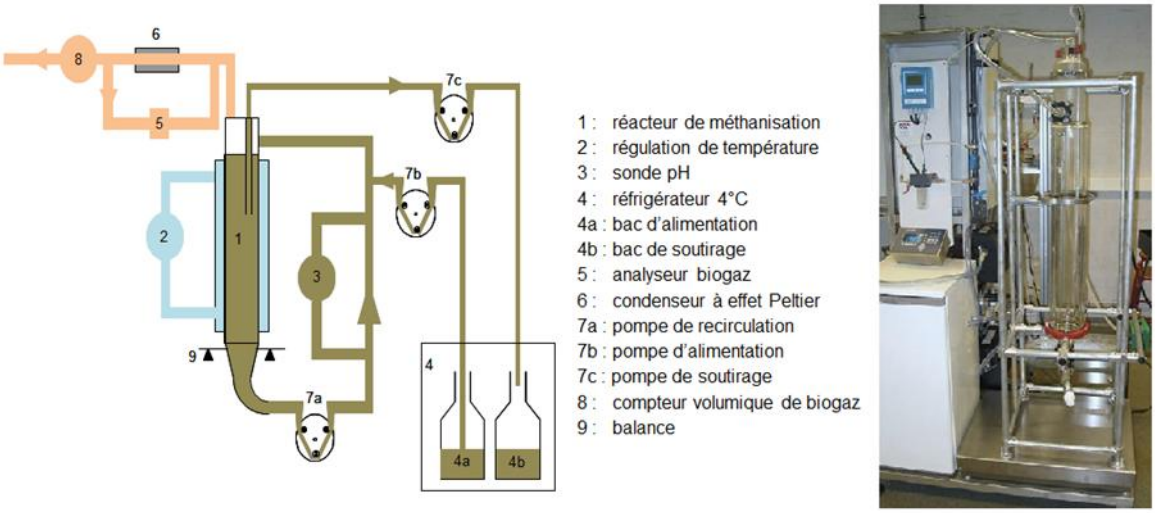

Figure II. 5 : Représentation schématique du montage expérimental (Guillaume et Lendormi, 2013)

II.3.1.2. Conditions expérimentales des études réalisées dans ce digesteur

II.3.1.2.1. Caractérisation de la production de méthane du marc de raisin à 37 °C

Le marc de raisin, cépage « Cabernet Franc » récolté au cours de la vendange 2013, a été utilisé dans ces expérimentations. En mode continu, le broyage est indispensable afin d'éviter le bouchage des tuyaux du pilote par les pépins et les matières fibreuses présentes dans le marc de raisin. Ce dernier a été broyé avec de l'eau résultant en une concentration finale de 0,25 $kg \cdot kg^{-1}$. La technique de broyage est similaire à celle décrite dans les paragraphes précédents.

Le digesteur a été opéré en conditions mésophiles, sous une température de 37 °C. Les opérations d'alimentation/soutirage ont été effectuées quotidiennement en appliquant un temps de séjour hydraulique (TSH) de 30 jours et une charge organique de 2,5 kg $DCO \cdot m^{-3} \cdot j^{-1}$.

Le choix du TSH dépend ordinairement de la nature du substrat et de sa difficulté à être digéré par les microorganismes. Compte tenu de la matrice complexe de notre matière première, le digesteur anaérobie doit ainsi avoir un temps de séjour suffisant. Sur la base de différentes études bibliographiques, le TSH de 30 jours s'est avéré le plus fréquemment utilisé durant la digestion anaérobie de nombreux déchets agro-industriels en mode continu (Kafle et Kim, 2013 ; Ruffino et al., 2015). C'est la raison pour laquelle un TSH de 30 jours a été choisi dans cette étude.

En outre, afin de maximiser la production de biogaz tout en maintenant la stabilité du milieu dans des digesteurs de type CSTR, il a été montré que la charge organique appliquée (COA) devait être comprise entre 0,25 et 3 kg DCO·m^{-3}·j^{-1} (Rajeshwari et al., 2000). Afin de respecter cette gamme, nous avons choisi de travailler avec une charge de 2,5 kg DCO·m^{-3}·j^{-1}.

Les taux d'alimentation et de soutirage dans les différents digesteurs sont reliés au temps de séjour appliqué et sont calculés selon l'équation suivante [Eq. 10] :

$$Taux\ d'alimentation = \frac{V_{digesteur}}{TSH} \qquad [Eq. 10]$$

Où le taux d'alimentation s'exprime en (L·j^{-1}), le volume utile du digesteur ($V_{digesteur}$) en L et le *TSH* en jours.

Pour maintenir un TSH stable de 30 jours tout au long de la digestion, 400 mL de digestat ont été alors évacués tous les jours et le même volume de marc de raisin a été introduit dans le digesteur par l'intermédiaire d'une vanne de prélèvement et à l'aide d'une seringue en plastique de 100 mL (prélèvement à 4 reprises). Un ratio massique de dilution du marc de raisin de 1/8 a été utilisé pour la préparation des intrants. Des échantillons homogènes ont été stockés à -20 °C jusqu'à utilisation.

II.3.1.2.2. Acclimatation du pilote à 25 °C

Après avoir atteint des conditions de stabilité dans le digesteur fonctionnant à 37 °C, sous un TSH de 30 jours et une COA de 2,5 kg DCO·m^{-3}·j^{-1}, des essais d'acclimatation à la température moyenne de la vallée de la Bekaa (25 °C) ont été réalisées afin d'adapter le système aux milieux libanais. L'idée étant de diminuer la consommation d'énergie liée au chauffage du digesteur. Pour cela, afin de mieux adapter le système au changement de température, celle-ci a été abaissée par des sauts de 3 °C, comme réalisé dans une étude précédente sur la digestion anaérobie des huiles de palmes (Choorit et Wisarnwan, 2007). Ainsi, les effets des températures de 34 °C, 31 °C, 28 °C et 25 °C sur la production de méthane et sur la stabilité du système ont été évalués. Deux à trois semaines ont été nécessaires pour achever chaque étape et enregistrer une stabilité dans la production de méthane et dans les paramètres physicochimiques.

II.3.2. Digesteurs de 2 L

II.3.2.1. Description et principe de fonctionnement

Ce système de mesure est constitué de trois unités principales (Figure 6). L'unité d'incubation (a) est un bain marie thermostaté (37 °C) qui contient des bioréacteurs de 2 L (Bioprocess Control, Lund, Suède). Chaque bioréacteur est équipé de deux tubulures obturables ; la première pour le soutirage du digestat et la seconde pour l'alimentation en substrat. Il est agité manuellement pour une minute, deux fois par jour, afin d'assurer un mélange suffisant. Le biogaz produit passe par un tube reliant l'unité d'incubation à l'unité de fixation du CO_2 (b). Cette dernière est constituée de bouteilles contenant une solution alcaline (80 mL de NaOH à 240 $g \cdot L^{-1}$) et de la thymolphthaléine comme indicateur de pH. Ainsi, Le volume de CH_4 libéré de cette unité est mesuré avec un compteur de gaz (Type MGC-1 PMMA, Ritter, Allemagne) ayant une bonne précision dans une plage de mesure de débit comprise entre 1 mL et 1 L par heure (c).

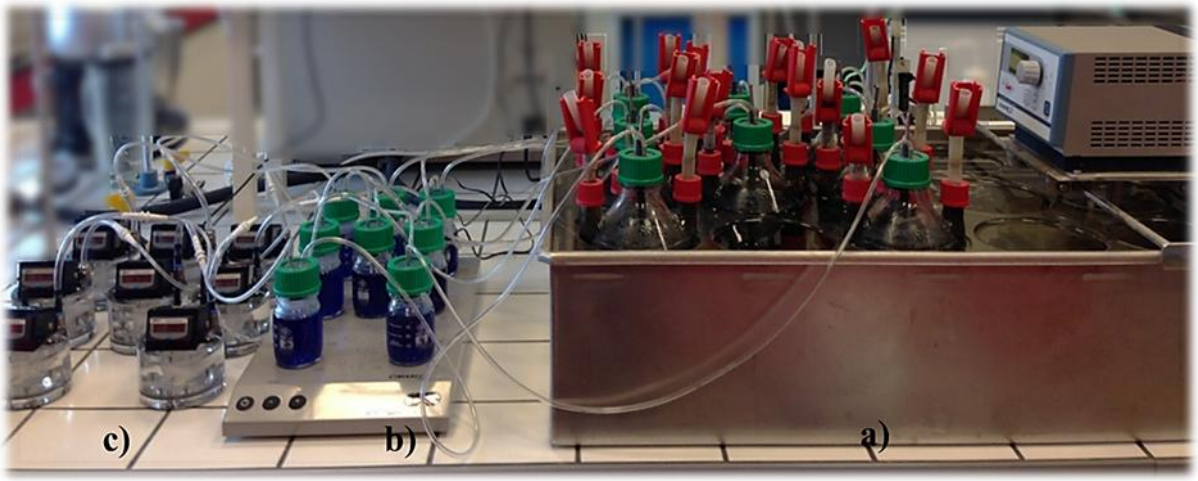

Figure II. 6 : Système des digesteurs en mode continu : unité d'incubation (a), unité de fixation du CO_2 (b) et unité de mesure du volume de CH_4 (c)

II.3.2.2. Conditions expérimentales des études réalisées dans ces digesteurs

II.3.2.2.1. Évaluation des effets du temps de séjour hydraulique (TSH) sur la productivité des réacteurs

Afin d'optimiser le processus de méthanisation du marc de raisin, les effets de la COA et du TSH ont été évalués. L'objectif étant de déterminer les conditions qui permettent à la fois d'assurer un taux de dégradation optimal de la matière première et une productivité optimale de méthane.

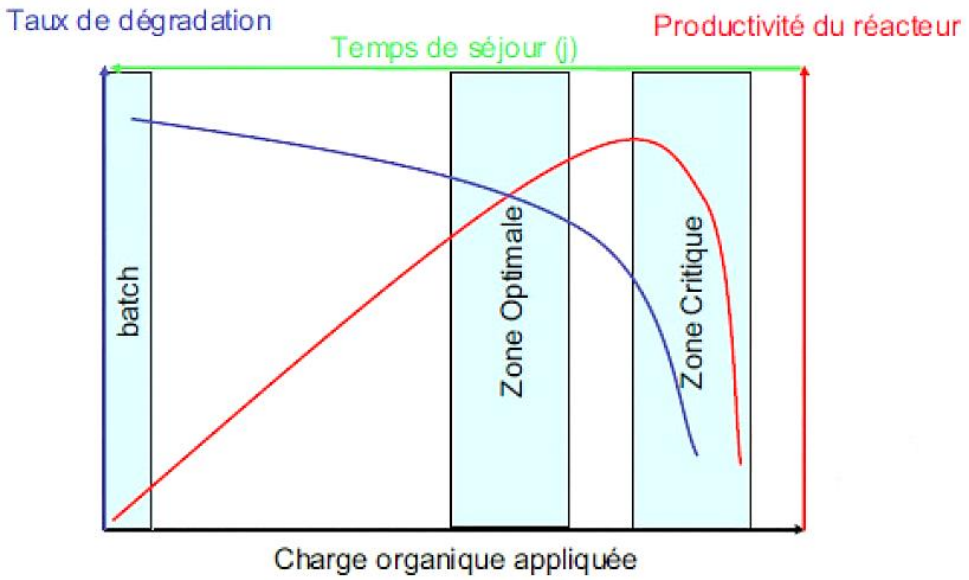

Figure II. 7 : Courbe théorique établissant la relation entre la charge organique appliquée, la productivité et le taux de dégradation lors de la digestion anaérobie d'un substrat donné (Guillaume et Lendormi, 2013)

Pour la préparation des intrants, du marc de raisin cépage « Chenin blanc » a été broyé avec de l'eau résultant en une concentration finale de 0,25 $kg \cdot kg^{-1}$. La technique de broyage est similaire à celle décrite précédemment. Il convient de noter que le même ratio de dilution du marc de raisin a été utilisé dans toutes les expérimentations en mode continu (ratio 1/8). Les opérations d'alimentation/soutirage ont été effectuées quotidiennement en appliquant différents TSH et ainsi différentes charges organiques. Les taux d'alimentation et de soutirage dans les différents digesteurs sont reliés au temps de séjour appliqué et sont calculés selon l'équation 10. Les conditions de fonctionnement sont rassemblées dans le tableau 2.

Le marc de raisin est composé d'une matrice complexe riche en fibres difficilement dégradables. Par conséquent, pour traiter un tel substrat lignocellulosique, une augmentation graduelle et lente de la charge organique appliquée (COA) doit être adoptée pour donner suffisamment de temps aux microorganismes pour s'y adapter (Aboudi et al., 2016). Dans cette étude, une montée en charge organique « douce » s'est effectuée selon une augmentation de 25% par rapport à la charge précédente. Cette stratégie est similaire à celle utilisée dans une étude précédente (Guillaume et Lendormi, 2015). Par la suite, une période d'une semaine consiste à la saisie réelle de la productivité de méthane dans les digesteurs qui doit être suffisamment stable (linéarité de la production cumulée de méthane au cours du temps) afin de continuer la montée en charge. Les digesteurs (1) et (2) ont été opérés sous un TSH de 30 jours, (3) et (4) sous un TSH de 20 jours, (5) et (6) sous un TSH de 15 jours et (7) et (8) sous un TSH

de 10 jours, ciblant des charges organiques finales de 2,5 kg DCO·m^{-3}·j^{-1}, 3,7 kg DCO·m^{-3}·j^{-1}, 5,7 kg DCO·m^{-3}·j^{-1} et 7,3 kg DCO·m^{-3}·j^{-1}, respectivement.

Afin d'aboutir à des conditions stables, en termes de taux de dégradation du marc de raisin et de productivité des digesteurs, il est nécessaire de considérer, à la charge finale, une durée de fonctionnement égale à 3 fois le temps de séjour (Aboudi et al., 2015 ; Murto et al., 2004). Le taux de dégradation en anaérobie (%) a été calculé en divisant le volume expérimental de méthane produit par le volume théorique, étant donné qu'un kg de DCO produit 0,35.10^{-3} Nm^{3} de méthane.

Tableau II. 2 : Paramètres de fonctionnement des digesteurs anaérobies.

Digesteurs	**Période**	**Ratio de dilution massique du marc de raisin**	**TSH (Jours)**	**Débit d'alimentation (L·j^{-1})**	**COA (Kg DCO·m^{-3}·j^{-1})**
1 et 2	I	1/8	30	0,07	1,5
	II				1,9
	III				2,3
	IV				2,9
	V				2,5
3 et 4	I	1/8	20	0,10	1,5
	II				1,9
	III				2,3
	IV				2,9
	V				3,7
5 et 6	I	1/8	15	0,13	1,5
	II				1,9
	III				2,3
	IV				2,9
	V				3,7
	VI				4,7
	VII				5,7
7 et 8	I	1/8	10	0,20	1,5
	II				1,9
	III				2,3
	IV				2,9
	V				3,7
	VI				4,7
	VII				5,7
	VIII				7,3

II.3.2.2.2. Évaluation des effets du traitement alcalin sur la production de méthane en continu

Afin d'évaluer l'effet du traitement alcalin sur la digestion anaérobie du marc de raisin en mode continu, quatre digesteurs ont été opérés sous une température de 37 °C en appliquant un TSH de 20 jours et une COA de 3,7 kg DCO·m^{-3}·j^{-1}. Deux premiers digesteurs ont été alimentés avec du marc non traité et deux autres avec du marc traité avec 10% NaOH m/m MS_{marc}. Les conditions expérimentales du traitement alcalin seront détaillées dans le paragraphe 4.2.1. Suite à ce traitement, et comme dans toutes les expérimentations en continu, le marc de raisin a été broyé et les échantillons préparés ont été conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

II.3.3. Méthodes analytiques de suivi des digesteurs

II.3.3.1. Détermination du Titre Alcalimétrique Complet (TAC) et de l'Acidité Volatile Totale (AVT)

Le TAC correspond à la teneur en carbonates et hydrogénocarbonates dans un échantillon liquide. Il est synonyme d'alcalinité et permet de jauger le pouvoir tampon du milieu de digestion. Par rapport à l'AVT, il représente l'ensemble des acides gras volatils comprenant moins de 6 carbones et d'autres acides volatils dissous. De ce fait, dans un digesteur anaérobie, l'augmentation de l'AVT peut être agrégée à celle des acides gras volatils.

Pour effectuer ces 2 analyses, on commence par prélever 25 mL de boues des digesteurs en fonctionnement. Puis, on les centrifuge à 8000 tr·min^{-1} pendant 5 minutes. Le liquide surnageant est ensuite recueilli dans un bécher de 400 mL. Le culot est suspendu avec 50 mL d'eau distillée en prenant soin de ne rien perdre de la partie solide. On centrifuge à nouveau à 8000 tr·min^{-1} pendant 5 minutes et on recueille aussi le surnageant. Ces étapes de lavages sont répétées au moins trois fois. Ainsi, le liquide recueilli contient particulièrement les bicarbonates et les acides volatils solubles.

Pour mesurer le TAC (en g de $CaCO_3$·L^{-1}), on met sous agitation le liquide récupéré dans le bécher. Ensuite, on plonge les électrodes d'un pH-mètre dans le liquide et on note le pH initial. A l'aide d'une burette au 1/25 mL, on verse de l'acide chlorhydrique HCl 0,1 N jusqu'à pH = 4. V_1 correspond au volume d'acide chlorhydrique versé jusqu'à l'obtention de pH = 4.

Ainsi, on obtient cette équation [Eq. 11] :

$$TAC = V_1 \times 4 \times 0{,}05 \quad [Eq.\,11]$$

Pour la mesure de l'acidité volatile (en g de $CH_3COOH \cdot L^{-1}$), on poursuit l'ajout d'acide chlorhydrique HCl 0,1 N jusqu'à pH = 3,5. Puis, on fait bouillir le liquide pendant 3 minutes précisément et on laisse refroidir jusqu'à température ambiante. On plonge ensuite les électrodes du pH-mètre dans le liquide refroidi et on ajoute à la burette une solution de NaOH 0,1 N jusqu'à pH = 4 sous agitation ; V_2 correspond au volume de NaOH versé. On poursuit ensuite l'addition de NaOH jusqu'à pH = 7 ; V_3 correspond au volume versé jusqu'à pH = 7.

On obtient alors l'équation suivante [Eq. 12] :

$$Acidité\ volatile = (V_3 - V_2) \times 4 \times 0{,}06 \qquad [Eq. 12]$$

II.3.3.2. Évaluation de la biodégradabilité des fractions lignocellulosiques

Après une période égale à trois fois le temps de séjour, un volume de 0,2 L a été prélevé dans chaque digesteur puis séché à 105 °C. Le fractionnement de Van-Soest a été réalisé sur les résidus secs pour évaluer la biodégradabilité des fibres lignocellulosiques et comparer les rendements de réduction en hémicellulose, cellulose et lignine, en fonction des différents temps de séjours.

II.4. Prétraitements du marc de raisin

Dans cette section, il convient de noter que tous les prétraitements ont été appliqués à un même cépage de marc de raisin : le Chenin blanc. En effet, en raison de la période de vendange tardive en France en 2015, il était le seul marc de raisin industriel disponible à la date des expériences. Les effets de ces prétraitements sur la biodégradabilité des fibres lignocellulosiques ont été évalués par le fractionnement de Van-Soest. Les effets respectifs sur la production de méthane ont été réalisés déterminés grâce au test de mesure du potentiel bio-méthanogène (BMP).

II.4.1. Prétraitements physiques

II.4.1.1. Congélation

Une technique de congélation / décongélation a été utilisée comme traitement en amont de la digestion anaérobie du marc de raisin. Un premier ensemble de marc a été congelé à -20 °C et le second à -80 °C, pendant 48 heures. Ensuite, les échantillons ont été décongelés pendant 24 h à 6 °C.

II.4.1.2. Traitement aux ultrasons

La désintégration par ultrasons a été réalisée à l'aide d'un bac à ultrasons (BPAC, Vern-Sur-Seiche, France) ayant une fréquence de 50 kHz et une puissance effective de 60 W. Le bain de sonication en acier inoxydable, a une capacité de 2 L, une longueur de 15 cm, une largeur 13,5 cm et une hauteur de 10 cm. Le marc de raisin est mis dans des bouteilles de 0,25 L, selon un ratio (masse $_{marc}$ / masse $_{liquide}$) de 1/10, correspondant à une charge en matières sèches proche de 50 $g \cdot L^{-1}$ (Monlau et al., 2013b). La sonication est effectuée par tranche de 5 minutes, avec un temps sans apport d'ultrasons de 5 minutes entre deux épisodes de sonication afin d'éviter l'augmentation de la température de plus de 5 °C.

Figure II. 8 : Bac à ultrasons

Pour évaluer le degré de désintégration, la DCO du surnageant a été suivie pendant le traitement. Le degré de désintégration (DD_{DCO}) est calculé comme étant le rapport entre l'augmentation de la DCO soluble due à la sonication et la DCO totale (Braguglia et al., 2008) selon cette équation [Eq. 13] :

$$Z = DD_{DCO} = \left[\frac{DCO_{sol,\,traité} - DCO_{sol,\,non\ traité}}{DCO_{sol,\,max} - DCO_{sol,\,non\ traité}}\right] \quad [Eq.13]$$

Où $DCO_{sol,\ traité}$, $DCO_{sol,\ non\ traité}$, représentent les DCO solubles, de l'échantillon traité et de celui non traité, respectivement et $DCO_{sol,\ max}$ représente celle de l'échantillon complètement désintégré par les ultrasons.

A partir de cette équation, deux niveaux différents de désintégration ont été déterminés. $Z_{0.5}$ correspond à la demi-désintégration du marc de raisin en appliquant une durée de traitement de 40 min. Z_1 correspond à une désintégration maximale avec une durée de traitement de 70 min.

L'énergie W_{US} (kJ·kg^{-1}) consommée par les ultrasons est calculée comme suit [Eq. 14] :

$$W_{US} = \frac{P_{US} \times t_{US}}{m} \quad [Eq. 14]$$

Où P_{US} est la puissance du générateur (égale à 0.06 kJ·s^{-1}), m est la masse du mélange (marc de raisin + eau) (kg) et t_{US} est le temps d'application des ultrasons (s).

II.4.1.3. Traitement CEP

Le traitement par les CEP a été réalisé en utilisant le système présenté dans la figure 6 comprenant :

- Une alimentation haute tension continue (2,5 kV, 0,24 A) (SR2.5-P-600, TECHNIX, France) (Fig. 9 a).
- Un générateur d'impulsion (TGP110, Tti, Royaume-Uni) qui sert à ajuster la durée d'impulsion t_i (10^{-5} - 10^{-4} s) et la fréquence (24 - 240 Hz) (Fig. 9 c). Il est relié à un oscilloscope (OX 8022-20MHz différentiel, Metcix, France) (Fig. 9 b).
- Un modulateur de tension (AHTPM2.5, Effitech, France) (Fig. 9 d).
- Une boite de mise à la terre (Fig. 9 e).
- Une chambre de traitement (Fig. 9 f).
- Un impédance-mètre (U1733C, Agilent Technologies, États-Unis) (Fig. 9 g).

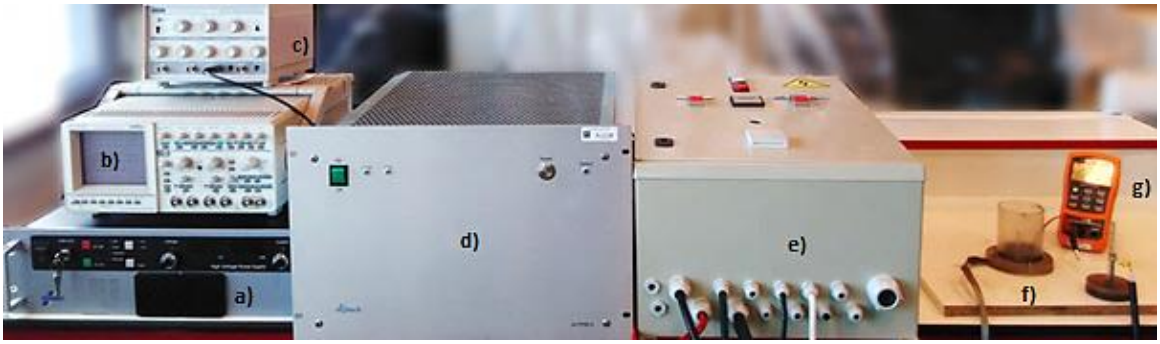

Figure II. 9 : Système de traitement CEP, générateur haute tension (a), oscilloscope (b), générateur d'impulsions (c), modulateur (d), boite de mise à la terre (e), chambre de traitement (f) et impédance-mètre (g)

La chambre de traitement est une cellule cylindrique en plexiglass contenant deux électrodes en acier inoxydable. Une première électrode mobile est reliée à la borne positive du modulateur de tension, et la seconde qui est fixée au fond de la cellule est reliée avec la boite de mise à la terre. Le diamètre des électrodes et de la cellule est de 6,5 cm et la hauteur de la cellule est de 7 cm.

L'indice de désintégration (Z) au cours du traitement a été calculé par l'équation suivante [Eq. 15] (Lebovka et al., 2002) :

$$Z = \frac{\sigma_m - \sigma_i}{\sigma_d - \sigma_i} \quad [Eq. 15]$$

Où σ est la conductivité électrique (S m^{-1}), σ_m est la conductivité électrique mesurée au cours du traitement CEP ; σ_i est la conductivité électrique initiale ; σ_d la conductivité électrique d'un échantillon totalement désintégré. σ_d est obtenu après trois cycles de congélation/décongélation d'un échantillon frais suivis d'un traitement microondes à 800 W pendant 2 minutes (Microwave ME82V – 800 W / 2450 MHz, Samsung, Malaisie). Ainsi, Z = 0 correspond à un produit intact et Z = 1 correspond à un produit totalement désintégré. En se référant à cette équation, trois niveaux de traitement du CEP ont été déterminés pour le marc de raisin : Z_0, $Z_{0,5}$ et Z_1.

Une intensité de champs électriques pulsés de 3600 V cm^{-1} a été utilisée. Des trains monopolaires rectangulaires (n = 240 impulsions) avec une durée d'impulsion de $50 \cdot 10^{-6}$ s (t_i) ont été appliqués et le nombre de trains (N) était de 9 pour $Z_{0,5}$ et de 14 pour Z_1.

Pour négliger les effets thermiques, l'élévation de la température a été maintenue en dessous de 5 °C en ajustant un temps de pause Δt (5 min) entre les séries.

La consommation énergétique du traitement CEP (W_{CEP}) peut être représentée par la somme des énergies injectées par chaque train d'impulsion.

W_{CEP} est exprimée en kJ·kg^{-1} de matière brute [Eq. 16] :

$$W_{CEP} = \sum_1^N \frac{U \cdot I_{moyenne} \cdot t_{train}}{m} \quad [Eq. 16]$$

Où U est la tension appliquée (V), $I_{moyenne}$ est le courant moyen (A), t_{train} est le temps d'un train (s) et m est la masse de l'échantillon dans la chambre de traitement (g).

II.4.2. Prétraitements chimiques

II.4.2.1. Traitement avec de la soude, de l'ammoniaque et de l'acide chlorhydrique

Les effets des traitements chimiques sur la production de méthane du marc de raisin ont été évalués en utilisant NaOH, NH_3 et HCl séparément. Les conditions des prétraitements ont été déterminées sur la base de quelques études bibliographiques évaluant leurs effets sur la

production de méthane de certains substrats lignocellulosiques (Monlau et al., 2012a, 2013b ; Sambusiti et al., 2012). Ces prétraitements ont été effectués dans des bouteilles de 250 mL, fermées par des septums en caoutchouc, dans lesquelles les échantillons de marc de raisin ont été introduits selon un ratio (masse $_{marc}$ / masse $_{liquide}$) de 1/10, homologue à une charge en matières sèches proche de 50 $g \cdot L^{-1}$.

Trois concentrations croissantes de NaOH, NH_3 et HCl de 0%, 6% et 10% m/m MS_{marc} ont été testées indépendamment. Les échantillons de marc de raisin frais ont été trempés dans les différentes solutions chimiques, à température ambiante (20 ± 1 °C) et pendant 24 heures (Figure 10). Pour assurer un mélange suffisant, les bouteilles ont été continuellement agitées à 150 $tr \cdot min^{-1}$ en utilisant un agitateur orbital (IKA KS 260 basique, Labtek, Staufen, Allemagne). A la fin des traitements et avant le test BMP, les échantillons ont été neutralisés avec des solutions concentrées d'HCl ou de NaOH de 3M jusqu'à pH = 7,5.

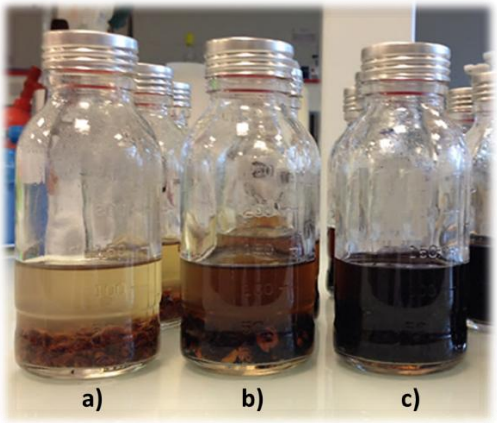

Figure II. 10 : Bouteilles contenant du marc de raisin avec des solutions à différentes concentrations en NaOH, après 24h de traitement. NaOH 0% (a), NaOH 6% (b) et NaOH 10% (c)

II.5. Analyses statistiques des données

II.5.1. Coefficient de corrélations linéaires

La corrélation mesure la relation entre deux variables. Le coefficient de corrélation le plus connu est celui de Pearson, également appelé coefficient de corrélation linéaire. Dans ce travail, il a été déterminé à l'aide du logiciel SPSS (logiciel SPSS, V20, SPSS Inc., Chicago, États-Unis).

II.5.2. Analyse en Composantes Principales (ACP)

La manipulation d'un grand nombre de variables sollicite l'utilisation d'un outil statistique

pour faciliter leur comparaison. L'Analyse en Composante Principale (ACP) est une méthode qui réduit l'espace géométrique utilisé pour visualiser les données, en utilisant une combinaison linéaire des variables qui maximise la variance. Elle est basée sur le principe de dualité. Plutôt que d'utiliser toutes les variables individuellement, des axes ou composantes qui groupent plusieurs de ces variables initiales sont ainsi créés.

Cette méthode permet donc de visualiser la typologie des échantillons et d'éviter la redondance des variables en considérant l'étude dans l'espace réduit des axes décorrélés. Elle transforme un grand nombre de variables corrélées en un nouveau jeu de variables non corrélées appelées Composantes Principales (PC) qui pourraient expliquer la majeure partie de la variation des données. Le travail d'analyse n'est plus effectué sur les individus et variables, mais sur les composantes et axes principaux. Le critère le plus connu pour la sélection des composantes principales est la valeur propre ou « Eigen value », qui consiste à garder les composantes ayant des valeurs supérieures à 1.

Dans ce travail, cette analyse a été menée pour étudier les relations possibles entre les paramètres physico-biochimiques étudiés et la variabilité de la production de méthane des différents marcs de raisins. La projection des variables sur les plans factoriels permet de visualiser ceux ayant la plus grande influence sur la distribution des échantillons. Plus la distance de l'origine est grande, plus l'influence est significative. En outre, les variables adjacentes sont positivement corrélées et celles en sens opposés sont négativement corrélées. La projection des échantillons sur les plans factoriels montre comment ils sont situés les uns par rapport aux autres, en fonction de la typologie des variables. En d'autres termes, en comparant les deux projections, les échantillons sont souvent corrélés avec des variables situées dans la même partie. Ce test a été effectué à l'aide du logiciel SPSS (logiciel SPSS, V20, SPSS Inc., Chicago, États-Unis).

Chapitre III

Méthanisation de marc de raisin : caractérisation biochimique des fractions et production de méthane dans des digesteurs discontinus et continus

III. Chapitre III : Méthanisation de marc de raisin : caractérisation biochimique des fractions et production de méthane dans des digesteurs discontinus et continus

L'article « Anaerobic digestion of grape pomace : biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters » a été publié dans le journal « Waste Management » en 2016, vol. 63, pp. 275-282. Il porte sur la caractérisation préliminaire de la méthanisation de marc de raisin en mode batch et continu.

III.1. Avant-propos

Les méthodes actuelles de valorisation du marc de raisin semblent être limitées et ne peuvent absorber qu'une faible proportion des déchets générés. Le présent article offre alors une alternative innovante en proposant une éventuelle possibilité de valorisation énergétique du marc de raisin par digestion anaérobie.

En premier lieu, nous avons procédé à la caractérisation de marc de raisin industriel issu de cépage Cabernet franc, vendange 2013, en provenance de la région de Layon en France. Des analyses physico-chimiques variées ont permis de déterminer le taux de matières sèches, de matières volatiles, la demande chimique en oxygène (DCO) ainsi que les proportions de polysaccharides structuraux (méthode de Van-Soest). Pour l'étude de la biodégradabilité « anaérobie » et la production maximale de méthane, des cinétiques de dégradation ont été évaluées en mode batch en utilisant l'AMPTS-II (Automatic Methane Potential Test System) pour le marc entier, les pulpes et les pépins, séparément. L'effet de broyage des substrats a également été considéré car, en mode continu, ce dernier est indispensable afin d'éviter l'obstruction des tuyaux du pilote par les grandes particules, en particulier les pépins.

En mode batch et pour tous les échantillons, la production de méthane augmente et tend vers un plateau qui apparaît environ 10 à 12 jours après le début des essais. A la fin des expérimentations, les productions cumulées de méthane des substrats sont de 0,125 ± 0,012, 0,170 ± 0,005, 0,165 ± 0,004, 0,182 ± 0,002, 0,052 ± 0,002 et 0,129 ± 0,001 Nm^3 CH_4 kg DCO^{-1} pour le marc entier, le marc entier broyé, les pulpes, les pulpes broyées, les pépins et les pépins broyés, respectivement. Ces résultats mettent en évidence l'absence d'effets synergiques entre les substrats et soulignent l'effet positif du broyage dans l'intensification de la production de méthane.

En effet, le broyage augmente la biodégradabilité anaérobie du marc entier, des pulpes et des

pépins de 13,1%, 4,8% et 22,2%, respectivement. L'enveloppe externe des pépins assez dure et épaisse, protège l'embryon des blessures mécaniques et bloque ainsi l'accessibilité des enzymes aux endospermes, assez riches en matières hydrocarbonées. Le broyage permet donc la rupture de cette enveloppe tout en libérant les composants cellulaires facilement biodégradables qui seront ainsi convertis en méthane ; d'où la grande augmentation de la production de gaz.

Les résultats obtenus fournissent des détails intéressants sur la production de méthane à partir de notre biomasse. Une étude aussi détaillée n'est pas retrouvée dans la littérature mais plutôt, des essais en batch accomplis sur du marc entier et sur des pépins en provenance de l'Italie (cépage non mentionné) où les résultats révèlent des productions de méthane proches aux nôtres.

Pour un meilleur transfert technologique et afin de valider ces résultats à l'échelle pilote, le potentiel méthane du marc entier a été déterminé en mode continu dans un réacteur de 12 L parfaitement mélangé (CSTR), avec une charge organique appliquée de 2,5 kg DCO m^{-3} j^{-1} et un temps de séjour de 30 jours. Le digesteur a fonctionné plus que 3 fois la durée du temps de séjour moyen soit 105 jours, sous température de 37 °C, afin de marquer une stabilité dans les paramètres physico-chimiques et la production de gaz.

Le pH moyen du milieu a diminué de 7,4 à 7,0 sans ajustement, tout au long de l'expérimentation. L'alcalinité (TAC) a diminué de 14,8 g eq. $CaCO_3$ L^{-1} au début jusqu'à 4,6 g eq. $CaCO_3$ L^{-1} à la fin des expérimentations, et l'acidité Volatile Totale (AVT) s'est stabilisée à une valeur de 0,91 g eq. CH_3COOH L^{-1}, soulignant ainsi le bon déroulement du procédé de digestion anaérobie. En outre, un autre critère permettant de confirmer la stabilité des bioréacteurs anaérobies est le rapport AVT/TAC qui doit être inférieur à 0,4. Dans notre cas, ce ratio n'a pas dépassé la valeur de 0,2, ce qui témoigne de la stabilité du procédé. Finalement, la production de biogaz s'est stabilisée à 6,43 ± 0,09 NL j^{-1} avec une teneur en méthane de 62,3 ± 0,6 %.

Il convient de noter que le potentiel méthane obtenu en continu comparé à celui issu du mode batch, a montré un rendement du pilote de 81%. Globalement, sur des digesteurs anaérobies en fonctionnement avec des cultures végétales, il est possible d'atteindre un optimum de 70-90 % du potentiel méthane en batch. Par conséquent, nous avons réussi à mettre en place un modèle de grande efficacité.

Enfin, les quantités énormes de marc de raisin issues du secteur viti-vinicole et leur richesse en molécules bioactives marquent cette biomasse végétale comme source d'énergie

verte alternative. Dans l'ensemble, les résultats obtenus démontrent clairement le succès de l'approche proposée pour une gestion écologique appropriée et une valorisation énergétique du marc de raisin.

III.2. Full paper: "Anaerobic digestion of grape pomace: biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters"

Anaerobic digestion of grape pomace: biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters

Jean H. El Achkar[1,2], Thomas Lendormi[1], Zeina Hobaika[2], Dominique Salameh[2], Nicolas Louka[2], Richard G. Maroun[2], Jean-Louis Lanoisellé[1]

(1) Univ. Bretagne Sud, FRE CNRS 3744, IRDL, F-56300 Pontivy, France

(2) Centre d'Analyses et de Recherches, Unité de recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, Beyrouth, Liban

Abstract

In this study, we have estimated the biogas and methane production from grape pomace (variety Cabernet Franc). The physical and chemical characteristics of the raw material were determined, and the structural polysaccharides were identified and analyzed by the Van-Soest method. Batch anaerobic digestions were carried out to assess the methane production of the grape pomace, pulp and seeds. The obtained cumulative methane productions are 0.125, 0.165 and 0.052 $Nm^3 \cdot kg\ COD^{-1}$ for grape pomace, pulps and seeds, respectively. The effect of grinding on the methane potential of the substrates, as a mechanical pretreatment, was evaluated. We found that it increased the anaerobic biodegradability for grape pomace, pulp and seeds by 13.1%, 4.8% and 22.2%, respectively. On the other hand, the methane potential of the grape pomace was determined in a laboratory pilot plant (12 L) continuously mixed with an organic loading rate of 2.5 $kg\ COD \cdot m^3 \cdot d^{-1}$ and a hydraulic retention time of 30 days. The corresponding biogas production was 6.43 10^{-3} $Nm^3 \cdot d^{-1}$, with a methane content of 62.3%. Thus, the pilot plant's efficiency compared to that achieved in the batch process was 81.2%. Finally, a significant correlation was found between the biochemical content and methane production.

Keywords

Anaerobic digestion, by-product valorization, grape pomace, biogas, biodegradability, batch to continuous reactor.

Highlights

* Methane potential of grape pomace, pulp and seeds, variety Cabernet Franc, was assessed in batch mode.

* Grinding increases the anaerobic biodegradability of the GP, pulp, and seeds by 13.1%, 4.8%, and 22.2%, respectively.

* Scale-up to pilot test succeeded, with a methane yield of 81% comparing to the batch mode.

* Van-Soest fractionation demonstrates that a correlation exists between polysaccharide composition of the fractions and methane production.

1. Introduction

The significant growth in energy needs has not been adequately followed by renewable energy source development (Rühl et al., 2012). Changing society's dependence on petroleum-based sources to one on renewable biomass-based resources is considered a crucial element for developing a sustainable industrial society and for the effective management of greenhouse gas emissions (Clark et al., 2012).

Anaerobic digestion (AD) is a promising and potent approach for the sustainable valorization of biomass resources in a future biobased economy. It is divided into four phases, hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis (Noykova et al., 2002), which transform the organic matter into mainly a mixture of methane and carbon dioxide called biogas.

The AD of organic waste provides a variety of environmental and public health benefits including the production of a renewable energy platform, greenhouse gas abatement, the possibility of nutrient recycling, reduction of waste volume and odor reduction (Pham et al., 2015). It was reported that 1 m^3 of biogas from AD is equivalent to 21 MJ of energy, and it could generate 2 kWh of electricity (Murphy et al., 2004).

The organic fractions of agricultural waste and residues are considered promising renewable energy resources, and their potential can be exploited through an AD process. As French and Lebanese research groups, we have chosen as a starting point to focus on the by-products of

winemaking, especially grape pomace (GP), which is the solid residue that remains after the processing of grapes into wine. GP contains skin, pulps and seeds. The grape (*Vitis vinifera*) is one of the most cultivated fruit crops worldwide; in 2012, the world grape production totaled 69.1 million metric tons (Castellucci, 2013). This biomass is available in many countries (as of 2014, 46 states are members of the International Organization of Vine and Wine), and its valorization is a global issue. For example, in France, the annual production of GP is currently approximately 700,000 tons, and its collection is organized for transport from the vineyards to the distilleries. However, these distilleries are energy-intensive. Thus, the electricity and heat produced during the AD of biomass have a direct benefit in highly reducing the dependence on energy imports. The AD of this waste also allows the stabilization of organic matter and the reduction of water content. In Lebanon, the GP annual production is estimated to be 1600 tons. This may seem relatively low, but it should be noted that this amount is mainly located in the Bekaa Valley, which facilitates the transport of the sources of biomass to a centralized biogas plant.

Through the decades, the utilization of GP for alternative uses has been minimal, with large portions discarded in landfills. Currently, GP is composted as fertilizer (Ferrer et al., 2001), processed into animal feed (Alipour and Rouzbehan, 2007) or extracted for grape seed oil and polyphenols (Ruberto et al., 2007). However, these applications have limited markets and can absorb only a small portion of the waste generated. As a result, alternative uses are needed to add value to GP (Dwyer et al., 2014); accordingly, its conversion into methane by AD is a promising possibility.

Few studies have been carried out on the AD of grape pomace. In 2010, the biogas potential of some Italian GP was evaluated. Experimental results highlighted their significant energetic potential (Dinuccio et al., 2010). In 2012, research was conducted to develop a thermodynamic equilibrium model of grape pomace anaerobic digestion for predicting the potential production of biogas and its composition. Simulation results showed that it is possible to obtain 94 kWh per ton of GP, covering up to 45% of the energy requirements for the wine-making process (Cáceres et al., 2012). The French Institute of Vine and Wine (IFV) organized a national experimental study from 2010 to 2013 on the reinstatement of these by-products, including the anaerobic digestion of GP. The results showed variability in methane potential depending on many factors such as color, origin and storage method of the grapes (Lempereur, 2014).

Given the aforementioned considerations, this paper focuses on an innovative experimental study carried out to assess and evaluate the methane production by anaerobic digestion for the

GP of the Cabernet Franc variety (whole pomace, pulp and seeds). The main objectives were (1) to evaluate the "anaerobic" biodegradability and the maximum methane production of the fractions in batch mode (2) to investigate the effect of the mechanical pretreatment on the GP biodegradability (3) to understand the correlation between methane yield and main biochemical fractions identified by the Van-Soest method , and (4) to determine the biogas and methane production of the whole grape pomace in a scaled-up process using a continuously stirred tank reactor, CSTR. The data obtained are useful to conduct an industrial technical evaluation of the digester.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The grape pomace variety Cabernet Franc was obtained from a winery located in Layon area, France. The grapes were carefully harvested at maturity during the 2013 vintage and the samples were collected immediately after the pressing operation. On arrival, the raw material was stored at –20 °C until utilization. It was ground using a blender (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, USA) to avoid clogging the pilot pipes with fibrous materiel in grape pomace. An active inoculum was collected from a local agricultural digester operating under mesophilic conditions. The particulate matter (> 1 mm) was removed from the inoculum by passing through sieve. The latter was subjected to a starvation period of 6 days before the start of the experiments, in order to facilitate the evaluation of the biodegradation of the substrate under study. A representative sample of the inoculum was collected and analyzed for total solids (TS), volatile solids (VS) and pH.

2.2. Analysis

Total Solids (TS) content were determined by dry weight in oven with forced air circulation at 105 °C until constant weight. Afterwards, Volatile Solids (VS) were determined in a muffle furnace after 4 h at 550 °C and then cooled in a desiccator and weighed. Total Chemical Oxygen Demand (COD) was measured using Merck COD Spectroquant® test, range 500-10,000 $mg \cdot L^{-1}$, and by a spectrophotometer NOVA 60 (Merck, Germany). One mL was introduced into the COD cell which is tightly attached to the screw cap and then put into the thermoreactor and heated for 2 hours at 150°C. it is assumed that all organic matter is oxidized with the hot sulfuric solution of potassium dichromate and with silver sulfate as the catalyst. The method is analogous to NFT 90-101. Total nitrogen (N) and total phosphorus (P) were performed using

Spectroquant® tests, range 1.0-150 mg N/L and 0.5-25 mg P/L respectively. These methods are analogous to EN ISO 11905-1, DIN 38405-9 and EN ISO 6878.

2.3. Van-Soest fractionation

The characterization of structural polysaccharides and lignin was carried out by the method of Van Soest, which presents the best compromise between the data obtained on the nature of the structural polysaccharides constituting the lignocellulosic biomass and the time of analysis required to obtain this information (Godin et al., 2011). The method of Van-Soest (Mertens, 2002; Soest et al., 1985; Van Soest et al., 1991) can extract nonstructural carbohydrates, pectins, mucilage, soluble tannins to neutral pH, lipids, soluble proteins to neutral detergent and some ash with a neutral detergent solution in excess, acting on the sample for 1 h at 100 °C. This neutral detergent solution is composed of Na_2HPO_4, sodium tetraborate, α-amylase, sodium EDTA, sodium lauryl sulfate and sodium sulfite. These products were provided by Merck (Germany). The extracted fraction is separated from the insoluble neutral detergent fibers (NDF) by filtration. Following the action of the neutral detergent, an excess of acid detergent solution (cetyltrimethylammonium bromide 2%, H_2SO_4 1 N) acting for 1 hour at 100 °C can extract hemicellulose. The extracted fraction is separated from the insoluble acid detergent fiber (ADF) by filtration. Cellulose is extracted by treating the ADF fraction with 72% H_2SO_4 for 3h at ambient temperature. The filtration residue, named ADL, corresponds to the lignin associated with the inorganic material. Hemicelluloses and celluloses were calculated as the differences between NDF and ADF and between ADF and ADL, respectively. The lignin content is equal to the ADL less the ash contained in the ADL (after calcination at 550 °C). Chemical compounds that are not cellulose or hemicellulose, lignin, or ash are called "soluble compounds". For each substrate, four to six samples were analyzed.

The Pearson correlation “r” was determined to evaluate the relationships between methane production and the main chemical parameters of the tested biomasses using SPSS software.

2.4. Mechanical pretreatment and particle size analysis

Grape pomace was grinded by means of a blender (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, USA) in a total volume of 0.8 L for 10 minutes and with a speed of 22,000 rpm. It should be noted that every minute of grinding was followed by a minute of pause in order to avoid the increase of the temperature in the solution. The particle size distribution was determined after grinding the GP to reach a concentration of 250 g TS/L in water. Samples were

diluted and dispersed in a stirred cell before being analyzed. Particle size was determined by laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). The particle size distribution is calculated as volume based in terms of equivalent spheres (range 0.02 – 2000 µm).

2.5. Automatic Methane Potential Test System (AMPTS)

The specific CH_4 yield of each substrate was determined using an Automatic Methane Potential Test System (AMPTS, Bioprocess Control, Sweden). AMPTS was developed for the automatic real-time measurement of the methane production during anaerobic digestion from any organic biomass. The system was designed so that 15 analyses can be carried out at one time. The system operation is described in this study (Badshah et al., 2012).

Grape pomace has been separately studied as the full grape pomace, pulp and seeds. Inoculum and substrate were added to 500 mL incubation bottles at a COD inoculum to substrate ratio of 3:1. Based on the chemical characteristics of substrates and inoculum mentioned in table 1, it should be noted that the 3 g inoculum / 1 g substrate ratio based on COD is not as far to the same ratio based on VS, with a maximum deviation of 17% for pulps, followed by a deviation of almost 5% for GP and seeds. In a recent study treating the anaerobic digestion of corn ethanol distillery, the optimal conditions for the maximal specific methane yield have been found at 37°C operating temperature, inoculum/substrate ratio of 3/1 and using an adapted inoculum to the substrates (Gyenge et al., 2014). Bottles were incubated at 37.5 °C until the biogas production ceased. All tests and blanks were carried out in triplicate, and the net values of methane production and yield were obtained by subtracting the endogenous production of the blank bottles. At the end of the test, the pH is measured to verify that the judgment of the biogas production is due to the depletion of the biodegradable COD and not the acidification of the medium due to an imbalance between the methanogenic and acidogenic populations.

The biochemical methane potential (BMP) was calculated from the volume of methane produced divided by the quantity of the sample based on COD introduced and expressed in Nm^3 $CH_4 \cdot kg\ COD_{added}^{-1}$.

The biodegradability was determined by dividing the methane specific production by the theoretical maximum methane yield of 0.35 10^{-3} Nm^3 $CH_4 \cdot kg\ COD^{-1}$ under standard conditions of temperature and pressure (0 °C, 1013 hPa) (Buffière et al., 2008):

Biodegradability (%) = (BMP / 0.35 10^{-3} Nm^3 $CH_4 \cdot kg\ COD^{-1}$) × 100

2.6. Kinetic study

The hydrolysis reaction of the macromolecules forming the particles is generally considered to be the reaction limiting the overall biological degradation process within the digester (Pavlostathis and Giraldo- Gomez, 1991). Thus, the methane potential test can be used to estimate the overall hydrolysis constant k. In descriptive terms, this reaction step is typically simplified and reduced to first-order kinetics (Eastman and Ferguson, 1981).

$$B = B_0 \times [1 - \exp(-k \cdot t)]$$

where B ($Nm^3\ CH_4 \cdot kg\ COD_{added}^{-1}$) is the cumulative methane yield, B_0 ($Nm^3\ CH_4 \cdot kg\ COD_{added}^{-1}$) is the maximum or ultimate methane yield of the substrate, k ($days^{-1}$) is the specific rate or apparent kinetic constant and t (days) is the time. The adjustment by non-linear regression of the pairs of experimental data (B, t) using GraphPad Prism® (San Diego, CA; USA) allows the calculation of the apparent kinetic constant k with 95% confidence limits obtained for each case studied, as well as B_0 and R^2.

It was reported that a non-linear regression model could be used as the modified Gompertz equation. However, the results showed that it is more applicable when a lag phase is present at the start (Lo et al., 2010), which is not the case here.

2.7. Anaerobic digestion reactor

The anaerobic digestion pilot is a completely mixed vertical tubular glass reactor (CSTR - continuous stirred tank reactor) with a working volume of 12.0 L. The pilot was operated under mesophilic conditions (37 °C), and temperature control was achieved by the circulation of hot water in the double jacket of the digester. Constant mixing in the reactor was continuously assured by a peristaltic circulation pump. Consequently, the reactor can be considered perfectly mixed. The reactor was operated at a hydraulic retention time (HRT) of 30 days. To achieve this parameter, 400 mL of digested sludge was drained and the same volume of grape pomace was manually fed to the reactor every day via a sampling valve and using a plastic syringe (100 mL). A detailed schematic representation of the reactor is shown in another paper (Guillaume and Lendormi, 2015). The digestion process was carried out at an organic loading rate (OLR) of 2.5 kg $DCO \cdot m^{-3} \cdot day^{-1}$. Biogas production was monitored daily using a MilliGascounter MGC-1 V3.2 PMMA gas meter (Ritter, Germany) with a measurement range between 1 mL/h to 1 L/h. A non-return valve prevents disturbances in the biogas measurement (related to the manual injections and extractions). The analysis of the biogas composition was conducted by

connecting a solution of 6 M NaOH, for the capture of CO_2, between two counters in series. Additionally, an ADC LFG 20 gas analyzer (Scientific Equipment, Garches, France) was used to quantify the CO_2, CH_4 and O_2 in the biogas produced. Homogeneous samples of inputs were prepared and stored at –20°C.

The measurements of the alkalinity and the total volatile acidity (TVA) were carried out as described in another paper (Guillaume and Lendormi, 2015).

3. Results and discussion

3.1. Batch reactor experiments

The inoculum used in these tests had a pH value of 8.1, a TS content of 5.2 ± 0.1%, a VS/TS ratio of 61.4 ± 0.3% and COD of 50.0 ± 0.1 g $O_2 \cdot kg^{-1}$. It was subjected to a starvation period of one week before starting the experiments to facilitate the separate evaluation of the biodegradability of each substrate. Theoretically, the inoculum/substrate ratio has an effect only on the kinetics and not on the ultimate methane yield, which only depends on the organic matter content. It is widely reported that a too high ratio of inoculum/substrate could prevent enzyme induction for biodegradation, while a too low ratio may be toxic (Liu et al., 2009; Neves et al., 2004). In this study, a ratio of 3 g COD inoculum / 1 g COD substrate was chosen as a compromise. Each test was carried out in triplicate until the exhaustion of methane production. The samples used in these tests were the full GP, pulps and seeds; their chemical characteristics are shown in Table 1. The pulp and seeds were obtained by manual separation from a representative sample of GP. The pulp represents 72.8% on a wet basis of GP, whereas the seeds constitute 28.2%.

Table 1: Characteristics of the substrates used in the experiments

Parameters	Units	Grape Pomace	Pulp	Seeds	Inoculum (Suspension)
pH	(for 100 g of solid matter /L)	3.94	3.65	4.60	8.1 (pH without dilution)
Total Dry Solids	$g \cdot kg^{-1}$	434 ± 5	339 ± 3	652 ± 4	52 ± 1
Volatile Solids	$g \cdot kg^{-1}$	371 ± 5	261 ± 5	630 ± 3	32 ± 1
Chemical Oxygen Demand	$g\ O_2 \cdot kg^{-1}$	610 ± 30	490 ± 20	1040 ± 40	50 ± 0.1
Total Nitrogen	$g\ N \cdot kg^{-1}$	7.0 ± 0.2	5.0 ± 0.1	14.3 ± 0.1	-
Total Phosphorus	$g\ P \cdot kg^{-1}$	2.2	2.1	2.5	-

The cumulative methane production (Nm^3 CH_4·kg COD^{-1}) during the digestion of different substrates are shown in Figure 1. For all substrates, the cumulative production of methane increases exponentially during the initial phase until day 10 to 12 after the beginning of the experiment, despite the varying velocities and volumes for each sample. This is the first phase of methane production, corresponding to organic material that is readily biodegradable. After approximately 30 days, a plateau is reached, which indicates that the biomass has been exhausted. The total production of methane from the inoculum (blank) was much lower than for the other substrates, demonstrating its high methane production capacity. As seen in this figure, the cumulative methane yields at the end of test were 0.125 ± 0.012, 0.170 ± 0.005, 0.165 ± 0.004, 0.182 ± 0.002, 0.052 ± 0.002 and 0.129 ± 0.001 Nm^3 CH_4·kg COD^{-1} for GP, milled GP, pulp, milled pulp, seeds and milled seeds, respectively. The final cumulative methane yield referred to added VS (Nm^3·kg^{-1}) was 0.205, 0.280, 0.311, 0.343, 0.085 and 0.214 for GP, milled GP, pulp, milled pulp, seeds and milled seeds, respectively. The comparison of the obtained results provides new detailed information about methane production from these substrates. Such a study on the same variety of GP was not found in the literature. Instead, batch trials were carried out to assess the methane potential of GP in Italy (variety not mentioned), and the results showed a specific methane production of 0.116 Nm^3·kg VS^{-1} (Dinuccio et al., 2010). Recent results reported by Lempereur in 2014 indicates a methane potential of 0.165 Nm^3·kg VS^{-1} for GP and emphasizes the presence of significant variability in methane potential depending on the color, origin and storage time. Another anaerobic digestion test performed in Italy showed that grape seeds have a net methane production of 0.253 Nm^3·kg VS^{-1} (Carchesio et al., 2014).

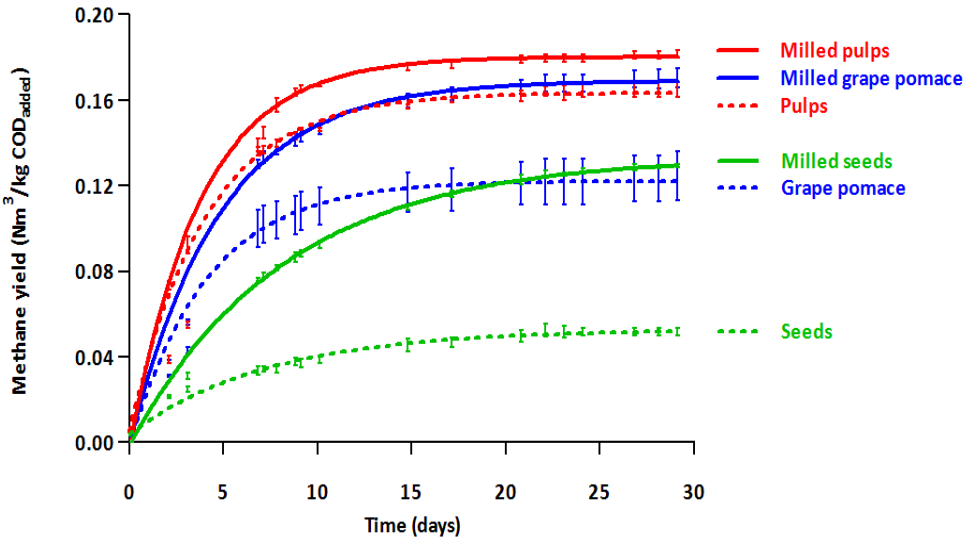

Figure 1: Cumulative methane production of the samples. Lines correspond to a first-order model. Bars represent the average standard deviation.

One of the objectives of this test was to separately assess the role of each component of GP in the co-digestion behavior. Anaerobic co-digestion is a process where two or more substrates are mixed for combined treatment. Substrates in co-digestion may influence the AD performance by enhancing or attenuating the anaerobic biodegradability or the methane yields of each substrate (Astals et al., 2014). In this work, the theoretical methane potential of the entire full GP, taking into consideration the composition of the latter (72.8% pulp and 28.2% seeds), should be 0.134 Nm^3 CH_4·kg COD^{-1} for the non-milled one and 0.169 Nm^3 CH_4·kg COD^{-1} for the milled. Comparing with the values obtained experimentally, 0.125 and 0.170 Nm^3 CH_4·kg COD^{-1}, no statically significant difference for $p = 0.05$ was found; therefore, the ultimate methane potential was not affected. These results highlight the absence of interaction and synergistic effects between the pulp and seeds during the anaerobic digestion process of GP.

The next objective was to evaluate the effect of grinding, as a mechanical pretreatment, on the methane potential of the substrates. Several studies have shown a positive correlation between the particle-size reduction due to mechanical pretreatment, COD solubilization and the enhancement of biodegradability from substrates with a high fiber content (Wang et al., 1999). Our results emphasize the positive effect of grinding on the anaerobic biodegradability of substrates. Grinding increases the anaerobic biodegradability of the GP, pulp, and seeds by 13.1%, 4.8%, and 22.2%, respectively (Fig. 2). The magnitude of the effect of the mechanical pretreatment depends on the substrate type and characteristics and if the solubilized material is

inherently easily accessible and biodegradable (Carlsson et al., 2012). The limitation of the pulp biodegradability could be explained by the fact that their cuticle remained at the end of the test. It was proposed that this cuticular waxy material is poorly accessible to the acid hydrolysis and is mainly composed of inaccessible cellulose (Mendes et al., 2013).

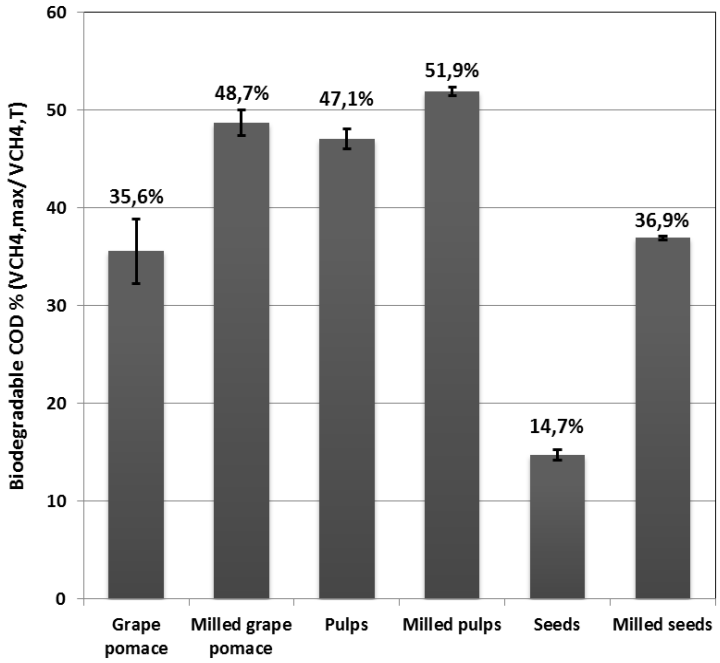

Figure 2: Anaerobic biodegradability of the substrates. VCH_4, max ($Nm^3 \cdot kg\ COD^{-1}$): Maximum volume of methane at the end of test ($Nm^3 \cdot kg\ COD_{added}^{-1}$). VCH_4, T ($Nm^3 \cdot kg\ COD^{-1}$): Theoretical volume of methane = 0.35 $Nm^3\ CH_4 \cdot kg\ COD_{degraded}^{-1}$

The seed coat is thick and hard, helping protect the embryo from mechanical injury. Thus, enzymes do not have access to the endosperm of the seeds, which is rich in oil, hydrocarbonaceous materials and other matter. A simple mechanical pretreatment allows breaking this wall while releasing the cellular components which are the main compounds responsible for the residual chemical oxygen demand in the AD process. The grinding effect is then highly significant for the seeds (Fig. 2). In fact, YuMin et al. (2011) demonstrated that the oil contained in the grape seed contributes to an increase in methane and biogas production. Additionally, the biodegradability could be highly enhanced by the increased surface area as well as by the solubilization and alteration of the lignin contained in the seeds (Pilli et al., 2011).

The effect of the mechanical pretreatment on biogas production was evaluated in many studies. The effect of milling on the AD of food wastes was evaluated in batch process experiments and at mesophilic temperature (37°C). The mechanical treatment led to a 28% higher biogas production (Izumi et al., 2010). Another study investigated the effect of ultra-fine grinding of

several organic solids on the particles biodegradation. The gas production was increased up to 20% during AD in batch digesters, depending on the characteristics of the substrate (Palmowski and Müller, 2000). In addition, it was demonstrated that when mechanical treatment is combined to another pretreatment, the combination was highly effective for the enhancement of biodegradability. A chemo-mechanical pretreatment was found to enhance the COD solubilization of dairy waste activated sludge by 24% and the biogas production by 76% (Uma Rani et al., 2012).

3.1.1. Kinetic study

Empirical linear and non-linear regression models were developed to evaluate the AD performance. In this study, a first-order kinetic equation for methane production was applied. The highest arithmetic mean k values were obtained for the pulp (0.248 for the non-milled one and 0.268 d^{-1} for the milled), followed by the GP (0.212 for the non-milled one and 0.242 d^{-1} for the milled). The lowest mean k values were obtained for the seeds (0.095 for the non-milled one and 0.121 d^{-1} for the milled); this is attributed to the presence of a high lignin content that is not digestible in the AD process and oils that need a longer time to be degraded. The high values of the coefficient of determination, R^2 (> 0.99 in all cases), and the low values of the confidence limits of the parameters obtained demonstrate that the model fits the data well (Table 2). These results are in agreement with those found in the literature. In fact, the k values obtained by a first-order model from the anaerobic digestion of vegetable waste are between 0.076 and 0.264 d^{-1} (Veeken and Hamelers, 1999). Another recent study has shown that grape seeds (variety Nero Buono, Italy) have a low k value of 0.097 d^{-1} (Fabbri et al., 2015).

Table 2: Values of the kinetic constants for the different samples (confidence interval of 95%).

Substrates	Grape pomace	Milled grape pomace	Pulp	Milled pulp	Seeds	Milled seeds
k: Methane production rate constant (day^{-1})	**0.2033 to 0.2201**	**0.2294 to 0.2552**	**0.2329 to 0.2621**	**0.2579 to 0.2784**	**0.07997 to 0.1095**	**0.1175 to 0.1253**
R^2	**0.9987**	**0.9979**	**0.9973**	**0.9995**	**0.9934**	**0.9994**

3.1.2. Determination of biochemical fractions

The Van-Soest method was used to achieve the fractionation of the solid matter. It is based on consecutive extractions by solvents with increasing extractive power. Hence, four fractions have been determined: soluble components, hemicellulose, cellulose and lignin. Table 3 reports the main fiber fractions of the brut matter of the analyzed substrates. In the grape pomace, the highest fraction is that of soluble compounds (11.6%) followed by lignin (11.1%), cellulose (7.5%) and hemicellulose (6.7%). In the pulp, we did not find major differences between the proportions of the fractions. These latter vary between 4.5% for hemicellulose and 8.6% for soluble compounds. In the seeds, it was observed that soluble compounds represent the most abundant fraction (21.2%) and consist of sugars, proteins, polyphenols, organic acids and oils, followed by the highest contents in polysaccharides with 17.6% lignin, 14.9% cellulose and 9.1% hemicellulose.

Table 3: Polysaccharide composition of the biomass (% w/w)

Fraction	Water	Soluble compounds	Hemicellulose	Cellulose	Lignin	Ash
Grape pomace	**56.6**	**11.6**	**6.7**	**7.5**	**11.1**	**6.4**
Pulps	**66.1**	**8.6**	**4.5**	**5.9**	**7.0**	**7.9**
Seeds	**34.8**	**21.2**	**9.1**	**14.9**	**17.6**	**2.4**

The correlation between the methane yields and the main chemical biomasses corroborate that the fractionation of the fiber fractions of biomass leads to a clear characterization of the biodegradability of the substrates. The Pearson coefficient was found to correlate significantly and positively with the hemicellulose and soluble compound fractions. The soluble fraction represents an important quantity of matter that is readily extracted and thus easily available to the microorganisms (Mottet et al., 2010). Hemicellulose was shown to have a positive effect on the AD process because it is normally degradable and provides the main carbon source for the anaerobic microorganisms (Dinuccio et al., 2010). In contrast, the Pearson coefficient correlates significantly and negatively with cellulose and lignin (Fig. 3). It was observed that lignin is the most refractory between structural polysaccharides because it is water-insoluble and resistant to microbial degradation and oxidation (Carlsson et al., 2012). The cellulose fraction needs a high-powered extraction detergent and is almost inaccessible and negligibly degradable

because of its crystalline structure that prevents penetration by micro-organisms or extracellular enzymes (Fan et al., 1981). Despite that, many authors have shown that it is usually degradable by anaerobic microorganisms in its pure form; it could become completely refractory when combined with lignin (Jimenez et al., 1990).

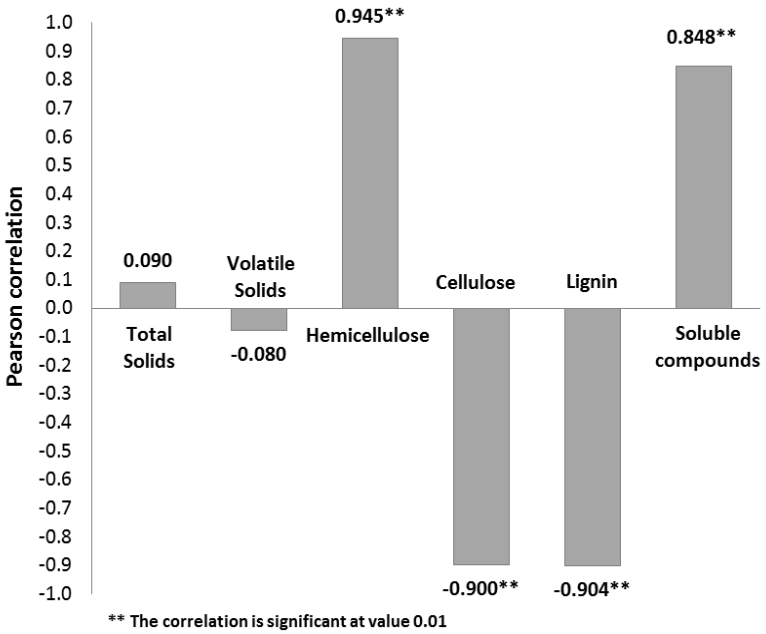

Figure 3: Pearson correlation between specific methane yield ($Nm^3 \cdot kg\ VS^{-1}$) and the main chemical biomass parameters

3.2. Continuous stirred tank reactor experiments

3.2.1. Operating conditions

A continuously stirred tank reactor, CSTR, was used in this study to determine the biogas and methane production in a scaled-up process. According to Table 1, GP has a TS content of 43.4%, so it is dry and difficult to be pumped, leading to the choice of a wet digestion process. This was done by adding water to the GP to a concentration of 250 g TS/L in water. An important parameter for a continuous process is the hydraulic retention time, HRT, which is the average time an input stays inside the reactor before it comes out. It has to be longer than it takes for the microorganisms to multiply, which is up to 12 days, or otherwise the microorganisms will be washed out of the reactor and the methane production will stop (Gashaw, 2014). The choice of HRT depends on how difficult the substrate is for the microorganisms to digest. The dry part of the GP mostly consists of fibers, so to digest them,

the reactor must have a sufficient HRT. Being based on different literature studies, it has been shown that an HRT of 30 days is usually used to evaluate the anaerobic digestion of many agro-industrial wastes in continuous modes (Kafle and Kim, 2013; Ruffino et al., 2015). This is the reason why a time period of 30 days was chosen. Moreover, the organic loading rate, OLR, is the amount of digestible material that is fed to the reactor, in kg COD per m^3 reactor and day. A high load enables high microorganism growth and high biogas production, but it also puts pressure on the microorganisms and can lead to process collapse due to acid accumulation. To maximize the production of biogas while maintaining stability in the reactor, the organic load must be between 0.25 and 3 kg $COD \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ (Rajeshwari et al., 2000). In addition, even that the GP is largely produced in the short period of harvesting, it should be noted that nowadays, in France, it is stored in the distilleries and the biogas reactors are operating up to 10 months with the same applied OLR. Thus, an OLR of 2.5 kg $COD \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ was selected (Table 4). In addition, though particle size does not have the same impact as temperature and pH in the anaerobic process, it still has an influence on gas production. In fact, the particle size of the GP should not be too large, or otherwise it would result in the clogging of the digester, mainly due to the presence of seeds. It would also be difficult for microorganisms to carry out digestion, thereby decreasing the gas production. It was found that out of five particle sizes (0.088, 0.4, 1, 6 and 30 mm), the maximum quantity of biogas was produced from material of 0.088 and 0.4 mm particle sizes (Sharma et al., 1988). On another note, as seen in the previous results, grinding also induced a positive effect on the anaerobic biodegradability and hence on methane production. Because of that, the samples of GP were ground to reach a particle size range between 0.04 µm and 1000 µm with a clear bimodal distribution centered on 25 µm and 500 µm, as evaluated using laser diffraction analysis (Malvern, UK). Finally, the digester was continuously stirred, to ensure intimate contact between the microorganisms and GP, which ultimately leads to an improved digestion process. In fact, previous results have shown that a good mixing system promotes biomass acclimation and restricts operating problems like foaming, biomass flotation and super-saturation of certain gases, forming precipitates (CO_2) in contact with the organic material or acting as reaction inhibitors (H_2S and H_2) (Guillaume and Lendormi, 2015).

Table 4: Operation parameters of the experimental anaerobic digestion unit

Reactor volume	**12 L**
Operation period	**105 days**
Hydraulic retention time	**30 days**
Organic loading rate	**2.5 kg COD·m^{-3}·day^{-1}**
Agitation	**Continuous by external recirculation**
Temperature	**37 °C**
Biogas production	**6.43 ± 0.09 NL·day^{-1}**
Methane content	**62.3 ± 0.6 %**
Dioxygen content	**< 0.4%**
Efficiency compared to batch	**81%**

3.2.2. Monitoring of the reactor parameters

The digester was initially started with full GP. The OLR was increased to 2.5 kg COD·m^{-3}·day^{-1} with an HRT of 30 days. Forty-five days of starting-up were necessary to reach this targeted OLR. Once reached, the reactor was followed for 60 days which constitute the acclimation period to this OLR. Therefore, the reactor was operated 3.5 the HRT duration (105 days) to record stability in biogas and methane production. The daily production of biogas and methane and pH were recorded and the two parameters of TVA and alkalinity were followed. As seen in figures 4 and 5, and during the acclimation period, the medium pH decreased from 8.15 to 7.35 without any adjustment throughout the study. The alkalinity decreased from 14.8 g $CaCO_3$·L^{-1} at the beginning to 4.6 g $CaCO_3$·L^{-1} at the end. It was noted that the value should be maintained above 3 g $CaCO_3$·L^{-1} to avoid drastic drops in pH. However, the TVA showed an almost steady evolution during the process. The TVA concentration at the beginning was 1.2 g CH_3COOH·L^{-1}, increasing to 1.42 g CH_3COOH·L^{-1} by day 30 and decreasing again to 0.91 g CH_3COOH·L^{-1} at the end. For a successful AD process, the concentration of volatile acids, acetic acid in particular, should be below 2 g CH_3COOH·L^{-1} (Yadvika et al., 2004). Therefore, one of the criteria for confirming the digester stability is the TVA/alkalinity ratio; in our study, it increased from 0.08 to 0.2. This ratio testified to the stability of the pilot during the AD of GP, with the reported normal ratio being below than 0.4 (Callaghan et al., 2002). Finally, as seen in figure 6, biogas production was stabilized to 6.43 10^{-3} Nm^3·d^{-1}, with a stable methane content of 62.3% during the acclimation period.

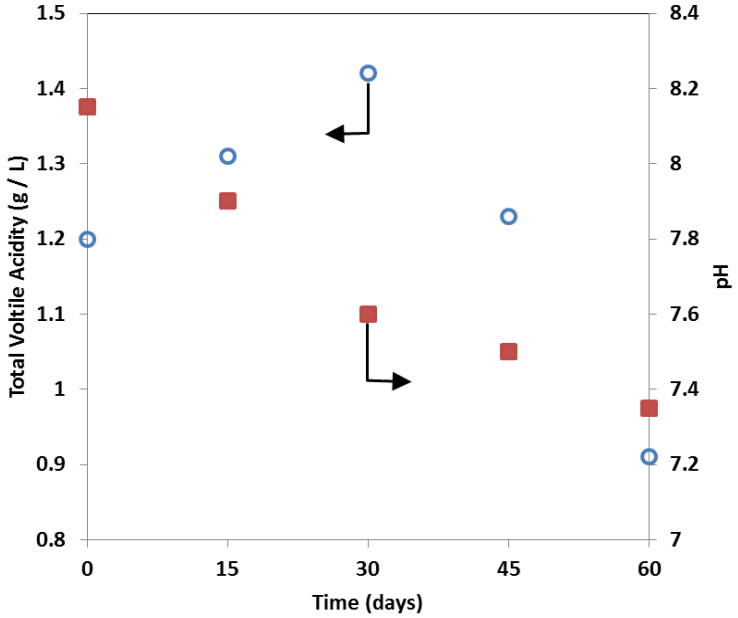

Figure 4: Evolution of pH and total volatile acidity (TVA) during the acclimation period of the reactor. Day 0 corresponds to the end of the start-up period.

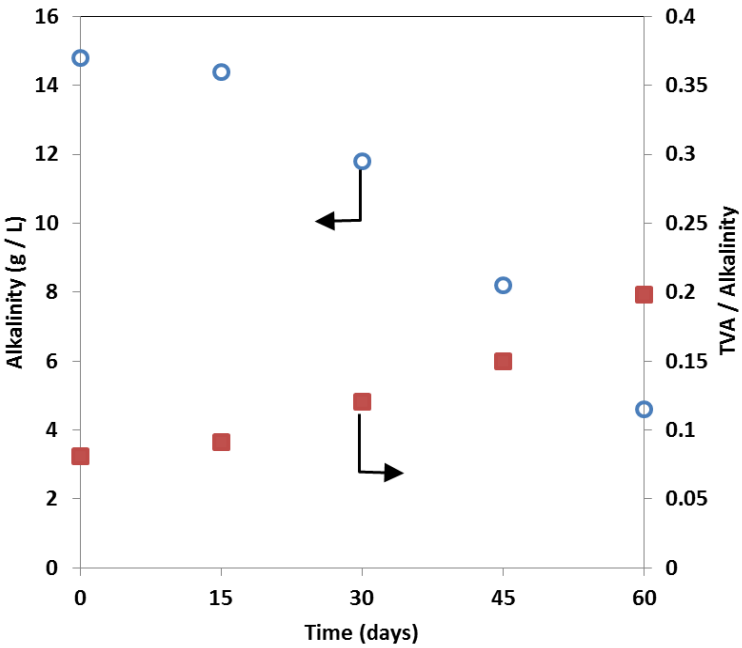

Figure 5: Evolution of alkalinity and TVA/alkalinity ratio during the acclimation period of the reactor. Day 0 corresponds to the end of the start-up period.

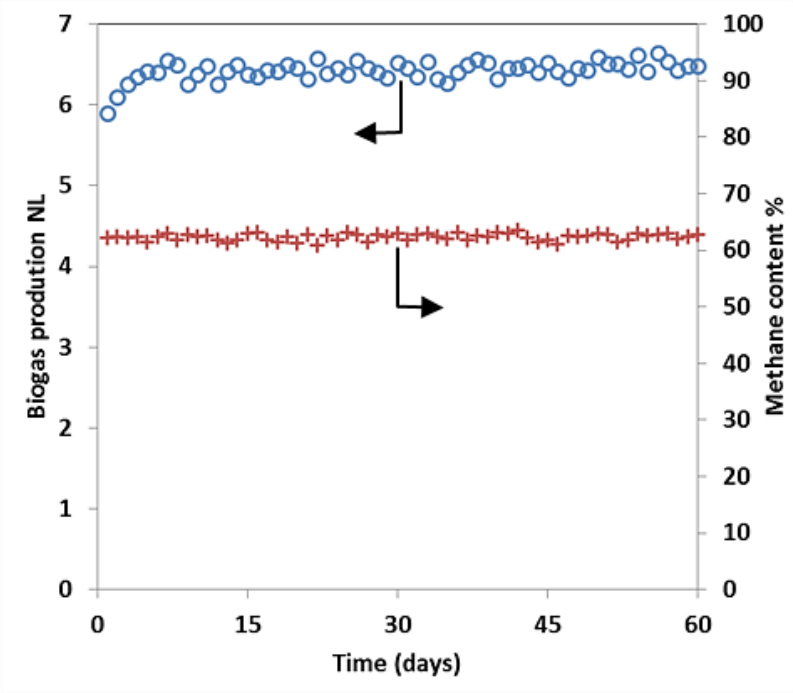

Figure 6: Daily biogas production and methane content during the acclimation period of the reactor. Day 0 corresponds to the end of the start-up period.

3.2.3. Technical evaluation of the process

To proceed to a technical evaluation of the digester, the efficiency of the potential production of methane from GP was determined by comparing the batch and continuous modes. The methane specific production in the continuous pilot represented 81% of that obtained with the batch system (Table 4). This is probably due to the longer contact time between the GP and microorganisms in the batch system, which permits a better degradation of the substrates. Additionally, in batch mode, the representativeness of the whole sample is guaranteed, so that possible inhibition in the system due to progressive acidification can be avoided. Finally, this efficiency may be related to the influence of the residence time distribution, the chosen hydraulic retention time and the difference between mixing systems in the two modes. In fact, few studies have reported the results of tests carried out using different modes on the same substrate. Nevertheless, a study was conducted to evaluate the AD of food waste in mesophilic conditions, using both batch and semi-continuous modes with an HRT between 12 and 32 days. The methane yield obtained in semi-continuous mode was between 60% and 80% of that obtained in batch mode (Zhang et al., 2013). Another study was conducted to assess the AD of apple waste and swine manure in batch and continuous modes with an HRT of 30 days, and the efficiency registered was approximately 90% (Kafle and Kim, 2013). Recently, the methane production capacity of vegetable waste from two industrial plants was assessed on the semi-

pilot and pilot scales with a chosen HRT of 30 days. The methane yield returned from the pilot scale test was approximately 80% of that obtained in the smaller one (Ruffino et al., 2015). Consequently, the result of this work is consistent with results collected from the literature, which indicates the success of the scale-up to the pilot test.

4. Conclusions

Due to the quantitative and qualitative importance of grape pomace, this study was conducted to evaluate its potential as an alternative energy source. Grape pomace, variety Cabernet Franc, was tested for both methane production and physico-chemical characterization. The batch anaerobic digestion test demonstrated that GP can be considered an important energy source via anaerobic digestion and highlighted the effect of grinding in increasing the GP biodegradability. In addition, the batch test was extrapolated to a continuous pilot scale test, leading to a methane yield from the pilot scale that was approximately 81% of that from the batch scale test. These results lead to a better understanding of the technical feasibility of a full-scale digester. Finally, the optimal valorization of biomass to bio-products and gaseous biofuels requires a good knowledge of their molecular composition. That is why different chemical analyses have been run, leading to a full understanding of the correlation between methane production and the main grape pomace components.

In conclusion, the obtained results clearly demonstrate the success of the proposed approach for optimal GP management and valorization for energy production.

Acknowledgment

The authors are thankful to the Research Council of Saint Joseph University (Project FS66), The National Council for Scientific Research – Lebanon (CNRS-L), Arcenciel association and the French institute in Lebanon for the financial support brought to the PhD work in the frame of which this study has been carried out.

III.3. Acclimatation du pilote à la température moyenne de la plaine de la Bekaa

III.3.1. Suivi des paramètres physico-chimiques et de la production de gaz

Après avoir abouti à des conditions de stabilité dans le digesteur fonctionnant à 37 °C, des essais d'acclimatation à la température moyenne de la vallée de la Bekaa (25 °C) ont été réalisées. Afin donc de mieux adapter le système au changement de température, celle-ci a été abaissée par des sauts de 3 °C. Ainsi, les effets des températures de 34 °C, 31 °C, 28 °C et 25 °C sur la production de méthane et sur la stabilité du système ont été évalués.

Les mesures du Titre Alcalimétrique Complet (TAC) et de l'Acidité Volatile Totale (AVT) ont été effectuées au début et à la fin de chaque saut de température. La figure 1 illustre les valeurs de pH enregistrées ainsi que le ratio AVT/TAC. Soulignons que ce rapport est un critère important pour confirmer la stabilité des bioréacteurs anaérobies avec des valeurs ne dépassant pas la gamme comprise entre 0,4 et 0,8 (Aboudi et al., 2016 ; Callaghan et al., 2002). Dans notre cas, il a affiché des valeurs maximales de 0,36 à la fin des expérimentations. Concernant le pH, celui-ci a diminué jusqu'environ 7,2 sans ajustement tout au long de l'étude. L'ensemble de ces valeurs témoigne de la stabilité et du bon déroulement du processus.

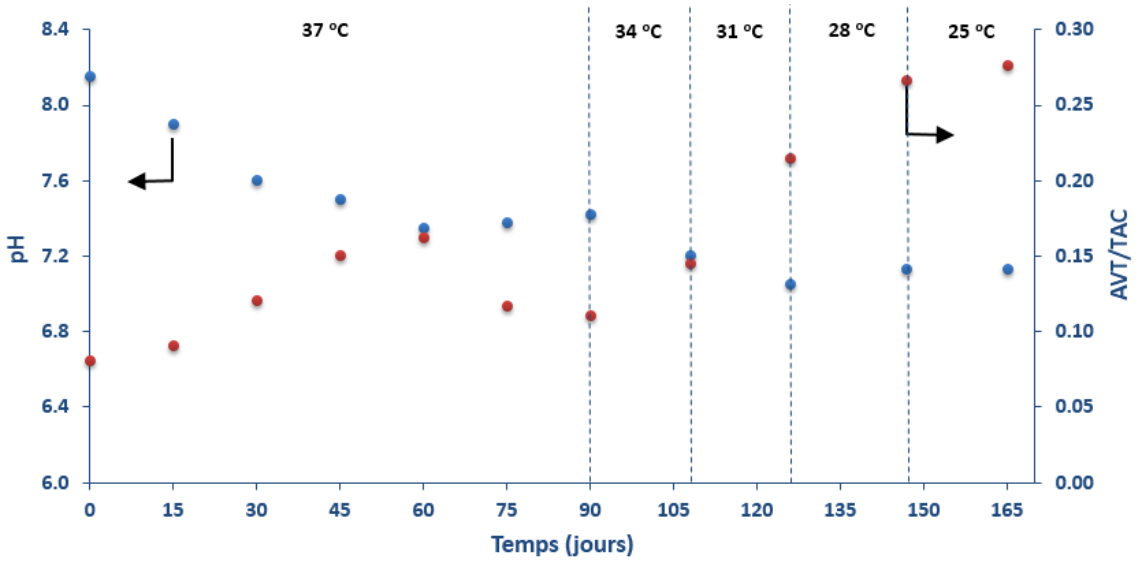

Figure III. 1 : Suivi du pH et du ratio AVT/TAC au cours des expérimentations, pour les différentes températures testées

La figure 2 montre des productions journalières moyennes de biogaz de 6,43 NL, 5,56 NL, 4,98 NL, 4,38 NL et 4,28 NL, pour les températures de 37 °C, 34 °C, 31 °C, 28 °C et 25 °C, respectivement. Le taux de méthane reste relativement stable durant les expérimentations, affichant une valeur de 62,28 ± 0,75%.

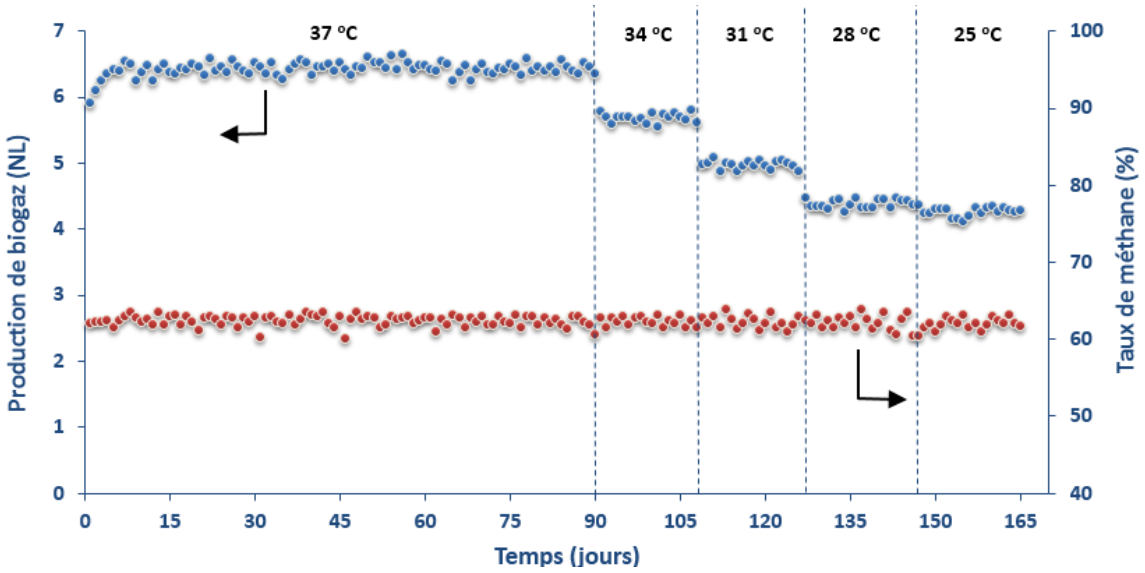

Figure III. 2 : Productions journalières de biogaz et taux de méthane au cours des expérimentations pour les différentes températures

III.3.2. Modèle de simulation pour la méthanisation du marc de raisin

Durant toute la période de fonctionnement, le digesteur CSTR fonctionne à des conditions de stabilité bien définies, avec un débit de matière constant et un temps de séjour fixe conservant ainsi son volume utile. La seule variable dans le système est alors la température qui diminue de 37 °C jusqu'à 25 °C. Les productions de méthane enregistrées, qui dépendent uniquement de la température, pourraient ainsi être décrites par une cinétique de premier ordre.

$$S \overset{k_T}{\leftrightarrow} CH_{4_{(g)}}$$

La cinétique chimique suivant un modèle de premier ordre peut être représentée par :

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_T \times [S] \quad [\text{Eq. } 1]$$

$$-\frac{d[S]}{[S]} = k_T \times dt \quad [Eq. 2]$$

$$\int_{S_0}^{S} -\ln[S] = k_T \times t \quad [Eq. 3]$$

D'où nous obtenons :

$$-\ln[S_t] + \ln[S_0] = k_T \times t \quad [Eq.4]$$

$$ln\frac{[S_0]}{[S_t]} = k_T \times t \quad [Eq.5]$$

$$[S_t] = [S_0]e^{-k_T t} \quad [Eq.6]$$

Où $[S_t]$ est la concentration en substrat à l'instant t, $[S_0]$ la concentration initiale en substrat et k_T la constante cinétique de vitesse qui dépend de la température.

Or le volume théorique de CH_4, $V_{CH_4}^{théo}$, attendu journellement est régi par l'équation 7 :

$$V_{CH_4}^{théo} = f \times q \times m_0(S) \quad [Eq.7]$$

Où f est le facteur égal à 0,35 étant donné qu'un gramme de DCO produit en théorie 0,35 L de CH_4, q est le facteur représentant le ratio g $DCO_{substrat}$/ 1 g $MB_{substrat}$ (avec MB : Matière Brute) ; dans notre cas q est égale à 0,6 et $m_0(S)$ représente la masse de substrat alimentée par jour qui est égale à 50 g.

Il en résulte alors que :

$$\frac{V_{CH_4}^{exp}}{V_{CH_4}^{théo}} = \frac{[S_0] - [S_{24}]}{[S_0]} = \frac{V_{CH_4}^{exp}}{f \times q \times m_0} = 1 - \frac{[S_{24}]}{[S_0]} \quad [Eq.8]$$

$$\frac{V_{CH_4}^{exp}}{f \times q \times m_0} = 1 - \frac{[S_{24}]}{[S_0]} \quad [Eq.9]$$

$[S_0] - [S_{24}]$ représenterait la quantité de substrat digérée et donc convertie en CH_4 après 24 heures. Elle est ainsi proportionnelle au volume de CH_4 expérimental.

Or :

$$\frac{[S_{24}]}{[S_0]} = e^{-k_T \times 24} \quad [Eq.10]$$

Nous pouvons donc en déduire que :

$$V_{CH_4}^{exp} = f \times q \times m_0 \times \left(1 - e^{-k_T \times 24}\right) \quad [Eq.11]$$

k_T sera exprimée par :

$$k_T = -\frac{1}{24} \times \ln\left(1 - \frac{V_{CH_4}^{exp}}{f \times q \times m_0}\right) \quad [Eq.12]$$

D'après cette équation, nous déterminons les valeurs des k_T pour les différentes températures d'expérimentations effectuées. La corrélation entre k_T et T dans la plage de températures de 25 à 37 °C est représentée dans la figure 3.

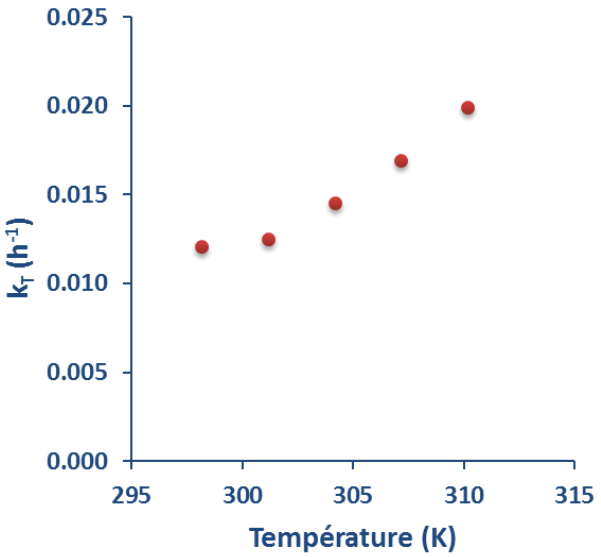

Figure III. 3 : Courbe montrant la variation de k_T en fonction des différentes températures d'expérimentations

Nous dénotons alors que k_T augmente avec l'augmentation de la température confirmant la loi d'Arrhenius.

Or, la loi d'Arrhenius énonce que :

$$k_T = A \times e^{\frac{-Ea}{RT}} \quad [Eq.13]$$

Où T est la température en K (kelvin), R la constante des gaz parfaits (8,314 J K^{-1} mol^{-1}), Ea l'énergie d'activation d'Arrhenius en J mol^{-1} et A le facteur pré-exponentiel.

$$Ea = \frac{R \times ln \frac{k_{T_1}}{k_{T_2}}}{\frac{T_1 - T_2}{T_1 \times T_2}} \quad [Eq.14]$$

Les valeurs expérimentales nous permettent de déduire aisément :

Ea = 40280 J mol^{-1} et A = 120491 h^{-1}

Il s'en suit alors la loi de variation de la constante cinétique k_T en fonction de la température :

$$k_T = 120491 \times e^{-\frac{4845}{T}} \quad [Eq.15]$$

Notons que les constantes des vitesses d'hydrolyse de premier ordre suivent clairement la loi d'Arrhenius avec une énergie d'activation moyenne de 40,28 kJ mol^{-1}.

À ce stade nous remplaçons k_T dans V_{CH_4}, obtenant :

$$V_{CH_4}^{exp} = f \times q \times m_0 \times \left(1 - e^{-A \times t \times e^{\frac{-Ea}{RT}}}\right) \quad [Eq.16]$$

$$V_{CH_4}^{exp} = 10{,}5 \times \left(1 - e^{-120491 \times t \times e^{-\frac{4845}{T}}}\right) \quad [Eq.17]$$

Nous avons pu ainsi établir un modèle d'évolution du $V_{CH_4}^{exp}$ obtenu à une température de fonctionnement donnée en fonction du temps de digestion. Ce modèle décrit et justifie les variations des productions de méthane observées dans le cadre de notre étude.

Nos résultats sont proches de ceux repérés dans une étude antérieure portant sur la digestion anaérobie des boues primaires, où les valeurs de k_T ont suivi la loi d'Arrhenius avec une énergie d'activation moyenne de 50 kJ mol^{-1} (Mahmoud et al., 2004). Par ailleurs, une étude récente publiée en 2017 a montré que l'énergie d'activation d'une large gamme de déchets organiques solides variait entre 32 et 346 kJ mol^{-1} lors leur digestion anaérobie (Li et al., 2017). Il est intéressant de souligner que l'énergie d'activation estimée par notre modèle se situe dans la gamme basse trouvée, certifiant le potentiel concurrentiel du marc de raisin, en tant que source d'énergie verte, par rapport aux autres types de déchets. Rappelons que l'énergie d'activation fournit des informations détaillées sur l'énergie critique nécessaire pour surmonter une barrière énergétique et déclencher ainsi une réaction (Lin et al., 2014). En outre, une réaction avec une faible énergie d'activation apparente nécessite moins d'énergie pour décomposer les liaisons chimiques entre les atomes (Ceylan and Kazan, 2015). Par conséquent, pour une conversion optimale en méthane qui est économiquement plus propice, les systèmes de méthanisation nécessitant moins d'énergie d'activation sont actuellement préférables à ceux exigeant plus d'énergie.

D'autres auteurs ont également signalé un comportement similaire pour six types de déchets solides organiques avec une énergie d'activation moyenne 64 kJ mol^{-1} (Veeken and Hamelers, 1999). Ils ont également prouvé que la constante d'hydrolyse déterminée en mode batch a été inférieure à celle déterminée en mode continu dans des digesteurs de type CSTR. Nous soulignons que ce résultat est similaire au nôtre, étant donné qu'une constante moyenne

d'hydrolyse de 0,24 j^{-1} a été trouvée en mode batch à 37 °C, contre une valeur plus élevée de 0,48 j^{-1} (obtenue en multipliant k_T = 0,02 h^{-1} par 24, Figure 1), estimée en mode continu et à une température analogue. Ceci est attendu puisque la vitesse de réaction, représentée par k, est proportionnelle au taux de croissance des bactéries présentes. En effet, en mode batch où nous n'apportons pas de nouveaux substrats au cours des expérimentations, la croissance bactérienne est limitée ; elle s'arrête par l'épuisement des substrats. Par contre, en mode continu, lorsque le digesteur à 37 °C est à l'équilibre sous un régime de fonctionnement nominal, la biomasse microbienne (B) ne varie pas :

$$\frac{dB}{dt} = 0$$

$$\frac{dB}{dt} = \mu B - \mu D = 0$$

D'où : $\mu = D$

Avec D (j^{-1}) = taux de dilution ou inverse du temps de séjour. La biomasse est synthétisée (μB) à la même vitesse qu'elle est éliminée par l'effluent (μD).

Enfin, il convient de noter que les réactions biochimiques dans les processus de dégradation anaérobie ne sont pas exothermiques et ne créent donc pas de chaleur. Il est ensuite nécessaire d'apporter cette chaleur aux digesteurs par chauffage externe afin d'obtenir des conditions optimales. Dans les digesteurs industriels, un changement de température, provoqué entre autres par une défaillance des systèmes de chauffage, induirait une baisse réversible de la production de méthane. Par contre, des variations répétées de températures entre différentes plages de fonctionnement (mésophile et thermophile) affecteraient les communautés microbiennes ainsi que les métabolismes réactionnels, conduisant à des problèmes plus complexes et même irréversibles (Batstone et al., 2002). Pour ces raisons, une attention particulière devrait être accordée pour surmonter les fortes diminutions de température durant la période hivernale dans la plaine de la Bekaa. D'où l'importance de développer davantage le modèle présent en évaluant la production de méthane sous températures psychrophiles.

Chapitre IV

Digestion anaérobie de neuf variétés de marcs de raisins : corrélation entre composition biochimique et production de méthane

IV. Chapitre IV : Digestion anaérobie de neuf variétés de marcs de raisins : corrélation entre composition biochimique et production de méthane

Les résultats du chapitre précédant ont confirmé le succès de notre étude pour une gestion appropriée et une exploitation énergétique du marc de raisin. La méthanisation de ce coproduit vitivinicole seule est alors possible. Mais est-ce que la production de méthane varie en fonction des cépages et des facteurs environnementaux ? Nous exposerons à présent une étude inter-cépages qui vise l'évaluation de l'influence des paramètres biochimiques sur la digestion anaérobie du marc de raisin. Cette partie de travaux a été valorisée sous forme d'un article intitulé « Anaerobic digestion of nine varieties of grape pomace : correlation between biochemical composition and methane production » soumis au journal « Biomass and Bioenergy » le 1er décembre 2016 (référence du manuscrit : JBB-D-16-01470).

IV.1. Avant-propos

Dans le cadre de la valorisation du marc de raisin en tant que source d'énergie alternative, nous cherchons à présent à évaluer l'influence des paramètres biochimiques sur la digestion anaérobie, voire sur la production de méthane. Cette étude, qui s'avère être pionnière, a été menée sur 9 cépages industriels de marcs de raisins, en provenance de différentes régions viticoles françaises et libanaises (Champagne, Bordeaux, Pays de la Loire et Plaine de la Bekaa). Étant donné que la composition en pulpes et pépins varie pour chaque cépage, et comme notre première étude a montré que les pulpes affichaient le potentiel méthane le plus élevé et les pépins celui le plus faible, nous avons choisi de travailler sur des marcs de raisins épépinés, après séparation des pépins des marcs entiers. Les productions maximales de méthane ont été suivies en utilisant l'AMPTS-II et les cinétiques de production ont fait l'objet d'une modélisation cinétique du premier ordre pour trouver les constantes d'hydrolyses correspondantes. Les teneurs en matière sèche, matière volatile, demande chimique en oxygène, hémicellulose, cellulose, lignine, fractions solubles et polyphénols ont été déterminées. L'ensemble des résultats a été exploré par la méthode statistique d'analyse en composante principale (ACP) afin d'établir les corrélations existantes entre les paramètres étudiés et la production de méthane des différents échantillons.

Le test BMP en mode batch a montré que la production de méthane diffère entre les variétés françaises et libanaises. À la fin des essais, les valeurs maximales enregistrées varient entre

0,104 et 0,242 Nm^3 CH_4 kg DCO^{-1}, correspondant à une variation de biodégradabilité en anaérobie entre 29,7% et 69,0%.

L'ACP est utilisée pour expliquer la répartition des échantillons en fonction des paramètres étudiés. Trois composantes principales, ayant une valeur propre supérieure à 1, sont considérées dans cette étude. Elles combinent les paramètres trouvés les plus pertinents et décrivent, à elles seules, jusqu'à 95% de la variabilité des données. L'interprétation des résultats a conduit à la mise en évidence d'une corrélation positive entre la production de méthane d'une part et les constantes cinétiques de premier ordre, les hémicelluloses et les fractions solubles d'autre part. A l'opposé, une corrélation inverse a été trouvée entre la production de méthane et les teneurs en lignine et en cellulose. De plus, aucune corrélation significative ne semble pointer entre le potentiel méthanogène, les teneurs en matières sèches et les polyphénols totaux.

En fait, la lignine est largement connue comme le polysaccharide le plus résistant à la dégradation microbienne dans les conditions anaérobies. La cellulose, elle, est généralement dégradable dans ces conditions sous sa forme pure. Par contre, lorsqu'elle est incrustée dans la lignine, elle perd son accessibilité aux enzymes hydrolytiques entravant ainsi sa dégradation. Le carbone présent dans la fraction soluble et dans les hémicelluloses est largement biodisponible et donc facilement dégradable par les microorganismes. Nous pensons alors que la biodégradabilité parfois limitée du marc de raisin, observée chez quelques cépages, serait liée directement à des taux élevés de lignine et de cellulose présents.

Concernant les composés phénoliques, ils sont généralement connus comme inhibiteurs des systèmes de digestion anaérobie en bloquant l'activité des microorganismes. Dans notre étude, ils n'ont pas révélé une corrélation significative avec le potentiel méthanogène des marcs sélectionnés. En fait, leur concentration dans le milieu n'a probablement pas été critique pour affecter les bactéries méthanogènes. En outre, il a été démontré que la vigueur de l'effet d'inhibition ou de désactivation des polyphénols dépendrait de leur niveau de polymérisation, des espèces microbiennes présentes et du type d'enzymes hydrolytiques. Par ailleurs, il a été montré que plus le substrat est riche en composés lignocellulosiques, plus l'effet des polyphénols sur l'activité des microorganismes est masqué et faible. Par conséquent, on peut déduire que l'extraction des polyphénols du marc de raisin avant la méthanisation ne semble pas être élémentaire pour accroître la production de méthane.

En conclusion, le principal défi dans l'utilisation des cultures lignocellulosiques, comme le marc de raisin, pour la production de biogaz, est donc leur structure et leur composition en

polysaccharides. Afin d'intensifier la conversion de notre matière première, il serait intéressant et même indispensable de réduire la complexité et la récalcitrance des fractions lignocellulosiques, en particulier la lignine et la cellulose. Pour répondre à ces besoins, divers prétraitements verts et innovants seront mis en œuvre ultérieurement en amont de la digestion anaérobie et leurs effets respectifs sur la production de méthane seront également évalués.

IV.2. Full paper: "Anaerobic digestion of nine varieties of grape pomace: correlation between biochemical composition and methane production"

Anaerobic digestion of nine varieties of grape pomace: correlation between biochemical composition and methane production

Jean H. El Achkar[1,2], Thomas Lendormi[1], Zeina Hobaika[2], Dominique Salameh[2], Nicolas Louka[2], Richard G. Maroun[2], Jean-Louis Lanoisellé[1]

(3) Univ. Bretagne Sud, FRE CNRS 3744, IRDL, F-56300 Pontivy, France
(4) Centre d'Analyses et de Recherches, Unité de recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, Beirut, Lebanon

Abstract

In the present study, nine different varieties of deseeded grape pomace were analyzed for the biochemical composition of the raw material (total solids, volatile matter, total chemical oxygen demand, cellulose, hemicellulose, lignin, total soluble compounds and polyphenols). The biological methane potential of the substrates was assessed in batch anaerobic digesters. The results showed that the cumulative methane yields varied widely and ranged from 102 to 300 dm^3 kg^{-1} of total solids, calculated at standard gas conditions of 273 K and 101.5 kPa. The anaerobic biodegradability of the total chemical oxygen demand varied between about 30% to a maximum of 69%. The data obtained were exploited by principal component analysis. The study revealed that lignin and cellulose, explaining almost 63% of the total variance in the data, are the main factors limiting the degradability of the selected grape pomace. The effects of the other parameters, which represent nearly 32% of the total variance, were fully reviewed. In particular, no significant correlation was found between the polyphenol content and the methane yield.

Keywords

Anaerobic digestion; Biochemical methane potential; Grape pomace; Biochemical analyses; Polyphenols; Principal component analysis.

Highlights

- Methane production can be a sustainable option for the recovery of the grape pomace.
- Methane potential was positively correlated with hemicellulose and soluble components fractions.
- Lignin and cellulose were the main factors limiting the anaerobic biodegradability of grape pomace.
- Grape pomace pretreatment prior to anaerobic digestion process is required to improve the methane potential.
- No significant correlation was observed between polyphenol content and methane production.

1. Introduction

Nowadays, a large fraction of the world's total energy demands is supported by non-renewable fossil resources such as coal, oil, and natural gas (Clark et al., 2012). These resources are not only limited in supply but also have adverse effects on the environment due to the emission of greenhouse gases into the atmosphere. Bioenergy, especially biogas produced through the anaerobic digestion (AD), is considered to be one of the highly promising alternatives to fossil-derived energy due to several inherent and significant merits (Pham et al., 2015).

The development and the use of vegetal biomasses as energy source are currently encouraged worldwide. According to an estimation reported by the international organization of vine and wine, almost 2800 hm^3 of wine were produced worldwide in 2015. The European Union participated in almost 60% of the total production with Italy, France and Spain as three main European producing countries (OIV, 2015). On another note, Lebanon is one of the oldest sites of wine production in the world ("Lebanon wine regions," 2014). The number of Lebanese wineries has increased from 5 in 1998 to over 30 today. Winemaking process generates large amounts of solid by-products, in particular Grape Pomace (GP) which consists of about 75% of pulp and 25% of seeds. GP are produced during a short period of harvesting, which boosts the source of biomass in the production area. During storage on harvesting sites, the buildup of phenolic compounds is responsible for decreasing the pH of the pomace as well as raising its resistance to biological degradation (Bustamante et al., 2008). An important environmental problem resides in the leachates of tannins and other compounds, which may lead to oxygen

depletion in the soil and ground waters that can affect topical fauna and flora (Chand et al., 2009). In the last decades, the interest in the recovery and exploitation of GP has become a global issue. Its conversion into methane is a promising possibility given that the current methods of valorization (cathecin polymers or anthocyan colorants extraction, oil, ethanol conversion, …) have limited markets and can absorb only a limited portion of the waste generated.

The recovery of these by-products, using the anaerobic digestion, was evaluated by The French Institute of Vine and Wine (IFV, Le Grau du Roi, France). The results showed that the methane potential of GP depends on factors like grape colors (red and white) and storing process (Lempereur, 2014). Literature review showed that the grape chemical composition is influenced by the environmental factors and the grape varieties. In a recent study, the chemical composition of red and white GP originating from different French areas of production was assessed. Large variability was observed in relationship with the color and the origin (Pierangelo Rondeau, 2013). Another research was conducted to investigate the influence of grape variety on the lignocellulosic fractions of grape stalks. Results showed that the grape variety significantly influences the composition of the raw material (Spigno et al., 2013). However, to our best knowledge, the influence of biochemical parameters on the AD of different GP varieties has never been investigated for their valorization as an alternative energy source. It is worth noting that the biochemical fractions are chemically linked. Their interactions in the lignocellulosic matrix are crucial to the recalcitrance of the biomass and have a direct influence on methane production (Fry, 2011). Due to that, using linear correlations to describe the interaction between methane yield and biochemical components cannot provide a highly significant relations in accordance with the AD theory (Thomsen et al., 2014). A recent research indicated that methane production cannot be investigated by a single parameter, a combination of many variables might be necessary to allow a better comprehension of the interactions (Xu et al., 2014).

To define the proceeding of this research, batch trials were carried out in a previous study to assess the methane potential of full GP, pulps and seeds separately (variety Cabernet Franc 2013, France). Results showed that pulps have the highest methane production, followed by full GP and seeds (El Achkar et al., 2016). Regarding the low methane potential of seeds, the aim of this research is the characterization and the valorization of different varieties of deseeded GP, as agro-industrial wastes, to generate green energy. The main objectives were to define the main chemical components of nine varieties of deseeded GP originating from different French and Lebanese wine-growing areas (Total Solids (TS), Volatile Solids (VS), total Chemical

Oxygen Demand (COD), cellulose, hemicellulose, lignin, total soluble compounds and polyphenols) and to evaluate the anaerobic biodegradability and the maximal methane production of the samples in batch mode. The possible correlations between the parameters were investigated using statistical methods.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The GP varieties (*Vitis vinifera*) were collected from different wineries located in France (Fr) and Lebanon (Lb) as indicated in Table 1. Samples about 5 kg of each substrate were collected and transported to the laboratory. On arrival, the seeds and stalks fragments were removed manually from the set of GP. The raw material was stored at –20 °C until utilization. An active inoculum was collected from the digester of the waste-water treatment plant of Saint-Brieuc city in France, operating under mesophilic conditions. The particulate matter (> 1000 mm) was removed from the inoculum by passing through sieve in order to ensure better homogeneity and to improve the reproducibility of the tests. The latter was subjected to a starvation period of one week before starting of the experiments.

Table 1: Grape pomace varieties, origins and collection

Samples	Grape variety	Collect time	Age (months)	Geo-coordinates	Altitude (m)	Origin and collection	Region and country
S1 S2	Cabernet Sauvignon (C.S Fr) Merlot	October 2014	11	45° 19' 15.913'' N 0° 57' 19.053'' W	6	- Civil society for agricultural holdings (SCEA Birot et Fils, Gaillan en Médoc) - GP collected directly after the pressing of the grapes	Bordeaux, France
S3 S4	Chardonnay Pinot noir	October 2014	11	49° 2' 15.023'' N 3° 57' 5.672'' E	78	- Civil society for manufacturing and commercialization of winemaking products (Sofralab, Magenta) - GP collected directly after the pressing of the grapes	Champagne, France
S5 S6 S7	Marselan Syrah Cabernet Sauvignon (C.S Lb)	September 2014	10	33° 49' 35.245'' N 35° 53' 33.405'' E	909	- Wine company (Château KSARA) - GP collected directly after the pressing of the grapes	Bekaa, Lebanon
S8	Cabernet Franc (C.F)	October 2014	11	47° 12' 25.949'' N 0° 25' 51.392'' W	59	- Wine company (Domaine Des Acacias) - GP collected directly after the pressing of the grapes	Tigné-Layon, France
S9	Ensiled GP	May 2014	18	47° 16' 1.927'' N 0° 30' 12.769'' W	28	- Agricultural and industrial distilleries: UAPL (Union Agricole Pays De Loire) - After the pressing of the grapes, GP was distilled, ensiled for seven months and then collected	Thouarcé, France

2.2. Analysis

Total Solids (TS) content were determined by dry weight in oven at 105 °C until constant weight. Afterwards, Volatile Solids (VS) were determined in a muffle furnace after 4 hours at 550 °C and then cooled in a desiccator and weighed. Total Chemical Oxygen Demand (COD) was measured using Merck COD Spectroquant® test, range 500-10,000 g m^{-3}, and by a spectrophotometer NOVA 60 (Merck, Germany). The matter was ground using a blender (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, USA). It is considered that all organic matter is oxidized with the hot sulfuric solution of potassium dichromate and with silver sulfate as the catalyst after 2 hours at 150 °C.

2.3. Van-Soest fractionation

The characterization of structural polysaccharides and lignin was carried out by the method of Van-Soest (Mertens, 2002; Soest et al., 1985; Van Soest et al., 1991) which can extract the total soluble compounds with a neutral detergent solution in excess, acting on the sample for 1 hour at 100 °C. This detergent solution is composed of Na_2HPO_4, sodium tetraborate, α-amylase, sodium EDTA, sodium lauryl sulfate and sodium sulfite. These products were provided by Merck (Darmstadt, Germany). The extracted fraction is separated from the insoluble neutral detergent fibers by filtration. Following the action of the neutral detergent, hemicellulose is extracted by an excess of acid detergent solution (cetyltrimethylammonium bromide 20 kg m^{-3}, 98 kg m^{-3} of H_2SO_4) acting for 1 hour at 100 °C. The extracted fraction is separated from the insoluble acid detergent fiber by filtration. Cellulose is extracted after a treatment with 1317 kg m^{-3} of H_2SO_4 for 3 hours at ambient temperature (20 ± 1 °C). The filtration residue, corresponds to the lignin associated with the inorganic material. For each substrate, four samples were analyzed.

2.4. Total polyphenol content

The solid-liquid extraction process of polyphenols was performed with a solid-liquid ratio of 1:10 using a 70% ethanol/water solvent (volume ratio) at 50 °C and for 3 hours without grinding of GP. The total polyphenol content was determined using the Folin–Ciocalteu colorimetric assay. 200 mm^3 of extract were mixed to 1 cm^3 of ten-fold diluted Folin–Ciocalteu reagent (Merck, Darmstadt, Germany). 800 mm^3 of sodium carbonate (Na_2CO_3) (75 kg m^{-3}) was then added. The mixture was incubated for 10 minutes at 60 °C then allowed to cool at room temperature, before the absorbance was measured at 750 nm by the UV/Vis spectrophotometer

(UV- 9200, BioTECH Engineering Management, Nicosia, Cyprus). Gallic acid was used for the calibration curve. Total polyphenol content was expressed as grams of gallic acid equivalent per kilogram of TS.

2.5. HPLC Analysis

Phenolic compound analyses of the extracts were carried out by HPLC. Prior to analysis, samples and standards were purified by filtration through 0.2 mm^3 syringe filters (polyethersulfone membrane). A liquid chromatography apparatus (KNAUER, Berlin, Germany) coupled to a diode array detector were utilized. Analyses were conducted on a Spherisorb ODS-2 (5 mm^3, 250 × 4.6 mm) column, at a flow rate of 1 $cm^3 \cdot min^{-1}$, using a 20 mm^3 injection volume and a detection at 280 and 320 nm. Eluent A was 25 kg m^{-3} aqueous formic acid and eluent B was 546 kg m^{-3} methanol, 290 kg m^{-3} HPLC grade water and 25 kg m^{-3} formic acid. Identification was based on comparing retention times of the peaks detected with those of original compounds, and on UV-Vis online spectral data. Quantification was accomplished using the phenolic standards solutions (Ho et al., 1999).

2.6. Automatic Methane Potential Test System (AMPTS)

The specific methane yield of the different varieties of deseeded GP were determined using an Automatic Methane Potential Test System (AMPTS, Bioprocess Control, Lund, Sweden). Fresh inoculum and substrate were added to 500 cm^3 incubation bottles at a COD inoculum to substrate ratio of 3:1 (mass ratio). Bottles were incubated at 37 °C until the biogas production has stopped. No external nutrients or trace elements were added to the reactors before starting the experiments. All tests and blanks were carried out in triplicate, without grinding of the substrates, and the net values of methane production and yield were obtained by subtracting the endogenous production of the blank bottles. At the end of the test, the pH is measured to verify that the judgment of the biogas production is due to the depletion of the biodegradable COD and not the acidification of the medium.
The biological methane potential (BMP) was calculated from the volume of methane produced divided by the quantity of the sample based on COD or TS introduced.

The biodegradability (%) was determined by dividing BMP by the theoretical maximum methane yield (350 dm^3 kg^{-1} of COD) under standard conditions of temperature and pressure (273 K and 101.5 kPa) (Buffière et al., 2008).

2.7. Kinetic study

The methane potential test can be used to estimate the overall hydrolysis constant k. In descriptive terms, this reaction step is typically simplified and reduced to first-order kinetics (Eastman and Ferguson, 1981).

$$B = B_0 \times [1 - \exp(-k \cdot t)] \qquad \text{(eq. 1)}$$

where B is the cumulative methane yield, B_0 is the maximum methane yield of the substrate, k ($days^{-1}$) is the apparent kinetic constant and t (days) is the time. The adjustment by non-linear regression of the pairs of experimental data (B, t) using GraphPad Prism® (GraphPad, San Diego, CA; USA) allows the calculation of the apparent kinetic constant k and R^2. Root Mean Square Prediction Error (RMSPE) was calculated as mentioned by (El-Mashad, 2013) in order to validate the studied model. It represents the deviation between experimental and estimated methane production. In addition, Kruskal-Wallis analysis of variance (chi-square test adjustment) was performed to evaluate statistical differences between the experimental data and the fitted curves.

2.8. Statistical analysis of experimental data

The Pearson correlation ‘‘r” was determined to evaluate the correlations between methane production and the main chemical parameters of the tested GP. Principal Component Analyses (PCA) were performed to investigate the possible relationships between the studied parameters and to understand the variability in the methane production. The PCA method is suitable for reducing the dimensionality of the data set. It transforms a large number of correlated variables to a new set of uncorrelated variables named Principal Components (PC) that could explain most of the total variation in the data. A principal component’s Eigen value greater or equal to one is a criterion for statistical significance. Two plots are therefore obtained and should be interpreted together: the loading plot and the score plot. The loading plot provides the correlation structure of the analyzed variables. A strong influence of the variable is represented by a large distance from the origin. Variables next to each other are positively correlated and those opposites to each other are negatively correlated. The score plot is an outline of the samples and displays how they are situated in respect to each other, based on the variables in the loading plots. It shows possible groups and similarities. Observations located in a certain part of the score plot are often correlated to variables located in the same part of the loading

plot. All statistical tests were conducted using SPSS (SPSS software, V20, SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Results and discussion

3.1. Batch reactor experiments

Table 2 presents the physicochemical characteristics of the GP which remarkably varies among the different varieties and origins. The Lebanese samples showed the highest values of Total Dry Solids (TS), Volatile Solids (VS) and Chemical Oxygen Demand (COD). French GP showed the lowest values of TS, VS and COD which were significantly different. The inoculum used had a pH value of 7.8, a TS content of 53 ± 2 g · kg^{-1}, a VS content of 33 ± 3 g · kg^{-1} and COD of 51.0 ± 0.1 g O_2 · kg^{-1}. As described in a first study treating the AD of GP, a ratio of 3 g COD inoculum / 1 g COD substrate was chosen in the batch experiments (El Achkar et al., 2016). Each test was carried out in triplicate until the depletion of methane production. The cumulative methane productions of the different GP varieties are shown in Figure 1. For all samples, the cumulative production of methane increases exponentially during the initial phase until day 12 to 14 after the starting of the experiment. This phase corresponds to the methane production from components that are easily degradable. A plateau is obtained after approximately 30 days, which signifies that the organic matter has been depleted. The cumulative methane yields at the end of test were 242 for Cabernet Sauvignon (Fr), 210 for Merlot, 200 for Chardonnay, 174 for Pinot Noir, 146 for Marselan, 136 for Syrah, 128 for Cabernet Sauvignon (Lb), 123 for Cabernet Franc and 104 dm^3 kg^{-1} of COD for the ensiled GP. Studying the methane potential of French and Lebanese deseeded GP was not found in the literature. Instead, in a previous study, batch trials were carried out to assess the methane potential of French deseeded GP variety Cabernet Franc collected in 2013. The results showed a specific methane production of 165 dm^3 kg^{-1} of COD (El Achkar et al., 2016).

Table 2: Physicochemical characteristics of the substrates used in the experiments.

Samples	Total dry Solids ($g \cdot kg^{-1}$)	Volatile Solids ($g \cdot kg^{-1}$)	Chemical Oxygen Demand ($g\ O_2 \cdot kg^{-1}$)
C.S Fr (S1)	230 ± 2^{b}	196 ± 4^{f}	282 ± 15^{d}
Merlot (S2)	226 ± 3^{b}	192 ± 3^{f}	321 ± 14^{c}
Chardonnay (S3)	193 ± 4^{c}	150 ± 4^{d}	268 ± 19^{d}
Pinot noir (S4)	223 ± 6^{b}	176 ± 4^{c}	326 ± 14^{c}
Marselan (S5)	376 ± 3^{a}	305 ± 4^{a}	547 ± 21^{b}
Syrah (S6)	406 ± 4^{a}	309 ± 3^{a}	573 ± 07^{a}
C.S Lb (S7)	396 ± 1^{a}	330 ± 5^{b}	591 ± 76^{a}
C.F (S8)	337 ± 3^{d}	269 ± 4^{e}	462 ± 14^{e}
Ensiled GP (S9)	314 ± 7^{e}	250 ± 4^{g}	432 ± 30^{f}

Error bars indicate ± s.d. Different superscript letters indicate significant statistical difference between means at 0.05% level, according to Tukey's test.

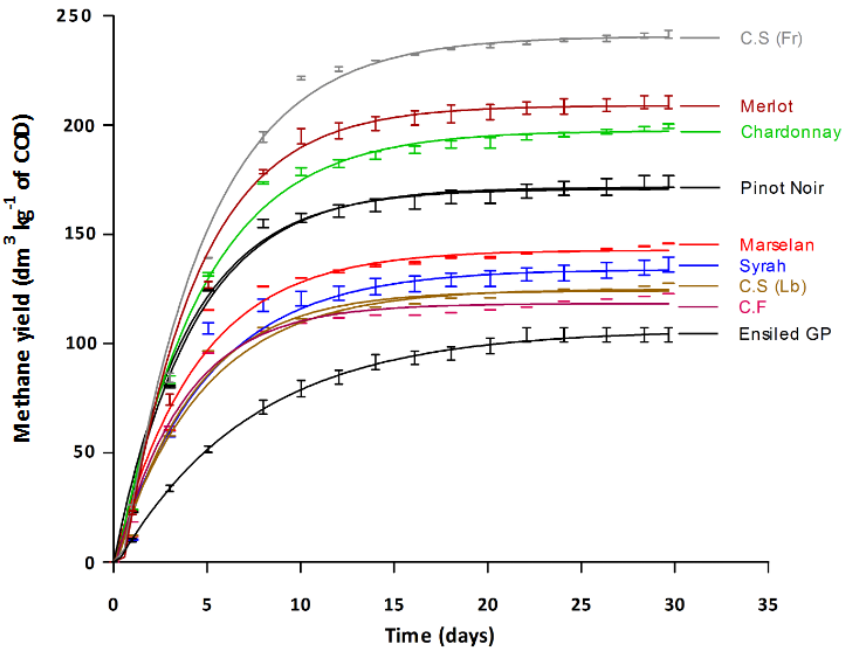

Figure 1: Cumulative methane production of the samples. Lines correspond to a first-order model and bars represent the average standard deviation of the experimental data.

Anaerobic biodegradability (BD) of substrates is presented in Figure 2. Differences can be observed between the biodegradability of the samples depending on the variety and the origin. It ranged from 29.7% for the ensiled GP to a maximum of 69.0% for the French GP variety Cabernet Sauvignon. From these results, it can be deduced that the tested GP contained a variable composition of biodegradable components which might be less or more accessible to anaerobic micro-organisms. This may be due to the structural characteristics of biochemical and lignocellulosic fractions contained in these samples.

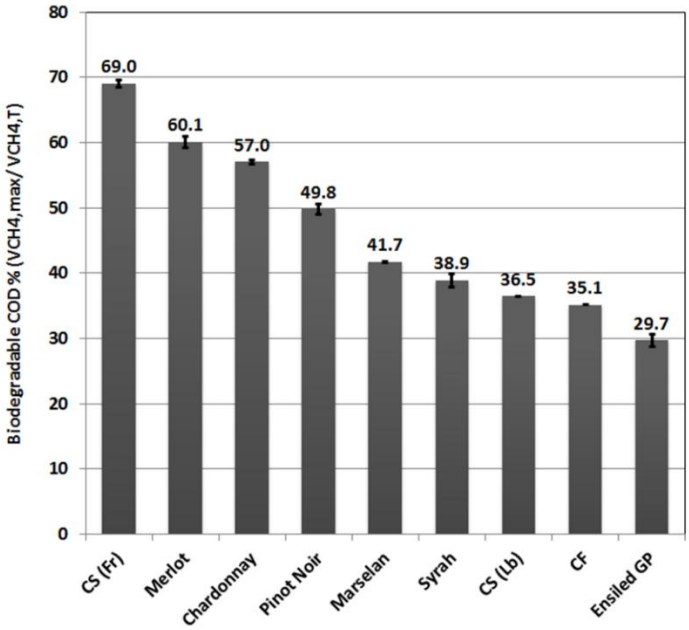

Figure 2: Anaerobic biodegradability of the GP varieties. Bars represent the average standard deviation. VCH_4, max: Maximum volume of methane at the end of test (dm^3 kg^{-1} of COD). VCH_4, T: Theoretical volume of methane = 350 dm^3 kg^{-1} of COD.

3.2. Kinetic study

Empirical linear and non-linear regression models were applied to characterize the AD performance. As no lag phase is present at the start of the experiments, a first-order kinetic equation for methane production was used to estimate the overall hydrolysis constant k (day^{-1}). The highest arithmetic mean k value was 0.2716 for Chardonnay variety, followed by 0.2565 for Merlot, 0.2494 for Syrah, 0.2470 for Marselan, 0.2434 for Pinot Noir, 0.2418 for Cabernet Sauvignon (Lb), 0.2384 for Cabernet Sauvignon (Fr), 0.2193 for Cabernet Franc and the lowest value 0.1337 day^{-1} was obtained for the ensiled GP (table 3). These results are in agreement with those found in a previous study showing that grape pulps (variety Cabernet Franc, 2013) have k values between 0.2329 and 0.2621 day^{-1} (El Achkar et al., 2016). High values of the coefficient of determination ($R^2 > 0.98$ in all cases) and small RMSPE values (1% to 5% of the

total methane production for each GP variety) were obtained. Kruskal-Wallis analysis revealed that there were no significant differences between the experimental and the estimated values; $p > 0.05$ in all cases (table 3). These observations indicate that the first-order kinetics model describes and fits the data well.

Table 3: Values of the kinetic constants (confidence interval of 95%), RMSPE values and Kruskal-Wallis test results for the different GP varieties.

Samples	C.S Fr (S1)	Merlot (S2)	Chardonnay (S3)	Pinot noir (S4)	Marselan (S5)	Syrah (S6)	C.S Lb (S7)	C.F (S8)	Ensiled GP (S9)
k: Methane production rate constant (day^{-1})	0.2313 to 0.2464	0.2495 to 0.2612	0.2645 to 0.2765	0.2364 to 0.2490	0.2323 to 0.2610	0.2349 to 0.2639	0.2321 to 0.2515	0.2095 to 0.2285	0.1295 to 0.1364
R^2	0.9914	0.9897	0.9937	0.9932	0.9803	0.9811	0.9868	0.9895	0.9986
RMSPE (dm^3)	7.8	7.0	4.9	4.4	6.4	7.1	4.5	3.7	1.3
Kruskal-Wallis test result: p-value (χ^2 test)	0.38 (14.0)	0.31 (14.0)	0.41 (11.5)	0.43 (10.1)	0.15 (13.5)	0.25 (14.9)	0.19 (13.8)	0.15 (13.5)	0.45 (14.0)

3.3. Determination of biochemical fractions

The valorization of vegetal biomass to methane as green energy requires a good knowledge of their biochemical composition and fiber content which affect their methane production. The main fiber fractions of the solid matter and the total polyphenol content of the nine GP varieties, in descending order of methane production based on TS introduced, are reported in Table 4. Major differences can be observed depending on the GP variety. Results shows that the soluble compounds represent the most abundant fraction in all deseeded GP with almost 588 $g \cdot kg^{-1}$ of TS in Cabernet Sauvignon (Fr) variety. There is an exception with the ensiled GP in which this fraction represents 182 $g \cdot kg^{-1}$ of TS. There was a loss of soluble compounds during the distillation process prior to the storage period. In addition, during GP ensilage, decrease of the soluble components is due to their fermentation by lactic acid bacteria that produce organic acids leading to a decrease in pH (Alipour and Rouzbehan, 2007). It is important to note that

ensiled GP has the lowest pH with a value of 3.2 while other varieties have pH values between 3.8 and 4.2 (data not shown).

Table 4: Biochemical composition of the GP varieties.

Samples	Soluble compounds ($g \cdot kg^{-1}$ of TS)	Hemicellulose ($g \cdot kg^{-1}$ of TS)	Cellulose ($g \cdot kg^{-1}$ of TS)	Lignin ($g \cdot kg^{-1}$ of TS)	Ash ($g \cdot kg^{-1}$ of TS)	Total Polyphenols ($g \cdot kg^{-1}$ of TS)	BMP ($dm^3\ kg^{-1}$ of TS)
C.S Fr (S1)	588 ± 7	41 ± 3	81 ± 2	131 ± 12	159 ± 3	17.3	296
Merlot (S2)	569 ± 7	65 ± 1	72 ± 3	132 ± 9	161 ± 2	21.4	300
Chardonnay (S3)	442 ± 7	55 ± 3	124 ± 2	144 ± 9	234 ± 3	2.1	277
Pinot noir (S4)	390 ± 7	43 ± 2	157 ± 1	188 ± 6	223 ± 2	7.8	255
Marselan (S5)	406 ± 2	58 ± 4	147 ± 4	191 ± 5	199 ± 1	21.0	212
Syrah (S6)	392 ± 2	51 ± 3	129 ± 4	180 ± 8	248 ± 1	18.5	192
C.S Lb (S7)	392 ± 10	55 ± 2	168 ± 18	207 ± 11	178 ± 1	14.7	191
C.F (S8)	374 ± 5	38 ± 3	172 ± 2	204 ± 7	211 ± 2	14.0	169
Ensiled GP (S9)	182 ± 11	12 ± 2	282 ± 5	311 ± 13	213 ± 3	3.9	102

Cellulose increased from about 81 $g \cdot kg^{-1}$ of TS to 282 $g \cdot kg^{-1}$ of TS with the decreasing of the methane yield, as well as lignin which increased from about 131 $g \cdot kg^{-1}$ of TS to 311 $g \cdot kg^{-1}$ of TS. No major differences were found between the hemicellulose fractions in the samples. Total polyphenol content varies between 2.1 $g \cdot kg^{-1}$ of TS for Chardonnay variety to 21.4 $g \cdot kg^{-1}$ of TS for Merlot variety. HPLC analysis showed different quantity of the three-main extracted phenolic compounds (rutin hydrate, quercetin and trans-cinnamic acid) for the different deseeded GP samples (table 5).

Table 5: Main phenolic content of the samples determined by HPLC.

Samples	Rutin hydrate ($mg\ kg^{-1}$ of TS)	Quercetin ($mg\ kg^{-1}$ of TS)	Trans-Cinnamic acid ($mg\ kg^{-1}$ of TS)
C.S Fr (S1)	732.0	12.1	Nd
Merlot (S2)	1218.3	27.4	347.9
Chardonnay (S3)	Nd	3.7	Nd
Pinot noir (S4)	233.9	9.0	Nd
Marselan (S5)	384.5	10.8	148.8
Syrah (S6)	442.9	21.1	100.3
C.S Lb (S7)	579.4	121.6	Nd
C.F (S8)	960.3	14.6	247.5
Ensiled GP (S9)	Nd	Nd	Nd

Nd: Not determined

As seen in Figure 3, the Pearson coefficient was found to correlate significantly and positively with the hemicellulose ($r = 0.663$, $p < 0.05$) and soluble compound fractions ($r = 0.913$, $p < 0.01$). However, it correlates significantly and negatively with cellulose ($r = -0.903$, $p < 0.01$) and lignin ($r = -0.931$, $p < 0.01$). No significant correlation was found between total polyphenol content and methane yield ($r = 0.248$). Likewise, the three-main extracted phenolic compounds did not show any significant correlations with methane production (data not shown).

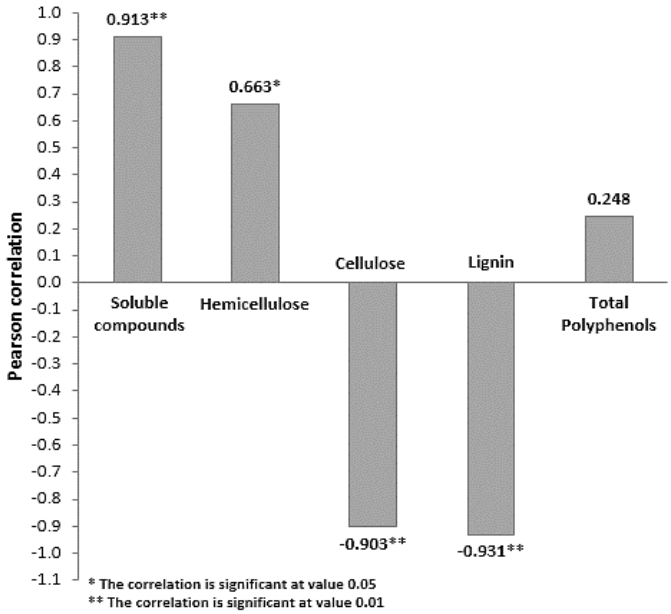

Figure 3: Pearson correlation between specific methane yield (dm^3 kg^{-1} of TS) and the main chemical biomass parameters

3.4. Principal component analysis

3.4.1 Analytical results

The ultimate dataset obtained for the deseeded GP varieties was analyzed through PCA in order to evaluate the quantitative and qualitative characteristics affecting the methane production and the biodegradability of the selected varieties. PCA is used for the description and the visualization of the samples in relation to the studied parameters: TS, VS, soluble compounds, hemicellulose, cellulose, lignin, total polyphenols, methane production rate constant and BMP based on TS introduced.

The data contains a large set of GP originating from different territories and environmental conditions. Having such a wide range of samples is essential to develop a statistical matrix. This is an important advantage since it permits a high significance of the principal components

leading to a high validity of the proposed approach. Another important criterion for having a reliable model is to have a low standard error due to the laboratory procedures. It is the case here since the results are collected from one study using the same protocols and materials for the various analyses. On the other hand, the consortium of microorganisms present in the inoculum and its characteristics are shown to affect significantly the methane yield in the AD process (Shi et al., 2014). Here, the same inoculum was used in the batch tests, so the possibility of being a source of comparison error has to be rejected.

The corresponding analysis defines the main components which are presented in Figure 4. Obtaining a minimum number of components that could explain most of the total variation in variables is the main objective of the test. In order to extend the representativeness of the statistical analysis, three main components PC1, PC2 and PC3 were selected by the Eigenvalue (> 1), which explained almost 95% of the variability of the data set (figure 4).

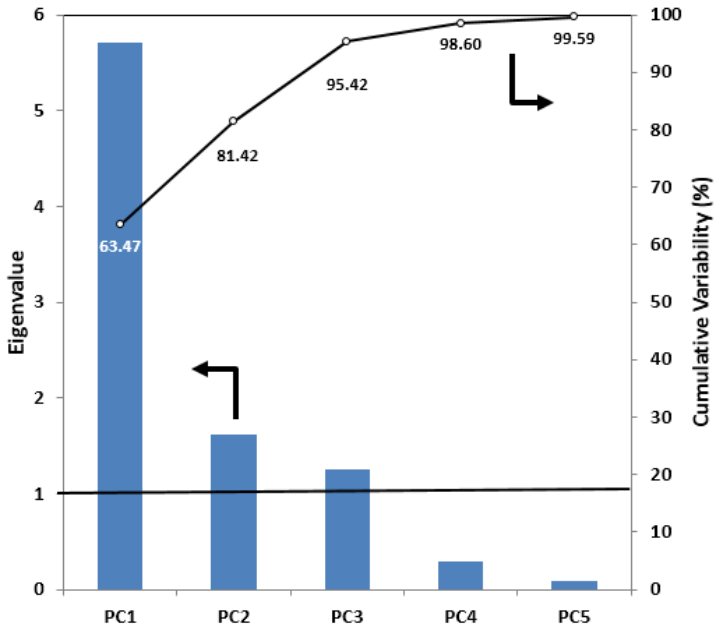

Figure 4: Results of the Principal Component Analysis (PCA) in main components.

The three PC equations are given below:

$$PC1 = 0.97\ k + 0.92\ \text{Hemicellulose} + 0.78\ \text{BMP} + 0.77\ \text{Solubles} + 0.45\ \text{Polyphenols} + 0.03\ \text{VS} - 0.18\ \text{TS} - 0.89\ \text{Cellulose} - 0.91\ \text{Lignin}$$

$$PC2 = -0.15\ k + 0.12\ \text{Hemicellulose} + 0.32\ \text{BMP} + 0.56\ \text{Solubles} + 0.62\ \text{Polyphenols} + 0.95\ \text{VS} - 0.11\ \text{TS} - 0.38\ \text{Cellulose} - 0.27\ \text{Lignin}$$

$$PC3 = 0.01\ k + 0.18\ \text{Hemicellulose} - 0.52\ \text{BMP} - 0.26\ \text{Solubles} + 0.59\ \text{Polyphenols} - 0.11\ \text{VS} + 0.96\ \text{TS} + 0.17\ \text{Cellulose} + 0.28\ \text{Lignin}$$

The plot of the loading of the variables established by the three principal components are represented in Figure 5. The first principle component expressed 63.5% of the overall variance. This component was associated to the parameters positioned close to both PC1 horizontal axis. These parameters were the hydrolysis constant (*k*), the hemicellulose fraction (*Hemicellulose*), the methane production (*BMP*) based on TS introduced and the soluble compounds fraction (*Solubles*) which were shown to be strongly correlated to each other and determinant to PC1 axis. The position of these parameters is opposed to the cellulose (*Cellulose*) and lignin (*Lignin*) fractions which overlapped, indicating that GP varieties with high soluble compounds, hemicellulose content and methane potential were generally poor in lignin and cellulose, and *vice versa*. Hydrolysis constant *k* is positioned near the hemicellulose and soluble components fractions in respect to PC1 axis showing that hydrolysis rate in AD is rather positively related to the soluble fraction and negatively affected by the presence of lignin and cellulose fractions which are located in the opposite side of the axis. Total polyphenols (*Polyphenols*), *TS* and *VS* did not show any clear correlation with respect to PC1.

In addition, it could be noticed that the three parameters (VS, total polyphenols and soluble components fraction) were determinant in the second principal component (PC2) which expressed 18% of the overall variance. The remaining parameters did not show any clear correlation with respect to PC2.

The plot of the samples scores established by principal components PC1 and PC2 are represented in Figure 6. The distribution of samples on the factorial plane described by PC1 x PC2 illustrates the heterogeneity of the nine substrates selected as part of this study. It clearly separated the GP varieties into many distinct categories. Axis PC1 expressed the opposition between two categories of samples. The first one includes the French GP originating from Bordeaux (S1) (S2) and Champagne (S3) (S4) against the ensiled GP (S9) which is distinguished by its extreme and unique profile. Cabernet Sauvignon (S1), Merlot (S2), Chardonnay (S3) and Pinot noir (S4) having the highest methane production as well as the highest fractions of soluble compounds were positioned in the right-hand side of the axis. However, the ensiled GP (S9) with the lowest biodegradability and the highest fractions of cellulose and lignin was on the left-hand side of PC1.

Most samples were distributed along PC2 Axis which distinguished mainly between the deseeded GP collected from Bordeaux (S1) and (S2) and the Chardonnay variety (S3). Cabernet Sauvignon (S1) and Merlot (S2) having higher volatile matter, soluble components fraction and total polyphenol content than the Chardonnay variety (S3). PC1/PC2 representation was poorly discriminant for the Lebanese varieties (S5), (S6) and (S7) and the Cabernet Franc collected from Layon (S8).

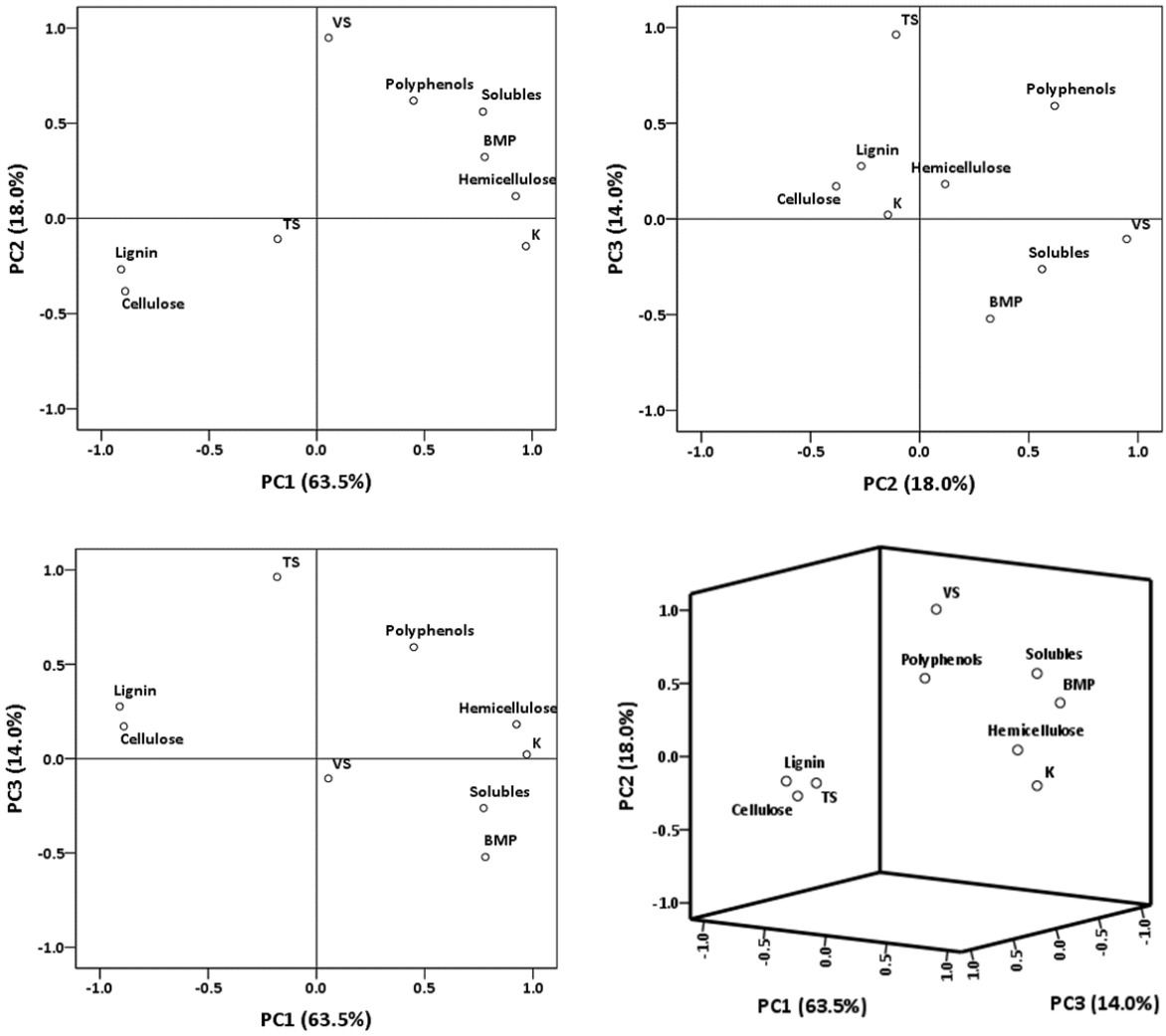

Figure 5: Plot of the loadings of the variables with principal components PC1×PC2, PC2×PC3, PC1×PC3 and PC1×PC2×PC3

Regarding the PC3 axis, it can be deduced that TS and total polyphenol content were its determinant parameters, expressing 14% of the overall variance of the data set. As seen in Figure 6, the Lebanese GP varieties (S5), (S6), and (S7), having the highest TS in the raw matter and a very high polyphenol content, constitutes a single group associated with PC3 axis in

opposition to the French varieties collected from Champagne and Bordeaux regions (S1), (S2), (S3) and (S4).

The figure PC1 x PC2 of the samples scores can distinguish four groups of samples (A, B, C, and D) (figure 6). The (PC2 x PC3) and (PC1 x PC3) representations show that the samples (S1) and (S2) in the group A, originating from Bordeaux region, must be considered as equivalent. In the group B, the samples (S3) and (S4) originating from Champagne region, should also be regarded as similar. The sample (S6) is plainly separated from both of these samples. Similarly, in the group C, it is possible to distinguish the sample (S8) from the samples (S5) and (S7) originating from Lebanon and which appear similar. Finally, the group D consists of a unique sample (S9) which can be distinguished directly from the other samples and groups. The four groups are clearly shown in the PC1 x PC2 x PC3 3D-figure.

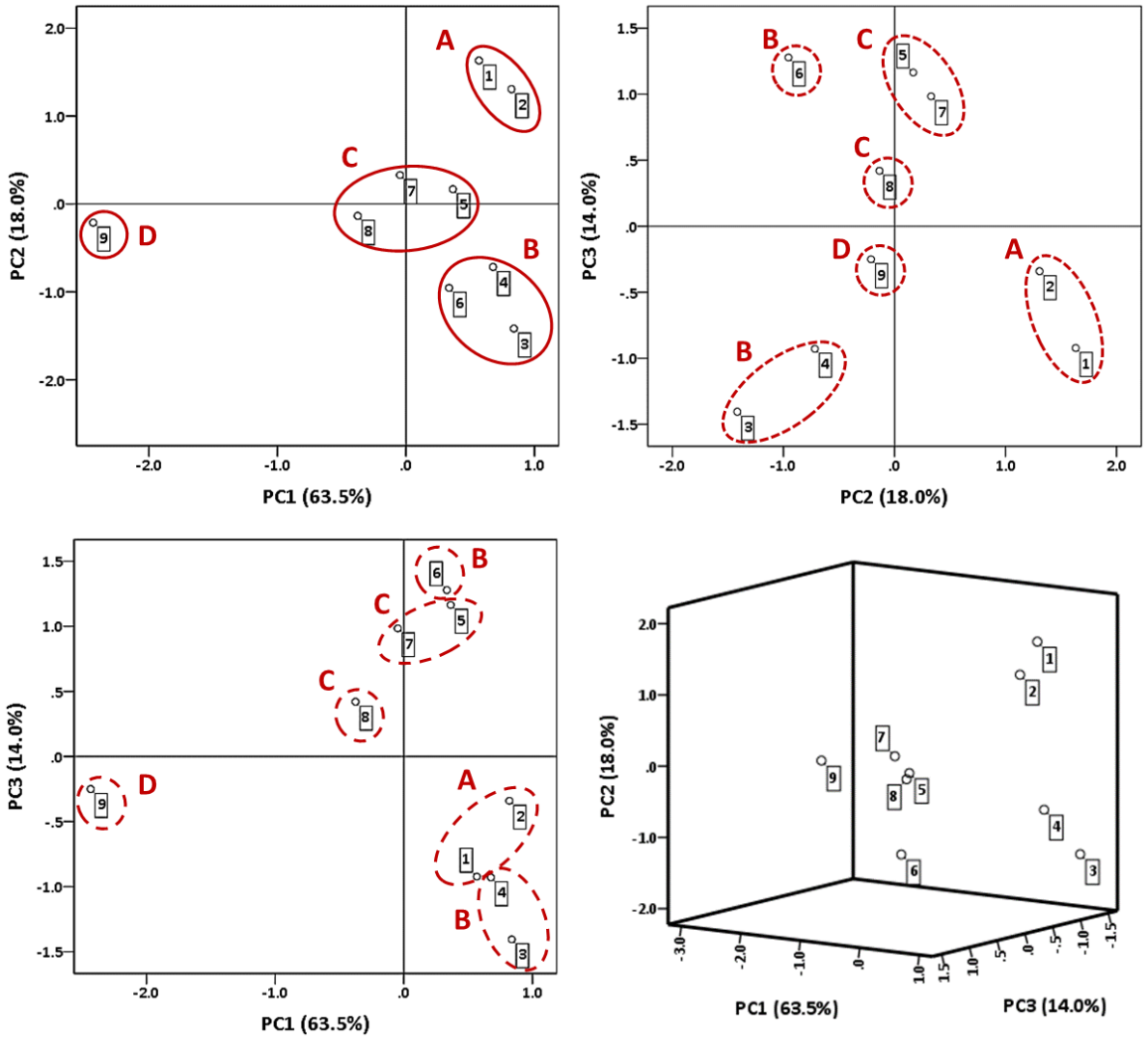

Figure 6: Plot of the samples scores with principal components PC1×PC2, PC2×PC3, PC1×PC3 and PC1×PC2×PC3

3.4.2 Discussion of PCA

These results demonstrate that lignin, cellulose, soluble compounds and hemicellulose fractions are the most relevant parameters to evaluate the methane production from GP. As described above, they explain almost 63.5% of the total variance. Many previous studies have reported that the lignin fraction is the most significant factor among all substrate characteristics (Liu et al., 2015; Xu et al., 2014). It is the most recalcitrant and the most resistant to microbial degradation and oxidation. Many papers have shown that cellulose is usually degradable under anaerobic conditions in its pure form (Carlsson et al., 2012). When combined with lignin, this latter seems to be an influent parameter to control its accessibility to hydrolytic enzymes and anaerobic micro-organisms preventing its degradation (Jimenez et al., 1990). On the other hand, the carbon in the soluble fraction and hemicellulose is easily available and thus readily degradable by the microorganisms (Mottet et al., 2010). The quite low anaerobic biodegradability of the GP which ranged from 30% to 69%, is likely due to the high amount of lignin and cellulose in the dry matter of the GP. Therefore, it can be concluded that GP pretreatment prior to AD is required to reduce the complexity of the lignocellulosic fractions and to alter the structural properties of lignin and cellulose. Consequently, development of innovative and low cost pretreatments methods is necessary in order to facilitate the microbial breakdown of the matter, to increase the GP degradation and so the methane yield.

In regards to phenolic compounds and TS content, results showed that they explain almost 14% of the total variance. Many studies have shown that there is no significant correlation between TS content in the GP matter and the methane production (Dinuccio et al., 2010). Polyphenols are generally known as inhibitors of AD systems by limiting the microorganism's activity as consequence of biostatic effects (Obied et al., 2013). Their prejudicial effects on anaerobic micro-organisms were observed in many anaerobic systems treating wine distillery wastewater (Camarillo and Rincón, 2009), olive mill wastes (Fezzani and Cheikh, 2007) and coal gasification wastewater (Wang and Han, 2012). A study investigating the methane production form several tropical tree leaves demonstrates that Pearson correlation coefficients between phenolic compounds and methane production of all leaves were not significant (Pal et al., 2015). This result is in agreement with the one found in our study ($r = 0.248$). Contrariwise, correlation coefficients were found significant in another study evaluating the dependence of the methane potential of tropical plants on their phenolic fractions (Jayanegara et al., 2011). A recent work aimed to investigate the effects of quercetin on AD of fruit waste with a focus on methane production and biogas composition. The results showed that its addition in the range of 0.5 –

5 kg m^3 reduced the methane production by 50 % (Wikandari et al., 2014). However, no significant correlation was found between quercetin and methane production of the different GP varieties in our study.

These contradictory observations may be explained by many reasons. The concentration of phenolic compounds in the medium was probably not critical to affect the methanogenic bacteria during the AD of GP. It was demonstrated that the successful anaerobic degradation likely depend on the concentrations of the phenolic content present and their bactericidal effects (Hierholtzer et al., 2013). Many studies suggest also that the strength of the inhibition or deactivation effect of the polyphenols is a function of their polymerization levels, the dominant microbial species found in anaerobic systems and the type of hydrolytic enzymes (Jayanegara et al., 2011; Ximenes et al., 2011). Besides, a study showed that more less is the content of lignocelluloses material, more high is the polyphenols effect on microorganism activity (Battista et al., 2014). The biochemical fractionation conducted in this study, demonstrates that GP is very rich in lignocellulosic materials (cellulose and lignin) which could potentially mitigate the inhibition effect caused by the polyphenols. Hence, polyphenols extraction before the AD process of GP does not seem to be elementary in order to improve the methane production.

On the other hand, it is worth noting that improvements of this statistical study may be possible if more variables and factors are available. Some abiotic and biotic factors such as particle size of the pulps, porosity, accessible surface area, moisture content, polymerization and crystallization of cellulose, microbial composition of inoculum, and so on were not considered and may have an impact on the methane production of the selected substrates (Shi et al., 2014; Zheng et al., 2014).

4. Conclusions

Anaerobic digestion is a potent biological process for the valorization of GP promoting the transition to renewable energy sources. The biochemical fractionation and methane production of different industrial GP varieties originating from French and Lebanese vineyards were evaluated. Statistical analyses showed that the AD process is highly dependent on grape varieties and biochemical fractions. The main correlations between methane yield and lignocellulosic fractions were reported. The effects of the most critical parameters, accounting for nearly 95% of the total variance of the data, have been fully reviewed. It can be concluded that GP pretreatment prior to AD is necessary to reduce the recalcitrance of the lignocellulosic

fractions particularly lignin and cellulose. The effects of various cost-effective and environmentally friendly pretreatments on anaerobic degradability of GP will therefore be investigated in future studies.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study demonstrating the influence of biochemical contents on methane potential of industrial GP contributing to green energy applications.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Research Council of Saint Joseph University of Beirut (Project FS66), The National Council for Scientific Research – Lebanon (CNRS-L), Arcenciel association and the French Institute in Lebanon for the financial support brought to the PhD work in the frame of which this study has been accomplished. We are also thankful to Yves Lemée, Sébastien Manteau, Dominique Birot and Paul Réthoré for providing the grape pomace and to Gael Le Noane for supplying the inoculum.

Chapitre V

Optimisation des paramètres opérationnels de la digestion anaérobie de marc de raisin

V. Chapitre V : Optimisation des paramètres opérationnels de la digestion anaérobie de marc de raisin

Nous avons déterminé, dans le chapitre 3, le potentiel méthane du marc de raisin dans un réacteur continu avec une charge organique de 2,5 kg DCO m^{-3} j^{-1} et un temps de séjour de 30 jours. Pour approfondir l'étude, l'objectif principal de ce chapitre est d'optimiser les paramètres opérationnels des digesteurs à l'interface TSH, charge organique et production de méthane. On cherche à déterminer si un temps de séjour inférieur à 30 jours serait suffisant ou non pour une digestion efficace du marc de raisin. L'ensemble de ces résultats a été rédigé sous forme d'un article intitulé « Continuous anaerobic digestion of grape pomace : Effect of the hydraulic retention time (HRT) on process performance and fibers degradability » qui sera prochainement soumis au journal « Waste Management ».

V.1. Avant-propos

A la lumière des travaux menés jusqu'à présent, l'étude de la digestion anaérobie du marc de raisin se baserait plutôt sur des résultats obtenus en mode batch et demeure un sujet à développer. Le domaine agricole impliquant souvent des procédés en mode continu, nous avons déterminé, dans le chapitre 3, le potentiel méthane du marc de raisin dans un réacteur continu parfaitement mélangé avec une charge organique appliquée (COA) de 2,5 kg DCO m^{-3} j^{-1} et un temps de séjour hydraulique (TSH) de 30 jours. Pour accomplir une étude plus approfondie, l'objectif principal de cette partie consiste à optimiser le fonctionnement à long terme des digesteurs anaérobies en mode continu en démontrant si un temps de séjour inférieur à 30 jours serait suffisant ou non pour une digestion efficace du marc de raisin. Il convient de noter que l'application d'un temps de séjour court minimise la durée du processus, réduit la taille des digesteurs et donc les coûts d'investissements des industriels.

Dans ce cadre, nous avons mené des expérimentations sur des digesteurs continus de 2 L et nous avons suivi les productions de méthane ainsi que les paramètres physico-chimiques correspondant. Les digesteurs ont été alimentés par des échantillons homogènes de marc de raisin de cépage « Chenin blanc », préalablement broyés et congelés à -20 °C. Les digesteurs (1) et (2) ont été opérés sous un TSH de 30 jours, (3) et (4) sous 20 jours, (5) et (6) sous 15 jours et (7) et (8) sous un TSH de 10 jours, visant des charges organiques finales de 2,5, 3,7, 5,7 et 7,3 kg DCO m^{-3} j^{-1}, respectivement. Afin d'aboutir à des conditions stables, il est nécessaire de considérer, à la charge finale, une durée de fonctionnement égale à 3 fois le temps

de séjour.

Pour les digesteurs (1) et (2), opérant sous TSH de 30 jours, la période d'équilibre a été caractérisée par une production de méthane de 0,984 ± 0,013 NL j^{-1} avec une biodégradabilité anaérobie de 56,0%. Le ratio AVT/alcalinité est passé de 0,03 à 0,09 témoignant de la stabilité du système. Pour les digesteurs (3) et (4), opérant sous TSH de 20 jours, une production de méthane de 1,362 ± 0.018 NL j^{-1} correspondant à une biodégradabilité anaérobie de 52,6% a été enregistrée pour une COA de 3,7 kg DCO m^{-3} j^{-1}. Le ratio AVT/alcalinité affiche une valeur de 0,13 à la fin des expérimentations attestant la stabilité du procédé. En outre, le pH auto-régulé dans ces 4 digesteurs indique qu'ils fonctionnent tous dans des conditions tolérables pour la production de méthane et ne se trouvent pas dans des conditions inhibitrices. Après une période égale à trois fois le temps de séjour, le fractionnement de Van-Soest a été réalisé sur les digestats pour évaluer la biodégradabilité des fibres lignocellulosiques et comparer les rendements de réduction en hémicellulose, cellulose et lignine, en fonction des différents temps de séjours. Pour l'ensemble de ces digesteurs, environ 71% de l'hémicellulose et 13% de la cellulose ont été dégradées. Par contre, aucune réduction significative de la teneur en lignine n'a été observée.

Pour les digesteurs (5) et (6), opérant sous un TSH constant de 15 jours, le potentiel méthane a atteint une valeur moyenne de 1,850 ± 0,013 NL j^{-1} avec une biodégradabilité anaérobie de 45,2%. Les valeurs de pH ont diminué en dessous de 7 ; la neutralisation du milieu a été alors nécessaire pour éviter l'échec du système par acidification. D'autre part, le ratio AVT/alcalinité a augmenté jusqu'à 0,29 à la fin des essais avec une tendance à la hausse, indiquant que le système est soumis à des conditions non optimales pouvant conduire à un dysfonctionnement à long terme. L'analyse du digestat a montré des taux de réduction de 53,5% et 6,9% pour l'hémicellulose et la cellulose, respectivement.

Dans les digesteurs (7) et (8) où un TSH de 10 jours est appliqué, le système a été incapable de neutraliser l'accumulation d'acides volatils en raison du faible pouvoir tampon et de la baisse drastique du pH. Par la suite, sous une COA de 4,7 kg DCO m^{-3} j^{-1}, la production de méthane a diminué progressivement jusqu'à arrêt total au jour 90, enregistrant des valeurs éminentes du ratio AVT/alcalinité allant jusqu'à 9,6. Ainsi, l'effondrement des digesteurs est dû au lessivage bactérien. Le TSH de 10 jours a été vraisemblablement inférieur à la durée du cycle de croissance des microorganismes, en particulier les méthanogènes, ce qui a entraîné leur drainage progressif du milieu.

Somme toute, le graphique ci-dessous récapitule les résultats obtenus et permet de référencer une zone optimale pour un pilotage simple et non critique des digesteurs. A savoir, retrouver les conditions qui permettent à la fois d'assurer un taux de dégradation optimal de la matière première et une productivité optimale de méthane.

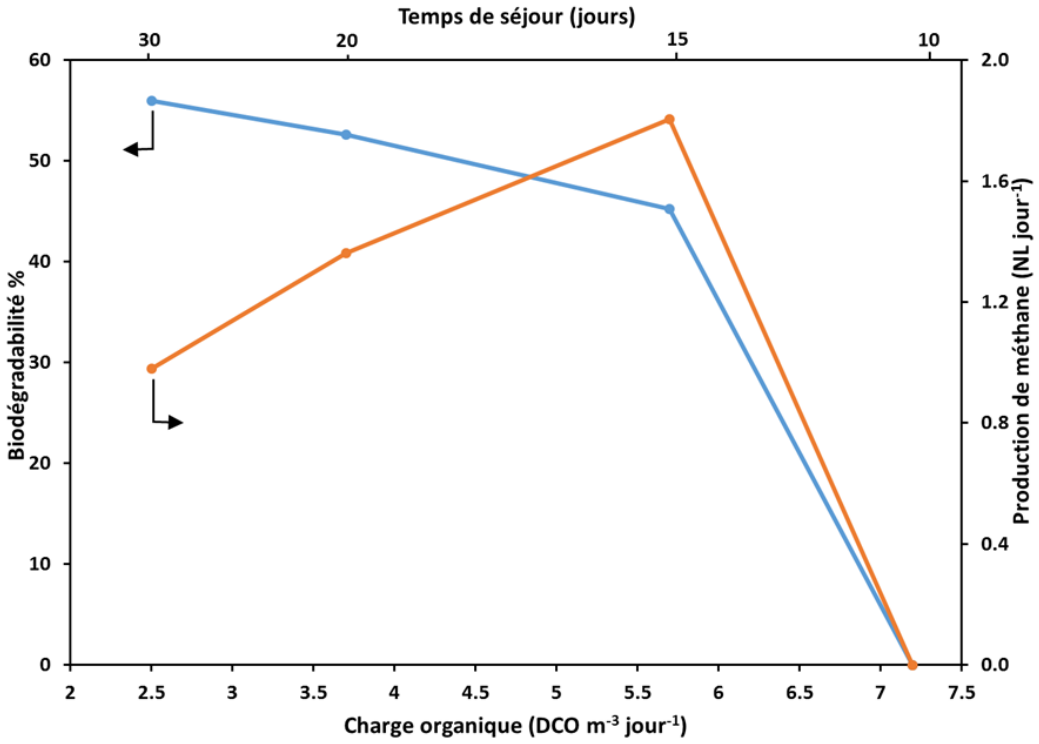

Figure V. 1 : Courbe expérimentale établissant la relation entre la charge organique appliquée, la production de méthane et le taux de dégradation lors de la digestion anaérobie du marc raisin

En conclusion, les différentes expérimentations de digestion anaérobie du marc de raisin menées pendant 6 mois nous ont permis de développer une approche scientifique en accord avec la réalité industrielle, élevant différents points. Nous avons réussi à définir un optimum de fonctionnement des digesteurs pour une charge appliquée de 3,7 kg DCO m^{-3} j^{-1}, soit 20 jours de temps de séjour. Sous ces conditions, notre substrat constitue une excellente matrice pour la digestion anaérobie ; le bon fonctionnement du procédé se traduit par un fort pouvoir tampon, sans correction de pH, ainsi que par des réactions stables sans accumulation d'acides volatils. Nous contribuons ainsi à une meilleure compréhension du déroulement de la digestion anaérobie du marc de raisin en continu ainsi qu'à l'optimisation de la conception et du dimensionnement des digesteurs industriels.

V.2. Full paper: "Continuous anaerobic digestion of grape pomace: Effect of the hydraulic retention time (HRT) on process performance and fibers degradability"

Continuous anaerobic digestion of grape pomace: Effect of the hydraulic retention time (HRT) on process performance and fibers degradability

Jean H. El Achkar[1,2], Thomas Lendormi[1], Zeina Hobaika[2], Dominique Salameh[2], Nicolas Louka[2], Richard G. Maroun[2], Jean-Louis Lanoisellé[1]

(1) Univ. Bretagne Sud, FRE CNRS 3744, IRDL, F-56300 Pontivy, France

(2) Centre d'Analyses et de Recherches, Unité de recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, Beirut, Lebanon

Abstract

In order to optimize the anaerobic digestion of grape pomace under mesophilic conditions, continuous digesters were operated at different hydraulic retention times (30, 20, 15 and 10 days) equivalent to OLRs of 2.5, 3.7 and 5.7 and 7.3 kg COD m^{-3} d^{-1}, respectively. At HRT of 30 and 20 days, steady state conditions were observed with methane yields of 0.984 ± 0.013 NL d^{-1} and 1.362 ± 0.018 NL d^{-1} for OLR of 2.5 kg COD m^{-3} d^{-1} and 3.7 kg COD m^{-3} d^{-1}, respectively. The HRT of 15 days was found critical because of acids accumulation throughout the experiments. When the OLR of 5.7 kg COD m^{-3} d^{-1} was reached, methane production was instable and decreased to a final value of 1.850 ± 0.013 NL d^{-1}. Finally, at HRT of 10 days, a failure of the system was observed due to the washing of the methanogenic microorganisms. Regarding the degradability of the lignocellulosic fractions, the maximum reduction yields for hemicellulose and cellulose were observed at HRTs of 30 days and 20 days while lignin was not degraded. For the best optimization of the process, HRT of 20 days can therefore be recommended for productive use in large-scale applications.

1. Introduction

Anaerobic digestion (AD) experiments in continuous mode, are long and complex, so that the great majority of studies are based on the results of batch tests (Barbanti et al., 2014; Kafle and Chen, 2016; Pellera et al., 2016). These tests, although valuable for determining the maximal methane production of a substrate under specific conditions, may not accurately predict the performance of large-scale anaerobic digesters, due to their dependence on the inoculum type,

the substrate to inoculum ratio and the experimental method used (Holliger et al., 2016). Moreover, it is complicated to monitor the physicochemical parameters affecting process stability, or to determine the lignocellulosic fractions biodegradability. Therefore, continuous digesters are required to evaluate and quantify the effect of a specific substrate and selected operating conditions on AD to the best optimization of the process (Carrère et al., 2010; Pokój et al., 2015).

A series of operating parameters including pH, temperature, digester configuration, Organic Loading Rate (OLR) and Hydraulic Retention Time (HRT) have been investigated due to their effect on digesters performance and methane production (Dareioti and Kornaros, 2014; Mariakakis et al., 2011; Nasir et al., 2012; Rincón et al., 2008; Torkian et al., 2003). Among them, HRT has been reported as one of the most important parameters significantly affecting microbial ecology in continuous digesters and thus must be optimized.

The HRT is the average time an input organic matter stays inside the digester before it comes out. Based on different literature studies, it has been shown that HRT of 30 days is usually used to evaluate the AD of many agro-industrial wastes in continuous mode (Kafle and Kim, 2013; Ruffino et al., 2015). The longer a substrate is kept in the digester, the more complete its degradation will become. The disadvantage of a longer HRT is that a large digester size is needed for a given amount of substrate. Although a shorter retention time is essential for reducing the digester volume, a compromise must be considered in order to maximize the methane production and to prevent the inhibition or failure of the system.

The OLR is the amount of digestible material that is fed to the digester, in kg COD per m^3 digester and day. A high load enables high microorganism growth and high biogas production, but it also puts pressure on the microorganisms and can lead to process collapse due to acid accumulation, during the acidogenesis stage. To maximize the production of biogas while maintaining stability in the digester, a study suggested that the organic load must be a wide operating range which can vary between 0.25 and 3 kg COD m^{-3} d^{-1} (Rajeshwari et al., 2000). However, other literature studies have shown that it is possible to operate digesters with higher applied OLR such as 5 kg COD m^{-3} d^{-1} (Ruiz et al., 1997), 11 kg COD m^{-3} d^{-1} (Sayed and De Zeeuw, 1988), 17 kg COD m^{-3} d^{-1} (Borja et al., 1994) and up to 21 kg COD m^{-3} d^{-1} (Patel and Madamwar, 2002).

To our best knowledge, the research papers evaluating the AD of grape pomace (GP) are only based on the results of batch tests (Caramiello et al., 2013; Dinuccio et al., 2010; Fabbri et al.,

2015). In a previous study, we have determined the methane potential of GP in a Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR) with an OLR of 2.5 kg COD·m^3·d^{-1} and a HRT of 30 days (El Achkar et al., 2016). Here, we investigate the optimization of the long-term operation of mesophilic and continuous anaerobic digesters treating GP. Our main purpose is to check whether a residence time of less than 30 days is adequate or not for a sufficient digestion of the GP to better process optimization. Consequently, continuous digesters were operated at different HRTs (30, 20, 15 and 10 days) equivalent to final OLRs of 2.5, 3.7 and 5.7 and 7.3 kg COD m^{-3} d^{-1}, respectively. In addition, at the end of the experiments, the effects of HRT on the biodegradability of the main lignocellulosic components (hemicellulose, cellulose and lignin) were measured.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The GP variety "Chenin blanc", was obtained from a wine company (Domaine Des Acacias, Layon, France, 47° 12' 25.949'' N 0° 25' 51.392'' W). The grapes were carefully harvested at maturity during the 2015 vintage and fresh samples of GP were collected immediately after the pressing operation and transported to the laboratory. On arrival, the stalks fragments were removed and the raw material was stored at -20 °C until utilization. An active inoculum was collected from the digester of the waste-water treatment plant of Saint-Brieuc city in France. The particulate matter (> 500 mm) was removed from the inoculum by passing through sieve.

2.2. Analysis

Total Solids (TS) content were determined by dry weight in oven at 105 °C until constant weight. Afterwards, Volatile Solids (VS) were determined in a muffle furnace after 4 hours at 550 °C. Total Chemical Oxygen Demand (COD) was measured using Merck COD Spectroquant® test, range 500-10,000 mg·L^{-1}, and by a spectrophotometer NOVA 60 (Merck, Germany). After 2 hours at 150 °C, it was considered that all organic matter is oxidized by the hot sulfuric solution of potassium dichromate.

2.3. Van-Soest fractionation

The structural polysaccharides and lignin fractions were determined using the method of Van-Soest (Mertens, 2002; Van Soest et al., 1991). The total soluble compounds were extracted with a neutral detergent solution, acting on the sample for 1 hour at 100 °C. This solution consists

of Na_2HPO_4, sodium tetraborate, α-amylase, sodium EDTA, sodium lauryl sulfate and sodium sulfite. The extracted fraction was separated from the insoluble neutral detergent fibers by filtration. Then, hemicellulose was extracted by an acid detergent solution (cetyltrimethylammonium bromide 20 kg m^{-3}, 98 kg m^{-3} of H_2SO_4) acting for 1 hour at 100 °C. This fraction was separated from the insoluble acid detergent fiber by filtration. Cellulose was extracted after a treatment with 1317 kg m^{-3} of H_2SO_4 for 3 hours at ambient temperature (20 ± 1 °C). The filtration residue corresponds to the lignin associated with the inorganic material. Lignin fraction is thus determined in a muffle furnace after 4 hours at 550 °C.

The reduction yields of hemicellulose, cellulose and lignin in the digesters were calculated according to the following equation (Bayr and Rintala, 2012):

$$\text{Reduction yield (\%)} = \frac{\text{Amount in the feed} - \text{Amount in the digestate}}{\text{Amount in the feed}} \times 100$$

2.4. Methane production in continuous mode

The system for measuring methane production in continuous mode consists of three main units. The incubation unit is a thermostatic water bath (37 °C) which contains eight digesters of 2 L (Bioprocess Control, Lund, Sweden). Each digester is equipped with two sealable tubes; the first one for drawing off the digestate and the second for supplying the GP. Digesters were stirred manually for one minute, twice a day, to ensure adequate mixing. The biogas produced passes through a tube connecting the incubation unit to the CO_2 fixing unit (6 M NaOH solution). Thus, the CH_4 released from this unit was measured with a gas meter (Type MGC-1 PMMA, Ritter, Germany) with a measurement range between 1 mL h^{-1} to 1 L h^{-1}.

For the feed preparation, water was added to GP in order to reach a final concentration of 0.25 kg GP · kg^{-1}. This set was grinded using a blender (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, USA) for 10 minutes, with a speed of 22,000 rpm. In all digesters, the same GP dilution ratio (1:8) was used as done in our previous study (El Achkar et al., 2016), despite the different feeding rate which were related to the applied HRT. Therefore, the comparison of the results obtained in the different digesters was achievable.

The dry part of the GP mostly consists of fibers that are almost resistant to anaerobic degradation. Therefore, to treat such complex lignocellulosic substrate, a gradual and slow OLR increase should be adopted to provide sufficient time to microorganisms for adaptation to the

new OLR (Aboudi et al., 2016). Consequently, the OLR in this study was accompanied by a 25% increase in the load compared to the previous one. This strategy is similar to one previously described (Guillaume and Lendormi, 2015). Thus, the applied OLR were 1.5, 1.9, 2.3, 2.9, 3.7, 4.6, 5.7 and 7.3 COD m^{-3} d^{-1}, corresponding to stages I, II, III, IV, V, VI, VII and VIII, respectively. It should be noted that digesters (1) and (2) operated under the HRT of 30 days, targeted a final OLR of 2.5 COD m^{-3} d^{-1}, in order to compare the results to our previous study evaluating the AD of GP using the same HRT and OLR in a continuous stirred tank reactor (CSTR) (El Achkar et al., 2016).

Subsequently, a period of minimum one week consists of the real seizure of daily methane production, which must be significantly stable to carry out a new increase in the load. Feeding and draining operations were performed daily using HRTs of 30 days, 20 days, 15 days and 10 days targeting final OLRs of 2.5 kg COD m^{-3} d^{-1}, 3.7 kg COD m^{-3} d^{-1}, 5.7 kg COD m^{-3} d^{-1} and 7.3 kg COD m^{-3} d^{-1}, respectively.

Digesters (1) and (2) were operated under HRT of 30 days, (3) and (4) under HRT of 20 days, (5) and (6) under HRT of 15 days and digesters (7) and (8) under HRT of 10 days.

The detailed operating conditions are presented in Table 2.

The digesters were maintained at the final OLR for a minimum equivalent time to three HRT, to record stability in methane production and physicochemical parameters reaching steady-state conditions (Aboudi et al., 2015; Murto et al., 2004). The anaerobic biodegradability (%) was calculated by dividing the experimental volume of methane produced by the theoretical volume, given that one kg of COD can produce 0.35 Nm^3 of methane.

For the process monitoring, the measurements of the pH, the alkalinity and the total volatile acidity (TVA) in the digesters were carried out as described in a previous paper (El Achkar et al., 2016).

3. Results and discussion

The physicochemical characteristics and the lignocellulosic fractions of the GP and the inoculum used in the experiments are presented in Table 1.

Table 1: Biochemical composition and physicochemical characteristics of the GP and the inoculum used in the experiments. Values correspond to the mean ± standard deviation of the measurement.

Parameters	Units	Grape Pomace	Inoculum
Total Solids	$g \cdot kg^{-1}$	454 ± 14	56 ± 3
Volatile Solids	$g \cdot kg^{-1}$	350 ± 10	35 ± 4
Chemical Oxygen Demand	$g\ O_2 \cdot kg^{-1}$	610 ± 20	52.1 ± 0.1
Hemicellulose	$g \cdot kg^{-1}$	54 ± 2	4 ± 1
Cellulose	$g \cdot kg^{-1}$	150 ± 6	11 ± 1
Lignin	$g \cdot kg^{-1}$	190 ± 8	15 ± 1
Alkalinity	$g\ eq.\ CaCO_3 \cdot L^{-1}$	0.10	3.90
Total Volatile Acidity	$g\ eq.\ CH_3COOH \cdot L^{-1}$	1.10	0.12

3.1. Effects of HRTs on methane production and process stability

For digesters 1 and 2, operated under constant HRT of 30 days, OLR was increased stepwise from stage I (OLR of 1.5 kg COD m^{-3} d^{-1}) to stage V targeting an OLR of 2.5 kg COD m^{-3} d^{-1} (Figure 1, A). Thirty-three days of starting-up were necessary to reach this OLR. Once attained, the digesters were monitored for 90 days to achieve steady state conditions. The mean methane production registered in each stage are presented in Table 2. The steady state period was characterized by a methane production of 0.984 ± 0.013 NL d^{-1} with an anaerobic biodegradability of 56.0%.

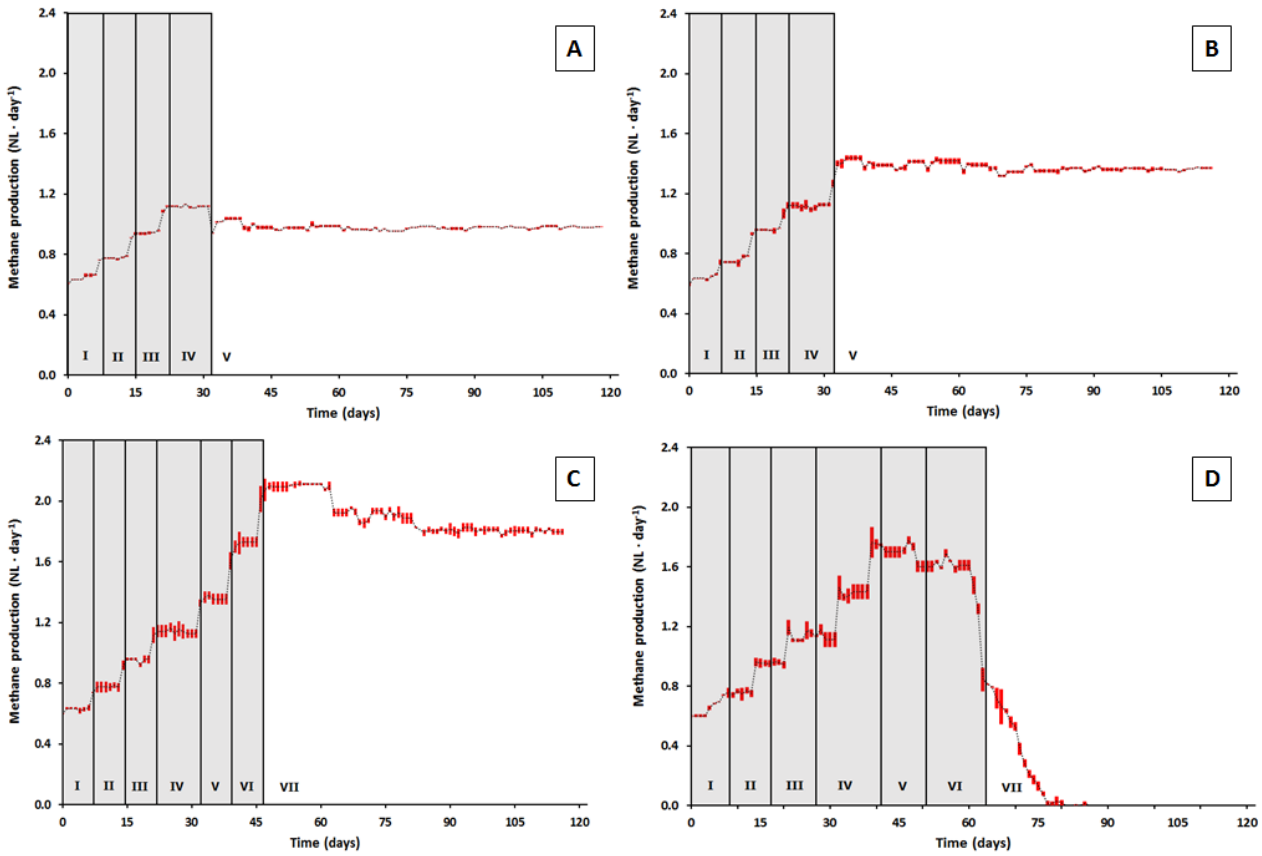

Figure 1: Average daily methane productions in digesters operating at HRT of 30 days (A), 20 days (B), 15 days (C) and 10 days (D). Red bars represent the standard deviation of the mean.

The mean pH of the medium was almost stable (7.30 ± 0.05) without any adjustment throughout the study. According to Figure 2, the alkalinity decreased from 3.9 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ at the start-up to 3.1 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ at the end. This parameter must be maintained above 2 g $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ to avoid drastic drops in pH. Total Volatile Acidity (TVA) increased from 0.12 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ to 0.28 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$, after 120 days of the digestion. TVA has been found to be a very good indicator of the metabolic status of an anaerobic degradation process (Björnsson et al., 2000; Cobb and Hill, 1991). For a successful AD process, the concentration of TVA, especially acetic acid, must be less than 2 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ to prevent the inhibition of the methanogenic bacteria (Yadvika et al., 2004). One of the criteria for confirming the digesters stability is the TVA/alkalinity ratio; at these operating conditions, it increased slowly from 0.03 to 0.09 (Figure 6). This ratio testified to the stability of the system, with the reported normal ratio being below than 0.4 (Callaghan et al., 2002).

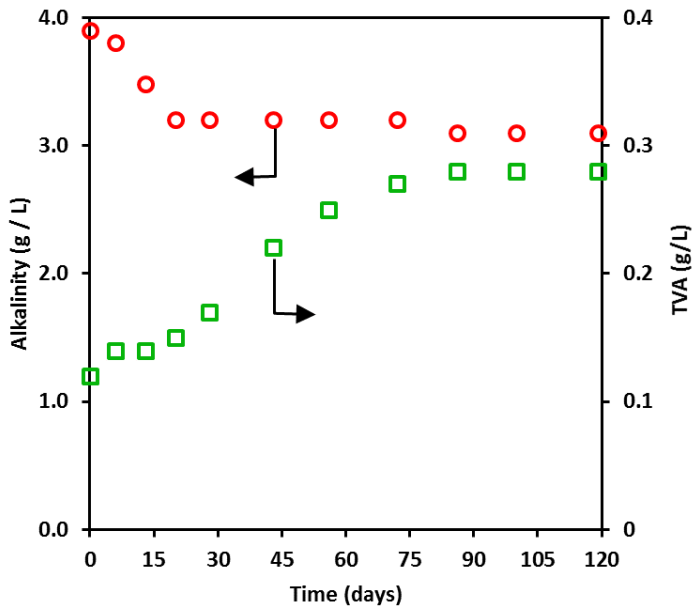

Figure 2: Evolution of alkalinity and TVA in digesters (1) and (2) operated at a HRT of 30 days. Values correspond to the mean of the measurement.

In this present study, methane production per one litter of digester was 0.49 NL·d^{-1}, against a value of 0.34 NL·d^{-1} recorded in our previous study treating GP variety "Cabernet Franc" under the same conditions (El Achkar et al., 2016). One should note that this variety is different from the "Chenin blanc" used here, regarding the physicochemical characteristics and the lignocellulosic composition. The variability observed in the methane production is most likely due to this.

Table 2: Operating parameters and conditions of the different anaerobic digesters. Values of the methane productions correspond to the mean ± standard deviation of the measurement performed in duplicate.

Digesters	Phase	Days of operation	GP dilution ratio	HRT (d)	Feeding rate (L d^{-1})	OLR (COD m^{-3} d^{-1})	Methane production (NL d^{-1})
1 and 2	I	0–7	1:8	30	0.07	1.5	0.643 ± 0.006
	II	8–15				1.9	0.777 ± 0.005
	III	16–22				2.3	0.939 ± 0.006
	IV	23–31				2.9	1.115 ± 0.005
	V	32–120				2.5	0.984 ± 0.013
3 and 4	I	0–7	1:8	20	0.10	1.5	0.635 ± 0.005
	II	8–15				1.9	0.754 ± 0.011
	III	16–22				2.3	0.948 ± 0.007
	IV	23–31				2.9	1.113 ± 0.021
	V	32–120				3.7	1.362 ± 0.018
5 and 6	I	0–7	1:8	15	0.13	1.5	0.628 ± 0.011
	II	8–15				1.9	0.772 ± 0.026
	III	16–22				2.3	0.947 ± 0.018
	IV	23–32				2.9	1.136 ± 0.042
	V	33–39				3.7	1.355 ± 0.034
	VI	40–47				4.7	1.706 ± 0.043
	VII	48–120				5.7	1.850 ± 0.013
7 and 8	I	0–7	1:8	10	0.20	1.5	0.635 ± 0.007
	II	8–15				1.9	0.754 ± 0.023
	III	16–22				2.3	0.956 ± 0.025
	IV	23–32				2.9	1.137 ± 0.033
	V	33–39				3.7	1.387 ± 0.051
	VI	40–47				4.7	1.722 ± 0.042
	VII	48–90				5.7	0
	VIII	–				7.3	Not attained

For digesters 3 and 4, operated under constant HRT of 20 days, OLR was increasing gradually from stage I (OLR of 1.5 kg COD m^{-3} d^{-1}) to stage V with a targeted OLR of 3.7 kg COD m^{-3} d^{-1} (Table 2). Thirty-three days of starting-up were necessary to reach this OLR. Once attained, the digesters were followed for 90 days to achieve steady state conditions (Figure 1, B). The steady state period was characterized by a methane production of 1.362 ± 0.018 Nm^3 d^{-1} with an anaerobic biodegradability of 52.6%.

The pH levels (7.20 ± 0.1) were self-maintained during the experiments without any adjustment. This pH stability and regulation by the system itself indicated that the digesters were working under tolerable conditions for methane production and were not under inhibitory conditions despite of increasing OLR. According to Figure 3, the alkalinity decreased from 3.9

g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ at the start-up to 2.7 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ at the end. The buffering capacity of the system (alkalinity > 2 g $CaCO_3 \cdot L^{-1}$) was thus good enough to maintain stable conditions in the digesters. TVA increased from 0.12 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ to 0.34 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ at the end of the digestion. TVA/alkalinity ratio was staying in acceptable values, ranging from 0.03 to 0.13, which were far below than the suggested failure limits values (Figure 6). This indicates that acidogenic, acetogenic and methanogenic microorganisms were balanced under the selected conditions (Ahring et al., 1995; Vavilin et al., 1997).

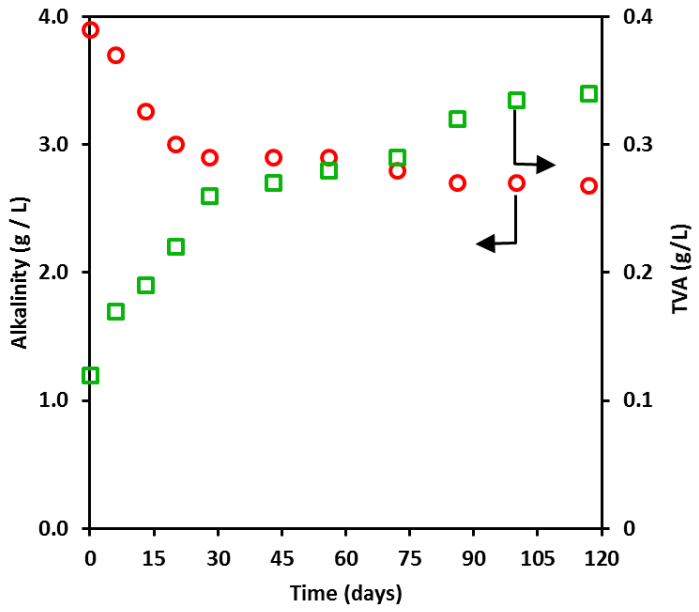

Figure 3: Evolution of alkalinity and TVA in digesters (3) and (4) operated at a HRT of 20 days. Values correspond to the mean of the measurement.

For digesters 5 and 6, operated under constant HRT of 15 days, OLR was increasing gradually to stage VII targeting 5.7 kg COD m^{-3} d^{-1} (Figure 1, C). Forty-seven days of starting-up were necessary to reach this OLR. Once attained, the digesters were followed for 70 days. The mean methane productions registered in each stage are presented in Table 2. At the beginning of stage VII, the methane production was stable for 15 days with a mean value of 2.080 ± 0.025 Nm^3 d^{-1}. Afterwards, at day 63, methane yield decreased to attain a mean value of 1.850 ± 0.013 Nm^3 d^{-1} for the last 30 days, with an anaerobic biodegradability of 45.2%.

At the beginning of the stage IV, pH values decreased below 7. A correction of pH by adding an alkali (NaOH, 6 M) was then necessary to avoid the failure of the system by acidification. Thereafter, the pH gradually increased to 7.1-7.2. The pH correction strategy was used when the digesters medium had a pH of less than 7, especially when increasing the OLR to ensure

optimum conditions for the microbial growth (Brooks et al., 2008; Cysneiros et al., 2012). According to Figure 4, the alkalinity decreased from 3.9 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ at the start-up to 1.5 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ at the end of the experiments highlighting the low buffering capacity of the system (alkalinity < 2 g $CaCO_3 \cdot L^{-1}$). In comparison with HRT 30 and 20 days, higher values of TVA were observed in this period. In fact, TVA increased from 0.12 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ to 0.43 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ at the end of the digestion. This increase agrees with the decrease of pH mentioned before. On the other hand, as shown in Figure 6, the ratio TVA/Alkalinity increased from 0.03 to 0.29 at the end of the experiments. The final value recorded is not that far below the safety threshold-value of 0.4, indicating that the system is not inhibited and still tolerates the OLR of 5.7 COD m^{-3} d^{-1}. On the other hand, it should be noted that the ratio curve shows a marginal upward trend, indicating that the system is subject to non-optimal operating conditions which can lead to a long-term system failure.

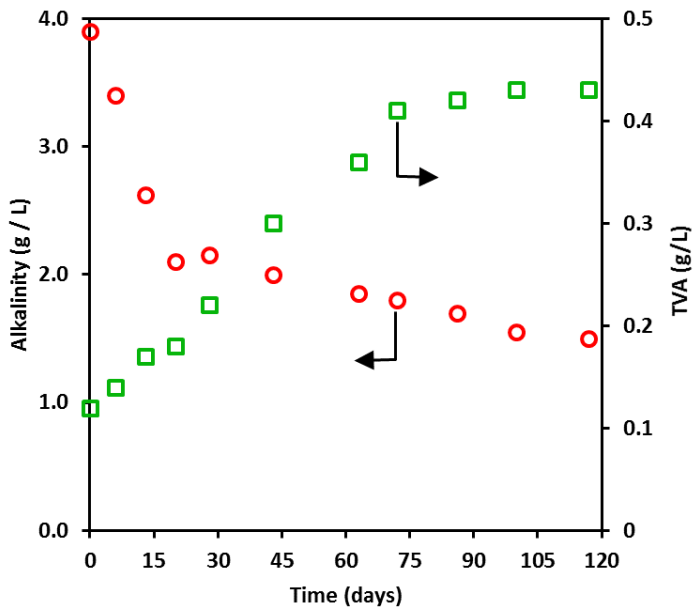

Figure 4: Evolution of alkalinity and TVA in digesters (5) and (6) operated at a HRT of 15 days. Values correspond to the mean of the measurement.

For digesters 7 and 8, operated under constant HRT of 10 days, OLR was planned to target 7.3 kg COD m^{-3} d^{-1} at the VIII. The mean methane productions recorded in each stage are presented in Table 2. A strong decrease in the pH value from 7 to 6.6 was observed since day 50 after increasing the OLR to 5.7 kg COD m^{-3} d^{-1} (stage VII) despite the daily corrections of pH. The digesters operation was affected by a decrease in methane production to mean value of 1.630 ± 0.023 Nm^3 d^{-1} and high levels of volatile acids accumulation attaining 0.67

g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ at day 65 (Figures 1D and 5). The acidification of the system was related to the low buffering capacity inside the digesters where alkalinity of the medium has recorded a low value of 1 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$. Consequently, the system was unable to neutralize the volatile acids accumulation, due to the organic overload, and hence to maintain the required pH for stable AD operation. Afterwards, from day 61, the methane yield decreased gradually and ineluctably until it ceased completely on day 90. Accordingly, the TVA/alkalinity ratio, considered as an indicator of the system instability (Chen et al., 2008; Franke-Whittle et al., 2014; Kleyböcker et al., 2012), reached eminent values of 0.84, 2.1, 4.6 and 9.6 by day 68, 75, 82 and 90, respectively (Figure 6).

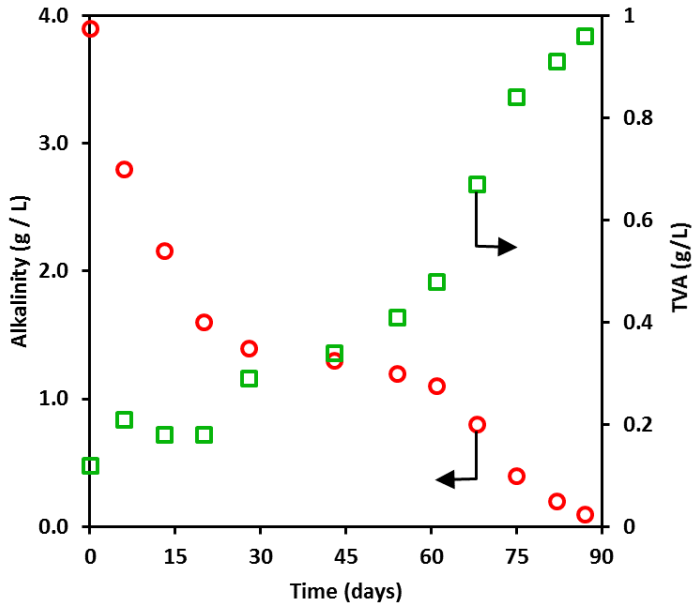

Figure 5: Evolution of alkalinity and TVA in digesters (7) and (8) operated at a HRT of 10 days. Values correspond to the mean of the measurement.

At this stage, starting from day 90, the feeding of the digesters 7 and 8 was stopped for 15 days to give the time required for the growth of acetoclastic and methanogenic microorganisms (Aboudi et al., 2015). However, the system was not recovered. No methane productions were registered and the alkalinity and TVA remained constant until the end of the experiments (day 95) and similar to the values recorded on day 90 (0.1 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ and 0.96 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$, respectively). One should note that these values are very close to those of the GP used in this study, having an alkalinity of 0.1 g eq. $CaCO_3 \cdot L^{-1}$ and TVA of 1.1 g eq. $CH_3COOH \cdot L^{-1}$ (Table 1). These findings showed that the medium was entirely composed of GP, indicating the absence of microorganisms responsible for its degradation and

conversion into methane. Therefore, the failure of the digesters was due to the applied HRT, which approached and exceeded the washout rate (critical HRT) at which the methanogenic microorganisms were flushed out of the digesters, along with volatile acids build-up in the medium (Berg et al., 1985; Cobb and Hill, 1991). Since the growth rate of acidogenic bacteria (almost 4 days) is faster than that of methanogens (almost 10 days), the increase in TVA concentration was due to their excessive production by the acidogenic microorganisms which was not coupled with their degradation by the acetogenic and methanogenic microorganisms (Ahring et al., 1995; Moletta, 2015; Yadvika et al., 2004).

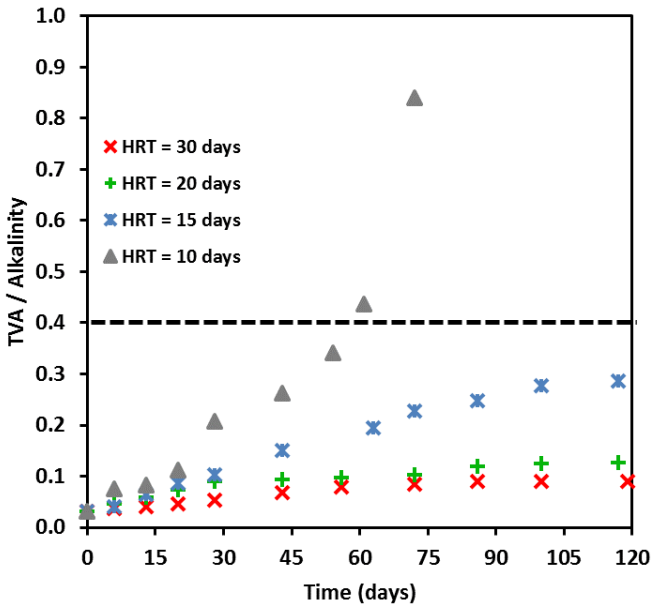

Figure 6: Evolution of the TVA/alkalinity ratio at the different HRTs.

This is consistent with a study revealing that HRT has to be longer than it takes for the methanogenic microorganisms to multiply, which is up to 10-12 days, or otherwise the microorganisms will be washed out of the digester and the methane production will stop (Gashaw, 2014). Moreover, it has been reported that HRT greater than 10-15 days is necessary when treating solid waste in order to achieve the stability in the continuous anaerobic digesters (Abubakar et al., 2015). Thus, 10 days-HRT was the critical HRT triggering the washing of methanogenic bacteria and leading to the failure of the digesters in our study.

AD of agro-industrial by-products and crop residues typically involves the operation at higher HRT (Brooks et al., 2008; Moraes et al., 2015). (Demirel et al., 2008) studied the AD of sugar beet using continuous digesters and reported that the highest methane production was obtained at HRT of 25 days. In a previous work (Labat et al., 1984), HRT of 17 days were proved to be

the best for the AD procedure.

In a recent study evaluating the AD of sugar beet and pig manure, HRTs of 20, 18, 15 and 12 days corresponding to OLRs of 3.73, 4.14, 4.97 and 6.21 kg of VS m^{-3} d^{-1} were tested. It has been reported that the stability of the system was attained at HRT of 20 days. However, HRT of 12 days was considered critical and led to pH drop accompanied by an accumulation of volatile acids (Aboudi et al., 2016).

On the other hand, digesters treating ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure were operated at three different HRTs (24, 16 and 12 days) equivalent to OLRs of 3.58, 5.36 and 7.15 kg COD m^{-3} d^{-1}, respectively. Methane yields of 0.326 and 0.310 m^3 kg of VS were therefore calculated at HRT of 24 and 16 days, respectively, whereas at the lower HRT (12 days) methane production ceased because of the washing of the microorganisms (Dareioti and Kornaros, 2015).

3.2. Effects of HRTs on fibers degradability

The effects of HRT on the biodegradability of the main lignocellulosic components in the digestate were investigated using Van-Soest fractionation method. Figure 7 shows the reduction yields of cellulose, hemicellulose and lignin respectively, for the different HRTs. Hemicellulose reduction yields of 72.1%, 70.9%, 53.5% and 3.5% were obtained at the end of experiments, for the HRTs of 30 days, 20 days, 15 days and 10 days, respectively. Cellulose reduction yields were 13.8%, 13.3%, 6.9% and 0.5% for the HRTs of 30 days, 20 days, 15 days and 10 days, respectively. Contrariwise, no significant reductions in lignin content were observed. Therefore, as regards the biodegradability of the GP, it can be deduced that 30-days and 20-days HRTs resulted in almost similar reduction yields of the main lignocellulosic components (no statically significant difference for $p = 0.05$ was found). Thus, in order to minimize the duration of the process operation and although the size of the anaerobic digester, we advocate the use of 20-days HRT for treating GP in continuous mode.

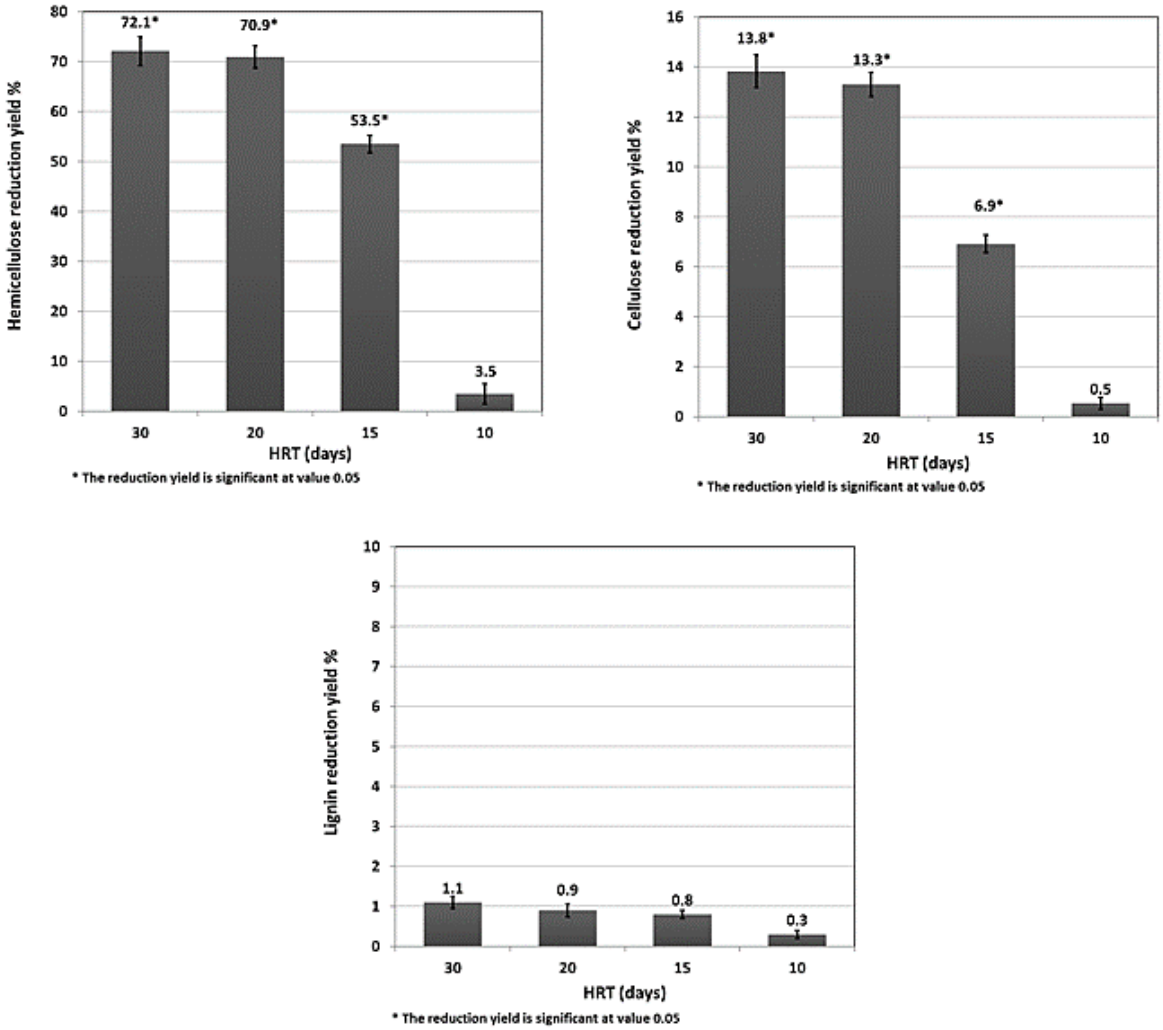

Figure 7: Reduction yields of the main lignocellulosic fractions at the end of the experiments and for the different HRTs. Values correspond to the mean ± standard deviation of the measurement.

In our study, the relatively low biodegradability of the GP is related to the high cellulose and lignin contents. Lignin is the most recalcitrant and therefore not biodegradable under anaerobic conditions (Bayard et al., 2015; Carlsson et al., 2012; Xu et al., 2014). In fact, lignin is an irregular and insoluble polymer consisting of phenylpropanoid subunits, and its enzymatic hydrolysis is difficult (Malherbe and Cloete, 2002). Cellulose, which is a glucose polymer linked through α-1,4-linkages usually disposed in microcrystalline structures, is difficult to degrade under natural conditions. However, anaerobic microorganisms can hydrolyze cellulose better than aerobic ones, because they contain membrane-bound cellulose hydrolyzing enzymes (Malherbe and Cloete, 2002). In addition, cellulose is usually degradable under anaerobic conditions in its pure form (Carlsson et al., 2012). However, when combined with lignin, this

latter appears to be an influential parameter in limiting the access to hydrolytic enzymes and anaerobic micro-organisms (Jimenez et al., 1990). On the other hand, the carbon in hemicellulose is easily available and thus readily degradable by microorganisms (Mottet et al., 2010). Hemicellulose is a hetero-polysaccharide composed of different hexoses, pentoses, and glucuronic acid and is more soluble than cellulose (Malherbe and Cloete, 2002). That is why reductions yields of hemicellulose in our study are much higher than those of cellulose.

During the AD of mixtures of energetic crops, cow sludge, agro-industrial waste and organic fraction of municipal solid waste, in a large-scale plant, fiber analysis showed reduction yields of 63% of cellulose and 58% of hemicellulose, with preservation of lignin, which increased with respect to initial mass content, of 9.5% (Tambone et al., 2009). In another study, co-digestion of primary and secondary sludge with an OLR of 1 kg VS m^{-3} d^{-1} and HRTs of 25-31 days resulted in methane productions of 0.15-0.17 m^3 kg VS d^{-1}. Reductions yields observed were almost 73% and 27% for cellulose and hemicellulose, respectively, while lignin showed an increase (Bayr and Rintala, 2012). The increase in lignin fractions is also obtained in another study (Lin et al., 2009) evaluating the AD of pulp and paper sludge.

Furthermore, the analysis of the solid digestate from the co-digestion of corn stover and dairy manure showed that the HRT mainly influenced the degradation of AD fiber (Yue et al., 2013). Results showed that the cellulose removal efficiency increased with the increase of HRT, indicating that the longer the input resided in the digester, the more the cellulose was degraded and used by microorganisms. The cellulose and hemicellulose reduction yields increased from HRT of 30 days to that of 40 days. At HRT of 50 days, reduction yields were similar to those obtained previously using HRT of 40 days. In fact, hemicellulose and cellulose have been reported to include both easily degraded portions and resistant portions (Jacobsen and Wyman, 2000). After the increase in HRT, most of fast-hydrolyzing cellulose and hemicellulose were degraded by the microorganisms. Thus, the reduction yields slowed down and approached to the same rate under the HRTs of 40 and 50 days. These results are consistent with those found in our study during HRTs of 20 and 30 days showing that hemicellulose and cellulose reductions yields were almost constant reaching their maximum. This demonstrates that HRT greater than 30 days is not effective in increasing the degradability of these fibers in GP.

4. Conclusions

The results of this study demonstrate that a residence time lower than 30 days is adequate for the digestion of GP. Among the tested conditions, the maximum OLR of 3.7 kg COD m^{-3} d^{-1}

and the minimum HRT of 20 days can therefore be considered as the optimum operating conditions for the AD of GP in large-scale applications. The HRT of 15 days was found critical and that of 10 days resulted in irreversible system failure. On the other hand, the hemicellulose and cellulose fractions were degraded with different rates but the lignin fraction did not. These results highlighted the need to test various pretreatments in continuous mode to reduce the complexity of these fractions enhancing the methane production. In addition, it will be necessary to evaluate the chemical composition of the digestate and its fertilizing properties for appropriate use as soil amendments.

Chapitre VI

Influence de divers prétraitements sur les fractions lignocellulosiques et la production de méthane du marc de raisin

VI. Chapitre VI : Influence de divers prétraitements sur les fractions lignocellulosiques et la production de méthane du marc de raisin

Nous avons jusqu'à présent optimiser les paramètres opérationnels des digesteurs. Qu'en est-il alors de la biomasse ? Nous avons montré que le marc de raisin est très riche en fractions lignocellulosiques. Nous cherchons dans cette partie à réduire ces fractions pour augmenter la biodégradabilité anaérobie et donc la production de méthane. Pour cela, nous avons évalué les effets d'une série de prétraitements chimiques et physiques non seulement sur la production de méthane mais aussi sur la biodégradabilité des fibres lignocellulosiques. Ces travaux ont fait l'objet d'un article intitulé « Influence of several pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace » qui sera prochainement soumis au journal « Bioresource Technology ».

VI.1. Avant-propos

De nos jours, divers prétraitements peuvent être mis en œuvre en amont de la digestion anaérobie pour dépasser ses limites existantes, notamment dans le cas de substrats difficilement biodégradables en anaérobiose. En effet, l'étape limitante de la méthanisation est généralement l'hydrolyse qui peut être accélérée voire remplacée par une hydrolyse physico-chimique ou biologique. Par conséquent, l'objectif du prétraitement est de rendre la matière plus facilement biodégradable par les microorganismes. L'étude inter-cépages précédente a montré que la digestion anaérobie du marc de raisin est directement affectée par sa structure lignocellulosique ; elle diminue en présence de taux élevés de lignine et de cellulose. Afin d'altérer cette structure complexe et par la suite intensifier le processus, nous présentons dans ce chapitre une panoplie de procédés verts et innovants (congélation, traitement alcalin, traitement acide, ultrasons et champs électriques pulsés) et nous abordons de même leurs effets correspondants. Dans ce but, des cinétiques de dégradation ont été réalisées en mode batch, afin de comparer la production maximale de méthane associée, avant et après chaque prétraitement. De plus, nous avons évalué l'impact respectif des prétraitements sur la biodégradabilité des fibres lignocellulosiques, par le biais du fractionnement de Van-Soest. Pour toutes les expérimentations, nous avons utilisé du marc de raisin de cépage « Chenin blanc », récolté lors de la vendange 2015 aux Pays de la Loire en France.

Le test BMP réalisé sur du marc de raisin frais, non traité, affiche une production de méthane

de 0,1305 ± 0,0035 Nm^3 kg DCO^{-1} ; ce chiffre s'inscrit dans la gamme précédemment obtenue dans le cadre de l'étude inter-cépages. La congélation du marc à des températures de -80 °C et -20 °C augmente le potentiel méthanogène d'environ 16% et 30%, respectivement. Cependant, et en comparaison avec le marc de raisin non traité, le fractionnement biochimique du marc congelé à -20 °C montre une composition lignocellulosique analogue. En fait, il a été démontré qu'une désintégration cellulaire élevée peut être obtenue pendant la congélation à -20 °C engendrant ainsi une plus grande accessibilité aux constituants solubles de la matrice ainsi qu'une meilleure solubilisation, sans pour autant aucune modification de sa composition biochimique ; ceci justifie l'augmentation observée de la production de méthane.

De plus, plusieurs prétraitements chimiques ont été étudiés mettant en jeu différents réactifs : la soude, l'ammoniaque et l'acide chlorhydrique. Le traitement alcalin avec 10% NaOH est le plus efficace quant à l'amélioration de la production de méthane (+ 36%), suivi de celui avec 6% NaOH (+ 20%) puis du traitement acide avec 10% HCl (+ 5%). Contrairement, le traitement alcalin avec du NH_3 a montré peu ou pas d'effet sur la production finale de méthane. Il convient de noter que le prétraitement avec 10% de NaOH a été le seul à modifier les principaux composants de la biomasse lignocellulosique. Des taux de réduction significatifs de 27,9%, 22,3% et 52,3% ont été obtenus pour l'hémicellulose, la cellulose et la lignine, respectivement ; cela explique l'amélioration de la production de méthane par rapport aux autres prétraitements. Par ailleurs, le traitement acide avec 10% de HCl n'a été efficace que pour éliminer l'hémicellulose affichant le rendement de réduction le plus élevé (79,4%).

En ce qui concerne les prétraitements mécaniques testés, le marc de raisin traité par les CEP à un niveau Z_1 (153 kJ kg^{-1}), révèle une augmentation limitée du rendement en méthane de 4%. Ce procédé n'a pas toutefois altéré les fractions biochimiques du marc. En fait, au cours de la digestion anaérobie, les pores créés par les CEP faciliteront l'accès aux composants intracellulaires qui deviennent plus favorables à l'hydrolyse enzymatique, ce qui explique l'amélioration de 4% de la production de méthane.

L'application des ultrasons à un niveau Z_1 (700 kJ kg^{-1}) entraîne une augmentation de 10% du potentiel méthanogène. Des taux de réduction significatifs de 13,2% et 6,3% sont enregistrés pour l'hémicellulose et la lignine, respectivement. Pratiquement, la sonication à basse fréquence perturbe mécaniquement la structure et la matrice cellulaire, conduisant à une réduction de la taille des particules et à un endommagement cellulaire important.

Dans un second temps, nous avons cherché à optimiser le procédé de production de méthane à partir de notre biomasse en étudiant les effets de couplage de la congélation à -20 °C avec le traitement alcalin à 10% de NaOH. Les résultats du test BMP témoignent alors de l'augmentation la plus importante de production de méthane (68%), classant cette combinaison de prétraitements en tête de la liste ici sélectionnée. Concernant les taux de réduction des fibres, ils s'avèrent être similaires à ceux obtenus avec le traitement à 10% NaOH seul, un résultat attendu d'ailleurs.

Le but ultime de cette étude étant de proposer des moyens d'intensification de la digestion anaérobie à l'échelle industrielle, nous visons valider ces derniers résultats trouvés en mode batch dans un processus à plus grande échelle. Par conséquent, la production de méthane du marc broyé, congelé à - 20 °C et traité avec 10% de NaOH a été suivie en mode continu dans des digesteurs de 2 L. Or, en mode continu, il est important de noter que le broyage est indispensable afin d'éviter le bouchage des tuyaux du pilote par les pépins et les matières fibreuses présentes dans le marc de raisin. Tout au long des expérimentations, une charge organique de 3,7 kg DCO m^{-3} j^{-1} et un temps de séjour hydraulique (TSH) de 20 jours étaient appliqués. Après 70 jours de fonctionnement, les productions de méthane étaient de 1,75 NL j^{-1} pour le marc broyé, congelé et traité avec 10% NaOH contre 1,37 NL j^{-1} pour celui congelé et broyé seulement. Ainsi, le traitement alcalin a intensifié la production de méthane de près de 29%, témoignant de l'efficacité du procédé proposé.

En conclusion, il s'agit d'une étude pionnière qui porte sur l'impact de divers prétraitements sur le potentiel méthanogène et les fractions lignocellulosiques du marc de raisin. Bien que certaines conditions testées ici semblent pertinentes, le développement de plusieurs prétraitements couplés s'impose afin d'optimiser les effets obtenus, d'une manière rentable mais surtout respectueuse de l'environnement.

VI.2. Full paper: "Influence of several pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace »

Influence of several pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace

(1) Univ. Bretagne Sud, FRE CNRS 3744, IRDL, F-56300 Pontivy, France

(2) Centre d'Analyses et de Recherches, Unité de recherche Technologies et Valorisation Alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, Beirut, Lebanon

Abstract

The lignocellulosic structure of grape pomace requires the use of pretreatments facilitating microbial decomposition of the matter and enhancing methane production. In this study, the effects of various pretreatments (freezing, alkaline treatment using NaOH and NH_3, acid treatment using HCl, Ultrasounds and Pulsed Electric Field) were investigated in batch digesters. The highest methane production (0.178 $Nm^3\ kg^{-1}$ of COD) was obtained after alkaline treatment with 10% NaOH w/w dry basis, at 20 °C and for 24h. This result is due to the removal of more than 50% of lignin and about 22% of cellulose present in GP. The coupling of this pretreatment with freezing at -20 °C exhibited the highest methane production of 0.2194 ± 0.0007 $Nm^3\ kg^{-1}$ of COD in batch mode. When applied on a largest scale using continuous digesters, this coupled pretreatment was found to increase methane production by about 27%, compared to the untreated samples. These findings highlight the positive impact of the combined pretreatment on the green valorization of our biomass.

1. Introduction

Nowadays, the production of bioenergy from agricultural biomass has become a global concern. Lignocellulosic residues are valuable raw materials for producing methane through Anaerobic Digestion (AD), thus facilitating the transition to renewable green energy sources (Kumar and Sharma, 2017; Monlau et al., 2013a). In fact, biomethane is a versatile energy source because it can be used to produce heat, electricity combined with heat (cogeneration) or biofuel. Compared to most liquid biofuels, biomethane showed much better performance in terms of both agricultural land area efficiency and life cycle emissions (Börjesson and Mattiasson, 2008).

The grape is one of the most cultivated plant crops in the world (FAOSTAT, 2014). According to an estimation reported by the International Organization of Vine and Wine, its total production amounted 75 million tons with 271 million hectoliters of wine in 2014 (OIV, 2015). The European Union has participated in nearly 60% of world production with Italy, France and Spain as the three main producer countries. The winemaking process generates large quantities of solid waste, especially grape pomace (GP), its major by-product (62% of the generated waste) (Schieber et al., 2001). We have shown previously that GP is a promising potential source of methane, addressing consequently two issues: green energy production as well as waste management and valorization (El Achkar et al., 2016).

The main challenge in the use of lignocellulosic crops, such as GP, for methane production, is their structure and composition (Monlau et al., 2012b). The solid matter of GP is mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin. The quite low anaerobic biodegradability of the GP is likely due to the high amount of lignin and cellulose in its dry matter. In fact, lignin is the most resistant to microbial degradation and oxidation (Bayard et al., 2015; Xu et al., 2014), whereas cellulose is usually degradable under anaerobic conditions in its pure form (Carlsson et al., 2012). However, when combined with lignin, cellulose shows limited accessibility to hydrolytic enzymes and anaerobic micro-organisms (Jimenez et al., 1990). On another note, carbon in hemicellulose is easily available and thus readily degradable by microorganisms (Mottet et al., 2010). Therefore, GP pretreatment before AD seems to be necessary in order to alter the structural properties of lignin and cellulose, reducing the complexity of lignocellulosic fractions. Accordingly, the development of innovative and low cost pretreatments methods is required to facilitate the microbial decomposition of the matter, to increase the GP degradation and hence the methane yield.

Different pretreatment methods have already been studied to facilitate the enzymatic hydrolysis and consequent methane production from organic waste. To the best of our knowledge, there are no studies evaluating the effects of different pretreatments on the methane production and the chemical composition of GP. In this study, we have assessed the impact of selective treatment methods on GP AD. These pretreatments, commonly used on a wide range of lignocellulosic substrates, include freezing pretreatment, chemical pretreatments (acid and alkaline) and physical pretreatments (ultrasounds and pulsed electric fields) (Carlsson et al., 2012; Carrère et al., 2016; Kondusamy and Kalamdhad, 2014; Yadvika et al., 2004; Yang et al., 2015). Biological pretreatments (using fungi and enzymes) are not considered in here, mainly due to the high loss of carbohydrates, the long treatment time and their high cost

(Sambusiti et al., 2012). Moreover, and despite their efficiency in solubilizing crops, thermal pre-treatments were not investigated since they are very energy intensive, particularly when compared to freezing process (Stabnikova et al., 2008).

For these reasons, the main objectives of this study consist in: (i) determining the effects of various pretreatments (freezing, alkaline treatment using NaOH and NH_3, acid treatment using HCl, Ultrasounds (US) and Pulsed Electric Field (PEF)) on GP methane production in batch digesters; (ii) investigating the impact of these pretreatments on the biodegradability of the main lignocellulosic components; (iii) validating the most efficient pretreatment, in terms of GP methane production, on a larger scale using continuous digesters.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The GP variety "Chenin blanc", was obtained from a wine company (Domaine Des Acacias, Layon, France). The grapes were carefully harvested at maturity during the 2015 vintage and fresh samples of GP were collected immediately after the pressing operation and transported to the laboratory. On arrival, stalks fragments were removed manually from the set of GP. The raw material was stored at + 6 °C until utilization. An active inoculum was collected from the digester of the waste-water treatment plant of Saint-Brieuc city in France, operating under mesophilic conditions. The particulate matter (> 500 mm) was removed from the inoculum by passing through sieve to ensure better homogeneity and to improve the reproducibility of the experimental tests.

2.2. Analysis

Total Solids (TS) content were determined by dry weight in oven at 105 °C until constant weight. Afterwards, Volatile Solids (VS) were determined in a muffle furnace after 4 hours at 550 °C. Total Chemical Oxygen Demand (COD) was measured using Merck COD Spectroquant® test, range 500-10,000 $mg \cdot L^{-1}$, and a spectrophotometer NOVA 60 (Merck, Germany). For this last analysis, the GP was ground using a blender (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, USA). After 2 hours at 150 °C, it is considered that all organic matter is oxidized with the hot sulfuric solution of potassium dichromate.

2.3. Van-Soest fractionation

The structural polysaccharides and lignin fractions were determined using the method of Van-

Soest (Mertens, 2002; Van Soest et al., 1991). A detailed description of the protocol used was provided in our previous paper (El Achkar et al., 2016). All reagents were provided by Merck (Darmstadt, Germany) and all analytical determinations were performed in triplicate.

2.4. Pretreatments of GP

2.4.1. Freezing

Some of the fresh GP were disintegrated using a freezing/thawing technique. First set of GP was frozen at -20 °C and the second at -80 °C, for 48h. Afterwards, samples were thawed for 24h at 6 °C.

2.4.2. Chemical treatments (NaOH, NH_3 and HCl)

The effects of chemical treatments on the methane production of GP were evaluated using NaOH, NH_3 and HCl, separately. These pretreatments were carried out in 250 mL flasks, closed with rubber septa. In each flask, GP samples are introduced with a total solid load of 50 g L^{-1} (Monlau et al., 2013b). Experiments conditions were determined according to some literature suggestions on agricultural substrates (Monlau et al., 2012a; Monlau et al., 2013b, Sambusiti et al., 2012). Therefore, fresh GP samples were soaked in chemical agent concentration of 6% and 10% w/w dry basis. To ensure sufficient mixing, the flasks were continuously shacked at 150 rpm using an orbital shaker (IKA KS 260 basic, Labtek, Staufen, Germany). Chemical treatments were carried out at ambient temperature (20 ± 1 °C), for 24 h. At the end of the treatment, the pretreated samples were neutralized with a concentrated HCl or NaOH solutions to pH = 7.5 prior to BMP test.

2.4.3. PEF treatment

The treatment chamber consists of a plexiglass cylinder (6 cm of height) with two steel electrodes (inner diameter of 6.5 cm). The electrodes were connected to the PEF system which consists of a high voltage power supply (2.5 kV, 0.24 A) (SR2.5-P-600, Technix, France), a pulse generator (TGP 110 – 10 MHz Pulse Generator – TTI Thurlby Thandar Instruments, France) used to control the PEF treatment protocol by adjusting the pulse duration t_i (10^{-5} – 10^{-4} s) and the frequency (24 – 240 Hz). To check the treatment protocol, an oscilloscope (OX 8022 – 20 MHz Differential, Metcix, France) has been used. The high voltage power supply and the pulse generator were connected to a modulator (AHTPM2.5, Effitech, Pau, France) which combines the generated high voltage with the pulse protocol to obtain the desired pulsed electric field. The measurement of the electrical conductivity, before and after the treatment, was conducted using an LCR meter (U1733C, Agilent, Les Ulis, France).

The PEF treatment effect, resulting in tissue damages, was estimated from the disintegration index (Z), based on the variation of the electrical conductivity before and after treatment (Lebovka et al., 2002).

$$Z = \sigma_m - \sigma_i / \sigma_e - \sigma_i \qquad \text{Eq. 1}$$

Where σ_m is the measured electrical conductivity value after the pause duration (Δt) between trains, σ_i and σ_e refer to the conductivities of the untreated (initial) and totally electroporated sample, respectively. Eq. 1 gives Z = 0 for an intact sample and Z = 1 for a completely damaged tissue; here, three levels of PEF treatment were determined: Z_0, $Z_{0.5}$ and Z_1.

The specific energy input W for each level of PEF treatment was calculated by summation of power consumption for each train and divided by the mass m of the sample in the treatment chamber:

$$W_{PEF} = \sum_1^N U\ I\ n\ t_i / m \qquad \text{Eq. 2}$$

Where U is the PEF applied voltage, I is the treatment's current intensity. As I varied during the treatment from a train to another, the specific energy for each train was obtained with the I value calculating from the measured conductivity of the sample. An intensity of pulsed electric fields of 3600 V cm^{-1} was used. Rectangular monopolar trains (n = 240 pulses) with $50 \cdot 10^{-6}$ s pulse duration (t_i) were applied and the number of trains (N) was 9 for $Z_{0.5}$ and 14 for Z_1. PEF treatment specific times (t_{PEF}) were 0.36s and 1s, for $Z_{0.5}$ and Z_1, respectively. To neglect the thermal effects, the elevation of temperature was kept below 5 °C by adjusting a pause time Δt (5 min) between the trains. Energy inputs were 41 kJ kg^{-1} and 153 kJ kg^{-1}, for $Z_{0.5}$ and Z_1, respectively.

2.4.4. Ultrasounds treatment

The disintegration by ultrasounds was performed with an ultrasonic processor (BPAC, Vern-Sur-Seiche, France) with an operating frequency of 50 kHz and an effective power output of 60 W. The sonication bath, with a capacity of 2 L, has the internal dimensions of 15 cm length, 13.5 cm breadth and 10 cm height. The total internal body is made up of stainless steel. The temperature of GP samples was controlled so as not to exceed 25 °C. The GP is put in 0.25 L bottles, with a total solid load of 50 g L^{-1}, as mentioned previously.

To assess the degree of disintegration, the COD of GP supernatant was determined. The degree of disintegration (DD_{COD}) is calculated as the ratio between soluble COD increase due to

sonication and the total COD (Braguglia et al., 2008):

$$Z = DD_{COD} = \left[\frac{COD_{sol,\,sonicated} - COD_{sol,\,untreated}}{COD_{sol,\,max} - COD_{sol,\,untreated}}\right] \qquad \text{Eq. 3}$$

where $COD_{sol,\,sonicated}$, $COD_{sol,\,untreated}$, are soluble COD (mg L^{-1}), of the sonicated and of the untreated sample, respectively, and $COD_{sol,\,max}$ is COD of the completely disintegrated sample. From this equation, two different levels of disintegration of GP were determined. $Z_{0.5}$ corresponds to half-disintegration of the GP by applying US treatment duration of 40 min. Z_1 corresponds to maximum disintegration with a treatment duration of 70 min.

The specific US energy input W_{US} was calculated as follows:

$$W_{US} = \frac{P_{US} \times t_{US}}{m} \qquad \text{Eq. 4}$$

where P_{US} is the power of the US generator power equal (0.06 kJ s^{-1}), m is the mass of GP + water mixture (kg) and t_{US} is the US treatment duration (s). In this study, energy inputs were 400 kJ kg^{-1} and 700 kJ kg^{-1}, for $Z_{0.5}$ and Z_1, respectively.

2.5. Automatic Methane Potential Test System (AMPTS)

The maximal methane production during AD experiments was determined using an Automatic Methane Potential Test System (AMPTS, Bioprocess Control, Lund, Sweden). This system measures the methane production of different samples over time. Fresh inoculum and substrate were added to 500 mL incubation bottles at a COD inoculum to substrate ratio of 3:1 (El Achkar et al., 2016). Bottles were incubated at 37 °C until the methane production has stopped. All tests and blanks were carried out in triplicate, and the net values of methane production and yield were obtained by subtracting the endogenous production of the blank bottles. At the end of the test, pH is measured to verify that biogas production stops due to the depletion of the biodegradable COD and not the acidification of the medium. The biological methane potential (BMP) was calculated from the volume of methane produced divided by the quantity of the sample based on COD introduced. The biodegradability (%) was determined by dividing BMP by the theoretical maximum methane yield (0.35 Nm^3 kg^{-1} of COD) under standard conditions of temperature and pressure (273 K and 101.5 kPa) (Buffière et al., 2008).

2.6. Kinetic study

The methane potential test can be used to estimate the overall hydrolysis constant k. In descriptive terms, this reaction step is typically simplified and reduced to first-order kinetics (Eastman and Ferguson, 1981).

$$BMP = BMP_0 \times [1 - \exp(-k \cdot t)] \qquad \text{Eq. 5}$$

where BMP is the cumulative methane yield, BMP_0 is the maximum methane yield of the substrate, k ($days^{-1}$) is the apparent kinetic constant and t (days) is the time. The adjustment by non-linear regression of the pairs of experimental data (BMP, t) using GraphPad Prism® (GraphPad, San Diego, CA; USA) allows the calculation of the apparent kinetic constant k and R^2. Root Mean Square Prediction Error (RMSPE) was calculated as mentioned by (El-Mashad, 2013) in order to validate the studied model. It represents the deviation between experimental and estimated methane production. High values of the coefficient of determination ($R^2 > 0.98$ in all cases) and small RMSPE values (1% to 6% of the total methane production for each GP variety) indicate that the first-order kinetics model describes and fits the data well.

2.7. Methane production in continuous mode

The system for measuring methane production in continuous mode consists of three main units. The incubation unit is a thermostatic water bath (37 °C) which contains four digesters of 2 L (Bioprocess Control, Lund, Sweden). Each digester is equipped with two sealable tubes; The first for drawing off the digestate and the second for supplying the GP. Digesters are stirred manually for one minute, twice a day, to ensure adequate mixing. The produced biogas passes through a tube connecting the incubation unit to the CO_2 fixing unit (6 M NaOH solution). Thus, the CH_4 released from this unit is measured with a gas meter (Type MGC-1 PMMA, Ritter, Germany) with a measurement range between 1 mL h^{-1} to 1 L h^{-1}.

Feeding and draining operations were carried out daily using a hydraulic retention time (HRT) of 20 days and an organic loading rate of 3.7 kg COD m^{-3} day^{-1}. Therefore, using a plastic syringe, 100 mL of the digestate were taken and a similar volume of GP was introduced into the digesters. The measurements of the alkalinity and the total volatile acidity (TVA) were carried out as described in another paper (El Achkar et al., 2016). Digesters operated 70 days (3.5 the HRT duration) to record stability in methane production and physicochemical parameters.

GP was grinded by means of a blender (Waring blender 8011EG, Waring Commercial, USA)

in a total volume of 0.8 L for 10 minutes and with a speed of 22,000 rpm. The particle size distribution was determined by laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). The particle size distribution is calculated as volume based in terms of equivalent spheres (range 0.02 – 2000 µm).

2.8. Statistical analysis of experimental data

Significant statistical differences between means at 0.01% and 0.05% levels were determined according to Tukey's test. Statistical tests were conducted using SPSS (SPSS software, V20, SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Results and discussion

3.1. Impact of pretreatments on methane production

GP variety “Chenin Blanc” has a TS content of 454 ± 14 g kg^{-1}, a VS content of 350 ± 10 g kg^{-1} and COD of 610 ± 20 g O_2 kg^{-1}. The inoculum used had a pH value of 7.5, a TS content of 56 ± 3 g kg^{-1}, a VS content of 35 ± 4 g kg^{-1} and COD of 52.0 ± 0.1 g O_2 kg^{-1}. For all samples, the cumulative production of methane increases exponentially during the initial phase until day 8 to 10 after the starting of the experiments, due to components that are easily hydrolysable by microorganisms. A plateau is then obtained indicating a depletion of biodegradable matter. The cumulative methane yield of the untreated GP at the end of test were 0.1305 ± 0.0035 Nm^3 kg^{-1} of COD.

Table 1: Methane production (BMP), hydrolysis kinetics constant (k) and anaerobic biodegradability (BD) for selected conditions of raw and pretreated GP. Values corresponds to mean ± standard deviation of measurement performed in triplicate.

Conditions	BMP_0 (Nm^3 CH_4 kg COD^{-1})	R^2	RMSPE (Nm^3)	Increase BMP_0 (%)	k (d^{-1})	Increase k (%)	BD (%)
Untreated GP	0.1305 ± 0.0035	0.9925	0.0035	-	0.2798 ± 0.0011	-	37
Freezing at -80 °C	0.1508 ± 0.0007	0.9980	0.0004	+ 16**	0.2858 ± 0.0029	+ 2	43
Freezing at -20 °C	0.1696 ± 0.0003	0.9976	0.0005	+ 30**	0.3051 ± 0.0070	+ 9	48
6% NaOH	0.1571 ± 0.0005	0.9992	0.0018	+ 20**	0.3928 ± 0.0060	+ 40**	45
10% NaOH	0.1780 ± 0.0004	0.9988	0.0021	+ 36**	0.4793 ± 0.0091	+ 71**	51
6% NH_3	0.1295 ± 0.0005	0.9932	0.0064	0	0.3099 ± 0.0121	+ 11	37
10% NH_3	0.1304 ± 0.0007	0.9902	0.0068	0	0.3107 ± 0.0106	+ 11	37
6% HCl	0.1352 ± 0.0003	0.9977	0.0044	+ 4*	0.3597 ± 0.0058	+ 29**	39
10% HCl	0.1375 ± 0.0003	0.9977	0.0048	+ 5*	0.3620 ± 0.0085	+ 29**	39
US $Z_{0.5}$	0.1312 ± 0.0006	0.9929	0.0054	+ 1	0.3497 ± 0.0131	+ 25**	37
US Z_1	0.1486 ± 0.0003	0.9975	0.0052	+ 10**	0.3773 ± 0.0181	+ 35**	43
PEF $Z_{0.5}$	0.1315 ± 0.0015	0.9886	0.0082	+ 1	0.3062 ± 0.0215	+ 9	38
PEF Z_1	0.1356 ± 0.0020	0.9857	0.0086	+ 4*	0.3192 ± 0.0221	+ 14*	39
Freezing at -20 °C + 6% NaOH	0.2060 ± 0.0009	0.9988	0.0021	+ 58**	0.3055 ± 0.0068	+ 9	59
Freezing at -20 °C + 10% NaOH	0.2194 ± 0.0007	0.9966	0.0019	+ 68**	0.3110 ± 0.0058	+ 11	63

* The increase is significant at value 0.05

** The increase is significant at value 0.01

3.1.1. Freezing

First, we conducted AD on GP, frozen at -80 °C and -20 °C, recording at the end of the test cumulative methane yields of 0.1508 ± 0.0007 and 0.1696 ± 0.0003 $Nm^3 kg^{-1}$ of COD, respectively (Figure 1). Significant increases in the BMP_0 of 16% and 30% were observed in comparison to the raw samples. By against, no significant increases in first-order kinetics were noted (Table 1). These results demonstrate that freezing at -20 °C is more effective than freezing at -80 °C in improving the methane production of GP. This increase can be explained by the impact of the freezing rate on the cells and their organoleptic consequences (Diller, 1975; Rabin et al., 1996; Thomashow, 1998). In fact, during slow freezing (at -20 °C), deterioration caused

by ice can be explained by the rigidity and the large size of crystals which generate mechanical pressure damaging the cellular structure. In addition, slow freezing leads to the dehydration of the cells via osmosis, which results in a weakening of the cellular tissue and a loss of its turgidity. However, the rapid freezing kinetics (at - 80 °C) create a multitude of small crystals in the cell, without denaturation of cellular structures. Moreover, rapid freezing process enables also a significant reduction in dehydration compared to slow freezing. As a result, GP frozen at -20 °C became more damaged than that frozen at -80 °C which led to an increase in its biodegradability and methane production.

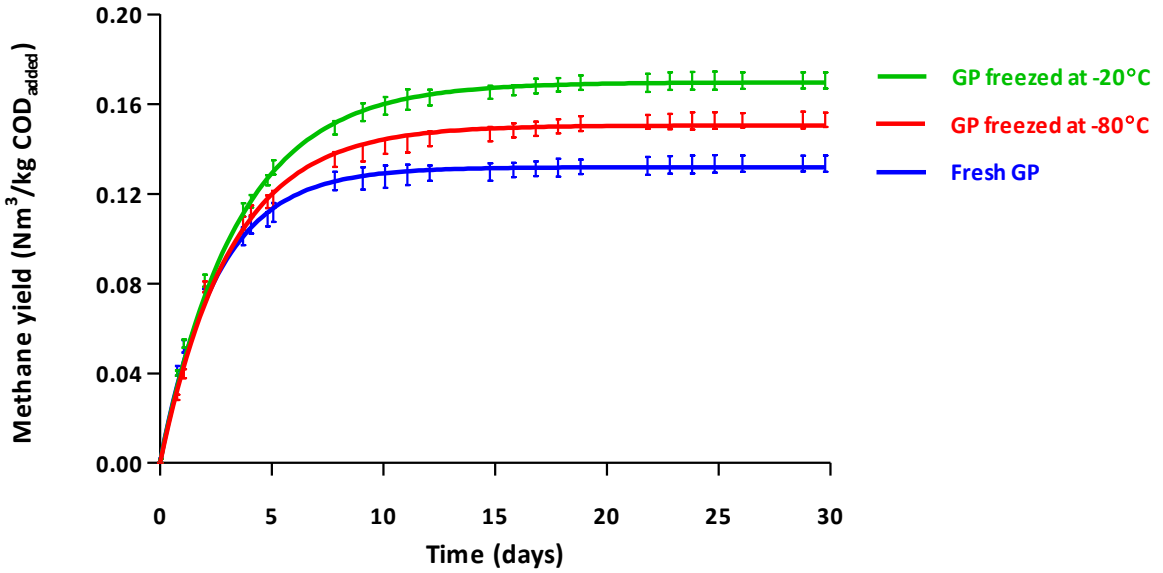

Figure 1: Cumulative methane production of the GP after freezing pretreatment. Lines correspond to a first-order model and bars represent the average standard deviation of the experimental data.

3.1.2. Alkaline treatment with NaOH

Alkaline treatment of GP with NaOH has recorded the highest methane production compared to all pretreatments. Cumulative methane yields at the end of test were 0.1571 ± 0.0005 and 0.1780 ± 0.0004 $Nm^3\ kg^{-1}$ of COD for GP treated with 6% NaOH and 10% NaOH, respectively (Figure 2). Significant increases in the BMP_0 of 20% and 36% were therefore highlighted in comparison with untreated samples. In addition, higher hydrolysis kinetics were recorded for the treatment with 6% and 10% NaOH, corresponding to 40% and 71% increase, respectively (Table 1). In fact, the effect of the alkaline treatment using NaOH on methane production was

evaluated in numerous studies. The treatment of rice straw with 1% NaOH, for 3 hours at 20 °C, improved methane production by 34% (Shetty et al., 2017). Similar augmentations were registered for various vegetal biomasses treated with 5 to 8% NaOH, for different time durations; we mention mainly corn stover, wheat plants and asparagus stems (Chen et al., 2014; Taherdanak and Zilouei, 2014; Zhu et al., 2010). A particular higher increase in BMP_0 by almost 94% was observed for poplar processing residues treated with 8% NaOH, for 4 days at 20 °C (Yao et al., 2013).

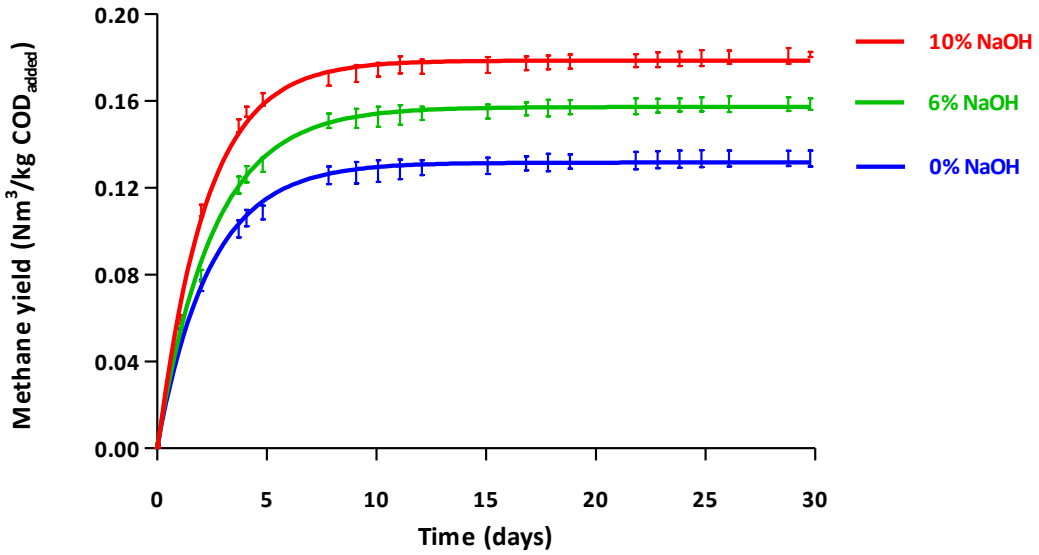

Figure 2: Cumulative methane production of the GP after alkaline pretreatment using NaOH. Lines correspond to a first-order model and bars represent the average standard deviation of the experimental data.

3.1.3. Alkaline treatment with NH_3

Alkaline treatment of GP with NH_3 did not affect the methane production yields in comparison with the raw GP. The cumulative methane yields at the end of test were 0.1295 ± 0.0005 and 0.1304 ± 0.0007 $Nm^3\,kg^{-1}$ of COD for GP treated with 6% NH_3 and 10% NH_3, respectively (Table 1). Furthermore, no significant increases in first-order kinetics were observed. It should be noted that the AD process was not inhibited which therefore proves that the presence of ammonia was not a barrier to the degradation of GP by anaerobic microorganisms. Similar results were obtained after alkaline treatment of wheat straw with NH_3; they showed that methane production was not significantly affected (Nordmann, 2013).

3.1.4. Acid pretreatment with HCl

Regarding the acid pretreatment using HCl, the cumulative methane yields at the end of test were 0.1352 ± 0.0003 and 0.1375 ± 0.0003 $Nm^3 kg^{-1}$ of COD for GP treated with 6% HCl and 10% HCl, respectively. BMP_0 showed a significant increase of 4% and 5%, respectively, in comparison with the raw GP, as where the hydrolysis constant increased by 29% (Table 1). Such positive impact was also observed in many studies evaluating the effect of HCl on AD of many lignocellulosic substrates, such as sugarcane bagasse and coconut fibers (Kivaisi and Eliapenda, 1994). On the other hand, treatment of maize plants with 2% HCl, for 24 hours at 20 °C did not show any effects on methane production which remained constant (Pakarinen et al., 2011).

3.1.5. Pulsed electric fields (PEF) pretreatment

The effects of PEF pretreatments on the AD of GP were also investigated. The Z_1 level of PEF (W = 153 kJ kg^{-1}) increases the cumulative methane yield and the hydrolysis constant by 4% and 14%, respectively (Table 1). This technology has been particularly used as a pretreatment upstream of AD carried out on sludge (Carlsson et al., 2012; Kopplow et al., 2004). For example, PEF applied to different waste activated sludge with higher energy inputs led to very high increases in biogas production (Lee and Rittmann, 2011; Salerno et al., 2009).

3.1.6. Ultrasounds pretreatment

The Z_1 level sonication of GP (W = 700 kJ kg^{-1}) generated an increase of 10 and 35% in the corresponding BMP_0 and hydrolysis constant (Figure 3 and Table 1). Usually, Ultrasounds with low frequencies are mainly coupled to AD of sewage sludge (Moletta, 2015; Pérez-Elvira et al., 2009). Recently, several research teams have studied ultrasounds effects on solid waste AD. For example, the sonication of maize straw and dairy manure in codigestion, using an energy of 285 kJ kg^{-1} of TS, has increased biogas production by about 70% (Zou et al., 2016).

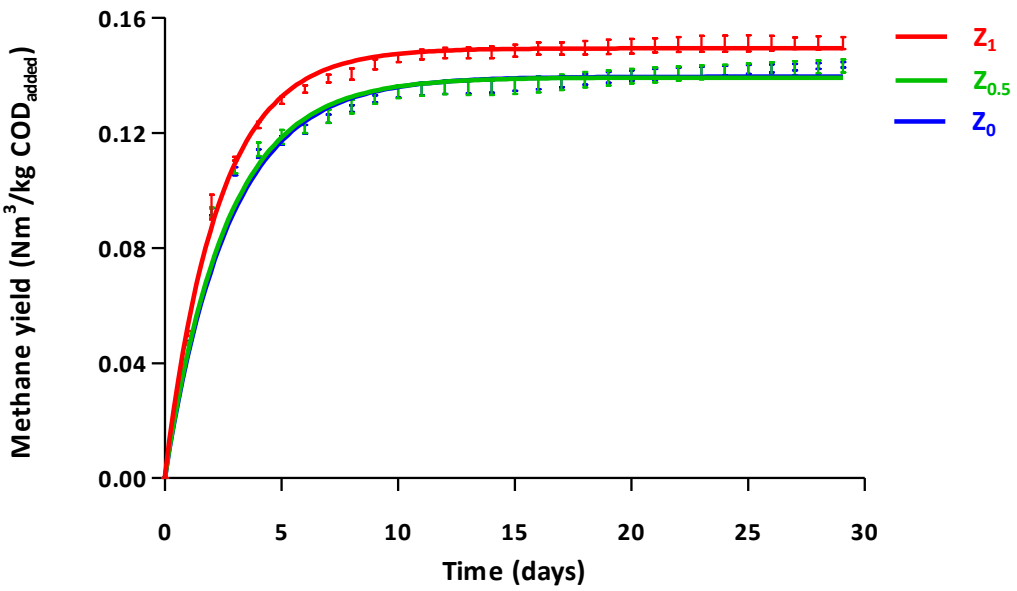

Figure 3: Cumulative methane production of the GP after US treatment. Lines correspond to a first-order model and bars represent the average standard deviation of the experimental data.

3.1.7. Alkaline pretreatment using NaOH combined with freezing at -20 °C

Altogether, our previous findings demonstrate that freezing treatment at -20 °C and alkaline treatment using 10% NaOH led, separately, to maximal increase in BMP_0. In order to maximize methane production from GP, we assessed the effects of the combination of these two pretreatments. Figure 4 illustrates the cumulative methane yields at the end of test for the GP frozen at -20 °C and treated with 6% NaOH and 10% NaOH, respectively. These combinations promoted the highest increase in BMP_0 (58% and 68%) among all pretreated samples (Table 1). A maximum GP biodegradability of 63% was reached for GP frozen at -20 °C and treated with 10% NaOH; listing this combination of pretreatments on the top of our selected ones.

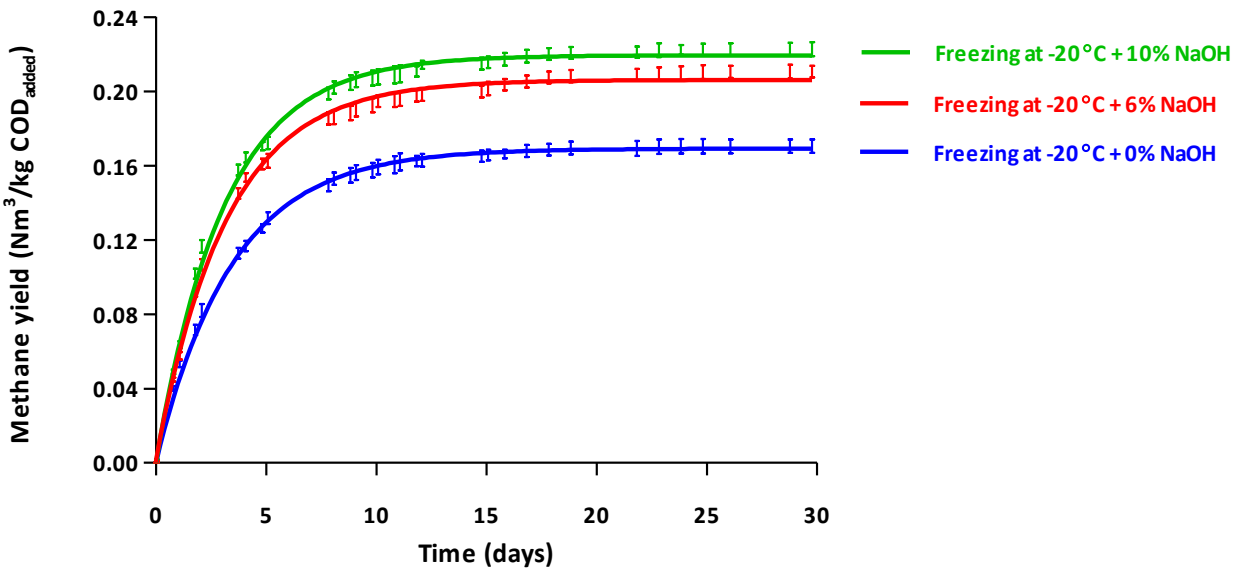

Figure 4: Cumulative methane production of the GP after freezing at -20 °C and alkaline treatment with 10% NaOH. Lines correspond to a first-order model and bars represent the average standard deviation of the experimental data.

3.2. Impact of selected pretreatment conditions on GP composition

After selecting conditions exhibiting the highest improvement in methane production for each pretreatment (freezing at -20 °C, 10% NaOH, 10% NH_3, 10% HCl, PEF Z_1, US Z_1 and 10%NaOH + freezing at -20 °C), we proceeded to analyze the composition of raw GP and treated samples, using Van-Soest fractionation method.

Figure 5 indicates that lignin, cellulose and hemicellulose are the three main components of lignocellulosic biomass representing about 49.5% of the VS in raw GP. In addition, we demonstrate that an increase in soluble matter, resulting from the removal of hemicellulose, cellulose and lignin, is positively correlated with an improvement of GP methane yield ($R^2 = 0.81$); our findings being consistent with previous studies (Carrère et al., 2008; Jackowiak et al., 2011). Moreover, another significant positive correlation was found between the increase in soluble matter and hydrolysis kinetic constants ($R^2 = 0.94$); the higher the soluble matter, the higher the kinetic constants. These results support another study evaluating the effects of seven types of thermo-chemical pretreatments on the AD of sunflower stalks, highlighting important correlation between the sum of solubilized proteins, hemicellulose, cellulose and lignin and the hydrolysis kinetic constants ($R^2 = 0.91$) (Monlau et al., 2012a).

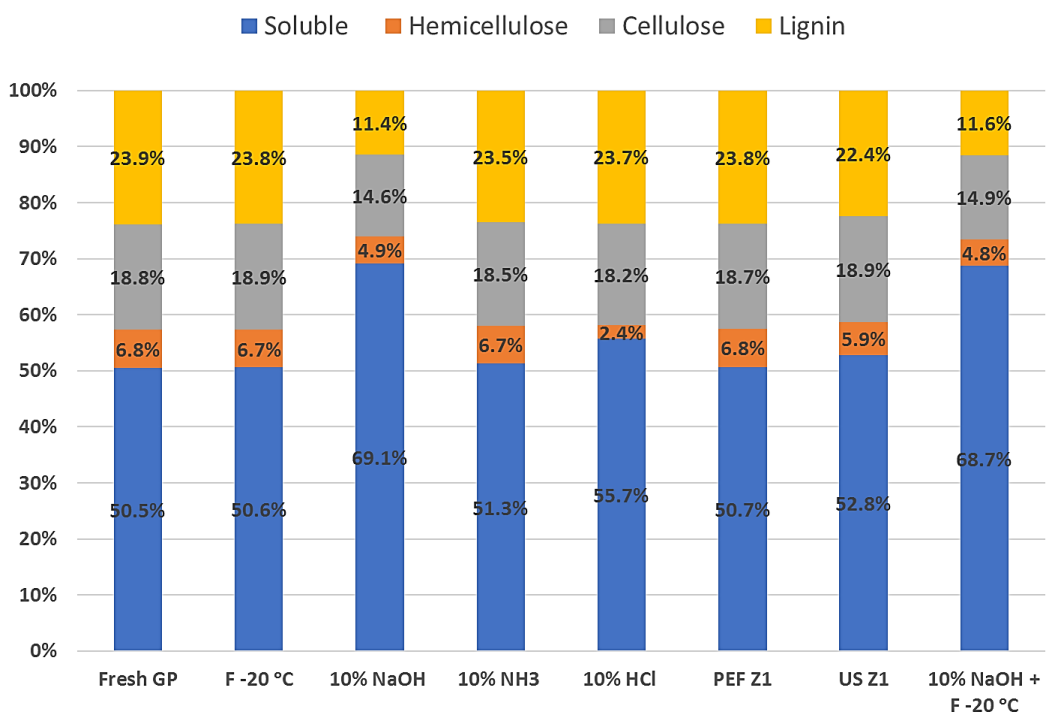

Figure 5: Van-Soest fractionation of the raw GP and the treated GP after selected pretreatment conditions (freezing at -20 °C, 10% NaOH, 10% NH_3, 10% HCl, PEF Z_1, US Z_1 and 10% NaOH + freezing at -20 °C), based on VS.

Freezing of the GP at -20 °C did not alter its lignocellulosic composition (Figure 6). However, it enhanced as previously mentioned, its methane production by almost 30% (Table 1). In fact, it has been shown that high cell disintegration can be achieved during freezing at low temperature without changing the chemical composition of the cell matrix (Thomashow, 1998; Webb et al., 1996). Moreover, grape freezing is usually used to promote the release of phenolic compounds from the skins. It causes the burst of the cells, breaking their membranes and thus releasing preferentially water-soluble compounds (Gil-Muñoz et al., 2009; Heredia et al., 2010). Therefore, the increase in methane production is directly linked to the release of the soluble compounds while lignocellulosic fractions remain intact (Jackowiak et al., 2011). For these reasons, freezing of food waste is considered essential to facilitate the hydrolytic process in anaerobic digesters ensuring faster supply of nutrients to microorganisms (Stabnikova et al., 2008).

In our study, alkaline treatment with 10% NaOH was the only treatment that altered the three components of the lignocellulosic biomass, justifying the highest enhancement in methane production. Significant reduction yields of 27.9%, 22.3% and 52.3% were obtained, for hemicellulose, cellulose and lignin, respectively (Figure 6). In fact, Sodium Hydroxide pretreatment of lignocellulosic biomass has been shown to modify lignin structure, increasing

the enzymatic accessibility to cellulose and hemicellulose fractions (Cheng et al., 2010; Sills and Gossett, 2011; Taherzadeh and Karimi, 2008). Herein, hemicellulose content decreased more than that of cellulose whereas lignin removal rate was much higher than both; this is in accordance with another study evaluating the effect of NaOH treatment on methane production from rice straw (Zhang et al., 2015). Hemicellulose having a molecular weight lower than that of cellulose is therefore easily degradable by the anaerobic microorganisms. Its solubilization is also explained by the disruption and the break-down of hydrogen bonds by the alkaline solution (Hendriks and Zeeman, 2009). The lignin removal is due to the saponification of intramolecular ester bonds which crosslink hemicellulose and lignin (He et al., 2008; Pavlostathis and Gossett, 1985). It was reported in 2010 that lignin degradation rate increased from 9% to 46% when corn stover was subjected to alkaline pretreatment at ambient temperature while the NaOH loading rate increased from 1.0% to 7.5% (Zhu et al., 2010). Regarding cellulose, it has shown in an alkaline medium the lowest removal rate between all three components; its native structure can be converted then to a more compact form, significantly limiting its reduction yield (He et al., 2008 ; Chen et al. , 2014).

Alkaline treatment using NH_3 showed no effects on the degradability of the fibers (Figure 6). In fact, NH_3 is considered to be a weak base because it does not completely dissociate into NH_4^+ and OH^- ions limiting its impact on the lignocellulosic matrix. Our results are consistent with those found in a previous study indicating no effects of NH_3 on methane yield and fibers biodegradability (Nordmann, 2013).

On another note, acid treatment using 10% HCl was only effective in removing hemicellulose displaying the highest reduction yield (79.4%) (Figure 6). Generally, these pretreatments are known to improve degradation of xylans which are the main components of hemicellulose (Nizami et al., 2009). These findings are supported by microscope observations of hemicellulose structural modifications caused by acid pretreatment on sunflower oil cake (Monlau et al., 2013b). Despite the high hemicellulose reduction in GP, our study registered a limited increase in methane production (+ 5%). This may be justified by the fact that the initial hemicellulose content in raw GP is low (around 7%, based on VS) (Figure 5) and that lignin and cellulose accounting for almost 43% of the GP based on VS, are not affected by acidic conditions (Figures 6 and 7).

Otherwise, PEF treatment did not affect the chemical composition of GP (Figure 6). Actually, it has been shown that the electroporation phenomena induced by PEF leads to a drastic increase in permeability, due to the appearance of pores in cell membranes releasing some components

to the extracellular medium (Ben Ammar et al., 2011; Lebovka et al., 2001). For that reason, PEF has been widely used for the extraction of various compounds from GP without modifying the chemical composition of the treated samples (El Darra et al., 2016; Rajha et al., 2015). During AD process, pores created by PEF will facilitate the access to intracellular components which become more amenable to enzymatic hydrolysis. This can explain the obtained 4% improvement of GP methane production.

After sonication of GP, significant reduction yields of 13.2% and 6.3% were obtained, for hemicellulose and lignin, respectively (Figure 6). In fact, US pretreatment at low frequency disrupts mechanically the cell structure and matrix leading to particle size reduction (Chu et al., 2002; Elliott and Mahmood, 2007). Sonication creates small cavitation bubbles; hydrolyzing hemicellulose fractions into simpler reducing sugars readily biodegradable by microorganisms (Kumar and Sharma, 2017). As for lignin, our finding is consistent with another one showing that sonication of wheat straw increased delignification by a maximum of 8% compared to untreated samples (Sun and Tomkinson, 2002).

To end with the coupled treatment using 10% NaOH and freezing at -20 °C, the later did not improve fibers reduction yields compared to 10% NaOH alone (Figure 6). These results are expected since freezing does not specifically modify the fiber content; however, it leads to high cell deterioration, thus facilitating the degradation of the matter when in contact with hydrolytic microorganisms.

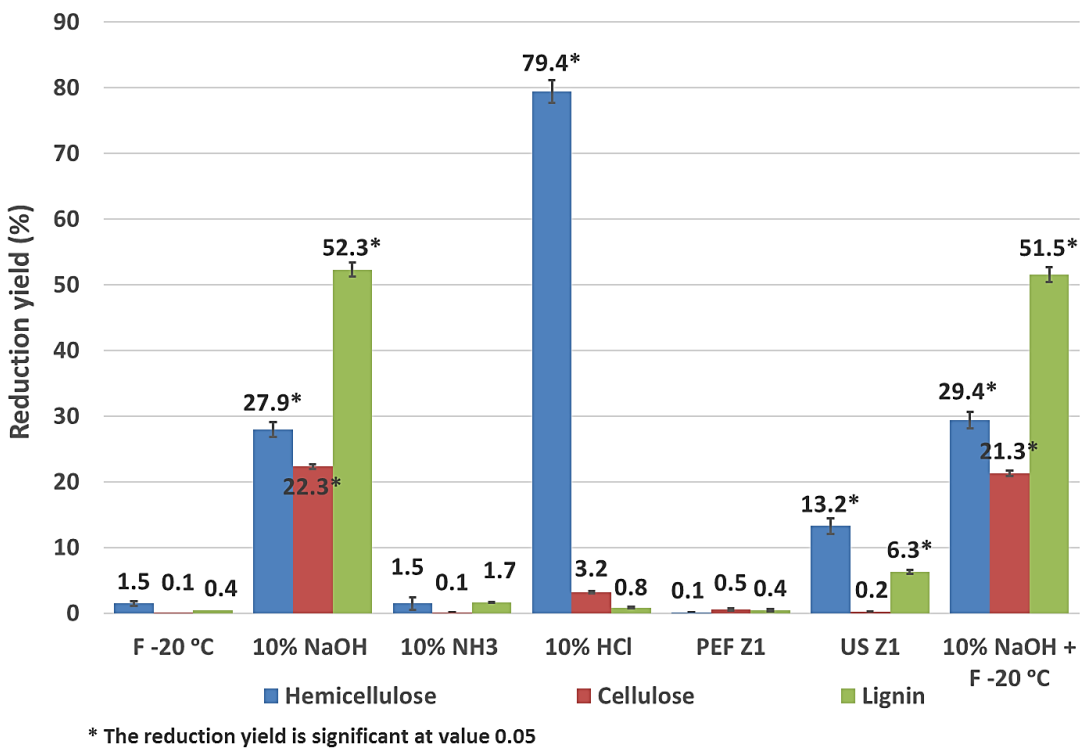

Figure 6: Fibers reduction yield (%) after selected pretreatment conditions.

3.3. Effect of alkaline treatment on methane production in continuous digesters

Today, increasing gas production remains one of the main targets when converting biomass to methane. Altogether, our results highlight the positive impact of coupling alkaline treatment using 10% NaOH and freezing at -20 °C on GP AD. Accordingly, experiments conducted in batch mode have to be validated in a scaled-up process using continuous digesters, aiming agricultural industries and wineries.

In continuous mode, the particle size of GP should not be too large, otherwise it would cause clogging of the digesters, mainly due to seeds presence. Additionally, we confirmed previously the positive effect of grinding on the anaerobic biodegradability of GP (El Achkar et al., 2016). For that, two sets of GP were prepared; the first represents the grinded GP without alkaline treatment and the second corresponds to the grinded GP treated with 10% NaOH. Following the alkaline pretreatment, the samples were ground to reach a particle size range between 0.04 µm and 1000 µm with a clear bimodal distribution centered on 25 µm and 500 µm, as evaluated using laser diffraction analysis (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, United Kingdom). Homogeneous samples of each set were frozen at -20 °C until use. Prior to the

continuous experiments, the effect of grinding was evaluated in batch mode and results showed that the cumulative methane yields were 0,208 $Nm^3 kg^{-1}$ and 0,260 $Nm^3 kg^{-1}$ of COD (data not shown), for the first and the second set of GP, respectively. Regarding the experiments in continuous mode, two digesters (1 and 2) were fed with the first set of GP and the two others (3 and 4) with the second.

For digesters (1) and (2) containing untreated GP, the mean pH of the medium decreased from 7.4 to 7.0 without any adjustment throughout the study. According to figure 7 (A), Alkalinity decreased from 3.9 to 2.8 g eq. $CaCO_3$ L^{-1} and Total Volatile Acidity (TVA) increased from 0.12 to 0.29 g eq. CH_3COOH L^{-1}, by the end of experiments. We note that, for a successful AD process, the alkalinity should be maintained above 2 g $CaCO_3$ L^{-1} to avoid drastic drops in pH and TVA, must be less than 2 g eq. CH_3COOH L^{-1} to prevent methanogenic bacteria inhibition (Yadvika et al., 2004). Moreover, another criteria for confirming the digester stability is the TVA/alkalinity ratio; in our study, it increased from 0.03 to 0.1. This ratio affirms our digesters stability, with the reported normal ratio being less than 0.4 (Callaghan et al., 2002). Finally, the average methane production was stabilized at 1.37 ± 0.01 NL (Figure 8).

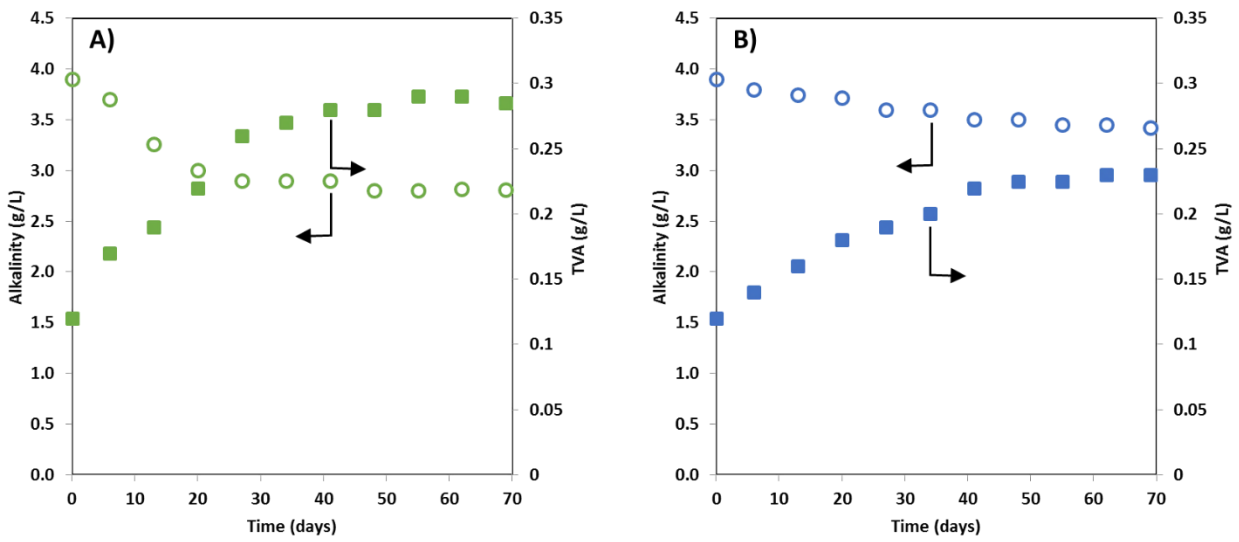

Figure 7: Evolution of alkalinity and TVA/alkalinity ratio during the acclimation period of the reactor. The values represent the means observed in the digesters containing untreated GP (A) and the digesters containing GP treated with 10% NaOH (B).

For digesters (3) and (4) containing GP treated with 10% NaOH, a pH value of about 7.4 ± 0.05 was recorded throughout the experiments. Alkalinity decreased from 3.9 to a stabilized value of 3.5 g eq. $CaCO_3$ L^{-1} and TVA increased from 0.12 to 0.23 g eq. CH_3COOH L^{-1}, at the end

of the experiments (Figure 7, B). The corresponding TVA/alkalinity ratio increased from 0.03 to 0.07, indicating system stability. The mean methane production was stabilized at 1.75 ± 0.01 NL (Figure 8); we conclude that alkaline treatment increases GP methane production by about 27%, in comparison to the untreated samples.

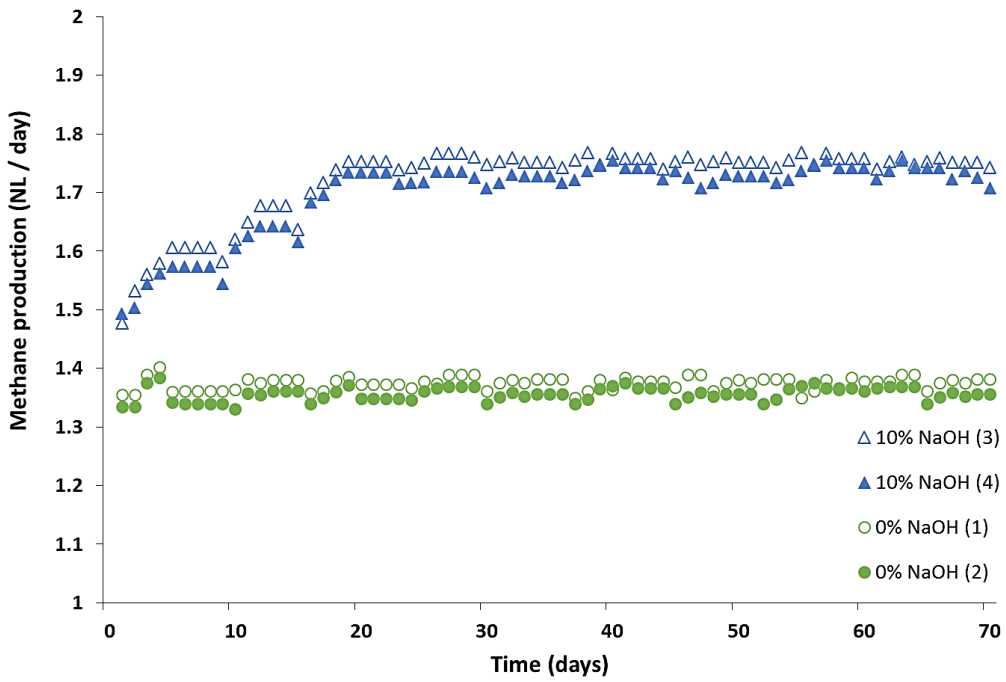

Figure 8: Daily methane production during the operating period of the digesters (1, 2, 3 and 4).

In order to proceed to a technical evaluation of the digester, the efficiency of the methane production of GP was determined by comparing the batch and continuous modes. Before and after the use of coupled pretreatment, methane production in the continuous digesters represents, in both cases, about 85% of that obtained with the batch system. In general, across anaerobic digesters operating with vegetable crops, it is possible to reach 70-90% of the methane potential in batch (Kafle and Kim, 2013; Zhang et al., 2013). Here in, the obtained yields stand for the success of our study on a large-scale test.

4. Conclusions

Among all tested pretreatments, alkaline treatment with NaOH is the most effective to improve GP hydrolysis rate and methane production by highly altering its lignocellulosic structure. Its combination with freezing treatment results in an increase in methane production of about 68% in batch mode, compared to the raw samples. Furthermore, the selected pretreatment conditions

were validated on a larger scale, using continuous digesters.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study investigating the influence of various pretreatments on GP methane potential and structural features. Although, some pretreatment conditions have been successful to some extent, the development of coupled pretreatments seems to be necessary to maximize the obtained effects, in a cost-effective and environmentally friendly manner. Finally, it will be advantageous to extend such pretreatments to other lignocellulosic crops with different chemical composition, contributing thus to green energy applications.

Chapitre VII

Transfert technologique

VII. Chapitre VII : Transfert technologique

Mise en place d'une première unité de méthanisation au sein de la Faculté des Sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth

La valorisation au Liban de coproduits industriels ne peut se compléter sans un transfert technologique d'expertise au sein de la communauté. C'est l'essence d'une stratégie établie au sein de la faculté des sciences qui collabore depuis des années avec des industriels libanais. Dans le cadre de cette thèse, nous avons ainsi cherché à implémenter une première unité de méthanisation au sein de la faculté. Nous avons mis en place, dans un premier temps, un modèle de digesteurs fonctionnant en mode batch au sein de notre laboratoire (Figure 1).

Figure VII. 1 : Unité de méthanisation en mode batch montée au sein de la faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth

Ce procédé de digestion anaérobie comprend trois unités principales. L'unité d'incubation consiste en un bain marie thermostaté (37 °C) qui contient des digesteurs de 500 mL hermétiquement fermés. Chaque digesteur est agité manuellement deux fois par jour, pendant une minute, afin d'assurer un mélange suffisant. Le biogaz produit passe par un tube reliant l'unité d'incubation à l'unité de fixation du CO_2. Cette dernière est constituée de bouteilles contenant une solution alcaline fixant le CO_2 (80 mL de NaOH à 240 $g \cdot L^{-1}$) et de la thymolphthaléine comme indicateur coloré de pH. La troisième unité permet la mesure du volume de CH_4 alors libéré, par déplacement de l'eau à l'intérieur des éprouvettes graduées.

Ensuite, nous avons cherché à valider ce modèle en évaluant le potentiel méthane sur du marc de raisin de cépage « Cabernet Franc », vendange 2014, en provenance de la région de Layon en France et qui a été précédemment étudié dans ce projet (voir chapitre 4). De plus, nous avons collaboré avec Château Kefraya qui nous a fourni un mélange de cépages libanais récupérés pendant la vendange 2016. Concernant l'inoculum, nous avons utilisé de la bouse de vache fraîche, récupérée d'une ferme locale située à Bikfaya au Liban. Celle-ci a été tamisée avec un tamis de 500 µm afin d'éliminer les grandes particules et d'assurer une meilleure homogénéité. Ensuite, elle a été diluée avec de l'eau, et rajoutée dans les digesteurs selon un rapport (g MS inoculum / g MS substrat) de 3/1. Le pH initial dans les digesteurs était de 7,8. Tous les tests ont été réalisés en *quadruplet*, sans broyage des substrats (Figure 2).

Figure VII. 2 : Dégagement des bulles de gaz à l'intérieur des digesteurs durant la digestion anaérobie du marc de raisin

La valeur nette de production de méthane est obtenue en soustrayant la production endogène des bouteilles contenant l'inoculum seul. Les valeurs de pH mesurées dans les digesteurs, à la fin des expérimentations, ont été supérieures à 7,5 ce qui prouve que l'arrêt de la production de méthane est dû à l'épuisement de la biomasse et non pas à l'acidification du milieu. Les productions cumulées de méthane des substrats sont présentées dans la figure 3. Après 30 jours, on obtient une production maximale de 0,154 Nm^3 CH_4 kg MS^{-1} pour le Cabernet Franc et 0,134 Nm^3 CH_4 kg MS^{-1} pour le mélange des cépages libanais, respectivement. Soulignons que les productions de méthane du cépage Cabernet Franc, ont été déterminées en France par l'AMPTS-II et ont affiché des valeurs maximales de 0,169 Nm^3 CH_4 kg MS^{-1} (Chapitre 4).

Cette faible différence de 9% entre les valeurs enregistrées permet la validation de notre unité en mode batch.

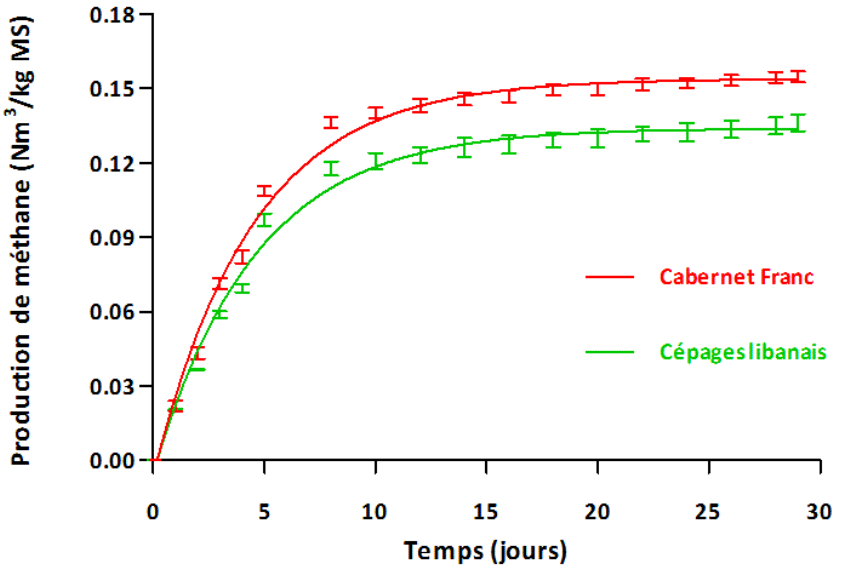

Figure VII. 3 : Production cumulée de méthane normalisée à la masse de matières sèches injectée en fonction du temps. Les courbes correspondent à un modèle du premier ordre. Les barres représentent l'écart-type moyen des échantillons.

Enfin, ce modèle a été reconnu par le ministère de l'industrie au Liban, et a remporté le prix du fonds LIRA (Lebanese Industrial Research Achievement) en avril 2017, qui valorise les bonnes initiatives des jeunes chercheurs libanais, à l'interface académique/industrielle, pour une société libanaise innovante.

Ce premier modèle de méthaniseur initie le travail sur le terrain à la faculté des sciences. Nous souhaitons ultérieurement accroître cette unité en optimisant davantage les digesteurs en mode batch. Plusieurs améliorations sont à introduire, particulièrement des instruments accessoires de détection ou de mesure de méthane. D'ailleurs, nous travaillerons surtout à mettre en place des digesteurs en mode continu, qui porteraient cet espace de travail à l'échelle industrielle et renforceraient nos partenariats ainsi que les secteurs agricoles et industriels Libanais.

Chapitre VIII

Conclusions générales et perspectives

VIII.Chapitre VIII : Conclusions générales et perspectives

La production de méthane par digestion anaérobie se présente comme une approche prometteuse et puissante pour la valorisation durable des ressources organiques naturelles, envisageant ainsi un avenir bioéconomique. Le secteur viti-vinicole étant l'une des activités agroalimentaires majeures, en France et au Liban, ce travail de thèse s'est concentré sur la valorisation des sous-produits issus de ce secteur, en particulier, du marc de raisin par digestion anaérobie afin de générer de l'énergie dite verte sous forme de méthane. En raison de leur dégradation rapide, notamment dans les pays sous climats méditerranéens comme le Liban et une partie de la France, les déchets issus de la viniculture souvent mis en décharges représentent une menace pour l'environnement et donc pour la santé humaine. Ce travail de recherche répondrait ainsi à divers besoins incontournables : leur traitement, leur réutilisation appropriée et la création d'une approche sociétale saine contribuant de manière significative à une chaîne durable du point de vue environnemental et économique.

Dans un premier temps, une étude a été menée afin de mettre en évidence le potentiel du marc de raisin comme source d'énergie verte. Les résultats obtenus avec le test BMP ont fourni des informations inédites et détaillées sur les productions maximales de méthane à partir du marc entier, des pulpes et des pépins, séparément. Pour valider ces résultats à l'échelle d'un pilote de 12 Litres de volume utile, fonctionnant en mode continu avec un temps de séjour de 30 jours, un débit de biogaz de 6,43 NL j^{-1} a été obtenu après stabilisation avec une teneur en méthane de 62,3 %. Les paramètres physicochimiques de suivi enregistrés ont témoigné du bon déroulement du processus. En outre, le potentiel méthane en continu comparé à celui réalisé en batch, a montré un rendement du pilote de 81% authentifiant la faisabilité du processus et confirmant le succès de notre étude pour une gestion appropriée et une exploitation énergétique de ce coproduit œnologique.

Comme l'activité vinicole au Liban est majoritairement répandue dans la plaine de la Bekaa, des essais d'acclimatation du digesteur de 37 °C à la température moyenne de la vallée de la Bekaa (25 °C) ont été exécutés en vue de simuler et adapter le système au milieu libanais. Nous avons réussi à construire un modèle d'évolution de la production de méthane en fonction de la température de fonctionnement et du temps de digestion. Les constantes des vitesses d'hydrolyse de premier ordre ont suivi la loi d'Arrhenius avec une énergie d'activation moyenne de 40 kJ mol^{-1}. Il est intéressant de souligner que cette valeur d'énergie s'insère dans la gamme basse des énergies trouvées dans la littérature pour différents substrats, attestant le potentiel

concurrentiel du marc de raisin, en tant que source d'énergie verte, par rapport aux autres types de déchets.

Un autre aspect pionnier de ce projet a consisté à étudier l'influence des paramètres bio-physico-chimiques sur la production de méthane d'une large gamme de marcs de raisins industriels provenant de différentes exploitations et de différents cépages. L'analyse en composantes principales a dévoilé qu'une corrélation positive existe entre la production de méthane d'une part et les constantes cinétiques de premier ordre, les taux d'hémicelluloses et de fractions solubles d'autre part. Au contraire, une corrélation négative a été trouvée entre le potentiel méthane et les teneurs en lignine et en cellulose. Il convient de noter également qu'aucune corrélation significative ne semble pouvoir s'établir entre le potentiel méthanogène et les polyphénols totaux ; ces derniers reconnus comme des inhibiteurs de croissance bactérienne. Pour l'ensemble des résultats obtenus, nous constatons qu'il serait pertinent de réduire la complexité et la récalcitrance des fractions lignocellulosiques, afin d'intensifier la conversion en méthane.

Notre étude vise promouvoir la digestion anaérobie à l'interface académique/industrielle ; nous avons donc procédé à l'optimisation du dimensionnement et du fonctionnement des digesteurs anaérobies en mode continu. Nos résultats démontrent qu'un temps de séjour inférieur à 30 jours est suffisant pour une digestion efficace du marc de raisin. Nous avons délimité une zone optimale pour une conduite fondamentale et non critique des digesteurs traitant du marc de raisin, avec une charge appliquée de 3,7 kg DCO m^{-3} j^{-1} et 20 jours de temps de séjour. Un temps de séjour de 15 jours semble être critique en raison de l'instabilité rencontrée dans le système, et celui de 10 jours provoque une panne irréversible du procédé dû au lessivage bactérien.

Enfin, dans le but d'améliorer l'étape d'hydrolyse et par la suite la production de méthane de notre matière première, nous avons évalué les effets d'un ensemble de prétraitements chimiques et mécaniques sur la digestion anaérobie (congélation, traitement alcalin, traitement acide, ultrasons et champs électriques pulsés). Le traitement alcalin avec 10% NaOH m/m MS_{marc} a été le plus efficace quant à l'augmentation de la production de méthane (+36%). Il est également le seul à altérer les principaux composants de la biomasse lignocellulosique avec des taux de réduction de 27,9%, 22,3% et 52,3% pour l'hémicellulose, la cellulose et la lignine, respectivement. Le couplage de ce traitement avec la congélation à -20 °C s'annonce le meilleur procédé d'intensification, améliorant la production de méthane de 68%. Ces résultats ont été

validés dans un processus à plus grande échelle dans des digesteurs en mode continu.

Dans l'ensemble, ce projet de recherche s'inscrit dans une dynamique de développement durable, impliquant secteurs privés et publique. Les résultats obtenus confirment l'intérêt de la valorisation verte des marcs de raisins par méthanisation. Cette approche scientifique pourrait ainsi être intégrée dans le cadre d'une stratégie nationale de gestion et valorisation matière/énergie des déchets.

Ce travail de thèse inspire de nouvelles pistes de recherche prometteuses.

A part les optimisations des temps de séjour qui permettent de réduire la taille des installations, de minimiser les investissements ou de maximiser la quantité des intrants en fonction d'un dimensionnement persistant, une deuxième voie pour augmenter la production de méthane résiderait dans la codigestion. C'est une voie captivante pour le traitement de déchets fermentescibles produits à l'échelle d'un territoire. Par conséquent, il serait intéressant d'inventorier et de caractériser les principaux déchets produits dans la zone périphérique du site de méthanisation des marcs de raisins. Leur couplage à des déchets organiques de collectivités ou des coproduits agricoles pourrait augmenter les performances des digesteurs en améliorant le bilan économique du processus. Cependant, les aspects géographiques liés aux circuits de collecte, au positionnement de l'installation et au transport sont à prendre en compte dans l'étude des impacts environnementaux, économiques et sociaux liés à la codigestion.

De plus, les fractions solides des digestats récupérés à la fin du processus présentent des caractéristiques voisines à des composts maturés et constituent des amendements organiques intéressants pour une valorisation agronomique. Néanmoins, le digestat doit faire antérieurement l'objet d'un traitement spécifique comprenant à titre d'exemple une séparation de phases, une étape de séchage ou un compostage. Il serait également important de caractériser le digestat, le taux de matières sèches, l'humidité, le taux d'azote total et ammoniacal, la teneur en carbone, le rapport C/N, les taux de potassium total et de phosphore total.

Bien que certaines conditions de prétraitements s'avèrent être adéquates, le développement de nouveaux prétraitements tels que les prétraitements fongiques et d'autres couplés s'exige afin d'optimiser les effets obtenus, d'une manière lucrative mais notamment respectueuse de l'environnement. Une étude développée permettrait donc de mieux évaluer les dépenses énergétiques liées à ces traitements, d'effectuer un bilan énergétique précis et d'envisager aussi

une analyse de cycle de vie (ACV).

Afin d'éviter les risques d'accumulation d'AGV, rencontrés lors d'un fonctionnement sous de faibles temps de séjour, nous proposons d'utiliser un digesteur à deux étapes. Dans le premier réacteur, on réalise une hydrolyse et une acidogenèse du marc de raisin, ce qui liquéfie la matière organique solide et la transforme en AGV, et dans le second on aura la méthanisation de la fraction liquide. C'est une piste inexploitée qui reste à découvrir.

D'autre part, les polyphénols ne porteraient pas d'effets inhibiteurs sur la méthanisation du marc de raisin, il serait donc pertinent de conduire des tests BMP sur des marcs, dont on a déjà extrait les composés phénoliques, et de comparer les résultats avec ceux obtenus avec les marcs entiers. Cette approche revêt un double intérêt : l'extraction et la valorisation des polyphénols comme molécules bioactives et la production d'énergie de la biomasse restante.

En vue d'offrir aux acteurs d'intérêt un modèle de fonctionnement optimisé, nous visons profiter des cinétiques de production de méthane en réacteur discontinu et de la distribution expérimentale des temps de séjour dans le réacteur continu pour prédire les volumes de méthane attendus lors d'un fonctionnement à grande échelle. Cette simulation est avantageuse, sachant que les essais en mode batch sont réalisés sur de courtes durées et à moindre coût par rapport à ceux en continu.

Dans le cadre de l'adaptation du processus aux milieux libanais, particulièrement au climat de la Bekaa, il serait judicieux d'explorer la digestion anaérobie appliquée aux écosystèmes psychrophiles. Cette extrapolation profiterait de même de l'étude du procédé à 40 °C, température maximale enregistrée en été à la Bekaa. Nous envisageons donc une projection vers un modèle plus évocateur couvrant les différentes températures affichées durant l'année. En outre, faciliter le fonctionnement des digesteurs à de basses températures ambiantes, sans apport énergétique externe, est abordable en opérant avec un temps de séjour supérieur à 30 jours et en vérifiant si le taux de dégradation correspondant serait voisin à celui obtenu à 37 °C.

Ainsi, le génie des procédés, la biochimie et la modélisation serviraient à une compréhension détaillée des conditions opératoires et du déroulement du processus. Toutefois, les outils de biologie moléculaire permettraient d'aborder l'aspect microbiologique. Des études ultérieures sont à réaliser pour caractériser la diversité phylogénétique des communautés bactériennes et comprendre leurs dynamiques de comportement. Des réponses sont à apporter quant à l'importance du choix de l'inoculum, qui déterminera la nature des espèces microbiennes présentes décidant des vitesses et des taux de dégradation. De plus, la concentration et l'activité

d'une espèce ou d'un groupe microbien au sein du milieu seraient décrites, grâce particulièrement à la PCR quantitative en temps réel. D'autres techniques d'investigation in situ (FISH et microscopie confocale) révèleraient la colonisation spatiale de notre substrat par les différentes communautés microbiennes. Ces analyses mettront l'accent sur les phénomènes de diffusion et de bioaccessibilité au marc de raisin.

Enfin, menons des campagnes de sensibilisation pour promouvoir la réduction de la production des rejets à la source ; gardons à l'esprit que « *le meilleur déchet est celui qu'on ne produit pas* ». Encourageons la culture du compostage domestique, du lombricompostage, de l'herbicyclage ou autres, conjointement à la méthanisation. Des perspectives durables engageraient les chercheurs auprès des industriels, des organisations gouvernementales ainsi que les communautés civiles. L'adhésion et la coopération entre les différents partenaires ouvrent ainsi la voie au bon développement de la filière de la méthanisation.

Références bibliographiques

Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C.J., Romero-García, L.I., 2016. Biomethanization of sugar beet byproduct by semi-continuous single digestion and co-digestion with cow manure. Bioresour. Technol. 200, 311–319. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.051

Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C.J., Romero-García, L.I., 2015. Semi-continuous anaerobic co-digestion of sugar beet byproduct and pig manure: Effect of the organic loading rate (OLR) on process performance. Bioresour. Technol. 194, 283–290. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.031

Abubakar, M., Saeed, A., Kul, O., 2015. The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock: Animal Health and Biotechnology. Springer, 151p.

ADEME, 2015. Chiffres-clés Déchets, Réf. 8500, ISSN 2275-5691, 96 p.

Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I., 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 559–565. doi:10.1007/BF00218466

Alipour, D., Rouzbehan, Y., 2007. Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 138–149. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.09.020

Álvarez, E., Rodiño-Janeiro, B.K., Jerez, M., Ucieda-Somoza, R., Núñez, M.J., González-Juanatey, J.R., 2012. Procyanidins from grape pomace are suitable inhibitors of human endothelial NADPH oxidase. J. Cell. Biochem. 113, 1386–1396. doi:10.1002/jcb.24011

Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 3, 117–129. doi:10.1007/s11157-004-2502-3

Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., Lens, P.N.L., 2014. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. Appl. Energy 123, 143–156. doi:10.1016/j.apenergy.2014.02.035

Astals, S., Batstone, D.J., Mata-Alvarez, J., Jensen, P.D., 2014. Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. Bioresour. Technol. 169, 421–427. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.024

Austermann-Haun, U., Rosenwinkel, K.-H., 1997. Two examples of anaerobic pre-treatment of wastewater in the beverage industry. Water Sci. Technol., Pretreatment of Industrial Wastewaters IISelected Proceedings of the Second IAWQ International Conference on Pretreatment of Industrial Wastewaters 36, 311–319. doi:10.1016/S0273-1223(97)00403-4

Badshah, M., Lam, D.M., Liu, J., Mattiasson, B., 2012. Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. Bioresour. Technol. 114, 262–269. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.022

Barbanti, L., Di Girolamo, G., Grigatti, M., Bertin, L., Ciavatta, C., 2014. Anaerobic digestion of annual and multi-annual biomass crops. Ind. Crops Prod. 56, 137–144. doi:10.1016/j.indcrop.2014.03.002

Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 45, 65–73.

Battista, F., Fino, D., Ruggeri, B., 2014. Polyphenols concentration's effect on the biogas production by wastes derived from olive oil production. Chem. Eng. Trans. 38, 373–378. doi:10.3303/CET1438063

Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. Crit. Rev. Plant Sci. 17, 125–197. doi:10.1080/07352689891304203

Bayard, R., Gonzalez-Ramirez, L., Guendouz, J., Benbelkacem, H., Buffière, P., Gourdon, R., 2015. Statistical Analysis to Correlate Bio-physical and Chemical Characteristics of Organic Wastes and Digestates to Their Anaerobic Biodegradability. Waste Biomass Valorization 6, 759–769. doi:10.1007/s12649-015-9411-2

Bayr, S., Rintala, J., 2012. Thermophilic anaerobic digestion of pulp and paper mill primary sludge and co-digestion of primary and secondary sludge. Water Res. 46, 4713–4720. doi:10.1016/j.watres.2012.06.033

Béline, F., 2013. État du développement de la méthanisation en France. Sci. Eaux Territ. Numéro 12, 28–29.

Ben Ammar, J., Lanoisellé, J.-L., Lebovka, N.I., Van Hecke, E., Vorobiev, E., 2011. Impact of a pulsed electric field on damage of plant tissues: effects of cell size and tissue electrical conductivity. J. Food Sci. 76, E90-97. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01893.x

Berg, L. van den, Kennedy, K.J., Samson, R., 1985. Anaerobic Downflow Stationary Fixed Film Reactors: Performance Under Steady-State and Non-Steady State Conditions. Water Sci. Technol. 17, 89–102.

Bilgili, M.S., Demir, A., Varank, G., 2009. Evaluation and modeling of biochemical methane potential (BMP) of landfilled solid waste: A pilot scale study. Bioresour. Technol. 100, 4976–4980. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.012

Björnsson, L., Murto, M., Mattiasson, B., 2000. Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 844–849.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 54, 519–546. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938

Bolado-Rodríguez, S., Toquero, C., Martín-Juárez, J., Travaini, R., García-Encina, P.A., 2016. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. Bioresour. Technol. 201, 182–190. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.047

Borja, R., Banks, C.J., Wang, Z., 1994. Performance and kinetics of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating slaughterhouse wastewater. J. Environ. Sci. Health Part Environ. Sci. Eng. Toxicol. 29, 2063–2085. doi:10.1080/10934529409376165

Börjesson, P., Mattiasson, B., 2008. Biogas as a resource-efficient vehicle fuel. Trends Biotechnol. 26, 7–13. doi:10.1016/j.tibtech.2007.09.007

Bougrier, C., Albasi, C., Delgenès, J.P., Carrère, H., 2006. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. Chem. Eng. Process. Process Intensif. 45, 711–718. doi:10.1016/j.cep.2006.02.005

Bougrier, C., Delgenès, J.P., Carrère, H., 2008. Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. Chem. Eng. J. 139, 236–244. doi:10.1016/j.cej.2007.07.099

Bracmort, K., 2011. Methane Capture: Options for Greenhouse Gas Emission Reduction. DIANE Publishing.

Braguglia, C.M., Mininni, G., Gianico, A., 2008. Is sonication effective to improve biogas production and solids reduction in excess sludge digestion? Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 57, 479–483. doi:10.2166/wst.2008.003

Brooks, L., Parravicini, V., Svardal, K., Kroiss, H., Prendl, L., 2008. Biogas from sugar beet press pulp as substitute of fossil fuel in sugar beet factories. Water Sci. Technol. 58, 1497–1504. doi:10.2166/wst.2008.516

Buffière, P., Bergeon, J.-P., Moletta, R., 2000. The inverse turbulent bed: a novel bioreactor for anaerobic treatment. Water Res. 34, 673–677. doi:10.1016/S0043-1354(99)00166-9

Buffière, P., Frederic, S., Marty, B., Delgenes, J.-P., 2008. A comprehensive method for organic matter characterization in solid wastes in view of assessing their anaerobic biodegradability. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 58, 1783–1788. doi:10.2166/wst.2008.517

Buffière, P., Loisel, D., Bernet, N., Delgenes, J.-P., 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 53, 233–241.

Bull, M.A., Sterritt, R.M., Lester, J.N., 1983. An evaluation of four start-up regimes for anaerobic fluidized bed reactors. Biotechnol. Lett. 5, 333–338. doi:10.1007/BF01141134

Buranov, A.U., Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. Ind. Crops Prod. 28, 237–259. doi:10.1016/j.indcrop.2008.03.008

Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. Waste Manag. 28, 372–380. doi:10.1016/j.wasman.2007.01.013

Buswell, A.M., Mueller, H.F., 1952. Mechanism of Methane Fermentation. Ind. Eng. Chem. 44, 550–552. doi:10.1021/ie50507a033

Cáceres, C.X., Cáceres, R.E., Hein, D., Molina, M.G., Pia, J.M., 2012. Biogas production from grape pomace: Thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system. Int. J. Hydrog. Energy 37, 10111–10117. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.178

Callaghan, F.J., Wase, D.A.J., Thayanithy, K., Forster, C.F., 2002. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. Biomass Bioenergy 22, 71–77. doi:10.1016/S0961-9534(01)00057-5

Camarillo, R., Rincón, J., 2009. Effect of inhibitory compounds on the anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84, 1615–1623. doi:10.1002/jctb.2247

Caramiello, C., Lancellotti, I., Righi, F., Tatàno, F., Taurino, R., Barbieri, L., 2013. Anaerobic digestion of selected Italian agricultural and industrial residues (grape seeds and leather dust): combined methane production and digestate characterization. Environ. Technol. 34, 1225–1237. doi:10.1080/09593330.2012.743597

Carchesio, M., Tatàno, F., Lancellotti, I., Taurino, R., Colombo, E., Barbieri, L., 2014. Comparison of biomethane production and digestate characterization for selected

agricultural substrates in Italy. Environ. Technol. 35, 2212–2226. doi:10.1080/09593330.2014.898701

Carlsson, M., Lagerkvist, A., Morgan-Sagastume, F., 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. Waste Manag. 32, 1634–1650. doi:10.1016/j.wasman.2012.04.016

Carrère, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., Ferrer, I., 2016. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. Bioresour. Technol., Pretreatment of Biomass 199, 386–397. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.007

Carrère, H., Bougrier, C., Castets, D., Delgenès, J.P., 2008. Impact of initial biodegradability on sludge anaerobic digestion enhancement by thermal pretreatment. J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 43, 1551–1555. doi:10.1080/10934520802293735

Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenès, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I., 2010. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. J. Hazard. Mater. 183, 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.06.129

Castellucci, F., 2013. World Vitiviniculture situation in 2012, in: XXXVIth World Congress of Vine and Wine. Bucarest, 3rd June 2013.

Chanakya, H.N., Ramachandra, T.V., Guruprasad, M., Devi, V., 2007. Micro-treatment options for components of organic fraction of MSW in residential areas. Environ. Monit. Assess. 135, 129–139. doi:10.1007/s10661-007-9711-5

Chand, R., Narimura, K., Kawakita, H., Ohto, K., Watari, T., Inoue, K., 2009. Grape waste as a biosorbent for removing Cr(VI) from aqueous solution. J. Hazard. Mater. 163, 245–250. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.084

Chen, X., Gu, Y., Zhou, X., Zhang, Y., 2014. Asparagus stem as a new lignocellulosic biomass feedstock for anaerobic digestion: Increasing hydrolysis rate, methane production and biodegradability by alkaline pretreatment. Bioresour. Technol. 164, 78–85. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.070

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. Bioresour. Technol. 99, 4044–4064. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057

Chen, Y., Wen, Y., Zhou, J., Xu, C., Zhou, Q., 2012. Effects of pH on the hydrolysis of lignocellulosic wastes and volatile fatty acids accumulation: The contribution of biotic and abiotic factors. Bioresour. Technol. 110, 321–329. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.049

Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S., 2010. Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 1768–1784. doi:10.1007/s12010-010-8958-4

Choi, E., Rim, J.M., 1991. Competition and Inhibition of Sulfate Reducers and Methane Producers in Anaerobic Treatment. Water Sci. Technol. 23, 1259–1264.

Choorit, W., Wisarnwan, P., 2007. Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent. Electron. J. Biotechnol. 10, 376–385. doi:10.4067/S0717-34582007000300005

Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.-V., You, C.S., Tay, J.H., 2002. "Weak" ultrasonic pre-treatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids. Water Res. 36, 2681–2688. doi:10.1016/S0043-1354(01)00515-2

Clark, J.H., Luque, R., Matharu, A.S., 2012. Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 3, 183–207. doi:10.1146/annurev-chembioeng-062011-081014

Cobb, S.A. Auburn U., Hill, D.T., 1991. Volatile fatty acid relationships in attached growth anaerobic fermenters. Trans. ASAE USA.

Crespo, J.G., Brazinha, C., 2010. Membrane processing: Natural antioxidants from winemaking by-products. Filtr. Sep. 47, 32–35.

Cresson, R., 2006. Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation : Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm. Thèse de l'Université de Montpellier II, France.

Cysneiros, D., Banks, C.J., Heaven, S., Karatzas, K.-A.G., 2012. The effect of pH control and "hydraulic flush" on hydrolysis and Volatile Fatty Acids (VFA) production and profile in anaerobic leach bed reactors digesting a high solids content substrate. Bioresour. Technol. 123, 263–271. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.060

Dareioti, M.A., Kornaros, M., 2015. Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a two-stage CSTR system: Effect of hydraulic retention time. Bioresour. Technol. 175, 553–562. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.102

Dareioti, M.A., Kornaros, M., 2014. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. Bioresour. Technol. 167, 407–415. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.045

Datta, R., 1981. Acidogenic fermentation of corn stover. Biotechnol. Bioeng. 23, 61–77. doi:10.1002/bit.260230106

De Baere, L., 2006. Will anaerobic digestion of solid waste survive in the future? Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 53, 187–194.

De Vrieze, J., Raport, L., Willems, B., Verbrugge, S., Volcke, E., Meers, E., Angenent, L.T., Boon, N., 2015. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. Microb. Biotechnol. 8, 776–786. doi:10.1111/1751-7915.12268

Demirel, B., Neumann, L., Scherer, P., 2008. Microbial Community Dynamics of a Continuous Mesophilic Anaerobic Biogas Digester Fed with Sugar Beet Silage. Eng. Life Sci. 8, 390–398. doi:10.1002/elsc.200800010

Diller, K.R., 1975. Intracellular freezing: Effect of extracellular supercooling. Cryobiology 12, 480–485. doi:10.1016/0011-2240(75)90029-2

Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S., 2010. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. Bioresour. Technol. 101, 3780–3783. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.113

Donoso-Bravo, A., Pérez-Elvira, S.I., Fdz-Polanco, F., 2010. Application of simplified models for anaerobic biodegradability tests. Evaluation of pre-treatment processes. Chem. Eng. J. 160, 607–614. doi:10.1016/j.cej.2010.03.082

Dwyer, K., Hosseinian, F., Rod, M., 2014. The Market Potential of Grape Waste Alternatives. J. Food Res. 3, p91. doi:10.5539/jfr.v3n2p91

Eastman, J.A., Ferguson, J.F., 1981. Solubilization of Particulate Organic Carbon during the Acid Phase of Anaerobic Digestion. J. Water Pollut. Control Fed. 53, 352–366.

El Achkar, J.H., Lendormi, T., Hobaika, Z., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R.G., Lanoisellé, J.-L., 2016. Anaerobic digestion of grape pomace: Biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters. Waste Manag. 50, 275–282. doi:10.1016/j.wasman.2016.02.028

El Darra, N., Grimi, N., Maroun, R.G., Louka, N., Vorobiev, E., 2013. Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. Eur. Food Res. Technol. 236, 47–56. doi:10.1007/s00217-012-1858-9

El Darra, N., Rajha, H.N., Ducasse, M.-A., Turk, M.F., Grimi, N., Maroun, R.G., Louka, N., Vorobiev, E., 2016. Effect of pulsed electric field treatment during cold maceration and alcoholic fermentation on major red wine qualitative and quantitative parameters. Food Chem. 213, 352–360. doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.073

El Darra, N.E., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R., 2013. Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating. Food Bioprocess Technol. 6, 1281–1289. doi:10.1007/s11947-012-0869-7

El Darra, N.E., Tannous, J., Mouncef, P.B., Palge, J., Yaghi, J., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R.G., 2012. A Comparative Study on Antiradical and Antimicrobial Properties of Red Grapes Extracts Obtained from Different Vitis vinifera Varieties. Food Nutr. Sci. 03, 1420. doi:10.4236/fns.2012.310186

Elliott, A., Mahmood, T., 2007. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. Water Res. 41, 4273–4286. doi:10.1016/j.watres.2007.06.017

El-Mashad, H.M., 2013. Kinetics of methane production from the codigestion of switchgrass and Spirulina platensis algae. Bioresour. Technol. 132, 305–312. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.183

Emsley, A.M., Stevens, G.C., 1994. Kinetics and mechanisms of the low-temperature degradation of cellulose. Cellulose 1, 26–56. doi:10.1007/BF00818797

Fabbri, A., Bonifazi, G., Serranti, S., 2015. Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants. Waste Manag. 36, 156–165. doi:10.1016/j.wasman.2014.11.022

Fang, J.M., Sun, R.C., Tomkinson, J., Fowler, P., 2000. Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system. Carbohydr. Polym. 41, 379–387. doi:10.1016/S0144-8617(99)00102-2

FAOSTAT, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations statistics division. http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E. Consulted on the 10th of October 2016.

Fedorak, P.M., Hrudey, S.E., 1984. The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. Water Res. 18, 361–367. doi:10.1016/0043-1354(84)90113-1

Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., Ferrer, A., 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. Bioresour. Technol. 76, 39–44. doi:10.1016/S0960-8524(00)00076-6

Ferry, J.G., 1994. Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics, 1993 edition. ed. Springer, New York.

Fezzani, B., Cheikh, R.B., 2007. Thermophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid wastes in a tubular digester. Chem. Eng. J. 132, 195–203. doi:10.1016/j.cej.2006.12.017

Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C., Insam, H., 2014. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. Waste Manag. 34, 2080–2089. doi:10.1016/j.wasman.2014.07.020

Fry, S.C., 2011. Plant cell walls. From chemistry to biology. Ann. Bot. 108, viii–ix. doi:10.1093/aob/mcr128

Garcia-Calderon, D., Buffière, P., Moletta, R., Elmaleh, S., 1998. Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in down-flow fluidized bed. Water Res. 32, 3593–3600. doi:10.1016/S0043-1354(98)00134-1

Garoma, T., Shackelford, T., 2014. Electroporation of Chlorella vulgaris to enhance biomethane production. Bioresour. Technol. 169, 778–783. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.001

Gashaw, A., 2014. Anaerobic Co-Digestion of Biodegradable Municipal Solid Waste with Human Excreta for Biogas Production: A Review. Am. J. Appl. Chem. 2, 55. doi:10.11648/j.ajac.20140204.12

Ghosh, S., Pohland, F.G., 1974. Kinetics of Substrate Assimilation and Product Formation in Anaerobic Digestion. J. Water Pollut. Control Fed. 46, 748–759.

Gil-Muñoz, R., Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J.I., Martínez-Cutillas, A., Gómez-Plaza, E., 2009. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. Eur. Food Res. Technol. 228, 777–788. doi:10.1007/s00217-008-0989-5

Girault, R., 2011. Etude des cinétiques de dégradation anaérobie et des interactions entre substrats organiques : impact sur les filières de co-digestion. Thèse de l'Université de Rennes 1, France.

Godin, B., Agneessens, R., Gofflot, S., Lamaudière, S., Sinnaeve, G., A. Gerin, P., Delcarte, J., 2011. Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. Base 15 15.

Griffin, M.E., McMahon, K.D., Mackie, R.I., Raskin, L., 1998. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. Biotechnol. Bioeng. 57, 342–355.

Guillaume, S., Lendormi, T., 2015. Anaerobic co-digestion of dairy cattle slurry and agro-industrial fats: Effect of fat ratio on the digester efficiency. Can. J. Chem. Eng. 93, 304–308. doi:10.1002/cjce.22118

Guillaume, S., Lendormi, T., 2013. Méthanisation de lisier de bovins et de graisses industrielles : Effet du taux de graisses incorporées sur le fonctionnement du digesteur. Numéro 104, Récents Progrès en Génie des Procédés, Edition SFGP, Paris, France.

Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. IAWPRC ; Pergamon.

Gyenge, L., Ráduly, B., Crognale, S., Lányi, S., Ábrahám, B., 2014. Cultivating conditions optimization of the anaerobic digestion of corn ethanol distillery residuals using response surface methodology. Cent. Eur. J. Chem. 12, 868–876. doi:10.2478/s11532-014-0542-2

Han, G., Deng, J., Zhang, S., Bicho, P., Wu, Q., 2010. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. Ind. Crops Prod. 31, 28–33. doi:10.1016/j.indcrop.2009.08.003

Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. Water Res. 32, 5–12. doi:10.1016/S0043-1354(97)00201-7

Haug, R.T., Stuckey, D.C., Gossett, J.M., McCarty, P.L., 1978. Effect of Thermal Pretreatment on Digestibility and Dewaterability of Organic Sludges. J. Water Pollut. Control Fed. 50, 73–85.

He, Y., Pang, Y., Liu, Y., Li, X., Wang, K., 2008. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. Energy Fuels 22, 2775–2781. doi:10.1021/ef8000967

Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W., Hoeks, F., 1989. Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in waste-water treatment. Chem. Eng. J. 41, B37–B50. doi:10.1016/0300-9467(89)80029-2

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 100, 10–18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027

Heredia, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Hernanz, D., Gordillo, B., Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., González-Miret, M.L., 2010. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. Food Chem. 118, 377–383. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.132

Hess, J., 2007. Modélisation de la qualité du biogaz produit par un fermenteur méthanogène et stratégie de régulation en vue de sa valorisation. Thèse de l'Université de Nice - Sophia Antipolis – UFR Sciences, France.

Hierholtzer, A., Chatellard, L., Kierans, M., Akunna, J. c., Collier, P. j., 2013. The impact and mode of action of phenolic compounds extracted from brown seaweed on mixed anaerobic microbial cultures. J. Appl. Microbiol. 114, 964–973. doi:10.1111/jam.12114

Ho, P., Hogg, T.A., Silva, M.C.M., 1999. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. Food Chem. 64, 115–122. doi:10.1016/S0308-8146(98)00115-0

Ho, S.Y., Mittal, G.S., 1996. Electroporation of cell membranes: a review. Crit. Rev. Biotechnol. 16, 349–362. doi:10.3109/07388559609147426

Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Laclos, H.F., Ghasimi, D.S.M., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Horvath, I.S., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Rüsch Pfund, F., Strömberg, S., Torrijos, M., van Eekert, M., van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 74, 2515–2522. doi:10.2166/wst.2016.336

Hwu, C.-S., Tseng, S.-K., Yuan, C.-Y., Kulik, Z., Lettinga, G., 1998. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. Water Res. 32, 1571–1579. doi:10.1016/S0043-1354(97)00352-7

Institut Français de la Vigne et du Vin, 2013. Marcs de raisins, lies de vin et bourbes : Quelle gestion des sous-produits vinicoles ? Itinéraires Numéro 25, Expérimentation nationale sur la valorisation des sous-produits vinicoles, 32 p.

Izumi, K., Okishio, Y., Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S., Toda, T., 2010. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. Int. Biodeterior. Biodegrad. 64, 601–608. doi:10.1016/j.ibiod.2010.06.013

Jackowiak, D., Frigon, J.C., Ribeiro, T., Pauss, A., Guiot, S., 2011. Enhancing solubilisation and methane production kinetic of switchgrass by microwave pretreatment. Bioresour. Technol. 102, 3535–3540. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.069

Jacobsen, S.E., Wyman, C.E., 2000. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. Appl. Biochem. Biotechnol. 84–86, 81–96. doi:10.1385/ABAB:84-86:1-9:81

Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C.R., Marquardt, S., Kreuzer, M., Leiber, F., 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. Anim. Feed Sci. Technol. 163, 231–243. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.11.009

Jimenez, S., Cartagena, M.C., Arce, A., 1990. Influence of lignin on the methanization of lignocellulosic wastes. Biomass 21, 43–54. doi:10.1016/0144-4565(90)90046-M

Kafle, G.K., Chen, L., 2016. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. Waste Manag. 48, 492–502. doi:10.1016/j.wasman.2015.10.021

Kafle, G.K., Kim, S.H., 2013. Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production: Batch and continuous operation. Appl. Energy 103, 61–72. doi:10.1016/j.apenergy.2012.10.018

Kayembe, K., 2013. Inhibitory Effects of Phenolic Monomers on Methanogenesis in Anaerobic Digestion. Br. Microbiol. Res. J. 3, 32–41. doi:10.9734/BMRJ/2013/2291

Kim, J., Park, C., Kim, T.-H., Lee, M., Kim, S., Kim, S.-W., Lee, J., 2003. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. J. Biosci. Bioeng. 95, 271–275.

Kirk, T.K., Farrell, R.L., 1987. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41, 465–505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341

Kivaisi, A.K., Eliapenda, S., 1994. Pretreatment of bagasse and coconut fibres for enhanced anaerobic degradation by rumen microorganisms. Renew. Energy, Climate change Energy and the environment 5, 791–795. doi:10.1016/0960-1481(94)90089-2

Kleyböcker, A., Liebrich, M., Verstraete, W., Kraume, M., Würdemann, H., 2012. Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rapeseed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters. Bioresour. Technol. 123, 534–541. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.089

Kondusamy, D., Kalamdhad, A.S., 2014. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. J. Environ. Chem. Eng. 2, 1821–1830. doi:10.1016/j.jece.2014.07.024

Kopplow, O., Barjenbruch, M., Heinz, V., 2004. Sludge pre-treatment with pulsed electric fields. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 49, 123–129.

Kumar, A.K., Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. Bioresour. Bioprocess. 4, 7. doi:10.1186/s40643-017-0137-9

Kumar, D., Murthy, G.S., 2011. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. Biotechnol. Biofuels 4, 27. doi:10.1186/1754-6834-4-27

Labat, M., Garcia, J.L., Meyer, F., Deschamps, F., 1984. Anaerobic digestion of sugar beet pulps. Biotechnol. Lett. 6, 379–384. doi:10.1007/BF00138009

Lacour, J., Bayard, R., Emmanuel, E., Gourdon, R., 2011. Evaluation du potentiel de valorisation par digestion anaérobie des gisements de déchets organiques d'origine agricole et assimilés en Haïti. Dechets Sci. Tech. N°60, 31–41 p.

Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. Bioresour. Technol. 87, 167–198.

Lauwers, A.M., Heinen, W., Gorris, L.G.M., Drift, C. van der, 1989. Variation of parameters affecting the start-up of methanogenic fluidized bed reactors. Biotechnol. Lett. 11, 907–912. doi:10.1007/BF01026851

Lebanon wine regions [WWW Document], 2014. Wine Search. URL http://www.wine-searcher.com/regions-lebanon (accessed 8.25.16).

Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F., 2016. Enhancing Extraction Processes in the Food Industry. CRC Press, Oxon, UK, 570 p.

Lebovka, N.I., Bazhal, M.I., Vorobiev, E., 2002. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. J. Food Eng. 54, 337–346. doi:10.1016/S0260-8774(01)00220-5

Lebovka, N.I., Bazhal, M.I., Vorobiev, E., 2001. Pulsed electric field breakage of cellular tissues: visualisation of percolative properties. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2, 113–125. doi:10.1016/S1466-8564(01)00024-8

Lee, I.-S., Rittmann, B.E., 2011. Effect of low solids retention time and focused pulsed pre-treatment on anaerobic digestion of waste activated sludge. Bioresour. Technol. 102, 2542–2548. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.082

Lempereur, V., 2014. Grape marc, wine lees and deposit of the must: How to manage oenological by-products? BIO Web Conf. 3, 01011. doi:10.1051/bioconf/20140301011

Les synthèses de FranceAgriMer, 2016. Vin commerce extérieur Bilan 2015. Mars 2016.

Lettinga, G., 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. Antonie Van Leeuwenhoek 67, 3–28.

Lin, Y., Wang, D., Wu, S., Wang, C., 2009. Alkali pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge. J. Hazard. Mater. 170, 366–373. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.086

Lindmark, J., Lagerkvist, A., Nilsson, E., Carlsson, M., Thorin, E., Dahlquist, E., 2014. Evaluating the Effects of Electroporation Pre-treatment on the Biogas Yield from Ley Crop Silage. Appl. Biochem. Biotechnol. 174, 2616–2625. doi:10.1007/s12010-014-1213-7

Liu, G., Zhang, R., El-Mashad, H.M., Dong, R., 2009. Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. Bioresour. Technol. 100, 5103–5108. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.081

Liu, H.W., Walter, H.K., Vogt, G.M., Vogt, H.S., Holbein, B.E., 2002. Steam pressure disruption of municipal solid waste enhances anaerobic digestion kinetics and biogas yield. Biotechnol. Bioeng. 77, 121–130.

Liu, X., Bayard, R., Benbelkacem, H., Buffière, P., Gourdon, R., 2015. Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics. Biomass Bioenergy 81, 534–543. doi:10.1016/j.biombioe.2015.06.021

Lo, H.M., Kurniawan, T.A., Sillanpää, M.E.T., Pai, T.Y., Chiang, C.F., Chao, K.P., Liu, M.H., Chuang, S.H., Banks, C.J., Wang, S.C., Lin, K.C., Lin, C.Y., Liu, W.F., Cheng, P.H., Chen, C.K., Chiu, H.Y., Wu, H.Y., 2010. Modeling biogas production from organic fraction of MSW co-digested with MSWI ashes in anaerobic bioreactors. Bioresour. Technol. 101, 6329–6335. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.048

Ma, J., Duong, T.H., Smits, M., Verstraete, W., Carballa, M., 2011. Enhanced biomethanation of kitchen waste by different pre-treatments. Bioresour. Technol. 102, 592–599. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.122

Mahmoud, N., Zeeman, G., Gijzen, H., Lettinga, G., 2004. Anaerobic stabilisation and conversion of biopolymers in primary sludge—effect of temperature and sludge retention time. Water Res. 38, 983–991. doi:10.1016/j.watres.2003.10.016

Malherbe, S., Cloete, T.E., 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 105–114. doi:10.1023/A:1020858910646

Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., Steinmetz, H., 2011. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. Int. J. Hydrog. Energy, International Conference on Hydrogen Production (ICH2P)-2010 36, 10690–10700. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.06.008

Mata-Alvarez, J., 2002. Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes. IWA Publishing, Barcelona, Spain, 292 p.

Mendes, J.A.S., Prozil, S.O., Evtuguin, D.V., Lopes, L.P.C., 2013. Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. Ind. Crops Prod. 43, 25–32. doi:10.1016/j.indcrop.2012.06.047

Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. J. AOAC Int. 85, 1217–1240.

Michaud, S., Bernet, N., Roustan, M., Delgenès, J.P., 2003. Influence of hydrodynamic conditions on biofilm behavior in a methanogenic inverse turbulent bed reactor. Biotechnol. Prog. 19, 858–863. doi:10.1021/bp025610c

MIEEN, 2012. Energies 2050, rapport du Centre d'analyse stratégique pour le compte du Ministère de l'industrie, de l'énergie et de l'économie numérique, 392 p.

Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2012. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—a review. Biotechnol. Bioeng. 109, 1430–1442. doi:10.1002/bit.24464

Moletta, R., 2015. La méthanisation (3° Éd.). Editions Tec&Doc, Lavoisier, Paris, France, 513 p.

Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrere, H., 2012. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. Bioresour. Technol. 120, 241–247. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.040

Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2013a. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 43, 260–322. doi:10.1080/10643389.2011.604258

Monlau, F., Latrille, E., Da Costa, A.C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2013b. Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreatment. Appl. Energy, Special Issue on Advances in sustainable biofuel production and use - XIX International Symposium on Alcohol Fuels - ISAF 102, 1105–1113. doi:10.1016/j.apenergy.2012.06.042

Monlau, Florian, Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X.M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.-P., Carrere, H., 2012a. Predictive Models of Biohydrogen and Biomethane Production Based on the Compositional and Structural Features of Lignocellulosic Materials. Environ. Sci. Technol. 46, 12217–12225. doi:10.1021/es303132t

Montgomery, L.F.R., Bochmann, G., 2014. Pretreatment of Feedstock for Enhanced Biogas Production. IEA Bioenergy, 28p.

Moraes, B.S., Triolo, J.M., Lecona, V.P., Zaiat, M., Sommer, S.G., 2015. Biogas production within the bioethanol production chain: Use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. Bioresour. Technol. 190, 227–234. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.089

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 96, 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025

Mottet, A., François, E., Latrille, E., Steyer, J.P., Déléris, S., Vedrenne, F., Carrère, H., 2010. Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge. Chem. Eng. J. 160, 488–496. doi:10.1016/j.cej.2010.03.059

Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A.K., Rubindamayugi, M.S.T., Mattiasson, B., 2006. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. Renew. Energy 31, 2385–2392. doi:10.1016/j.renene.2005.10.015

Murphy, J.D., McKeogh, E., Kiely, G., 2004. Technical/economic/environmental analysis of biogas utilisation. Appl. Energy 77, 407–427. doi:10.1016/j.apenergy.2003.07.005

Murto, M., Björnsson, L., Mattiasson, B., 2004. Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. J. Environ. Manage. 70, 101–107. doi:10.1016/j.jenvman.2003.11.001

Mussoline, W., Esposito, G., Giordano, A., Lens, P., 2013. The Anaerobic Digestion of Rice Straw: A Review. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 43, 895–915. doi:10.1080/10643389.2011.627018

Nasir, I.M., Mohd Ghazi, T.I., Omar, R., 2012. Anaerobic digestion technology in livestock manure treatment for biogas production: A review. Eng. Life Sci. 12, 258–269. doi:10.1002/elsc.201100150

Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2004. Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. Process Biochem. 39, 2019–2024. doi:10.1016/j.procbio.2003.10.002

Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, S.J., 2000. Particle-based biofilm reactor technology. Trends Biotechnol. 18, 312–320. doi:10.1016/S0167-7799(00)01461-X

Nizami, A.-S., Korres, N.E., Murphy, J.D., 2009. Review of the Integrated Process for the Production of Grass Biomethane. Environ. Sci. Technol. 43, 8496–8508. doi:10.1021/es901533j

Nordmann, V., 2013. Caractérisation et impact des différentes fractions d'une biomasse lignocellulosique pour améliorer les prétraitements favorisant sa méthanisation. Thèse de l'Université de Bordeaux 1, France.

Noykova, N., Müller, T.G., Gyllenberg, M., Timmer, J., 2002. Quantitative analyses of anaerobic wastewater treatment processes: Identifiability and parameter estimation. Biotechnol. Bioeng. 78, 89–103. doi:10.1002/bit.10179

Obied, H.K., Song, Y., Foley, S., Loughlin, M., Rehman, A., Mailer, R., Masud, T., Agboola, S., 2013a. Biophenols and Antioxidant Properties of Australian Canola Meal. J. Agric. Food Chem. 61, 9176–9184. doi:10.1021/jf4026585

OIV, 2015. State of Vitiviniculture World Market 2015. International Organization of Vine and Wine.

Ormaechea, P., Castrillón, L., Marañón, E., Fernández-Nava, Y., Negral, L., Megido, L., 2016. Influence of the ultrasound pretreatment on anaerobic digestion of cattle manure, food waste and crude glycerine. Environ. Technol. 0, 1–5. doi:10.1080/09593330.2016.1208278

Pakarinen, O.M., Kaparaju, P.L.N., Rintala, J.A., 2011. Hydrogen and methane yields of untreated, water-extracted and acid (HCl) treated maize in one- and two-stage batch assays. Int. J. Hydrog. Energy, Fuel Cell Technologies: FUCETECH 2009 36, 14401–14407. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.08.028

Pal, K., Patra, A.K., Sahoo, A., Kumawat, P.K., 2015. Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation in vitro. Livest. Sci. 180, 98–105. doi:10.1016/j.livsci.2015.07.011

Palmowski, L.M., Müller, J.A., 2000. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 41, 155–162.

Patel, H., Madamwar, D., 2002. Effects of temperatures and organic loading rates on biomethanation of acidic petrochemical wastewater using an anaerobic upflow fixed-film reactor. Bioresour. Technol. 82, 65–71. doi:10.1016/S0960-8524(01)00142-0

Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. Crit. Rev. Environ. Control 21, 411–490. doi:10.1080/10643389109388424

Pavlostathis, S. G., Gossett, J.M., 1985. Alkaline treatment of wheat straw for increasing anaerobic biodegradability. Biotechnol. Bioeng. 27, 334–344. doi:10.1002/bit.260270319

Pellera, F.-M., Santori, S., Pomi, R., Polettini, A., Gidarakos, E., 2016. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of olive mill solid waste. Waste Manag. 58, 160–168. doi:10.1016/j.wasman.2016.08.008

Pérez-Elvira, S., Fdz-Polanco, M., Plaza, F.I., Garralón, G., Fdz-Polanco, F., 2009. Ultrasound pre-treatment for anaerobic digestion improvement. Water Sci. Technol. 60, 1525–1532. doi:10.2166/wst.2009.484

Pérez-Serradilla, J.A., de Castro, M.D.L., 2008. Role of lees in wine production: A review. Food Chem. 111, 447–456. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.019

Pham, T.P.T., Kaushik, R., Parshetti, G.K., Mahmood, R., Balasubramanian, R., 2015. Food waste-to-energy conversion technologies: Current status and future directions. Waste Manag. 38, 399–408. doi:10.1016/j.wasman.2014.12.004

Pierangelo Rondeau, F.G., 2013. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. Ind. Crops Prod. 43, 251–254. doi:10.1016/j.indcrop.2012.06.053

Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., LeBlanc, R.J., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2011. Ultrasonic pretreatment of sludge: A review. Ultrason. Sonochem. 18, 1–18. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.02.014

Pinnekamp, J., 1989. Effects of Thermal Pretreatment of Sewage Sludge on Anaerobic Digestion. Water Sci. Technol. 21, 97–108.

Pirmohammadi, R., Golgasemgarebagh, A., Azari, A.M., 2007. Effects of ensiling and drying of white grape pomace on chemical composition, degradability and digestibility for ruminants. J Anim Vet Adv 6, 1079–1082.

Poggi-Varaldo, H.M., Valdés, L., Esparza-García, F., Fernández-Villagómez, G., 1997. Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids, and municipal solid waste. Water Sci. Technol., Forest Industry Wastewaters VSelected Proceedings of the 5th IAWQ International Symposium on Forest Industry Wastewaters 35, 197–204. doi:10.1016/S0273-1223(96)00957-2

Pokój, T., Bułkowska, K., Gusiatin, Z.M., Klimiuk, E., Jankowski, K.J., 2015. Semi-continuous anaerobic digestion of different silage crops: VFAs formation, methane yield from fiber and non-fiber components and digestate composition. Bioresour. Technol. 190, 201–210. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.060

Puñal, A., Trevisan, M., Rozzi, A., Lema, J.M., 2000. Influence of C:N ratio on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors. Water Res. 34, 2614–2619. doi:10.1016/S0043-1354(00)00161-5

Rabin, Y., Steif, P.S., Taylor, M.J., Julian, T.B., Wolmark, N., 1996. An Experimental Study of the Mechanical Response of Frozen Biological Tissues at Cryogenic Temperatures. Cryobiology 33, 472–482. doi:10.1006/cryo.1996.0048

Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V.N., 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. Renew. Sustain. Energy Rev. 4, 135–156. doi:10.1016/S1364-0321(99)00014-3

Rajha, H.N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R.G., Vorobiev, E., 2015. Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. Sep. Purif. Technol. 146, 243–251. doi:10.1016/j.seppur.2015.03.058

Rajha, H.N., Darra, N.E., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R.G., Louka, N., 2014. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. Food Nutr. Sci. 05, 397. doi:10.4236/fns.2014.54048

Ranalli, P., 2007. Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses. Springer Science & Business Media.

Raposo, F., De la Rubia, M.A., Fernández-Cegrí, V., Borja, R., 2012. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. Renew. Sustain. Energy Rev. 16, 861–877. doi:10.1016/j.rser.2011.09.008

Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., De la Rubia, M. a., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J. c., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V., 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. J. Chem. Technol. Biotechnol. 86, 1088–1098. doi:10.1002/jctb.2622

Rice, A.C., 1976. Solid Waste Generation and By-Product Recovery Potential from Winery Residues. Am. J. Enol. Vitic. 27, 21–26.

Rincón, B., Borja, R., González, J.M., Portillo, M.C., Sáiz-Jiménez, C., 2008. Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue. Biochem. Eng. J. 40, 253–261. doi:10.1016/j.bej.2007.12.019

Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., Tommasi, N.D., 2007. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. Food Chem. 100, 203–210. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.041

Ruffino, B., Fiore, S., Roati, C., Campo, G., Novarino, D., Zanetti, M., 2015. Scale effect of anaerobic digestion tests in fed-batch and semi-continuous mode for the technical and economic feasibility of a full scale digester. Bioresour. Technol. 182, 302–313. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.021

Rühl, C., Appleby, P., Fennema, J., Naumov, A., Schaffer, M., 2012. Economic development and the demand for energy: A historical perspective on the next 20 years. Energy Policy, Special Section: Past and Prospective Energy Transitions - Insights from History 50, 109–116. doi:10.1016/j.enpol.2012.07.039

Ruiz, I., Veiga, M.C., de Santiago, P., Blázquez, R., 1997. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. Bioresour. Technol. 60, 251–258. doi:10.1016/S0960-8524(97)00020-5

Salerno, M.B., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., 2009. Using a pulsed electric field as a pretreatment for improved biosolids digestion and methanogenesis. Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed. 81, 831–839.

Sambusiti, C., Ficara, E., Malpei, F., Steyer, J.P., Carrère, H., 2012. Influence of alkaline pre-treatment conditions on structural features and methane production from ensiled sorghum forage. Chem. Eng. J. 211–212, 488–492. doi:10.1016/j.cej.2012.09.103

Sayed, S., de Zeeuw, W., 1988. The performance of a continuously operated flocculent sludge UASB reactor with slaughterhouse wastewater. Biol. Wastes 24, 199–212. doi:10.1016/0269-7483(88)90062-6

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. Trends Food Sci. Technol. 12, 401–413. doi:10.1016/S0924-2244(02)00012-2

Schieder, D., Schneider, R., Bischof, F., 2000. Thermal hydrolysis (TDH) as a pretreatment method for the digestion of organic waste. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 41, 181–187.

Schröder, P., Herzig, R., Bojinov, B., Ruttens, A., Nehnevajova, E., Stamatiadis, S., Memon, A., Vassilev, A., Caviezel, M., Vangronsveld, J., 2008. Bioenergy to save the world. Producing novel energy plants for growth on abandoned land. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 15, 196–204.

Seghezzo, L., Zeeman, G., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M., Lettinga, G., 1998. A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. Bioresour. Technol. 65, 175–190. doi:10.1016/S0960-8524(98)00046-7

Servant, J., 1991. Les sources naturelles et artificielles de méthane dans l'atmosphère a l'échelle mondiale. Atmospheric Res. 26, 525–542. doi:10.1016/0169-8095(91)90042-U

Sharma, S.K., Mishra, I.M., Sharma, M.P., Saini, J.S., 1988. Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. Biomass 17, 251–263. doi:10.1016/0144-4565(88)90107-2

Shelton, D.R., Tiedje, J.M., 1984. General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Microbiol. 47, 850–857.

Shetty, D.J., Kshirsagar, P., Tapadia-Maheshwari, S., Lanjekar, V., Singh, S.K., Dhakephalkar, P.K., 2017. Alkali pretreatment at ambient temperature: A promising method to enhance biomethanation of rice straw. Bioresour. Technol. 226, 80–88. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.003

Shi, J., Xu, F., Wang, Z., Stiverson, J.A., Yu, Z., Li, Y., 2014. Effects of microbial and non-microbial factors of liquid anaerobic digestion effluent as inoculum on solid-state anaerobic digestion of corn stover. Bioresour. Technol. 157, 188–196. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.089

Shih, J.C.H., 1993. Recent Development in Poultry Waste Dizgestion and Feather Utilization—A Review,. Poult. Sci. 72, 1617–1620. doi:10.3382/ps.0721617

Sills, D.L., Gossett, J.M., 2011. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. Bioresour. Technol. 102, 1389–1398. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.035

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: Enzymology, B.-M. in (Ed.), Oxidants and Antioxidants Part A. Academic Press, pp. 152–178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Soest, P.J.V., Robertson, J.B., Department, C.U.A.S., 1985. Analysis of Forages and Fibrous Foods. Cornell University.

Spigno, G., Maggi, L., Amendola, D., Dragoni, M., De Faveri, D.M., 2013. Influence of cultivar on the lignocellulosic fractionation of grape stalks. Ind. Crops Prod. 46, 283–289. doi:10.1016/j.indcrop.2013.01.034

Stabnikova, O., Liu, X.Y., Wang, J.Y., 2008. Digestion of frozen/thawed food waste in the hybrid anaerobic solid–liquid system. Waste Manag. 28, 1654–1659. doi:10.1016/j.wasman.2007.05.021

Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1996. Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. Carbohydr. Polym. 29, 325–331. doi:10.1016/S0144-8617(96)00018-5

Sun, R., Sun, X.F., Wang, S.Q., Zhu, W., Wang, X.Y., 2002. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. Ind. Crops Prod. 15, 179–188. doi:10.1016/S0926-6690(01)00112-1

Sun, R., Tomkinson, J., 2002. Comparative study of lignins isolated by alkali and ultrasound-assisted alkali extractions from wheat straw. Ultrason. Sonochem. 9, 85–93. doi:10.1016/S1350-4177(01)00106-7

SWEEP-NET, 2014. Country report on the solid waste management in Lebanon, 66 p.

Taherdanak, M., Zilouei, H., 2014. Improving biogas production from wheat plant using alkaline pretreatment. Fuel 115, 714–719. doi:10.1016/j.fuel.2013.07.094

Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. Int. J. Mol. Sci. 9, 1621–1651. doi:10.3390/ijms9091621

Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., Adani, F., 2009. Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. Bioresour. Technol. 100, 3140–3142. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.012

Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S., 1993. Integrated Solid Waste Management: Engineering Principles and Management Issues. McGraw-Hill, New York, 978 p.

Thomashow, M.F., 1998. Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. Plant Physiol. 118, 1–8.

Thomsen, S.T., Spliid, H., Østergård, H., 2014. Statistical prediction of biomethane potentials based on the composition of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 154, 80–86. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.029

Tiehm, A., Nickel, K., Zellhorn, M., Neis, U., 2001. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. Water Res. 35, 2003–2009. doi:10.1016/S0043-1354(00)00468-1

Tomei, M.C., Mosca Angelucci, D., Levantesi, C., 2016. Two-stage anaerobic and post-aerobic mesophilic digestion of sewage sludge: Analysis of process performance and hygienization potential. Sci. Total Environ. 545–546, 453–464. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.053

Torkian, A., Eqbali, A., Hashemian, S.J., 2003. The effect of organic loading rate on the performance of UASB reactor treating slaughterhouse effluent. Resour. Conserv. Recycl. 40, 1–11. doi:10.1016/S0921-3449(03)00021-1

Uma Rani, R., Kaliappan, S., Adish Kumar, S., Rajesh Banu, J., 2012. Combined treatment of alkaline and disperser for improving solubilization and anaerobic biodegradability of dairy waste activated sludge. Bioresour. Technol., Advances in Biological Waste

Treatment and Bioconversion Technologies 126, 107–116. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.027

Van Lier, J.B., Grolle, K.C., Stams, A.J., Conway de Macario, E., Lettinga, G., 1992. Start-up of a thermophilic upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with mesophilic granular sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 130–135.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Van Soest, P.J.V., Robertson, J.B., Department, C.U.A.S., 1985. Analysis of Forages and Fibrous Foods. Cornell University.

Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y., 1997. A balance between hydrolysis and methanogenesis during the anaerobic digestion of organic matter. Microbiology 66, 712–717.

Veeken, A., Hamelers, B., 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. Bioresour. Technol. 69, 249–254. doi:10.1016/S0960-8524(98)00188-6

Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., Lema, J.M., 2000. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. Bioresour. Technol. 74, 231–239. doi:10.1016/S0960-8524(00)00015-8

Vogt, G.M., Liu, H.W., Kennedy, K.J., Vogt, H.S., Holbein, B.E., 2002. Super blue box recycling (SUBBOR) enhanced two-stage anaerobic digestion process for recycling municipal solid waste: laboratory pilot studies. Bioresour. Technol. 85, 291–299. doi:10.1016/S0960-8524(02)00114-1

Vorobiev, E., Lebovka, N., 2009. Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials. Springer Science & Business Media, New York, US, 281 p.

Wang, B., Strömberg, S., Li, C., Nges, I.A., Nistor, M., Deng, L., Liu, J., 2015. Effects of substrate concentration on methane potential and degradation kinetics in batch anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 194, 240–246. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.034

Wang, Q., Kuninobu, M., Kakimoto, K., I.-Ogawa, H., Kato, Y., 1999. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pretreatment. Bioresour. Technol. 68, 309–313. doi:10.1016/S0960-8524(98)00155-2

Wang, W., Han, H., 2012. Recovery strategies for tackling the impact of phenolic compounds in a UASB reactor treating coal gasification wastewater. Bioresour. Technol. 103, 95–100. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.002

Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. Bioresour. Technol. 99, 7928–7940. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.044

Webb, M.S., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F., Steponkus, P.L., 1996. Effects of COR6.6 and COR15am Polypeptides Encoded by COR (Cold-Regulated) Genes of Arabidopsis thaliana on Dehydration-Induced Phase Transitions of Phospholipid Membranes. Plant Physiol. 111, 301–312. doi:10.1104/pp.111.1.301

Weiland, P., Rozzi, A., 1991. The Start-Up, Operation and Monitoring of High-Rate Anaerobic Treatment Systems: Discusser's Report. Water Sci. Technol. 24, 257–277.

Wikandari, R., Sari, N.K., A'yun, Q., Millati, R., Cahyanto, M.N., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2014. Effects of Lactone, Ketone, and Phenolic Compounds on Methane Production and Metabolic Intermediates During Anaerobic Digestion. Appl. Biochem. Biotechnol. 175, 1651–1663. doi:10.1007/s12010-014-1371-7

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. Enzyme Microb. Technol. 48, 54–60. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.09.006

Xu, F., 2010. Chapter 2 - Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition A2 - Sun, Run-Cang, in: Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. Elsevier, Amsterdam, pp. 9–47.

Xu, F., Wang, Z.-W., Li, Y., 2014. Predicting the methane yield of lignocellulosic biomass in mesophilic solid-state anaerobic digestion based on feedstock characteristics and process parameters. Bioresour. Technol. 173, 168–176. doi:10.1016/j.biortech.2014.09.090

Xu YuMin, Zhang WuDi, Xu Rui, Yin Fang, Li JianChang, Chen YuBao, Liu ShiQing, 2011. Study on the potential of biogas production from grape seed by anaerobic digestion before and after oil-extracting. Kezaisheng Nengyuan Renew. Energy Resour. 29, 78–80.

Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T.R., Kohli, S., Rana, V., 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques—a review. Bioresour. Technol. 95, 1–10. doi:10.1016/j.biortech.2004.02.010

Yang, L., Xu, F., Ge, X., Li, Y., 2015. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. Renew. Sustain. Energy Rev. 44, 824–834. doi:10.1016/j.rser.2015.01.002

Yao, Y., He, M., Ren, Y., Ma, L., Luo, Y., Sheng, H., Xiang, Y., Zhang, H., Li, Q., An, L., 2013. Anaerobic digestion of poplar processing residues for methane production after alkaline treatment. Bioresour. Technol. 134, 347–352. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.160

Yue, Z., Chen, R., Yang, F., MacLellan, J., Marsh, T., Liu, Y., Liao, W., 2013. Effects of dairy manure and corn stover co-digestion on anaerobic microbes and corresponding digestion performance. Bioresour. Technol. 128, 65–71. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.115

Zahller, J.D., Bucher, R.H., Ferguson, J.F., Stensel, H.D., 2007. Performance and stability of two-stage anaerobic digestion. Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed. 79, 488–497.

Zhang, C., Su, H., Tan, T., 2013. Batch and semi-continuous anaerobic digestion of food waste in a dual solid-liquid system. Bioresour. Technol. 145, 10–16. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.030

Zhang, Y., Chen, X., Gu, Y., Zhou, X., 2015. A physicochemical method for increasing methane production from rice straw: Extrusion combined with alkali pretreatment. Appl. Energy 160, 39–48. doi:10.1016/j.apenergy.2015.09.011

Zhang, Y.-H.P., Ding, S.-Y., Mielenz, J.R., Cui, J.-B., Elander, R.T., Laser, M., Himmel, M.E., McMillan, J.R., Lynd, L.R., 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. Biotechnol. Bioeng. 97, 214–223. doi:10.1002/bit.21386

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. Prog. Energy Combust. Sci. 42, 35–53. doi:10.1016/j.pecs.2014.01.001

Zhu, J., Wan, C., Li, Y., 2010. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. Bioresour. Technol. 101, 7523–7528. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.060

Zimmermann, U., 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105, 176–256.

Zimmermann, U., Pilwat, G., Beckers, F., Riemann, F., 1976. Effects of external electrical fields on cell membranes. Bioelectrochem. Bioenerg. 3, 58–83. doi:10.1016/0302-4598(76)85007-6

Zou, S., Wang, X., Chen, Y., Wan, H., Feng, Y., 2016. Enhancement of biogas production in anaerobic co-digestion by ultrasonic pretreatment. Energy Convers. Manag. 112, 226–235. doi:10.1016/j.enconman.2015.12.087

zu-shan, C., Paszner, L., 2009. Salt Catalyzed Wood Bonding with Hemicellulose. Holzforsch. - Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood 42, 11–20. doi:10.1515/hfsg.1988.42.1.11