

Station de criblage à haut-débit du potentiel de saccharification et de valorisation en bioraffinerie de biomasses lignocellulosiques : application à des clones de peuplier

BELMOKHTAR Nassim^{1,2}, BOIZOT Nathalie^{1,2}, TOUZET Orlane^{1,2}

¹UMR BioForA, INRAE, ONF, 45075 Orléans, France

² Plateforme Phénobois, INRAE, 45075 Orléans, France

nassim.belmokhtar@inrae.fr

Mots clefs : bioraffinerie ; saccharification ; haut-débit ; FTIR ; cellulose ; hémicelluloses ; lignines ; peuplier.

Contexte et objectifs

Parmi les ressources d'origine forestière utilisables en bioraffinerie, le peuplier apparaît très prometteur, notamment pour la production de bioéthanol de seconde génération grâce à sa croissance rapide et son haut potentiel de biomasse (An et al 2021; Sannigrahi et al 2010). Ce procédé industriel convertit la cellulose contenue dans la paroi en glucose fermentescible en éthanol, via un procédé intégrant prétraitement physico-chimique, hydrolyse enzymatique et fermentation alcoolique (Martín et al 2022). L'exploration du potentiel de saccharification d'une large gamme de biomasses lignocellulosiques de peuplier est l'une des clés pouvant garantir la pérennité de la filière de valorisation en bioraffinerie. En effet, l'identification des candidats les moins récalcitrants issus des programmes d'amélioration variétale peut permettre de réduire considérablement les coûts de production.

Le criblage de ces biomasses devant être réalisé dans des conditions expérimentales proches du procédé de production utilisé au niveau industriel, nous avons développé un outil permettant de réaliser les étapes de prétraitement et de saccharification en microplaques 96-puits afin d'étudier le potentiel de saccharification de la biomasse en absence et en présence d'un prétraitement hydrothermique, s'inspirant du test développé par Selig et al au NREL (Belmokhtar et al 2017, Selig et al 2010). La quantité de glucose cellulosique libérée après hydrolyse enzymatique en présence de quantités saturantes d'enzymes cellulolytiques fongiques permettra de déterminer le potentiel intrinsèque de chaque variété. Par ailleurs, nous procédons à la caractérisation moléculaire des variétés en faisant appel à la spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). En effet, cette technique de spectroscopie vibrationnelle qui repose sur l'interaction de la lumière infrarouge avec les liaisons moléculaires de la matière organique constituant les biomasses de peuplier est capable de nous fournir une analyse semi-quantitative des principaux polymères pariétaux tels que la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (Lupoi et al 2014). Notre étude du potentiel de saccharification de biomasses de peuplier hybride (*Populus deltoïdes* x *trichocarpa*) a révélé un impact significatif du prétraitement sur la variabilité du potentiel de conversion de la fraction cellulosique. En effet, les quantités de glucose cellulosique libérées variaient entre 64 et 98 mg/g MS sans prétraitement et entre 182 et 375 mg/g MS après prétraitement hydrothermique. De plus, cette approche comparative nous a permis de démontrer la meilleure digestibilité enzymatique des biomasses de peupliers cultivés en Taillis à Courte Rotation (TCR) en comparaison avec une culture en Taillis à Très Courte Rotation (TTCR) et dans quelle mesure celle-ci dépendait de l'étape de prétraitement. Des corrélations du potentiel de saccharification de chaque génotype avec la structure chimique des parois ont été établies, apportant des éléments sur les déterminants de la récalcitrance de la biomasse.

Matériel et méthode :

Préparation de la biomasse lignocellulosique

Les biomasses de peuplier proviennent de deux types de récoltes : la première, en taillis à très courte rotation (TTCR), fournit des arbres âgés de 3 ans, tandis que la seconde, en taillis à courte rotation (TCR), fournit des arbres de 8 ans. Après une prédécoupe en copeaux réalisée à l'aide d'un broyeur à couteaux, les échantillons sont finement broyés à l'aide d'une station de broyage robotisée développée par la société Labman, spécifiquement pour la plateforme Phénobois. Ce broyage repose sur un système de billes dans des pots contenant environ 2 grammes de matière sèche (Gebreselassie et al 2017).

Les biomasses ainsi obtenues sont ensuite distribuées en plaques 96-puits à l'aide d'un robot distributeur, également développé par la société Labman pour la plateforme Phénobois. Une masse d'environ 5 mg est répartie avec précision soit dans des plaques de 96 puits, soit dans des tubes en verre pour leur stockage (Belmokhtar et al 2017) (Fig.1).

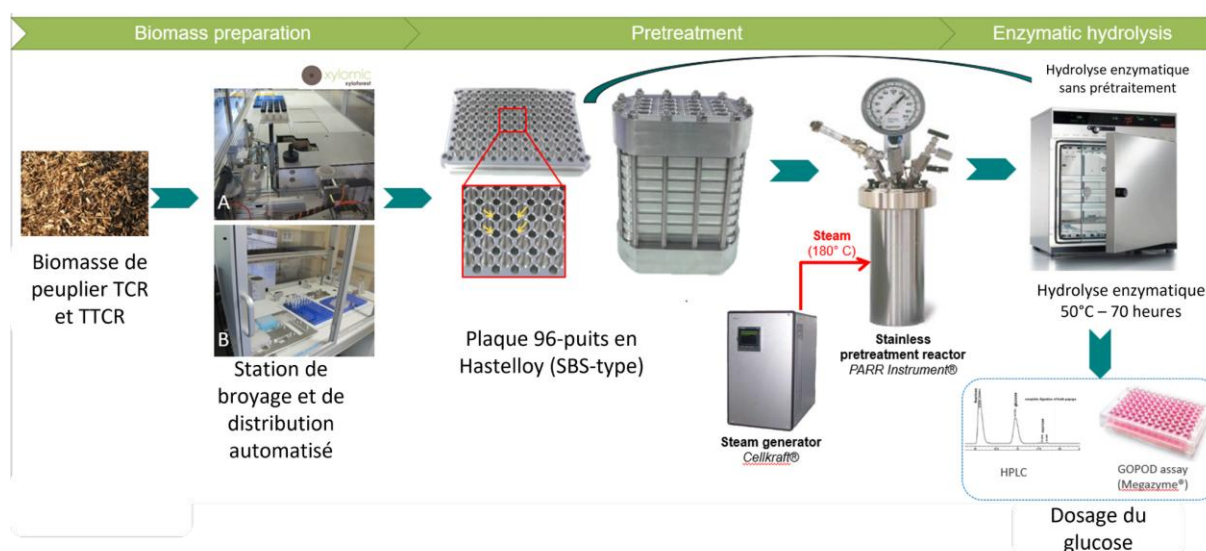


Fig. 1 : Station de criblage haut-débit de biomasses lignocellulosiques

Acquisition des spectres FTIR

Les spectres FTIR ont été acquis entre 4000 et 650 cm^{-1} par réflexion totale atténuée (ATR) à l'aide du spectromètre FTIR Frontier de Perkin Elmer. Pour ce faire, les poudres de peuplier ont été déposées sur une fenêtre en diamant-ZnSe, puis pressées pour acquérir les spectres.

Prétraitement des biomasses de peuplier

Nous utilisons des plaques 96-puits en Hastelloy, matériau hautement résistant aux fortes pressions et hautes températures. Elles sont préalablement remplies à l'aide du robot distributeur, un volume de 300 μL d'eau est ensuite ajouté dans chaque puits avant de les sceller hermétiquement. Ces plaques ont été conçues pour pouvoir être empilées au multiplieur ainsi le nombre de clones et de variétés de biomasse criblées. Ainsi, à raison d'environ 15 biomasses différentes par plaque et en empilant 6 plaques, nous sommes en mesure de cribler 90 échantillons à la fois. La pile de plaques est introduite dans un réacteur alimenté par de la vapeur permettant de prétraiter les biomasses à 180 °C et 10 bars, pendant 40 minutes dans le cas de cette étude. L'arrêt du prétraitement se fait par un refroidissement rapide du réacteur après sa dépressurisation (Fig. 1).

Hydrolyse enzymatique des biomasses de peuplier

Nous utilisons un cocktail d'enzymes cellulolytiques issues de souches fongiques *Trichoderma reesei*. Nous travaillons avec des concentrations d'enzymes dites saturantes, à raison de 70 mg d'enzymes par gramme de matière sèche (environ 10 UI) (Belmokhtar et al 2017). L'ajout d'enzyme se fait à la fois sur les plaques prétraitées et sur celles contenant de la biomasse brute (Fig. 1).

Analyse des données

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R et ses fonctions de base (version 4.4.1).

Résultats

Libération de glucose cellulosique après hydrolyse enzymatique

Les distributions de densité (Fig. 2-A et B) montrent que, sans prétraitement (A), les profils de libération du glucose des biomasses issues de TCR et TTCR se recouvrent largement. Les valeurs de glucose libéré se situent dans une plage restreinte (<100 mg/g MS), ce qui traduit une faible capacité discriminante de l'essai enzymatique direct. Une légère tendance est toutefois observée avec des valeurs plus élevées pour les TTCR.

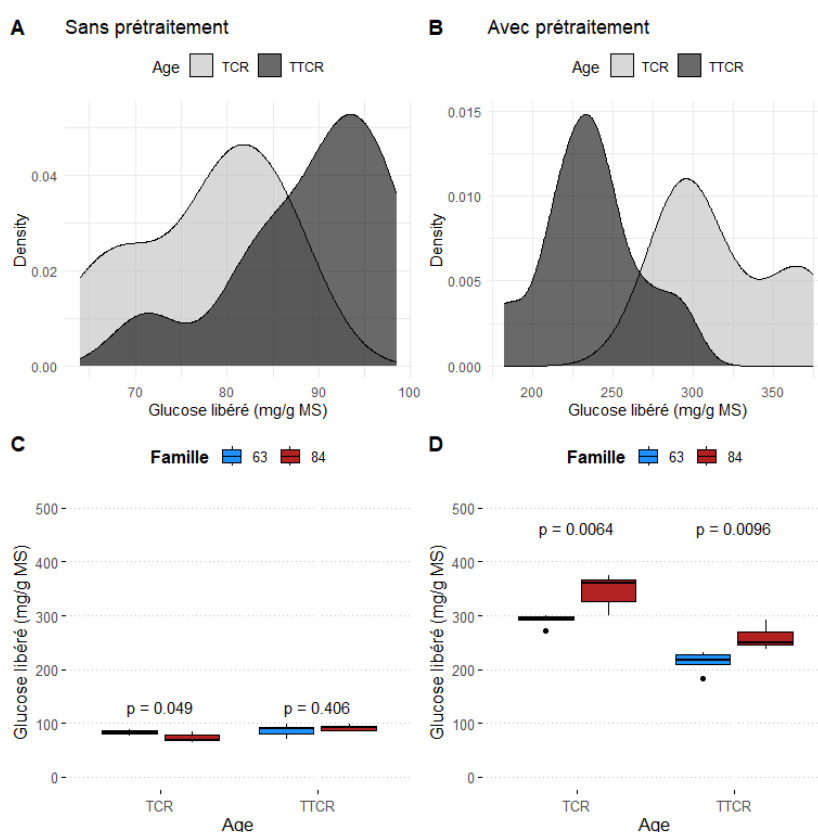


Fig. 2 : Distribution du glucose libéré avant (gauche) et après prétraitement (droite)

En revanche, après prétraitement (B), les distributions se déplacent vers des valeurs bien plus élevées, oscillant entre 182 et 375 mg/g MS, et se séparent nettement. Contrairement à la tendance observée sans prétraitement, les TCR présentent alors une libération de glucose supérieure à celle des TTCR, mettant en évidence une meilleure aptitude à la saccharification une fois la biomasse prétraitée.

Les comparaisons par familles (Fig. 2-C et D) confirment cette tendance. Sans prétraitement (Fig. 2-C), les différences entre familles sont faibles : seule une différence marginale apparaît en TCR ($p = 0.049$), tandis qu'aucune distinction significative n'est détectée en TTCR ($p = 0.406$). Avec le prétraitement hydrothermal (Fig. 2-D), les différences deviennent significatives : la famille 84 libère significativement plus de glucose que la famille 63, et ce aussi bien en TCR ($p = 0.0064$) qu'en TTCR ($p = 0.0096$).

Analyse FTIR

Nous avons concentré notre analyse sur la région de l'empreinte spectrale s'étendant de 1800 à 800 cm^{-1} . L'interaction de la lumière infrarouge avec l'échantillon est affectée par l'effet de la surface et la granulométrie des échantillons analysés, ce qui conduit à la déviation de la lumière de son trajet, se traduisant par une dérive des spectres, notamment pour les grands nombres d'onde (Fig. 3-A). Nous remédions à cela par une correction de la ligne de base spectrale, suivie d'une normalisation des intensités (Fig.3-B) (Belmokhtar 2012).

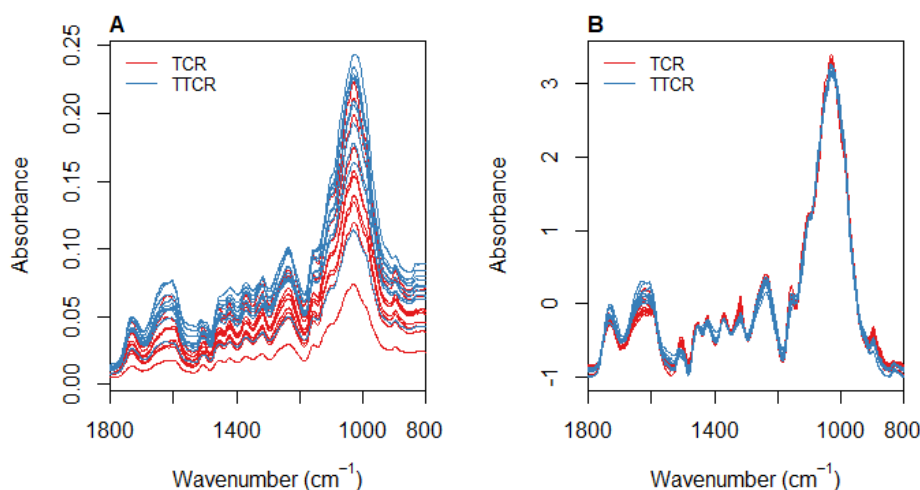


Fig. 3 : Spectres moyen infrarouge bruts (A) et normalisés (B)

Nous avons ensuite comparé les spectres moyens des TCR et des TTCR afin de mettre en évidence les différences de composition biochimique pariétale, susceptibles d'expliquer les rendements de saccharification avant et après prétraitement hydrothermique. Les absorbances des TTCR s'avèrent plus élevées à 1735 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} , correspondant respectivement aux hémicelluloses et aux lignines. Les TCR présentent une absorbance plus importante à 1510 cm^{-1} , indiquant une lignine plus condensée, riche en unités guaiacyl (Faix 1988, Rodrigues et al 1998). L'absorbance à 1315 cm^{-1} , correspondant aux unités syringyl des lignines, est légèrement plus élevée chez les TCR. Enfin, des absorbances légèrement supérieures sont observées aux bandes 1033 cm^{-1} et 898 cm^{-1} , correspondant à la cellulose (Fig. 4).

Les différences en termes de composition moléculaire, révélées par la spectroscopie dans le moyen infrarouge, peuvent expliquer les variations des rendements de saccharification observées après prétraitement. Ainsi, les absorbances à 1735 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} sont négativement corrélées avec la conversion de la cellulose en monomère de glucose après prétraitement, tandis que ces mêmes bandes montrent une corrélation positive lors de la saccharification sans prétraitement. À l'inverse, les bandes à 1510, 1460, 1420, 1370, 1315, 1330, 1100, 1050, 1033 et 898 cm^{-1} sont positivement corrélées avec les rendements de saccharification après prétraitement, inversant ainsi les tendances observées lors de la saccharification sans prétraitement de la biomasse de peuplier. Cela démontre le changement

structural important induit par le prétraitement hydrothermique et l'indispensable intégration de cette étape dans le criblage des biomasses.

Spectres FTIR de peuplier

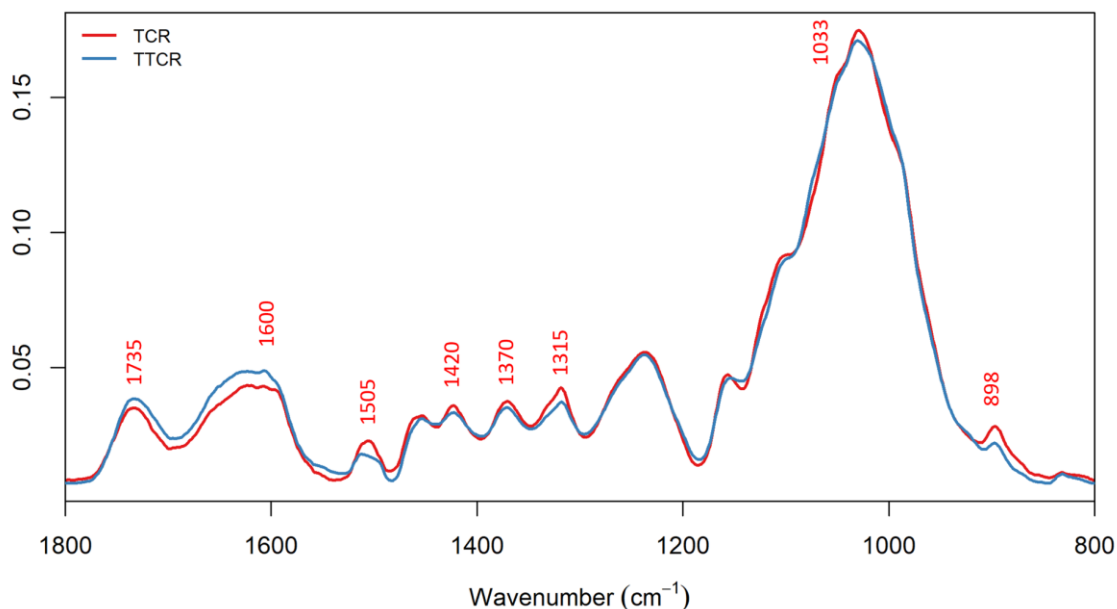


Fig. 4 : Spectres d'absorbance moyens des TCR et TTCR de peuplier.

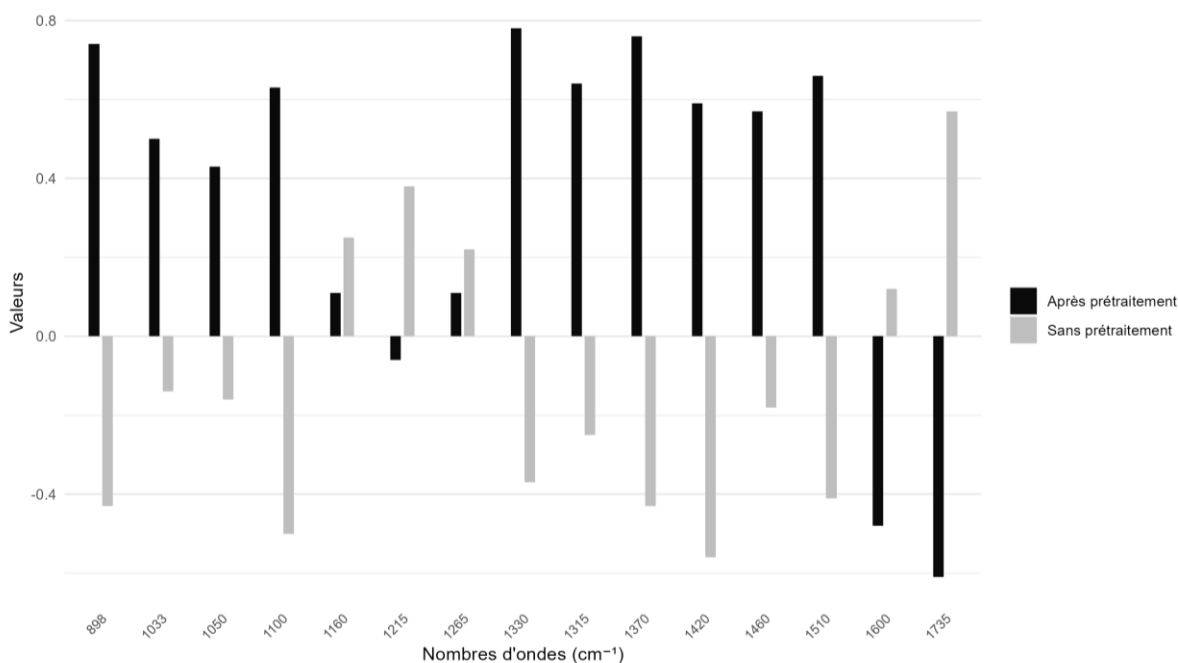


Fig. 5 : Comparaison des corrélations entre bandes spectrales pertinentes et rendement de saccharification avec et sans prétraitement.

Conclusion

La mise au point de cet outil, fiable, précis et relativement modulable, ouvre la voie à de nombreuses applications pour évaluer l'impact de la variabilité biochimique entre différentes biomasses sur leur valorisation potentielle en bioraffinerie, mais permet également de tester et de comparer plusieurs approches de transformation en variant à la fois les prétraitements et les

mélanges enzymatiques utilisés. Notre travail a également démontré la pertinence d'associer ce criblage à la spectrométrie moyen infrarouge (FTIR) pour caractériser la matière première et identifier des prédictors moléculaires d'une meilleure saccharification. La FTIR peut aussi être utilisée après transformation pour évaluer l'impact des procédés de bioraffinerie sur les co-produits de la saccharification, notamment les lignines, qui peuvent être valorisées pour la production de monomères aromatiques, intégrées dans des matériaux composites ou utilisées comme additifs dans des revêtements et des adhésifs.

Références bibliographiques

- An Y, Liu Y, Liu Y, et al (2021) Opportunities and barriers for biofuel and bioenergy production from poplar. *GCB Bioenergy* 13 (6): 905–13. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12829>.
- Belmokhtar N (2012) Etude de la saccharification enzymatique du miscanthus par des cocktails cellulolytiques de *Trichoderma reesei*. Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Belmokhtar N, Arnoult S, Chabbert B, Charpentier J-P, Brancourt-Hulmel M (2017) Saccharification performances of miscanthus at the pilot and miniaturized assay scales: genotype and year variabilities according to the biomass composition. *Frontiers in Plant Science* 8 (740). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00740>.
- Faix O (1988) Practical Uses of FTIR Spectroscopy in wood science and technology. *Microchimica Acta* 94 (1): 21–25. <https://doi.org/10.1007/BF01205830>.
- Gebreselassie MN, Ader K, Boizot N, et al (2017) Near-infrared spectroscopy enables the genetic analysis of chemical properties in a large set of wood samples from *Populus nigra* (L.) Natural Populations. *Industrial Crops and Products* 107 (November): 159–71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.013>.
- Lupoi JS, Singh S, Simmons BA, Henry RJ (2014) Assessment of lignocellulosic biomass using analytical spectroscopy: an evolution to high-throughput techniques. *BioEnergy Research* 7 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9352-1>.
- Martín C, Dixit P, Momayez F, Jönsson LF (2022) Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic feedstocks to facilitate biochemical conversion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10: 846592.
- Rodrigues J, Faix O, Pereira H (1998) Determination of lignin content of *Eucalyptus globulus* wood using FTIR Spectroscopy. *Holzforschung*, vol. 52 (1): 46–50. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1998.52.1.46>.
- Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Tuskan GA (2010) Poplar as a Feedstock for Biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4 (2): 209–26. <https://doi.org/10.1002/bbb.206>.
- Selig MJ, Melvin P. Tucker, Robert W. Sykes, et al (2010) ORIGINAL RESEARCH: Lignocellulose recalcitrance screening by integrated high-throughput hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification. *Industrial Biotechnology* 6 (2): 104–11. <https://doi.org/10.1089/ind.2010.0009>.