



Cet article de la revue **Fourrages**,
est édité par l'Association Francophone pour les Prairies et les Fourrages

Pour toute recherche dans la base de données et
pour vous abonner :

www.afpf-asso.fr

Coupler les avantages des cultures herbagères et du bioraffinage vert pour produire des protéines, des matériaux et des services pour la transition écologique

U. Jørgensen^{1,4}, S.K. Jensen^{2,4}, M. Ambye-Jensen^{3,4}

RESUME

Par rapport aux cultures annuelles de céréales, les prairies pérennes perdent beaucoup moins d'éléments nutritifs et nécessitent peu de pesticides, tout en favorisant l'accumulation de carbone dans le sol. Jusqu'à présent, les prairies étaient presque exclusivement destinées à l'alimentation des ruminants et des chevaux. Nos expériences sur le bioraffinage des fourrages ont produit des protéines d'une qualité égale à celle du tourteau de soja. Les cultures fourragères peuvent fournir des rendements élevés de biomasse et de protéines avec un profil d'acides aminés bien équilibré. Dans les cultures de poacées provenant de prairies permanentes non fertilisées, l'effort doit être mis sur la partie fibreuse de l'herbe en raison d'un faible rendement en protéines. Avec les techniques actuelles, nous avons récupéré jusqu'à 40 % des protéines du fourrage dans un concentré protéique contenant environ 50 % de protéines. De plus, une fraction de fibres contenant 15 à 18 % de protéines de la matière sèche peut être produite et utilisée pour l'alimentation des ruminants, la bioénergie, ou encore transformée en molécules plateformes biosourcées ou en biomatériaux. Nos expériences en alimentation animale ont montré que les protéines bioraffinées à partir des prairies peuvent remplacer la farine de soja pour la volaille et les porcs sans effets négatifs sur les performances des animaux. Les premières bioraffineries de la biomasse verte à l'échelle industrielle pour l'alimentation animale et la bioénergie fonctionnent au Danemark, bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour évaluer la qualité des protéines pour les applications alimentaires et fourragères. En outre, une approbation complète de l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) doit être obtenue pour l'application à l'alimentation humaine. Le concept de bioraffinerie verte ouvre de nouveaux marchés pour les prairies et représente une opportunité pour augmenter leur surface et bénéficier de leurs services écosystémiques associés.

SUMMARY

Coupling the benefits of grassland crops and green biorefining to produce protein, materials and services for the green transition

Compared with annual grain and seed crops, perennial grassland has significantly lower losses of nutrients and low pesticide requirements, while also supporting soil carbon build-up. Until now grassland crops have almost exclusively been fed to ruminants and horses. Our experiments on biorefining forages have produced protein of a quality equal to soybean meal. Forage crops can deliver high yields of biomass as well as protein with a well-balanced amino acid profile. In grass crops from unfertilized permanent grassland, focus has to be on the fibre part of the grass due to a low protein yield. With current techniques we have recovered up to 40 % of the forage protein into a protein concentrate with around 50 % protein. In addition, a fibre fraction containing 15-18 % protein of dry matter can be produced and used as ruminant feed, bioenergy, or further biorefined into chemical building blocks or bio-materials. Our feeding experiments have shown that biorefined grassland protein can provide a substitute for soybean meal for poultry and pigs without negative effects on animal performance. The first industrial scale biorefineries on green biomass for feed and bioenergy are now established in Denmark, although more research is needed in order to evaluate protein quality for both feed and food applications. In addition, a full EFSA approval has to be obtained for the application for food. The green biorefinery concept opens new markets for grassland and opportunities for increasing the grassland area to obtain associated ecosystem services.

AUTEURS

1 : Department of Agroecology, Aarhus University, Denmark

2 : Department of Animal- and Veterinary Sciences, Aarhus University, Denmark

3 : Department of Biological and Chemical Engineering, Aarhus University, Denmark

4 : Aarhus University Centre for Circular Bioeconomy, Aarhus University, Denmark

MOTS-CLES : Intensification durable, poacées pérennes et trèfle, bioraffinage, protéines, fibres

KEY-WORDS: Sustainable intensification, perennial grasses and clover, biorefining, protein, fibre

REFERENCE DE L'ARTICLE : Jørgensen U., Jensen S.K., Ambye-Jensen M., (2023). « Coupler les avantages des cultures herbagères et du bioraffinage vert pour produire des protéines, des matériaux et des services pour la transition écologique ». *Fourrages* 253, 47-60

Cet article a été publié en anglais dans la revue *Grass and Forage Science* (Volume 77, Issue 4), et traduit en français pour la revue *Fourrages*, avec l'aimable autorisation des auteurs et de la revue *Grass and Forage Science*.

Article d'origine : Jørgensen, U., Jensen, S. K., & Ambye-Jensen, M. (2022). « Coupling the benefits of grassland crops and green biorefining to produce protein, materials and services for the green transition ». *Grass and Forage Science*, 77(4), 295–306. <https://doi.org/10.1111/gfs.12594>

Une bioéconomie pleinement développée nécessitera une utilisation complète de la biomasse agricole, non seulement pour l'alimentation humaine et animale, mais aussi pour les produits chimiques, les matériaux et la bioénergie. Cela nécessitera à la fois une production totale de biomasse plus importante et une plus grande utilisation des résidus. Toutefois, en Europe, il pourrait être difficile d'augmenter la productivité des systèmes de culture existants sans accroître les incidences sur l'environnement, et le concept d'"intensification durable (plus avec moins)" est contesté dans de nombreux ouvrages récents. Van Grinsven *et al.* (2015) ont proposé de se concentrer sur une "extensification durable (moins avec moins)" en Europe. En revanche, Jørgensen & Lærke (2016) ont proposé un changement des systèmes de culture pour le nord-ouest de l'Europe, passant de rotations de cultures annuelles à des prairies. Cela permettrait d'augmenter le rendement en biomasse, de réduire l'impact environnemental, et de développer une production européenne de protéines pour remplacer les importations actuelles élevées de soja. Cela soutiendrait la stratégie de l'UE en matière de protéines qui, par ailleurs, met l'accent sur l'augmentation de la production de graines protéagineuses (légumineuses) (Commission européenne, 2018).

L'idée d'utiliser des concentrés de protéines de feuilles comme source de protéines pour la consommation animale ou humaine n'est pas nouvelle ; elle remonte au début du 20^{ème} siècle où des efforts pionniers ont conduit à de nombreux efforts de recherche et de développement à l'échelle pilote (Pirie, 1942). Tout au long du 20^{ème} siècle et jusqu'au 21^{ème} siècle, il y a eu de multiples tentatives et recherches pour encourager le succès commercial des bioraffineries vertes au Danemark (Pedersen *et al.*, 1979) et au niveau international (Chiesa & Gnansounou, 2011 ; Houseman & Connell, 1976 ; Näsi & Kiiskinen, 1985 ; Pirie, 1978 ; Pisulewska *et al.*, 1991). Cependant, ces premières évaluations ne tenaient pas compte des avantages environnementaux liés à la modification des systèmes de culture, à l'utilisation des prairies excédentaires et à la substitution des importations de produits à base de soja en provenance d'autres continents à forte empreinte carbone. Ces effets environnementaux ont fait l'objet d'une attention politique beaucoup plus grande au cours des dernières décennies, et les législations nationales et européennes telles que la directive-cadre sur l'eau, la directive sur les nitrates et les récentes politiques climatiques stipulent des besoins d'amélioration.

La combinaison du potentiel technico-économique et environnemental d'un captage élevé de carbone dans les prairies avec les développements récents des techniques de bioraffinage constitue la nouveauté du concept de "bioraffinage vert". Notre objectif est de développer et de documenter des solutions gagnant-gagnant avec une économie d'entreprise positive, des avantages environnementaux, un impact nul ou négatif

sur l'environnement, la fourniture de bioénergie et une meilleure autosuffisance en concentrés protéiques, comme une nouvelle opportunité de résoudre plusieurs de nos grands défis de manière durable. Jusqu'à présent, deux usines commerciales ont été établies dans ce contexte ; voir, par exemple, www.biorefine.dk.

Le développement de nouveaux systèmes de production végétale combinés à des bioraffineries vertes ne concerne pas seulement les développements techniques à l'échelle de la production. Il est également important de discuter de l'utilisation totale des terres par rapport aux exigences sociétales en matière d'environnement, de climat, de loisirs et de biodiversité. Cette discussion a été soutenue par plusieurs scénarios d'utilisation des terres et de technologie, notamment Gylling *et al.* (2016), Larsen *et al.* (2017) et Mortensen & Jørgensen (2022). Nous montrons ici que la bioéconomie peut contribuer de manière significative à des réductions supplémentaires du lessivage des nitrates et des émissions de gaz à effet de serre, mais l'ampleur des réductions dépend beaucoup de la manière dont l'agriculture est combinée avec le secteur de l'énergie et des matériaux biosourcés. L'évolution de l'utilisation des terres vers une intensification ou une extensification durable et un meilleur partage de la nature se sont avérés être des facteurs déterminants de la taille potentielle de la bioéconomie et de la réduction des émissions. L'objectif de cet article est de décrire de manière interdisciplinaire le développement, basé sur la recherche, d'une nouvelle industrie biosourcée à partir de cultures durables de prairies au Danemark, dans le but de produire des protéines, des matériaux et des services durables pour l'alimentation animale et humaine dans le cadre de la transition écologique.

Matériel et Méthodes

Plateforme pour l'intensification durable de la production végétale

L'Université d'Aarhus (UA) a un large historique de recherche sur les cultures agricoles, qui remonte à d'anciennes recherches au sein de l'Institut danois des sciences agricoles et de l'Institut danois des sciences des plantes et des sols (Christensen *et al.*, 2022). En 2012, un essai a été mis en place à deux endroits au Danemark pour comparer des systèmes de culture très différents (une gamme de cultures de prairie et de cultures mixtes) dans le but d'étudier leur productivité potentielle, tout en mesurant également les bilans de nutriments, les demandes d'intrants et les bilans de gaz à effet de serre. À titre de comparaison, une rotation de cultures courante au Danemark, composée d'orge de printemps, d'orge d'hiver, de colza et de blé d'hiver, ainsi que des monocultures de maïs et de triticales ont été incluses dans l'essai (Manevski *et al.*, 2017), qui est destiné à être poursuivi sur le long terme pour évaluer

la productivité des cultures, le carbone du sol et les impacts des systèmes sur le microbiome.

L'essai a été établi avec 4 répétitions dans un plan en blocs incomplets. Les cultures sont le plus souvent récoltées avec une moissonneuse de taille adaptée à la récolte des micro-parcelles (Halstrup), et analysées pour la teneur en matière sèche, les teneurs en minéraux, etc. (pour plus de détails, voir Solati *et al.*, 2018). L'interception du rayonnement a été calculée à partir de la réflexion dans le proche infrarouge de la canopée mesurée (Manevski *et al.*, 2017), et le lessivage des nitrates a été calculé à partir des concentrations de nitrates mesurées dans l'eau du sol extraite à l'aide de ventouses installées à 1 m de profondeur dans les parcelles expérimentales (Manevski *et al.*, 2018). Les concentrations de carbone du sol ont été mesurées dans des échantillons de sol excavés à 1 m de profondeur et séparés en 0-20, 20-50 et 50-100 cm après 5 ans d'expérience (Chen *et al.*, 2022). De nouveaux échantillons ont été prélevés 10 ans après et sont toujours en cours d'analyse.

Outre les expériences menées dans les fermes expérimentales universitaires, des recherches sont également effectuées dans les parcelles des agriculteurs, par exemple pour analyser la productivité et la teneur en protéines des cultures, ainsi que le bilan des gaz à effet de serre sur les sols organiques de plaine (Kandel *et al.*, 2013 ; 2016 ; Nielsen *et al.*, 2021a, b).

Plateforme d'extraction de protéines et d'autres produits à partir de la biomasse verte et feuillue.

La R&D technologique du concept de bioraffinerie verte à l'UA a été initiée à l'échelle du laboratoire (1 kg

d'apport) par une presse à double vis (Angelia 8500S, Angel) en 2013 (Méthodes décrites dans Damborg *et al.*, 2020) et développée à l'échelle pilote (1 tonne d'apport) de 2015 à 2018 sur la base d'opérations unitaires (méthodes décrites dans Stødkilde *et al.*, 2021). En 2019, nous avons établi une plateforme de démonstration entièrement automatisée avec une capacité d'entrée de 10 tonnes de biomasse fraîche par heure, avec une conception de procédé flexible appropriée pour le test, l'optimisation et la collecte de données à une échelle pertinente pour l'industrie. Le procédé et l'équipement sont décrits plus en détail ci-dessous. La plateforme fonctionne actuellement depuis trois saisons et a fourni des résultats, de l'expérience et des produits pour plus de 15 projets de R&D.

L'objectif de la plateforme est d'accélérer le développement et la mise en œuvre de la production durable de protéines pour l'alimentation humaine et animale, de composés biochimiques, de biomatériaux et de bioénergie à partir de biomasses vertes telles que les poacées et les légumineuses. Nous testons, optimisons et intégrons des technologies physiques, biologiques et chimiques de conversion de la biomasse, et collaborons dans un réseau interdisciplinaire sur la bioéconomie circulaire avec des partenaires au sein des universités, de l'industrie et des organisations publiques.

Plusieurs opérations et étapes sont nécessaires pour le traitement de la biomasse verte fraîche, avant que le concentré de protéines souhaité puisse être séparé. Les principales étapes sont la récolte, le transport, le déchetage/macération, le fractionnement, la précipitation et la séparation. Un aperçu de ces étapes du procédé et de la plate-forme de séparation des protéines est présenté dans la figure 1.

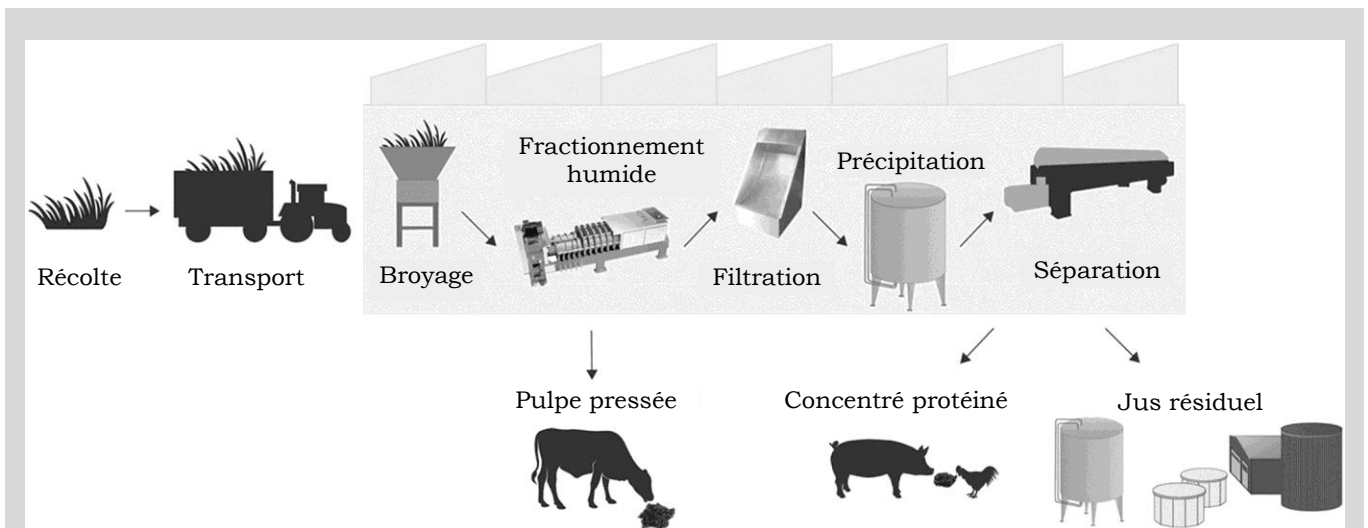


FIGURE 1 : La plateforme de bioraffinerie verte pour la séparation des protéines. Opérations et étapes du procédé permettant la séparation des protéines depuis la biomasse verte au sein de la plateforme de bioraffinerie verte (Jacobsen, 2020).

Figure 1: The green biorefinery protein separation platform. Unit operations and process steps involved in separation of protein from green biomass in the green biorefining platform (Jacobsen, 2020)

Toute la biomasse provient de l'installation de recherche agricole de l'UA Foulum, au Danemark. De nombreux types de biomasse, de stratégies de coupe et d'équipements de récolte différents sont testés sur la plateforme. La biomasse est toujours traitée directement après la récolte pour en extraire le jus frais ; le flétrissement est ainsi évité. Lorsqu'il est nécessaire de livrer la biomasse sans la hacher sur le terrain, nous utilisons un GrassTech GT140 (Future Grass Technology Ltd., IE). Lorsqu'il est nécessaire de hacher la biomasse sur le terrain, nous utilisons un andaineur (Kuhn FC 10030D avec un FC 3525 F monté à l'avant) et un broyeur (CLAAS Jaguar 990-930) avec une longueur de coupe théorique de 10-15 mm. La biomasse verte est transportée du champ à la plateforme de démonstration et introduite dans le système dans l'heure qui suit la coupe afin de garantir une dégradation minimale des protéines. Les exceptions à cette règle sont les essais dont le but est d'explorer et d'évaluer l'effet du temps entre la récolte et le traitement, et la façon dont les processus biologiques et chimiques dans les différentes plantes influencent le traitement, les rendements et la qualité du produit.

Les principaux procédés de la plateforme sont les suivants :

- *La macération mécanique et le fractionnement humide*

La biomasse récoltée est d'abord déchiquetée dans un broyeur stationnaire (fabriqué sur mesure à l'UA) à une longueur théorique de 4-5 cm. Une étape supplémentaire de macération a été couplée dans certaines des expériences. Après macération, la biomasse broyée est convoyée vers une presse à double vis P25 (vitesse de rotation de 10-18 rpm. Moteur de 45 kW, Cir-Tech A/S, Kogsvej 62, 6780 Skærbæk, DK) où la séparation mécanique de la pulpe de fibres et du jus vert est effectuée. Le jus vert est filtré dans un tamis en arc à filtre de 50 µm pour éliminer les plus grosses particules.

- *La précipitation des protéines*

La précipitation par la chaleur est la méthode la plus souvent utilisée. Dans ce cas, le jus vert est pompé à travers un échangeur de chaleur à deux étapes. La première étape chauffe le jus à environ 65°C en récupérant la chaleur du jus brun résiduel. La deuxième étape chauffe encore plus le jus vert pour atteindre une température de 85°C. Dans certains essais, les protéines sont précipitées par acidification, soit par l'ajout d'acide chlorhydrique pour atteindre un pH de 4,0, soit par l'abaissement du pH par des bactéries de fermentation lactique naturellement présentes dans le jus.

- *La séparation et le séchage*

Les protéines précipitées sont séparées du jus prétraité dans une centrifugeuse décanseuse (GEA Westfalia Separator CF 4000) produisant le concentré de protéines et un résidu liquide appelé jus brun. La teneur en matière sèche de la pâte de concentré protéique est

d'environ 30 à 50 %, elle est ensuite séchée dans un séchoir sous vide pour atteindre une teneur en matière sèche (MS) d'environ 95 %.

- *La digestion anaérobie*

Lorsqu'ils ne sont pas utilisés pour d'autres essais spécifiques envisageant des applications alternatives, le jus brun et la pulpe de fibres servent à produire de la bioénergie et des engrais par digestion anaérobie dans l'usine de biogaz de R&D à l'échelle de la ferme à UA Foulum.

Les travaux en cours sur la plateforme de démonstration comprennent :

- l'évaluation et l'optimisation des procédés
- la valorisation de tous les flux des procédés
- l'intégration technologique
- l'évaluation technico-économique
- l'analyse et l'amélioration de l'impact sur la durabilité des procédés
- la mise à l'échelle et la mise en œuvre.

Plateforme d'expérimentation d'alimentation animale

Les essais d'alimentation et l'évaluation de la valeur nutritionnelle et alimentaire de nouvelles sources d'aliments font partie intégrante du département des sciences animales et vétérinaires de l'Université d'Aarhus depuis de nombreuses années. Les installations expérimentales et les connaissances comprennent à la fois les monogastriques (porcs, volailles et rats) et les ruminants (bovins et ovins). Les essais d'alimentation sont réalisés avec des animaux fistulés pour les déterminations séquentielles de la digestibilité dans le tube digestif, avec des animaux intacts pour les déterminations de la digestibilité au niveau de l'ensemble du tube digestif, l'utilisation des aliments, la palatabilité et les études de performance sanitaire, ainsi qu'avec des techniques *in vitro* et grâce à des laboratoires bien équipés pour la détermination de la composition chimique et la détermination *in vitro* de la digestibilité (www.anis.au.dk/en/research/facilities).

Résultats et discussion

Les cultures herbagères sont les cultures agricoles les plus durables, bien que leur marché soit limité.

Par rapport aux cultures annuelles de céréales et de semences, l'utilisation des terres pour les cultures herbagères pérennes réduit considérablement les lessivages de nutriments, avec un besoin réduit de pesticides, et elle favorise davantage l'accumulation de carbone dans le sol (Cadoux *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*,

2022 ; Manevski *et al.*, 2018 ; Pugesgaard *et al.*, 2015). Même si la qualité de l'eau sera améliorée dans les systèmes de culture pérennes avec des saisons de croissance plus longues, la quantité d'eau (excédent pour les eaux souterraines et le débit des rivières) peut être réduite en raison d'une évapotranspiration annuelle plus élevée que celle des cultures annuelles.

Cependant, il existe une capacité d'infiltration d'eau accrue dans les cultures pérennes par rapport aux cultures annuelles en raison d'un plus grand nombre de macropores dans le sol (Basche et DeLonge, 2019), ce qui peut réduire les pertes causées par le ruissellement de l'eau. Le potentiel de sécurisation d'un approvisionnement en eau pour une longue période de croissance est le plus élevé dans le nord-ouest humide de l'Europe. Les poacées et les légumineuses peuvent y capter le rayonnement solaire plus efficacement que les cultures annuelles de céréales, car celles-ci nécessitent une partie considérable de la saison de croissance pour la maturation des cultures, la récolte, le travail du sol et les semis (Cadoux *et al.*, 2014 ; Dohleman & Long 2009 ; Pugesgaard *et al.*, 2015). En conséquence, nous avons mesuré une interception de près du double de la quantité de rayonnement photosynthétiquement actif dans les cultures pérennes des prairies par rapport aux monocultures annuelles ou aux rotations de cultures (Manevski *et al.*, 2017), ce qui s'est traduit dans la plupart des cas par une récolte plus importante de poacées (figure 2). Cependant, la betterave en particulier, mais aussi le maïs, présentaient des Efficacités d'Utilisation du Rayonnement (EUR - calculée pour la culture récoltée) plus élevées que les autres cultures et avaient donc des rendements similaires à ceux des meilleures poacées. Le mélange poacées-légumineuses, qui n'a pas été fertilisé avec de l'azote, a eu une EUR significativement plus faible que les autres poacées et a donc donné les rendements les plus faibles (à l'exception du miscanthus dans les premières années de son établissement). La fétuque élevée et le festulolium ont donné les meilleurs rendements parmi les espèces de prairie, et il semble que, en général, ces espèces soient les poacées fourragères les plus productives aux latitudes du nord-ouest de l'Europe (Becker *et al.*, 2020 ; Cougnon *et al.*, 2017).

Il n'est pas nouveau que les prairies soient considérées comme généralement inoffensives pour l'environnement. Cependant le problème s'est posé que, d'une part, ces avantages écosystémiques des prairies ne sont pas valorisés économiquement et d'autre part, les débouchés pour l'augmentation des surfaces de prairies ont été limités presque entièrement au secteur des ruminants. Il existe une utilisation de l'herbe pour la production de biogaz (Pehme *et al.*, 2017), mais pour éviter de graves effets indirects de changement d'affectation des terres, il est également nécessaire d'envisager de nouveaux débouchés alimentaires aux prairies afin d'assurer une meilleure production de leurs services écosystémiques. L'extraction de protéines pour

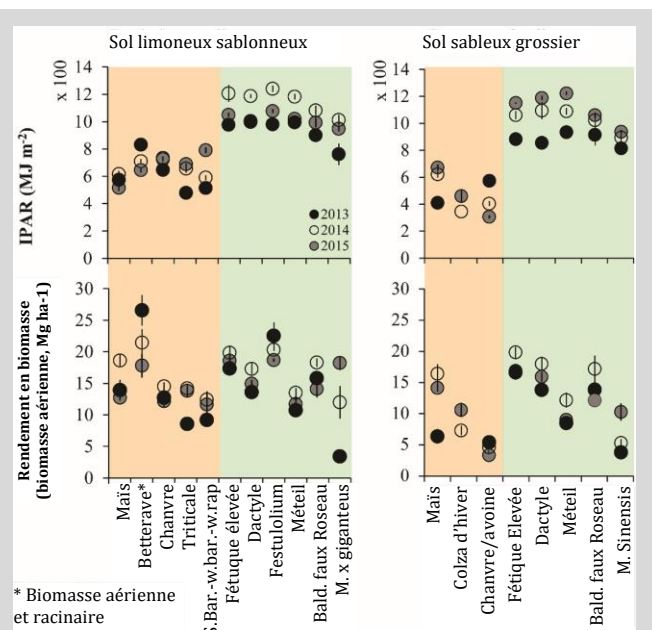


FIGURE 2 : Interception du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, Photosynthetically Active Radiation) dans des cultures annuelles (orange) et pérennes (vert) pendant la période 2013-2015 dans deux types de sols à l'Université d'Aarhus. Les prairies ont été établies en 2012 (d'après Manevski *et al.*, 2017).

*Figure 2: Interception of photosynthetically active radiation (IPAR) in annual (orange shade) and perennial (green shade) crops during 2013–2015 on two soil types at Aarhus University. Grasses were established in 2012 (from Manevski *et al.*, 2017)*

l'alimentation des monogastriques ou pour l'utilisation dans des produits alimentaires destinés à la consommation humaine directe ouvrira un marché pour davantage de prairies, ce qui pourrait permettre d'augmenter la séquestration de carbone par unité de terre et de réduire les impacts environnementaux.

Cultures pérennes de poacées et de légumineuses sur terres arables cultivées intensivement

La production intensive de poacées pérennes sur des terres arables peut être gérée de manière à optimiser la concentration et la qualité des protéines en vue de leur extraction dans une bioraffinerie. De nombreux facteurs influencent la teneur en protéines, l'extractibilité et le rendement par ha. Parmi les plus importants figurent l'espèce végétale, la période de récolte, la fertilisation et le rapport feuilles/tige. Nous avons étudié la qualité des protéines en fonction de leur disponibilité pour les animaux en utilisant le Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) comme indicateur de leur extractibilité dans une bioraffinerie (Solati *et al.*, 2017 ; Thers *et al.*, 2021). En ce qui concerne les espèces végétales, la récupération des protéines totales dans le concentré était la plus élevée pour les légumineuses (Thers *et al.*, 2021), mais cela

peut dépendre de l'optimisation de la fertilisation des cultures de poacées. Solati *et al.* (2017) ont constaté, lors de l'extraction des protéines de cinq espèces, que la fraction estimée des protéines totales extraites dans les fractions facilement disponibles B1+B2 était significativement plus faible pour le trèfle rouge (Figure 3A). Cependant, en incluant la fraction protéique B3, plus liée à la paroi cellulaire, toutes les légumineuses présentaient une fraction protéique extraite similaire, tandis que les deux espèces de poacées présentaient une extraction relative plus élevée, à la plupart des périodes de récolte (Figure 3B). En effectuant le calcul de la

teneur en protéines extractibles (g/kg MS), la somme des fractions protéiques facilement disponibles B1+B2, était significativement plus élevée pour le trèfle blanc et la luzerne (Figure 3C). Si la fraction protéique B3 peut aussi être extraite, c'est le trèfle blanc qui a la plus haute teneur en protéines extractibles parmi toutes les espèces (Figure 3D). En raison de sa plus grande productivité de biomasse, le trèfle rouge est l'espèce qui a montré la plus grande productivité de fractions protéiques B1+B2+B3 par ha (Figure 3F), tandis que cette différence était moins claire pour B1+B2 et dépendait du moment de la récolte (Figure 3E).

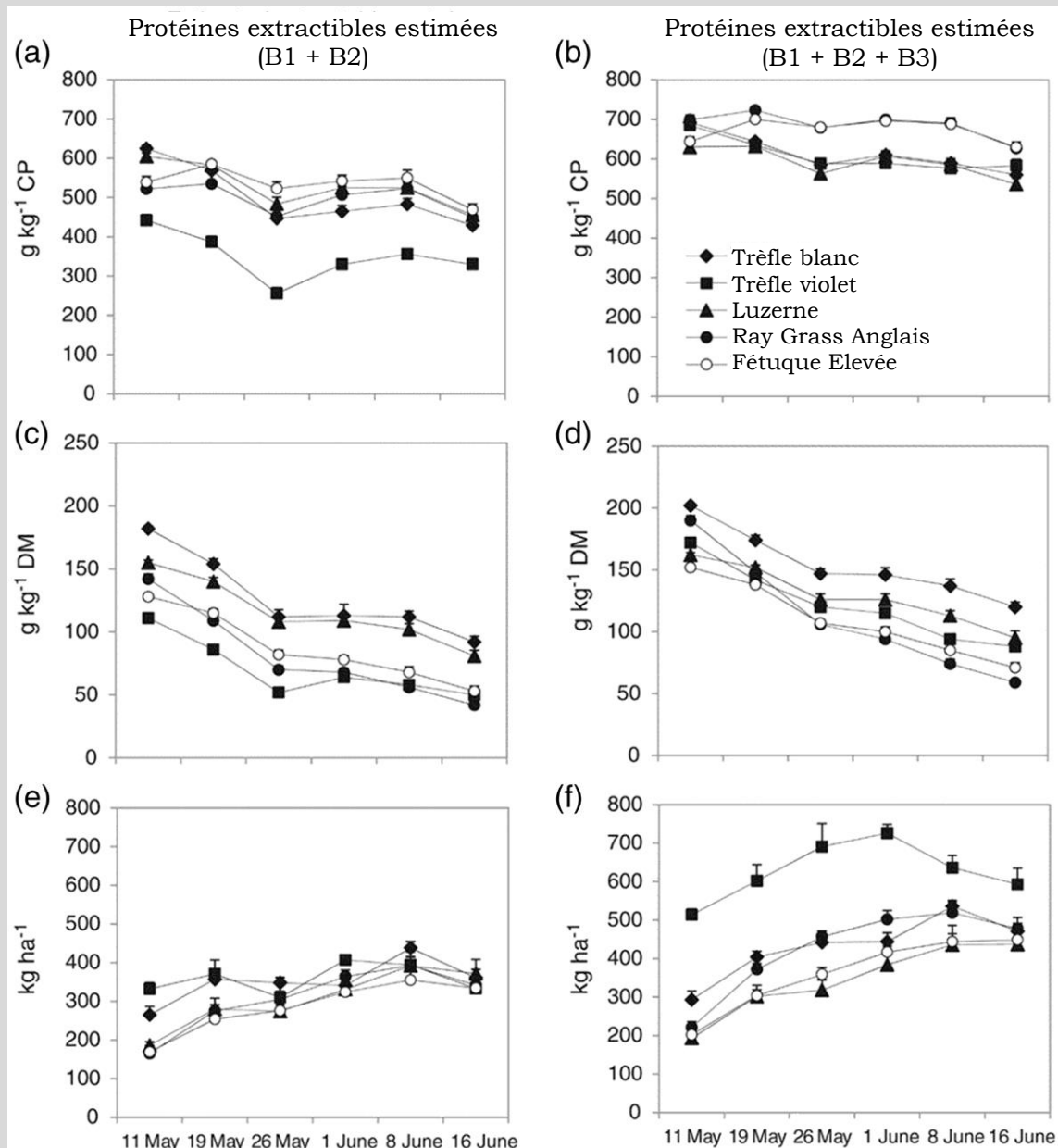


FIGURE 3 : Protéines extractibles autour de la première coupe de printemps définies comme facilement disponibles (B1 + B2, correspondant aux graphiques A, C et E) et potentiellement extractibles (B1 + B2 + B3, correspondant aux graphiques B, D et F) dans différentes espèces de légumineuses et de poacées (Solati et al., 2017).
 Figure 3: **Extractable protein around the first cut in spring defined as easily available (B1 + B2) (left side shown with letters A, C, E) and potentially extractable (B1 + B2 + B3) (right side shown with letters B, D, F) in legume and grass species (Solati et al., 2017)**

La composition chimique, et en particulier la teneur en protéines, dépend de la fertilisation azotée. Dans les mélanges poacées-trèfle, la fertilisation N n'influence pas beaucoup le rendement en protéines totales, alors que le rendement en protéines du ray-grass pur augmente de manière significative avec l'augmentation de la fertilisation N (Jørgensen *et al.*, 2021). Ainsi, le rapport entre les protéines et les glucides est élevé dans les poacées qui sont fauchées fréquemment et fertilisées par de l'engrais N, alors que la teneur en protéines du mélange poacée-trèfle ne varie que peu en fonction de la fertilisation azotée.

Les prairies pérennes dans un système de production extensive

Si les prairies de longue durée ne sont pas fertilisées, on ne peut s'attendre qu'à des rendements en MS très modérés après quelques années de récolte ; au Danemark, ces rendements seraient généralement de 2 à 4 t/ha/an (Nielsen, 2012 ; Nielsen *et al.*, 2013). En outre, les espèces des prairies non fertilisées présentent généralement de faibles concentrations en azote et en protéines et ne conviennent donc pas à l'extraction des protéines. Alternativement, il est possible d'envisager l'utilisation de la biomasse pour la production de biogaz, pouvant conduire à des résultats positifs en termes d'ACV, à condition qu'il n'y ait pas d'autre utilisation des prairies, comme le pâturage animal par exemple (Pehme *et al.*, 2017). Une autre option disponible pour soutenir la bioéconomie est l'utilisation de fibres d'espèces prairiales à faible teneur en protéines, notamment pour la fabrication de papier, d'emballages, de litière pour animaux, de biochar, etc. (Höller *et al.*, 2021 ; www.go-grass.eu).

Le rendement d'une prairie permanente sur des sols organiques dépend du type d'espèces et de cultivars, de l'âge du couvert végétal, de la fréquence de récolte annuelle et des niveaux de fertilisation (Jørgensen *et al.*, 2021). Dans les zones bien drainées, les prairies permanentes fertilisées devraient produire le même rendement que les poacées en rotation pendant plusieurs années après leur établissement. Cependant, si elles ne sont pas bien drainées, on estime que la production typique de MS se situe entre 70 et 80 % des poacées en rotation (Nielsen, 2012). La culture d'espèces tolérantes aux inondations, par exemple la baldingère faux roseau, le festulolium et la fétuque élevée sur des sols organiques humides ou temporairement inondés, également appelée paludiculture, a permis de documenter des rendements annuels élevés allant jusqu'à 10-19 t MS/ha (Jørgensen *et al.*, 2021 ; Kandel *et al.*, 2013 ; Kandel *et al.*, 2016 ; Nielsen *et al.*, 2021b). Ce chiffre est comparable à la productivité des poacées en rotation sur des sols drainés sous des taux de fertilisation similaires de 160 - 240 kg N/ha par an.

Pour le bioraffinage, la teneur en protéines de la biomasse des poacées dépend de la disponibilité de l'azote, de la fréquence et du moment de la coupe, à

l'instar des systèmes sur les terres arables intensives. Des recherches récentes ont révélé des teneurs en protéines brutes allant jusqu'à 2,9 - 3,4 t/ha/an, et des concentrés de protéines précipitées allant jusqu'à 1,2 - 2,2 t/ha/an, pour la baldingère faux-roseau et la fétuque élevée, cultivés sur des sols organiques humides (Nielsen *et al.*, 2021a). Le moment optimal de la récolte semble rester le facteur le plus critique pour les rendements en biomasse et en protéines.

Le bioraffinage vert et ses principaux produits

Le bioraffinage vert est un concept fondamental qui "représente la transformation durable de la biomasse verte en un éventail de produits et d'énergie commercialisables" (McEniry & O'Kiely, 2014). En d'autres termes, le bioraffinage vert est une plateforme technologique qui intègre une variété de différentes solutions durables afin de tout produire, de l'alimentation humaine et animale aux biomatériaux, biocarburants et bioénergie. Le bioraffinage vert se concentre intrinsèquement sur les produits contenant des protéines ou des acides aminés, ce qui est dû à la productivité élevée en protéines des prairies.

Les rendements et la répartition de la masse entre les différents flux de traitement dépendent d'une longue liste de paramètres et peuvent varier dans une large mesure. La figure 4 montre les fourchettes typiques des rendements en MS et en protéines brutes après un procédé de séparation de bioraffinage vert comme celui de la figure 1. En fonction des conditions de traitement, de l'extractibilité des protéines de la biomasse verte et de l'efficacité de la bioraffinerie, 30 à 50 % de la MS de la biomasse et jusqu'à 40 à 60 % des protéines seront extraites par pression dans la fraction de jus.

À partir de la fraction de jus, 5 à 20 % de la MS d'origine et 20 à 60 % de la protéine d'origine peuvent être précipités et rester dans la fraction riche en protéines précipitées, et le reste va au jus résiduel (Damberg *et al.*, 2020 ; et résultats non publiés de L. Stødkilde). Ces fourchettes de masse et de répartition des protéines ne sont pas maximales, mais elles illustrent les possibilités d'optimisation du procédé en fonction du résultat souhaité en matière de rendement protéique et de coût du procédé.

Ces dernières années, le développement au Danemark s'est concentré sur le traitement de la biomasse verte fraîche, par opposition au traitement de l'herbe ensilée. Les principaux produits concernés sont un concentré riche en protéines qui peut remplacer le tourteau de soja dans les mélanges d'aliments pour animaux monogastriques, un produit riche en fibres issu de la presse pour l'alimentation des ruminants et/ou la production de biogaz, et un jus résiduel pour le biogaz et le recyclage des nutriments.

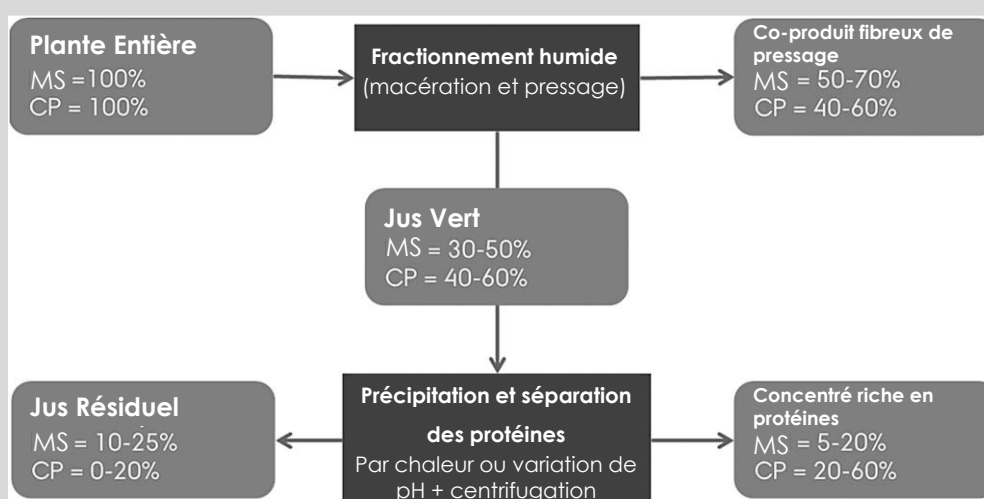


FIGURE 4 : Schéma synthétique du taux de matière sèche (DM, Dry Matter) et des rendements en matières azotées totales (CP, Crude Protein) dans les différentes fractions issues de la fragmentation de la biomasse verte. Les nombres indiqués correspondent au bilan massique en % (Poids / poids du matériel initial) (M. Ambye-Jensen et estimations à partir de Damborg et al., 2020).

Figure 4: **Schematic overview and typical dry matter (DM) and crude protein (CP) yields in the fractionation of green biomass into the three process streams of fibre press cake, residual juice and protein concentrate.** The numbers are mass balance % (weight per weight in input material) (M. Ambye-Jensen and estimates from Damborg et al., 2020)

Le produit protéique

La fraction protéique est considérée comme le plus précieux des trois produits principaux, et l'accent a été mis sur l'augmentation de la quantité de protéines ainsi que sur la concentration et la qualité nutritionnelle de ces protéines. La concentration en protéines dans les concentrés protéiques verts produits à l'échelle pilote était initialement d'environ 35 % de la MS, et cette concentration a été ensuite améliorée sur la plateforme de démonstration pour atteindre entre 50 et 60 % de protéines brutes, et la qualité nutritionnelle des protéines a augmenté simultanément (Stødkilde et al.,

2022). Le tableau 1 montre la composition chimique des concentrés protéiques verts avec 46 % et 56 % de protéines dans la MS (Stødkilde et al., 2021).

La composition en acides aminés des deux lots de protéines verts du tableau 1 est similaire à la composition en acides aminés du tourteau de soja, tandis que la teneur en lipides est la plus élevée dans les concentrés de protéines verts. Il convient de noter qu'environ 50 % des acides gras des concentrés sont constitués d'acide alpha-linolénique (C18:1n3). De plus, la teneur en fibres est élevée dans les concentrés de protéines verts. En accord avec des études

Sur la base de MS	Protéines, 46 %	Protéines, 56 %	Tourteau de soja
MS, %	97.4	92.32	87.2
Protéines brutes, %	45.8	56.2	52.4
Lipides, %	10.6	13.8	2.9
Cendres, %	12.1	8.30	8.14
Fibres alimentaires totales, %	29.7	Na ²⁾	Na ²⁾
Acides aminés, g/16 g N			
Lysine	5.76	5.75	6.29
Méthionine	2.27	2.03	1.36
Méthionine + Cystéine	2.73	2.72	2.79
Thréonine	5.02	4.60	4.06
Tryptophane	2.42	2.21	1.38
EDOMi ¹⁾ , %	67.9	72.8	77.8

¹⁾EDOMi: Digestibilité enzymatique de la matière organique au niveau de l'iléon (Enzyme Digestibility of Organic Matter at the ileum)

²⁾ Non analysé

Tableau 1 : Composition chimique des protéines vertes avec respectivement 46 % et 56 % de protéines et tourteau de soja décortiqué (Stødkilde et al., 2021)

Table 1: **Chemical composition of green protein with 46 % and 56 % protein respectively and dehulled soybean meal** (Stødkilde et al., 2021)

antérieures sur des rats, où il a été montré que la digestibilité des protéines augmentait avec la teneur en protéines des concentrés de protéines vertes (Stødkilde *et al.*, 2019), la digestibilité *in vitro* (EDOMi) était plus élevée dans le concentré de protéines vertes le plus élevée, mais toujours inférieure à celle du tourteau de soja (Tableau 1).

Valeur nutritionnelle de la protéine comme aliment pour les porcs et les volailles

Le premier essai danois d'alimentation a été réalisé avec des poulets de chair biologiques nourris avec un régime à relativement faible teneur en protéines brutes contenant un concentré à seulement 36 % de PB. Avec ce concentré protéique, il a été possible de remplacer 8 % de l'alimentation, principalement des tourteaux de soja (13 % des PB) par un concentré protéique extrait d'une culture biologique de poacée-trèfles sans affecter les performances de croissance (Stødkilde *et al.*, 2020). Cependant, des inclusions plus importantes ont remis en cause les apports alimentaires et les taux de croissance en raison de la faible teneur en protéines et de la teneur élevée correspondante en fibres alimentaires insolubles dans l'extrait protéique, qui sont dans une large mesure indigestes.

De plus, nous avons réalisé deux expériences d'alimentation de porcs en croissance-finition avec un concentré protéique contenant respectivement 46 % et 56 % de protéines (Tableau 1). Les deux concentrés protéiques présentaient une composition en acides aminés bien équilibrée. La teneur en lysine était légèrement inférieure à celle du soja, mais la teneur en la plupart des autres acides aminés essentiels était supérieure. Avec ces concentrés, les porcs ont obtenu des performances égales, quel que soit la part d'aliment substituée (Stødkilde *et al.*, 2021). Le taux de substitution le plus élevé, soit 15 % de l'alimentation traditionnelle (jusqu'à 41 % des protéines brutes) avec des protéines de poacée-trèfle, a permis d'obtenir des niveaux d'ingestion, de croissance et d'utilisation des aliments similaires à ceux d'un groupe témoin dont la source de protéines dominante était le tourteau de soja. Dans les deux expériences, des gains de poids quotidiens supérieurs à 1000 g ont été obtenus.

Dans les expériences sur les poulets de chair, les acides gras n3 ont augmenté de 6,7 % à 11,8 % des acides gras totaux dans la masse pectorale (blancs), et dans l'expérience sur les porcs, l'augmentation était de 1,17 % à 3,12 % des acides gras totaux dans le *Longissimus dorsi* (Stødkilde *et al.*, 2020 ; Stødkilde *et al.*, 2021). Dans une étude récente (Stødkilde *et al.*, 2022) où la farine de soja a été remplacée à 1:1 par des protéines vertes (9 % du régime total), un jury professionnel n'a pas été en mesure de détecter des différences significatives dans l'odeur, la texture, le goût et la saveur des rôtis de *M. longissimus dorsi* provenant de porcs femelles.

Possibilités d'utilisation des protéines dans l'alimentation humaine

Une étude récente a conclu que les protéines vertes de haute qualité peuvent être incorporées dans l'alimentation humaine (Møller *et al.*, 2021). La RuBisCO et les protéines de luzerne présentent les propriétés fonctionnelles les plus prometteuses en ce qui concerne la solubilité et les propriétés moussantes, ce qui en fait un substitut potentiel aux ingrédients protéiques animaux. Jusqu'à présent, lorsqu'on a considéré les protéines vertes pour l'alimentation, l'accent a été mis sur les protéines de feuilles de luzerne et de betterave à sucre. Cependant, la protéine RuBisCO est très bien conservée parmi les différentes espèces végétales en termes de séquence et de structure protéique, ce qui explique pourquoi la RuBisCO obtenue à partir de plantes à feuilles, telles que les poacées et les trèfles, peut avoir des propriétés fonctionnelles similaires. En même temps, la RuBisCO présente un pouvoir allergène relativement faible, de sorte que la RuBisCO purifiée peut servir de source potentielle de protéine pour les consommateurs multi-allergiques à haut risque. Cependant, il n'est pas clair si d'autres protéines, présentes dans différents types de biomasse verte (en plus de la RuBisCO), peuvent avoir des propriétés allergènes, et cette question doit être résolue. Aujourd'hui, les protéines de luzerne sont approuvées dans les applications alimentaires, mais uniquement sur la base d'une dose journalière limitée. Il reste encore du chemin à parcourir pour décrire la matrice complète de la luzerne et des autres biomasses vertes. Différents facteurs antinutritionnels sont présents dans différentes espèces végétales et ils doivent être quantifiés dans chaque cas spécifique car ils peuvent se concentrer dans la fraction protéique et affecter la biodisponibilité des nutriments. Tout nouveau produit protéique fabriqué à partir de luzerne, de trèfle ou de poacées doit être approuvé par l'EFSA avant de pouvoir être utilisé dans des produits alimentaires dans l'UE (Møller *et al.*, 2021).

Co-produit fibreux de pressage

Environ la moitié des protéines brutes de la plante se répartissent dans le co-produit de pressage des fibres (pulpe), et la composition des acides aminés dans cette fraction est similaire à celle de la plante entière (Damborg *et al.*, 2018). Comme une proportion considérable des protéines retenues dans la pulpe est associée aux fibres, la pulpe devrait convenir aux ruminants. L'analyse chimique de la pulpe a révélé une fraction avec une concentration en MS plus élevée que dans la culture entière (plante), une concentration en protéines brutes similaire et une concentration en cendres brutes plus faible (Tableau 2). La digestibilité *in vitro* dans le rumen a eu tendance à être plus faible pour la pulpe, comme prévu en raison d'une grande proportion de matière organique soluble éliminée lors de

Espèces végétales	Fraction	MS, %	Protéines brutes, % de MS	Cendres brutes, % de MS	Digestibilité <i>in vitro</i> de la MO, %	MOD ¹⁾ , %
Trèfle rouge	Plant	16.6	20.5	9.06	65.4	59.4
	Pulp	43.5	19.8	6.63	57.9	54.0
Ray-grass Anglais	Plant	19.9	16.7	8.63	74.4	67.9
	Pulp	41.4	16.4	5.11	69.9	66.3
Luzerne	Plant	19.6	20.5	8.86	61.9	56.4
	Pulp	39.9	19.8	5.80	56.6	53.2
Trèfle Blanc	Plant	15.8	26.7	10.4	77.4	69.4
	Pulp	41.2	26.8	7.23	74.3	68.9
P-Value		<0.001	0.44	<0.001	0.046	0.21

Toutes les valeurs sont la moyenne de trois récoltes (Nov 2013, Juin 2014, Sep 2014)

¹⁾ MOD = Matière Organique Digestible *in vitro* en % de la matière sèche totale

Tableau 2 : Composition chimique du trèfle rouge, du ray-grass anglais, de la luzerne et du trèfle blanc et de la pulpe qui en résulte (Damborg et al., 2018)

Table 2: Chemical composition of red clover, perennial ryegrass, alfalfa and white clover plant and the resulting pulp (Damborg et al., 2018)

l'extraction du jus. Lorsqu'elle est exprimée en matière organique digestible (MOD) par rapport à la MS, la différence disparaît pour le trèfle blanc et le ray-grass anglais, car la teneur en cendres est également réduite lors de l'étape d'extraction.

Valeur nutritionnelle de la pulpe comme aliment pour les ruminants

Jusqu'à présent, seuls les résultats de quelques expériences d'alimentation en bovin ont été publiés (Damborg et al., 2019 ; Savonen et al., 2019 ; Sousa et al., 2022). Dans ces études, la substitution d'ensilages de plante entière par de la pulpe de plante entière fractionnée ou de l'ensilage de plante entière a conduit à des résultats différents. Damborg et al. (2019) ont montré une augmentation de la production de lait chez les vaches laitières, alors que dans l'expérience de Savonen et al. (2019), la production de lait a eu tendance à diminuer, et dans l'expérience de Sousa et al. (2022), la production de lait a diminué. De plus, l'ingestion de matière sèche n'a pas été affectée (Damborg et al., 2019 ; Sousa et al., 2022) ou a augmenté à un taux d'incorporation moyen (Savonen et al., 2019), lorsque les vaches ont été nourries avec de la pulpe d'ensilage par rapport à l'ensilage de plantes entières pour une espèce végétale donnée. Plusieurs expériences d'ensilage ont été réalisées avec la pulpe. Malgré le faible taux de sucre résiduel dans la pulpe, celle-ci s'ensile généralement très bien, probablement parce que le pouvoir tampon est également faible en raison de la teneur relativement faible en minéraux (Hansen et al., 2020). Contrairement aux analyses de digestibilité *in vitro* et *in situ* de la pulpe par Damborg et al., (2018), la digestibilité *in vivo* des CP (Crude Protein) et des NDF (Neutral detergent fiber) était plus importante pour les régimes d'ensilage de pulpe par rapport aux régimes d'ensilage de poacées-trèfle. Cette observation peut probablement être expliquée par le traitement physique de la pulpe dans la presse à vis pendant le bioraffinage,

qui désintègre les fibres et augmente l'accessibilité pour les microorganismes du rumen, augmentant ainsi la dégradabilité des fibres et des nutriments liés aux fibres. Cette meilleure utilisation des aliments s'est traduite par un rendement laitier corrigé de l'énergie plus élevé chez les vaches nourries d'ensilage de pulpe par rapport à l'ensilage de poacées-trèfle (Tableau 3). Ces résultats impliquent que l'extraction des protéines des espèces prairiales peut augmenter la digestibilité de la partie fibreuse des espèces prairiales. Dans l'étude finlandaise de Savonen et al. (2020) portant sur les effets de l'incorporation de pulpe fabriquée à partir d'ensilage jusqu'à une substitution de 50 % de l'ensilage de poacées, aucun effet sur le rendement laitier (37 kg ECM) n'a été détecté.

Alimentation	Ensilage de pulpe	Ensilage de poacée-trèfle
MS, %	28	52
Protéines brutes, %	18	16
Cendres, %	9.3	9.4
NDF, %	45	39
MO digestible In-vitro, %	70	72
Apport de MS, kg/jour	23.0	22.7²⁾
ECM1), kg/jour	37.0	33.5²⁾
Digestibilité In-vivo		
MO, %	73	70²⁾
NDF, %	63	54²⁾
Protéines, %	66	60²⁾

¹⁾ ECM = Rendement laitier corrigé en énergie

²⁾ Différence significative avec l'ensilage de pulpe

Tableau 3 : Expérience d'alimentation des vaches laitières avec de l'ensilage de pulpe en comparaison avec de l'ensilage de poacée-trèfle (Damborg et al., 2019).

Table 3: Feeding experiment with pulp to dairy cattle compared with grass clover (Damborg et al., 2019)

Utilisations alternatives de la pulpe de fibres

La pulpe de fibres a de nombreuses applications autres que son utilisation comme aliment pour ruminants et il existe de nombreuses possibilités d'ajouter d'autres technologies de bioraffinage. Les exemples incluent la production de bioénergie par la digestion anaérobie pour produire du biogaz, la production de bioéthanol cellulosique, la pyrolyse pour synthétiser du gaz, de la biohuile et du biochar ou la liquéfaction hydrothermale pour produire du biobrut, ou bien encore la production de matériaux grâce à la transformation des fibres en biomatériaux et grâce à la conversion biologique ou chimique en composés biochimiques. Dans le projet Grass Biochar (projet GUDP financé par le Danemark), nous étudions comment le bioraffinage vert peut être intégré à la pyrolyse de la pulpe de fibres. La pyrolyse produira de l'énergie renouvelable sous forme de gaz combustible pour fournir la chaleur nécessaire à la précipitation des protéines et au séchage du concentré protéique, ainsi que du biochar qui sera utilisé comme additif alimentaire. La production à grande échelle de biochar à partir de la pulpe de fibres de poacées offrira un potentiel important pour la création de solutions de bioénergie avec captage et stockage du carbone (BECCS) en combinaison avec des bioraffineries vertes (Elsgaard *et al.*, 2022).

L'utilisation de la pulpe de fibres pour la fabrication de biomatériaux à base de fibres est une autre application intéressante. Cette approche est en fait l'objectif principal de toutes les bioraffineries vertes existantes qui traitent l'ensilage au lieu de la biomasse fraîche verte. Biowert à Brensbach, en Allemagne (www.biowert.de), produit des matériaux d'isolation à base d'herbe et du bioplastique renforcé par des fibres de poacées, un matériau biocomposite adapté aux applications de moulage par injection ou extrusion. Newfoss à Uden aux Pays-Bas (www.newfoss.com) produit des matériaux d'isolation et des fibres pour le papier et l'emballage. Le projet SinProPack au Danemark (Projet - Papier à base de fibres de poacées pour des produits d'emballage "à emporter" durables - Institut technologique danois (www.dti.dk)) a récemment commencé à étudier et à développer la production d'emballages biologiques pour le marché des produits à emporter à partir de la pâte de fibres provenant de bioraffineries vertes, et un autre projet, Høsttek, a commencé à développer des panneaux de fibres durables à partir de la pâte de fibres. ([Ny høstteknologi til klimavenlig dyrkning af lavbundsjord - Grønt Udviklings- og Demonstrationsprogram](https://www.hoesteknologi.dk) (www.lbst.dk)).

Pour l'utilisation de la pâte de fibres pour la bioénergie ou les biomatériaux, il est avantageux que la fibre soit appauvrie en protéines. Ainsi, l'extraction efficace des protéines dans les bioraffineries vertes n'a

pas d'impact négatif sur ces applications. Cependant, pour l'application où la pulpe de fibres est utilisée pour l'alimentation des ruminants, il existe une limite inférieure quant à la quantité de protéines qui doit rester dans la pulpe.

Fraction de jus résiduel

Le jus résiduel restant après la précipitation des protéines du jus vert est caractérisé par une faible teneur en MS (5-8 %), une teneur variable mais élevée en glucides solubles et en minéraux, tandis que la fraction protéine brute (10-20 % de la MS) n'est composée que pour moitié de protéines, l'autre moitié correspondant à divers composés azotés non protéiques (CAP) (Damborg *et al.*, 2020). La composition spécifique du jus résiduel dépend d'un certain nombre de facteurs, notamment les étapes de traitement de la plateforme de séparation du bioraffinage vert, en particulier la méthode de précipitation, ainsi que le type, la maturité et les conditions de croissance de la biomasse verte utilisée.

Digestion anaérobie de jus résiduel

L'application de la digestion anaérobie du jus résiduel est une opportunité directe, surtout au Danemark, qui possède une importante industrie du biogaz. De nombreuses usines de production de biogaz au Danemark pourraient bénéficier d'un substrat supplémentaire avec une concentration faible en solides mais faciles à digérer, afin de co-digérer des résidus agricoles fibreux tels que la litière épaisse, le fumier de vache et la paille provenant de la production de céréales ou de semences de poacées. C'est, par exemple, le cas à Ausumgaard, la première bioraffinerie verte commerciale du Danemark (www.ausumgaard.dk/baeredygtig-energi/graesproteiner), qui dispose d'une grande installation de biogaz où le jus résiduel et la pulpe fibreuse de la bioraffinerie peuvent être digérés. L'utilisation du jus résiduel pour la digestion anaérobie a été évaluée en termes de durabilité technique, économique et environnementale (Corona *et al.*, 2018 ; Djomo *et al.*, 2020 ; Feng *et al.*, 2021 ; Jensen & Gylling, 2018 ; Santamaria-Fernandez *et al.*, 2018). Si le jus résiduel ne peut pas être co-digéré dans une usine de digestion anaérobie existante, c'est une solution beaucoup moins chère et plus efficace d'installer un réacteur à lit tassé, comme le montrent Feng *et al.*, (2021). Ici, le jus résiduel a été efficacement digéré comme un seul substrat à faible temps de rétention (5,5 jours) et par conséquent la taille de réacteur et l'investissement en capital nécessaires sont beaucoup moins importants.

Un avantage évident de la digestion anaérobie du jus résiduel des bioraffineries vertes est que les nutriments inorganiques seront utilisés directement dans les systèmes existants de recirculation des nutriments. Comme c'est déjà le cas dans le système

actuel, le digestat issu de la digestion anaérobie est épandu sur les terres agricoles comme engrais.

Produits biochimiques issus du jus résiduel

Le jus résiduel pourrait potentiellement être utilisé pour bien plus que de la bioénergie, avant que les nutriments ne soient remis en circulation pour soutenir la production agricole. Historiquement, l'utilisation des précieux produits du jus résiduel/du jus brun issu de la transformation de la biomasse verte s'est focalisée sur ses acides aminés et son acide lactique. Plusieurs études et activités commerciales ont porté sur la production de concentrés d'acides aminés (Ecker *et al.*, 2012) ou d'acides aminés spécifiques tels que la L-Lysine (Andersen & Kiel, 2000 ; Thomsen *et al.*, 2015).

Dans les quelques bioraffineries vertes existantes qui traitent l'ensilage d'herbe, le jus qui est utilisé pour la bioénergie par la production de biogaz (Biower) ou pour sa teneur en acides aminés, acides organiques et nutriments inorganiques ajoutés principalement aux produits fertilisants, est concentré grâce à la technologie de filtration sur membrane.

Lorsqu'il est traité dans le cadre du scénario danois (Figure 4), le jus résiduel est riche en glucides et en nutriments inorganiques. Cette composition présente un fort potentiel comme substrat pour les applications de fermentation dans l'industrie biotechnologique, ou comme substrat pour la fermentation de précision, par exemple pour la production de molécules plateformes biosourcées, de protéines d'origine unicellulaire ou de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. Afin d'obtenir un bon substrat de fermentation, il est avantageux de réduire le volume et d'augmenter la concentration des glucides ainsi que d'autres macronutriments présents dans le jus résiduel. Ceci est expérimenté dans l'actuelle plateforme de démonstration de bioraffinerie par filtration sur membrane. Ainsi, le potentiel de valorisation du jus résiduel est important et pourrait être considéré comme un "fruit à portée de main" afin d'améliorer la durabilité économique globale de la bioraffinerie verte.

Perspectives futures

Les perspectives d'obtenir simultanément des licences de production pour les agriculteurs et de créer une nouvelle industrie biosourcée capable de fournir des produits locaux pour la transition agroécologique soutiennent le développement du bioraffinage vert au Danemark. Dans un récent projet de loi de finances, un budget important a été prévu à la fois pour la R&D et pour le soutien de nouvelles activités commerciales. Plusieurs projets européens soutiennent le développement à plus grande échelle. Il reste encore beaucoup de paramètres à optimiser pour être en mesure de produire la matière première idéale d'une

bioraffinerie, contrairement à ce qui se passait auparavant, où l'accent était mis sur la qualité des aliments pour les ruminants. Ces questions incluent :

- une sélection végétale pour une extractibilité et une qualité optimales des protéines,
- des études sur les différences de solubilité des protéines entre les espèces fourragères et les cultivars,
- le développement d'une planification et d'une logistique efficaces de récolte pour permettre la livraison continue d'une biomasse verte de bonne qualité aux bioraffineries,
- le développement et l'optimisation des procédés dans les bioraffineries afin d'obtenir des rendements élevés et constants de concentrés de protéines présentant une digestibilité et une valeur nutritionnelle élevées,
- la création de valeur à partir de la pulpe de fibres et du jus résiduel afin d'obtenir une meilleure rentabilité globale de la bioraffinerie verte,
- l'intégration de technologies pour l'utilisation en cascade de flux secondaires et de résidus,
- le développement de solutions flexibles de bioraffinage, dans lesquelles la biomasse d'entrée et les produits de sortie peuvent changer en fonction des variations saisonnières et des conditions du marché, afin de parvenir à une utilisation efficace des installations de production tout au long de l'année,
- des options de stockage de la biomasse verte destinée à être utilisée dans la bioraffinerie pendant l'hiver,
- la valorisation des avantages de la production herbagère en termes de climat (réduction nette des gaz à effet de serre) et autres bénéfices environnementaux.

Remerciements : Ce travail a été soutenu par plusieurs projets au cours des 10 dernières années, et actuellement GO-GRASS (programme de recherche et d'innovation Horizon 2020, convention de subvention N° 862674), Green Valleys (Interreg Øresund-Kattegat-Skagerrak, projet N° 20201847), GrassTools (Fonds d'innovation du Danemark, projet N° 0224-00091B), et divers projets de développement et de démonstration verts sous l'égide du Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche du Danemark, Grass Biochar, SinProPack, SuperGrassPork, AlfaMaxBioraf figurent parmi les principaux contributeurs.

Accepté pour publication le 21/04/2023

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andersen M. & Kiel P. (2000). "Integrated utilisation of green bio-mass in the green biorefinery". *Industrial Crops and Products*, 11, 129-137. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00055-2)
- Basche A.D. & DeLonge M.S. (2019). "Comparing infiltration rates in soils managed with conventional and alternative farming methods: A meta-analysis". *PLoS ONE* 14(9): e0215702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215702>

- Becker T., Isselstein J., Jurschik R., Benke M. & Kayser M. (2020). "Performance of modern varieties of *Festuca arundinacea* and *Phleum pratense* as an alternative to *Lolium perenne* in intensively managed sown grasslands". *Agronomy*, 10(4), 540. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040540>
- Cadoux S., Ferchaud F., Demay C., Boizard H., Machet J.M., Fourdinier E., Preudhomme M., Chabbert B., Gosse G. & Mary B. (2014). "Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops". *GCB Bioenergy*, 6, 425-438. <https://doi.org/10.1111/qcbb.12065>
- Chen J., Lærke P.E. & Jørgensen U. (2022). "Land conversion from annual to perennial crops: A win-win strategy for biomass yield and soil organic carbon and total nitrogen sequestration". *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 330, 107907. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.107907>
- Chiesa S. & Gnansounou E. (2011). "Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery - possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption". *Bioresource Technology*, 102(2), 427-436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.125>
- Christensen B.T., Thomsen I.K. & Eriksen J. (2022). "The Askov long-term field experiment (1894-2021) represents a unique research platform". *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 185(2), 187-201. <https://doi.org/10.1002/jipln.202100354>
- Corona A., Ambye-Jensen M., Vega G.C., Hauschild M.Z. & Birkved M. (2018). "Techno-environmental assessment of the green biorefinery concept: Combining process simulation and life cycle assessment at an early design stage". *Science of the Total Environment*, 635, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.357>
- Cougnon M., De Swaef T., Lootens P., Baert J., De Frenne P., Shahidi R., Roldan-Ruiz I. & Reheul D. (2017). "In situ quantification of forage grass root biomass, distribution and diameter classes under two N fertilisation rates". *Plant and Soil*, 411, 409-422. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-016-3034-7>
- Damborg V.K., Jensen S.K., Johansen M., Ambye-Jensen M., & Weisbjerg M.R. (2019). "Ensilaged pulp from biorefining increased milk production in dairy cows compared with grass-clover silage". *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8883-8897. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16096>
- Damborg V.K., Jensen S.K., Weisbjerg M.R., Adamsen A.P. & Stødkilde L. (2020). "Screw-pressed fractions from green forages as animal feed: Chemical composition and mass balances". *Animal Feed Science and Technology*, 261, 114401. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114401>
- Damborg V.K., Stødkilde L., Jensen S.K. & Weisbjerg M.R. (2018). "Protein value and degradation characteristics of pulp fibre fractions from screw pressed grass, clover, and lucerne". *Animal Feed Science and Technology*, 244, 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.08.004>
- Djomo N.S., Knudsen M.T., Martinsen L., Andersen M.S., Ambye-Jensen M., Møller H.B. & Hermansen J.E. (2020). "Green proteins: An energy-efficient solution for increased self-sufficiency in protein in Europe". In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 14, 3, 605-619. <https://doi.org/10.1002/bbb.2098>
- Dohleman F.G. & Long S.P. (2009). "More productive than maize in the Midwest: how does miscanthus do it?". *Plant Physiology* 150(4), 2104-2115. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139162>
- Ecker J., Schaffenberg M., Koschuh W., Mandl M., Böchzelt H.G., Schnitzer H., Harasek M. & Steinmüller H. (2012). "Green Biorefinery Upper Austria – pilot plant operation". *Separation and Purification Technology*, 96, 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.05.027>
- Elsgaard L., Adamsen A.P.S., Møller H.B., Winding A., Jørgensen U., Mortensen E. Ø., Arthur E., Abalos D., Andersen M.N., Thers H., Sørensen P., Dilness A.A. & Eloffson K. (2022). "Knowledge synthesis on biochar in Danish agriculture - Biochar production, use and effect in soil agroecosystems (part 1) and Economic assessment of biochar production and use (part 2)". *Advisory report from DCA – Danish Centre for Food and Agriculture*, 160 pp. https://pure.au.dk/portal/files/283110980/Biokul_vidensyntese_samlet_1909_2022.pdf
- EU Commission (2018). "REPORT FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT on the development of plant proteins in the European Union". COM(2018) 757 final, 16 pp.
- Feng L., Ward A.J., Ambye-Jensen M. & Møller H.B. (2021). "Pilot-scale anaerobic digestion of by-product liquid (brown juice) from grass protein extraction using an un-heated anaerobic filter". *Process Safety and Environmental Protection*, 146, 886-892. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.12.026>
- Gylling M., Jørgensen U., Bentsen N.S., Kristensen I.T., Dalgaard T., Felby C. & Johansen V.K. (2016). "The + 10 million tonnes study: increasing the sustainable production of biomass for biorefineries". (Updated edition 2016 ed.) Department of Food and Resource Economics, University of Copenhagen. https://ifro.ku.dk/publikationer/saerlige_ifro-udgivelser/10miotons/
- Hansen N.K., Kristensen T., Johansen M. & Weisbjerg M.R. (2020). "Effect of regrowth period for perennial ryegrass on yield and nutritive value of grass". In: P. Virkajärvi, K. Hakala, M. Hakojärvi, J. Helin, I. Herzon, V. Jokela, S. Peltonen, M. Rinne, M. Seppänen, & J. Uusi-Kämpä (eds.), Meeting the future demands for grassland production: Proceedings of the 28th General Meeting of the European Grassland Federation Helsinki, Finland 19-22 October 2020 (pp. 267-269). Wageningen Academic Publishers. Grassland Science in Europe, Vol 25. https://www.europeangrassland.org/fileadmin/documents/Infos/Printed_Matter/Proceedings/EGF2020.pdf
- Houseman R.A. & Connell J. (1976). "Utilization of products of green-crop fractionation by pigs and ruminants". *Proceedings of the Nutrition Society*, 35, 213-220.
- Höller M., Lunze A., Wever C., Deutsche A.L., Stücker A., Frase N., Pestsova E., Spiess A.C., Westhoff P. & Pude R. (2021). "Meadow hay, *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby and *Silphium perfoliatum* L. as potential non-wood raw materials for the pulp and paper industry". *Industrial Crops and Products* 167, 113548. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113548>
- Jacobsen E. (2020). "Fermentation of concentrated brown juice from a green biorefining platform. Production of high value carotenoids using recombinant oleaginous yeast - An experimental and industrial, techno-economic case study". *MSc thesis at Aarhus University*, Department of Biological and Chemical Engineering supervised by Ambye-Jensen, M.
- Jensen J.D. & Gylling M. (2018). "Økonomiske vurderinger i forhold til værdikæden for Grøn Bioraffinering". Institut for Fødevarer- og Ressourceøkonomi, Københavns Universitet, 11 pp.
- Jørgensen U. & Lærke P.E. (2016). "Perennial Grasses for Sustainable European Protein Production". In: S. Barth, D. Murphy-Bokern, O. Kalinina, G. Taylor, & M. Jones (Eds.), *Perennial Biomass Crops for a Resource-Constrained World* (pp. 33-41). Springer Publishing Company. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44530-4_3
- Jørgensen U., Kristensen T., Jørgensen J.R., Kongsted A.G., De Notaris C., Nielsen C., Mortensen E.Ø., Ambye-Jensen M., Jensen S.K., Stødkilde-Jørgensen L., Dalsgaard T.K., Møller A.H., Grøn Sørensen C., Asp T., Lehmann Olsen F. & Gylling M. (2021). "Green biorefining of grassland biomass". *DCA report No. 193* <https://dcapub.au.dk/djfpublikation/index.asp?action=show&id=1480>
- Kandel T.P., Elsgaard L., Karki S. & Lærke P.E. (2013). "Biomass yield and greenhouse gas emissions from a drained fen peatland cultivated with reed canary grass under different harvest and fertilizer regimes". *BioEnergy Research* 6 (3), 883-895. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-013-9316-5>
- Kandel T.P., Elsgaard L., Andersen M.N. & Lærke P.E. (2016). "Influence of harvest time and frequency on light interception and biomass yield of festulolium and tall fescue cultivated on a peatland". *European Journal of Agronomy*, 81, 150-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2016.09.010>
- Larsen S., Bentsen N.S., Dalgaard T., Jørgensen U., Olesen J.E. & Felby C. (2017). "Possibilities for near-term bioenergy production and GHG-mitigation through sustainable intensification of agriculture and forestry in Denmark". *Environmental Research Letters* 12(11). <http://dx.doi.org/10.1088/1748-9326/aa9001>

- Manevski K., Laerke P.E., Jiao X., Santhome S. & Jørgensen U. (2017). "Biomass productivity and radiation utilisation of innovative cropping systems for biorefinery". *Agricultural and Forest Meteorology*, 233, 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.11.245>
- Manevski K., Laerke P.E., Olesen J.E. & Jørgensen U. (2018). "Nitrogen balances of innovative cropping systems for feedstock production to future biorefineries". *Science of the Total Environment*, 633, 372-390. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.155>
- McEniry J. & O'Kiely P. (2014). "Developments in grass-/forage-based biorefineries". In Waldron, K (Eds), *Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation* (pp. 335-363). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097385.1.335>
- Mortensen E.Ø. & Jørgensen U. (2022). "Danish agricultural biomass production and utilization in 2030". Memorandum from DCA – Danish Centre for Food and Agriculture, 24 pp. https://pure.au.dk/portal/files/257489198/Danish_agricultural_biomass_production_2030_DCA_memorandum_2022.pdf
- Møller A.H., Hammershøj M., Passos N.H.M., Tanambell H., Stødkilde L., Ambye-Jensen M., Danielsen M., Jensen S.K. & Dalsgaard T.K. (2021). "Biorefinery of Green Biomass. How to Extract and Evaluate High Quality Leaf Protein for Food?". *Journal of Agricultural and Food Science* 69(1), 14341-14357. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04289>
- Nielsen L. (2012). "Baggrundsnotat: Udbytteniveauer ved forskellig drift af lavbundsjord", 7 p. <https://static-curis.ku.dk/portal/files/221266740/BPL4.pdf>
- Nielsen A.L., Hald A.B., Larsen S.U., Lærke P.E. & Møller H.B. (2013). "Potassium as a mean to increase production and NP-capture from permanent grassland on organic soils". In: *The role of grasslands in a green future: threats and perspectives in less favoured areas. Grassland Science in Europe* 18, 569-571. https://www.europeangrassland.org/fileadmin/documents/Infos/Printed_Matter/Proceedings/EGF2013.pdf
- Nielsen C.K., Stødkilde L., Jørgensen U. & Lærke P.E. (2021a). "Effects of harvest and fertilization frequency on protein yield and extractability from flood-tolerant perennial grasses cultivated on a fen peatland". *Frontiers in Environmental Science* 9:619258. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.619258>
- Nielsen C.K., Elsgaard, L., Jørgensen U. & Lærke P.E. (2021b). "Mitigation potential of paludiculture for five different Danish peatland sites under controlled water tables – a mesocosm study. Renewable resources from wet and rewetted peatlands". *Proceedings of the RRR2021 conference*, p. 43. Greifswald.
- Näsi M. & Kiiskinen T. (1985). "Leaf protein from green pulse crops and nutritive-value of legume protein-concentrates for poultry". *Agricultural and Food Science*, 57(2), 117-123. <https://doi.org/10.23986/afsci.72192>
- Pedersen E.J.N., Witt N., Mortensen J. & Sørensen C. (1979). "Fractionation of green crops and preservation of pressed crops and juice". In: *Ensiling of pressed crops. Tidsskrift for Planteavl, Beretning nr. 1509*.
- Pehme S., Veromann E. & Hamelin L. (2017). "Environmental performance of manure co-digestion with natural and cultivated grass - A consequential life cycle assessment". *Journal of Cleaner Production*, 162, 1135-1143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.067>
- Pirie N. (1942). "Green leaves as a source of proteins and other nutrients". *Nature* 149, 251. <https://doi.org/10.1038/149251a0>
- Pirie N.W. (1978). "Leaf Protein and its by-products in human and animal nutrition (2nd edition)". Cambridge: Cambridge University Press. ISBN: 9780521330305
- Pisulewska E., Hanczakowski P., Pisulewski P. & Szymczyk B. (1991). "The changes of the yield, composition and nutritive value of leaf protein extracted from vetch and cereal mixtures during three years cultivation". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(2), 197-205. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740550205>
- Pugesgaard S., Schelde K., Larsen S.U., Lærke P.E. & Jørgensen U. (2015). "Comparing annual and perennial crops for bioenergy production - influence on nitrate leaching and energy balance". *Global Change Biology Bioenergy*, 7, 1136-1149. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12215>
- Santamaria-Fernández M., Molinuevo-Salces B., Lübeck M. & Uellendahl H. (2018). « Biogas potential of green biomass after protein extraction in an organic biorefinery concept for feed, fuel and fertilizer production". *Renewable Energy*, 129, part B, 769-775. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.012>
- Savonen O., Franco M., Stefanski T., Mäntysaari P., Kuoppala K. & Rinne M. (2020). "Grass silage pulp as a dietary component for high-yielding dairy cows". *Animal*, 14(7), 1472-1480. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002970>
- Sousa D., Larsson M. & Nadeau E. (2022). "Milk production of dairy cows fed grass-clover silage pulp". *Agriculture*, 12:33. <https://doi.org/10.3390/agriculture12010033>
- Solati Z., Jørgensen U., Eriksen J. & Søggaard K. (2017). "Dry matter yield, chemical composition and estimated extractable protein of legume and grass species during the spring growth". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3958-3966. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8258>
- Solati Z., Manevski K., Jørgensen U., Labouriau R., Shahbazi S. & Lærke P.E. (2018). « Crude protein yield and theoretical extractable true protein of potential biorefinery feedstocks". *Industrial Crops and Products*, 115, 214-226. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.010>
- Stødkilde L., Damborg V., Jørgensen H., Lærke H. & Jensen S. (2019). "Digestibility of fractionated green biomass as protein source for monogastric animals". *Animal*, 13(9), 1817-1825. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000156>
- Stødkilde L., Ambye-Jensen M. & Jensen S.K. (2020). "Biorefined grass-clover protein composition and effect on organic broiler performance and meat fatty acid profile". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(6), 1757-1767. <https://doi.org/10.1111/jpn.13406>
- Stødkilde L., Ambye-Jensen M. & Jensen S.K. (2021). "Biorefined organic grass-clover protein concentrate for growing pigs: effect on growth performance and meat fatty acid profile". *Animal Feed Science and Technology*, 276, 114943. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114943>
- Stødkilde-Jørgensen L., Lærke H.N., Ambye-Jensen M. & Jensen S.K. (2022). "Protein concentrates from lucerne; effect of processing on ileal digestibility". *Animal - Science proceedings*, 13(2), 145.
- Stødkilde L., Mogensen L., Bache J.K., Ambye-Jensen M., Vinther J. & Jensen S.K. (2022). "Local protein sources for growing-finishing pigs and their effects on pig performance, sensory quality and climate impact of the produced pork". *Livestock Science* (Under Revision).
- Thers H., Stødkilde L., Jensen S.K. & Eriksen J. (2021). "Linking Protein Quality in Biorefinery Output to Forage Crop Crude Protein Input via the Cornell Net Carbohydrate and Protein System". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193(3), 1-12. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03496-x>
- Thomsen M.H. & Kiel P. (2008). "Selection of lactic acid bacteria for acidification of brown juice (grass juice), with the aim of making a durable substrate for L-lysine fermentation". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(6), 976-983. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3176>
- van Grinsven H.J.M., Erismann, J.W., de Vries W. & Westhoek H. (2015). "Potential of extensification of European agriculture for a more sustainable food system, focusing on nitrogen". *Environmental Research Letters* 10, 2.
- Vils E., Jensen S.K., Bache J.K. & Vinther J. (2020). "Grønprotein, Hestebønne og Rapskager til Slagtesvin". Meddelelse nr. 1214. In: *SEGES Svineproduktion, Den rullende Afpr*