**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar após diversos
pré-tratamentos visando melhorar o rendimento de hidrólise enzimática**

Melissa Cristina do Espirito Santo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Bioenergia

**Piracicaba
2020**

Melissa Cristina do Espirito Santo
Bacharela em Biotecnologia

Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar após diversos pré-tratamentos visando melhorar o rendimento de hidrólise enzimática
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **IGOR POLIKARPOV**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Bioenergia

Piracicaba
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Espirito Santo, Melissa Cristina do

Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar após diversos pré-tratamentos visando melhorar o rendimento de hidrólise enzimática / Melissa Cristina do Espirito Santo. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2020.

181 p.

Tese (Doutorado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade Estadual de Campinas. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Pré-tratamento 3. Técnicas físicas I. Título

À minha família, por serem meus grandes
incentivadores e a minha fonte de amor e
companheirismo

AGRADECIMENTOS

À Jeová por ter criado todas as coisas (Apocalipse 4:11) e por meio de sua criação ter demonstrado suas qualidades a todos nós (Romanos 1:20)

Aos meus pais, João e Elaine, por me instruírem no caminho correto, por ser uma fonte de revigoramento e amor para minha família.

Às minhas irmãs, Milena e Mariane, por todo amor que sempre demonstraram e por me ensinar a compartilhar a vida

Aos meus amigos Patrícia e Felipe Corradini, Carla e Wagner Marioto por me apoiarem em todos os momentos e serem uma segunda família para mim

Ao meu orientador Igor Polikarpov pela confiança e apoio no trabalho.

Aos meus colegas do IFSC Amanda, Aline, Renata, Marina, André, Danilo, Bruno, Graziele, Vinícius, Marco, Paula e Monstro (Lorenzo) por ouvirem as minhas reclamações, angústias, dúvidas e em todas as situações buscarem me ajudar.

Aos funcionários do IFSC pelo bom trabalho que coordenam, contribuindo assim para o andamento do projeto de cada aluno

A “minha grupa” Vanessa Arnoldi por dividir diversos trabalhos comigo e pela confiança em cada um deles.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho

A CAPES pela bolsa de doutorado

Meu muito obrigada a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
Capítulo 1.	11
Organização do trabalho.....	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1. 1 Anatomia vegetal	13
1. 2 Composição química da parede celular	18
1. 2. 1 Celulose.....	19
1. 2. 2 Hemiceluloses (Polioses)	20
1. 2. 3 Lignina	22
1. 2. 4 Outras substâncias.....	24
1. 3 Cana-de-açúcar	24
1. 4 Produção de bioetanol.....	25
1. 5 Pré-tratamento.....	27
1.5.1 Fator severidade	30
1.5.2 Fator severidade combinado.....	31
1. 6 Hidrólise enzimática	32
1. 7 Análises Físicas.....	33
1. 7. 1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	33
1. 7. 2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
1. 7. 3 Microscopia de fluorescência confocal	35
1. 8 Justificativa	36
1. 9 Objetivos	36
1. 9. 1 Objetivo geral.....	36
1. 9. 2 Objetivos Específicos.....	36
REFERÊNCIAS	37
Capítulo 2.	45
Análise biofísica do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições	46
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. METODOLOGIA.....	48
2. 1 Biomassa	48

2. 2 Preparação da biomassa.....	49
2. 3 Pré-tratamento	49
2. 3. 1 Severidade dos pré-tratamentos.....	50
2. 4 Análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar	50
2. 4. 1 Extração dos carboidratos solúveis e extrativos	51
2. 4. 2 Hidrólise ácida concentrada (H ₂ SO ₄ 72%)	51
2. 4. 3 Determinação da lignina	52
2. 4. 4 Cinzas totais.....	53
2. 4. 5 Análise dos carboidratos, furfural, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos	54
2. 4. 6 Caracterização da composição química do licor resultante da etapa de pré-tratamento	55
2. 5 Enzimas	56
2. 6 Hidrólise enzimática da fração sólida	56
2. 7 Técnicas Físicas.....	57
2. 7. 1 Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido ¹³ C (ssRMN ¹³ C)	57
2. 7. 2 Análise morfológica.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3. 1 Caracterização química	59
3. 2 Hidrólise enzimática.....	60
3. 3 Ressonância Magnética Nuclear	62
3. 4 Análises morfológica.....	67
3. 4. 1 Microscopia confocal.....	67
3. 4. 2 Microscopia eletrônica de varredura	70
4. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76
Capítulo 3.....	81
Artigo 1 - Hidrólise aprimorada do bagaço de cana tratado pelo processo hidrotérmico e estudo das mudanças estruturais visando melhorar o biorrefino	82
Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification.....	83
1. INTRODUCTION	84
2. MATERIALS & METHODS	87
2.1. Pretreatment of substrates and their chemical composition analyses.....	87
2.2. Effect of spiking Cellic CTec2 with purified xylanase (Tlxyl) on saccharification of native and pretreated substrates.....	87
2.3. Scanning electron microscopy.....	88

2.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)	88
2.5. X-ray diffraction (XRD)	89
2.6. ^{13}C Solid-state nuclear magnetic resonance (^{13}C ssNMR)	89
2.7. Statistical analysis	89
3. RESULTS & DISCUSSION	91
3.1 Evaluating potential of <i>Thermomyces lanuginosus</i> (CM-11T) as a source of xylanase and auxillary enzymes.....	91
3.2. Effect of pretreatments on sugarcane bagasse chemical composition	93
3.3. Biophysical analysis of native and pretreated substrates	94
3.3.1. Field emission scanning electron microscopy (FESEM) images of substrates.....	94
3.3.2. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analyses of the substrates.....	95
3.3.3. X-Ray Diffraction of native and pretreated SCB	97
3.3.4. ssNMR analysis of native and pretreated SCB samples.	98
3.4. Morphological analysis of the SCB samples after enzymatic hydrolysis	99
3.4.1. Enzymatically hydrolysed native SCB samples	100
3.4.2 Enzymatically hydrolysed pretreated SCB samples.....	101
4. CONCLUSIONS	109
REFERENCES	110
Capítulo 4.	118
Artigo 2 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor sob diferentes condições de severidade, levando a distintos rendimentos de hidrólise enzimática	119
Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields	120
1. INTRODUCTION.....	122
2. MATERIAL AND METHODS.....	124
2.1 Sugarcane bagasse	124
2.2 Steam explosion pretreatment.....	124
2.3 Enzymatic hydrolysis.....	125
2.4 Chemical compositional analysis by HPLC	125
2.5 X-ray diffraction (XRD) experiments.....	126
2.6 Confocal Microscopy.....	126
2.7 ^{13}C solid-state Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C solid-state NMR) analysis	126
2.8 Multivariate Curve Resolution (MCR) analysis of the ^{13}C solid-state NMR data	127
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	128

3.1 Chemical composition.....	128
3.2 Principal component analysis (PCA)	134
3.3 Enzymatic hydrolysis	137
3.4 Structural changes	140
4. CONCLUSIONS.....	144
REFERENCES.....	145
Capítulo 5.....	153
Artigo 3 - Técnicas físicas lançam luz sobre as diferenças na estrutura e composição do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes condições de pré-tratamentos por explosão a vapor, sob equivalente fator de severidade combinado	154
Physical techniques shed light on the differences in structure and composition of sugarcane bagasse subjected to different steam explosion pretreatments at equivalent combined severity factors.....	155
2. MATERIAL AND METHODS	158
2.1 Material	158
2.2 Pretreatment.....	158
2.3 Chemical composition of the biomass samples.....	159
2.4 Enzymatic hydrolysis	159
2.5 ¹³ C Solid-state nuclear magnetic resonance (¹³ C ssNMR).....	159
2.6 X-Ray diffraction.....	160
2.7 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)	160
3. RESULTS AND DISCUSSION	161
4. CONCLUSION.....	171
REFERENCES.....	172
Capítulo 6.....	179
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS	180
Outras colaborações	181
Artigos publicados	181

RESUMO

Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar após diversos pré-tratamentos visando melhorar o rendimento de hidrólise enzimática

No Brasil o emprego de resíduos sucroalcooleiros, como o bagaço da cana-de-açúcar, destaca-se como uma alternativa para ampliar a produção de etanol e reduzir as dependências com combustíveis fósseis. Os principais constituintes da parede celular desta biomassa são carboidratos que podem ser clivados em açúcares fermentescíveis via hidrólise enzimática. Para facilitar esta etapa e tornar o substrato acessível às enzimas, o material lignocelulósico deve ser submetido a um pré-tratamento, o qual irá influenciar as etapas subsequentes. No entanto é preciso investigar o efeito do pré-tratamento para melhor compreensão de como o mesmo irá afetar as etapas subsequentes. A utilização de diferentes técnicas físico-químicas auxilia no estudo de como a composição e estrutura da fibra está relacionada com a sacarificação enzimática. Assim, com o objetivo de contribuir neste estudo, foram empregados diferentes pré-tratamentos em diversas condições, sendo eles ácidos, hidrotérmico e explosão a vapor com e sem catalisadores externos, a fim de se compreender a sua atuação e influência no contexto de conversão glicosídica. Foi realizado a caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência e por ressonância magnética nuclear, além da hidrólise com diferentes cargas enzimáticas, utilizando Accelerase[®] suplementado com β -glicosidase, Cellic CTec e xilanase. Também foi realizado análise morfológica da biomassa, através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. As análises físico-químicas revelaram a correlação entre o tempo de reação do pré-tratamento como proporcional ao efeito de desprendimento das fibras que constituem o bagaço, bem como a formação de aglomerados de lignina na superfície do mesmo. Também foi possível confirmar que há forte correlação entre a estrutura da lignina e a conversão enzimática, sendo que a mesma também é afetada pela presença de alto teor de derivados da hemicelulose, inibindo a ação de celulasas. Por fim, por meio deste trabalho foi verificado que o fator de severidade não é suficientemente robusto para relacioná-lo com a eficiência do pré-tratamento aplicado.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, Pré-tratamento, Técnicas físicas

ABSTRACT

Physical-chemical characterization of sugarcane bagasse after several pretreatments aiming to improve enzymatic hydrolysis yield

In Brazil, the use of sugar and alcohol residues, such as sugarcane bagasse, stands out as an alternative to expand ethanol production and reduce dependencies on fossil fuels. The main constituents of the cell wall of this biomass are carbohydrates that can be cleaved into fermentable sugars via enzymatic hydrolysis. To facilitate this step and make the substrate accessible to enzymes, the lignocellulosic material must be subjected to a pretreatment, which will influence the subsequent steps. However, it is necessary to investigate the effect of the pretreatment to better understand how it will affect the subsequent steps. The use of different physical-chemical techniques contributes to the study of how the composition and structure of the fiber is related to enzymatic saccharification. Thus, in order to contribute to this study, different pre-treatments were used in different conditions, acids, hydrothermal and steam explosion with and without external catalysts, in order to understand their performance and influence in the context of glycosidic conversion. Chemical characterization was performed by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance, in addition to hydrolysis with different enzyme charges, using Accelerase[®] supplemented with β -glycosidase, Cellic CTec and xylanase. Morphological analysis of biomass was also performed, using scanning electron microscopy and confocal microscopy. The physical-chemical analyzes revealed the correlation between the reaction time of the pretreatment as proportional to the effect of detachment of the fibers that make up the bagasse, as well as the formation of lignin clusters on its surface. It was also possible to confirm that there is a strong correlation between the structure of lignin and enzymatic conversion, and it is also affected by the presence of high content of hemicellulose derivatives, inhibiting the action of cellulases. Finally, through this work it was verified that the severity factor is not robust enough to relate it to the efficiency of the applied pretreatment.

Keywords: Sugarcane bagasse, Pre-treatment, Physical techniques

Capítulo 1.

Artista: Vincent van Gogh

Organização do trabalho

A presente tese está organizada na forma de capítulos, distribuídos do seguinte modo:

- ✚ **Capítulo 1:** contempla a revisão bibliográfica referente ao tema abordado neste trabalho, bem como os objetivos principais e a justificativa do mesmo.
- ✚ **Capítulo 2:** apresenta o estudo do pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar por meio de análises biofísicas
- ✚ Os **Capítulos de 3 a 5** estão apresentados em forma de artigo.
 - ✚ **Capítulo 3:** intitulado “**Hidrólise aprimorada do bagaço de cana tratado pelo processo hidrotérmico e estudo das mudanças estruturais visando melhorar o biorrefino**” aborda a caracterização físico-química de duas condições para o pré-tratamento hidrotérmico e a aplicação destas amostras no processo de hidrólise enzimática com enzimas acessórias
 - ✚ **Capítulo 4:** “**Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes condições de severidade pré-tratado por explosão a vapor, levando a distintos rendimentos de hidrólise enzimática**” apresenta o estudo da influência do fator de severidade sobre a estrutura, composição e hidrólise enzimática realizados por amostras pré-tratadas de bagaço de cana por meio da explosão a vapor na presença e ausência de um catalisador externo
 - ✚ **Capítulo 5:** “**Técnicas físicas lançam luz sobre as diferenças de estrutura e composição do bagaço de cana-de-açúcar submetidas a diferentes pré-tratamentos por explosão de vapor com fatores equivalentes de severidade combinados**” demonstra o estudo do bagaço de cana tratado em diferentes condições mantendo o fator de severidade equivalente entre eles a fim de se investigar a influência deste parâmetro e das variáveis isoladas, como a temperatura, na estrutura da biomassa, bem como no acesso enzimático, por meio do estudo de hidrólise aqui aplicado.
- ✚ **Capítulo 6:** Apresenta resumidamente os resultados obtidos e sugestões para a continuação desta linha de pesquisa

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Anatomia vegetal

Uma das mais significativas características da célula vegetal é a presença da parede celular. Esta representa um material biológico complexo, heterogêneo e variável em termos de estrutura e composição dependendo da fonte e características botânicas da planta. Sua estrutura fundamental é formada por microfibrilas de celulose, imersas em uma matriz contendo polissacarídeos não-celulósicos: hemiceluloses e pectinas, conforme ilustrado na Figura 1. (1)

Figura 1 – Modelo de estrutura da parede celular. Fonte: modificado de Loix, 2017 (1)

A parede celular vegetal, é formada nos primeiros estágios do desenvolvimento da célula (Figura 2). Sua formação inicia-se com o aparecimento da placa celular na telófase da divisão da célula-mãe (Fig. 2). Nesta, os microtúbulos estão dispostos periféricamente. Entretanto, antes da prófase, ocorre o aparecimento da banda pré-prófásica, formada por microtúbulos na região equatorial da célula-mãe (Fig. 2). Esta banda tem papel importante na formação da placa celular, na telófase (Figura 2). (2)

Figura 2 - Esquema da formação da parede celular durante a divisão da célula. Fonte: modificado de Tatout et al., 2014 (3)

Na região equatorial da célula-mãe, forma-se o fragmoplasto, constituído por dois grupos de microtúbulos que são orientados perpendicularmente ao plano de divisão desta célula (Fig. 2). No local onde as terminações dos microtúbulos se sobrepõem, são acumuladas as vesículas de secreção provenientes do complexo de Golgi, contendo polissacarídeos não-celulósicos, como a hemicelulose e pectinas. (2, 4)

Estas vesículas fundem-se constituindo a placa celular e se estendem até atingir a parede da célula-mãe, dividindo-a em duas partes (Fig. 2), exatamente na região onde havia se formado a banda da pré-prófase. (2, 4) A medida que a placa celular aumenta de tamanho no sentido radial, as vesículas coalescem, liberando as substâncias constituintes da placa celular. (2, 4)

A partir da união do revestimento das vesículas, que é de natureza lipoprotéica, origina-se a membrana plasmática de cada uma das futuras células-filhas. Sequencialmente, há deposição de novos polissacarídeos de parede, dando origem às paredes primárias nas duas células-filhas junto à placa celular (Fig. 2). Desse modo, cada célula-filha fica com a sua parede primária completa. O material derivado da placa celular torna-se a lamela média da nova parede, a qual, é uma fina camada que cria uma fronteira entre dois núcleos e mantém as células coesas, formando o tecido (Fig. 3). (2, 4)

Durante o crescimento das células-filhas (Fig. 2), a parede da célula-mãe é eliminada e as novas microfibrilas de celulose são orientadas pelos microtúbulos, dispostos

perpendicularmente na direção do alongamento celular. No caso de essas células formarem parede secundária, esta aparecerá posteriormente e internamente à parede primária. (2)

A síntese das microfibrilas de celulose é realizada por complexos enzimáticos celulose-sintase (Figura 1), com formato de rosetas, situados na membrana plasmática, que é responsável pela extrusão de uma fibrila de celulose (Figura 3). (2)

Figura 3 - Modelo de síntese da fibrila de celulose. Fonte: modificado de Himmel et al., 2008 (5)

Para a síntese das microfibrilas são necessárias condições específicas no citoplasma, como a quantidade de alguns íons, a presença de precursores de celulose e pH 7,2. (2) Os outros polissacarídeos não-celulósicos, como a hemicelulose, sintetizados pelo complexo de Golgi se fundem com a membrana plasmática e descarrega seu conteúdo na parede em formação (Figura 4). (2)

Figura 4 - Esquema de síntese da parede celular. Fonte: modificado de Himmel et al., 2008 (5)

A microfibrila de celulose é uma estrutura filamentosa composta de 30 a 100 moléculas de celulose, que se unem paralelamente por meio de pontes de hidrogênio. (2) Estas moléculas de celulose, em certas frações, mostram um arranjo ordenado, que é responsável por conferir propriedade cristalina (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da estrutura da microfibrila. Fonte: Modificado de Raven et al. 2001 (4)

Entre as substâncias orgânicas presente na parede, encontram-se lignina, proteínas e lipídios, enquanto que inorgânicas podemos citar a sílica e os cristais. (2)

Os precursores da lignina, monolignóis, álcoois aromáticos glicosilados, ou não, parecem ser armazenados no vacúolo e durante a lignificação saem destes, sendo excretados pela membrana plasmática, mas as reações que levam à formação destes precursores não estão bem esclarecidas. (2)

As primeiras camadas da parede celular constituem a parede primária. Entre as células individuais há a lamela média, ou mediana, depositada logo após a mitose (Figura 6). Esta lamela é altamente lignificada, apresentando substâncias pécticas principalmente no estágio inicial de formação. (4)

Figura 6 - Esquema de estrutura da parede primária. Fonte: Modificado de Raven et al. 2001 (4)

Com base em sua composição de polissacarídeos, principalmente da hemicelulose, as paredes celulares primárias são geralmente classificadas como tipo I ou tipo II. (7) A parede primária do tipo I, estão presentes em dicotiledôneas, já a parede celular do tipo II em gramíneas.

As paredes secundárias (Fig. 7), que se desenvolvem após o término de crescimento celular e são depositadas no interior das paredes primárias são mais grossas, lignificadas e podem ser divididas em camadas adicionais, subdividida em camadas S1, S2 e S3. (8 - 10) Elas são comumente presentes em plantas superiores por requererem resistência estrutural (Figura 7).

Figura 7- Esquema de estrutura da parede secundária. Fonte: Modificado de Raven et al. 2001 (4)

As paredes primária e secundária diferem em espessura, composição e propriedades físicas nas diferentes células. A parede primária é altamente hidratada, com cerca de 65 % de água, o restante corresponde à matéria seca, sendo esta composta de 90 % de polissacarídeos (30 % de celulose, 30 % de hemicelulose e 30 % de pectina) e 10 % de proteínas (expansina, extensina e outras glicoproteínas). Ainda é possível observar a presença de impregnações e, ou, depósitos de cutina, suberina e ceras na parede primária de algumas células. (2)

Durante a deposição da parede secundária inicia-se a lignificação. Devido a deposição de lignina, que é um polímero hidrofóbico, a parede secundária possui um teor de água reduzido e a matéria seca, apresenta a constituição de majoritariamente celulose (20 - 50 % baseado na massa seca), hemicelulose (15 - 35 %) e lignina (10 - 30 %), (7) sendo a proporção de cada um dos componentes variável conforme a espécie e sazonalidade da planta.

1. 2 Composição química da parede celular

A estrutura lignocelulósica pode ser definida como um material complexo devido ao arranjo de seus componentes químico e físicos, tanto em escalas macroscópicas, quanto microscópicas.

Os carboidratos que fazem parte da parede celular são complexos em termos químicos e estruturais, altamente interligados e organizados no espaço tridimensional formando biocompósitos que evoluíram para ser resistentes à hidrólise enzimática. (11)

Formada por mais de 35 tipos celulares, as quais desempenham diversas funções, a estrutura de materiais lignocelulósicos forma uma engenhosa organização arquitetônica. (12)

1. 2. 1 Celulose

A celulose é um homopolímero linear de alto peso molecular. Possui fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, é constituída exclusivamente de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4), sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero, formada por unidades D-glucose invertidas 180 ° em relação à anterior [#] (Figura 8).(13-15)

Figura 8 - Representação da estrutura da celulose e seus produtos de hidrólise celobiose e glicose. Fonte: adaptado de Franssen et al. 2013. (16)

Certas regiões dentro das microfibrilas de celulose apresentam uma elevada organização e são denominadas de região cristalina, nas quais as cadeias de glicose estão firmemente ligadas em paralelo, com um elevado número de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals, formando um arranjo cristalino, (13) insolúvel em água e de difícil degradação tanto química quanto enzimática. (7, 13 - 15) Já as áreas que apresentam regiões menos

Nota: * A nomenclatura D (Dextrogiro) nos monossacarídeos, refere-se à posição do grupo OH à direita do átomo C assimétrico mais distante do grupo aldeído. Quando acontece o oposto, isto é, o grupo OH encontra-se à esquerda do carbono, designa-se como L (Levogiro). Um carbono (C) assimétrico apresenta átomos ou grupos diferentes em cada uma de suas quatro valências. (6)

estruturadas são denominadas amorfas, sendo estas mais susceptíveis à hidrólise enzimática. O polímero celulose pode ser hidrolisado à D-glucose, e considerado como um polímero de anidroglicose, significando o prefixo anidro, que a água é perdida da unidade de glucose durante sua condensação em celulose. (6, 17 - 19) O grau de polimerização da celulose é variável e suas propriedades como porosidade, conformação molecular, cristalinidade, associação com compostos não-celulósicos, como a lignina, podem afetar o processo de hidrólise. (17 - 18) Na parede celular a celulose é interligada com a hemicelulose, que diferentemente dessa, é uma mistura de polissacarídeos heterogêneos. (19) A composição química e morfológica da hemicelulose depende do tipo da célula e da espécie da planta, variando em tipos de ligações glicosídicas, composição de cadeias laterais e grau de polimerização. (8, 20)

1. 2. 2 Hemiceluloses (Polioses)

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos com estrutura ramificada cujas cadeias encontram-se fortemente associadas às regiões cristalinas da celulose por ligações de hidrogênio, bem como por forças de Van der Waals, além de apresentarem ligações covalentes com outros compostos, como com as unidades de ácido ferúlico. (21) São formadas por diferentes monossacarídeos, sendo tanto pentoses (D-xilose e L-arabinose) quanto hexoses (D-manose, D-galactose e D-glicose), além de grupamento acetil e ácidos hexurônicos (ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico)*. Todos estes grupamentos funcionais podem se reunir em uma variedade de polissacarídeos, proporcionando uma variedade estrutural, podendo ser encontrada as ligações do tipo β -(1→4) que confere uma conformação linear ou do tipo β -(1→3), e a possibilidade de apresentar ramificações. (15, 18, 19)

As hemiceluloses são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero, não sendo designada por um composto químico definido, mas sim

Nota: # A conformação em cadeia dos resíduos de glicose na estrutura da celulose, dispõe os grupos hidroxilas em uma orientação radial, ou equatorial, e os átomos alifáticos de hidrogênio em posição axial, sendo que cada unidade de glicose possui três hidroxilas livres, ligadas aos carbonos 2, 3 e 6. Devido a disponibilidade destes grupos hidroxilas, as moléculas de celulose tendem a formar ligações de hidrogênio inter e intra-moleculares. (15)

Os seis átomos de carbono na cadeia de glicose são numerados por convenção, começando pelo carbono aldeído (C1). A forma molecular β refere-se à posição do grupo OH (ou grupo de ligação oxigênio) no carbono 1 (C1). Quando o grupo está acima do plano ou no lado oposto da cadeia do anel, da ciclização, o açúcar é chamado β , e quando abaixo do plano equatorial ou ao mesmo lado da cadeia do anel, da ciclização, α (5)

uma classe de componentes poliméricos presentes em diversos vegetais, possuindo cada componente propriedades peculiares. (6)

A estrutura hemicelulósica, diferentemente da celulose possui menor estabilidade térmica e química quando comparada à celulose, possivelmente devido ao seu menor grau de polimerização e menor cristalinidade, ocasionados pela presença de diversas ramificações que se dispõem ao longo da cadeia principal à hidrólise química, mesmo em condições mais brandas. (15, 22) De maneira simplificada as hemiceluloses podem ser classificadas em xiloglucanos, (glucuronoarabino) xilanos, galacto(gluco)mananos, e β - (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glucanos. (8, 21) Esses tipos de hemiceluloses estão presentes em paredes celulares de todas as plantas terrestres, com exceção dos β - (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glucanos, que são restritos a Poales, como as gramíneas e a alguns outros poucos grupos. (21) Os xilanos são os polissacarídeos de hemicelulose predominantes nas madeiras e nas herbáceas. (23, 24) São compostos por monômeros de xilose e podem ser divididos em outras categorias como homo- ou heteroxilanos com base na existência de grupos funcionais nas cadeias laterais. (19) Os xilanos são formados por uma cadeia linear de β -(1 $\rightarrow$ 4) D-xilopirranose, que pode então estar associada com grupamentos como acetil, L-arabinofuranosil, glucuronosil e 4-O-metilglucuronosil, sendo classificados baseado na estrutura e abundância destes grupos em glucuronoxilano, arabinoxilanos e arabinoglucuronoxilano ou glucuronoarabinoxilano. (8, 19, 21) Os glucuronoxilanos são encontrados predominantes em madeira (15 – 30 % massa seca) e possuem principalmente a presença de ácido 4-O-metilglucurônico e/ou ácido glucurônico, este último minoritariamente. O arabinoxilano é um polissacarídeo composto de xilose na cadeia principal ligada por β -(1 $\rightarrow$ 4) com substituições de arabinose com ligação α -(1 $\rightarrow$ 2) ou ligação α -(1 $\rightarrow$ 3) e são principalmente encontrados em herbáceas. (19) Uma característica dos arabinoxilanos de gramíneas é a presença de ácido ferúlico ligado aos resíduos de arabinose. Esses podem formar ligações covalentes com moléculas de lignina, o que contribui para o aumento da recalcitrância da parede celular. (19, 21) Outro fator interessante é que os arabinoxilanos com ramificações de ácido glucurônico e ácido 4-O metilglucurônico, denominados de glucuronoarabinoxilano, interagem com as microfibrilas de celulose na parede, encobrindo as mesmas e contribuindo assim para o aumento da recalcitrância da parede celular. (25, 26) Isso apresenta um benefício óbvio na defesa contra microrganismos e animais herbívoros, bem como uma dificuldade adicional na hidrólise enzimática visando transformar esta biomassa lignocelulósica em açúcares simples.

Em algumas monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, o arabinoxilano e o β -glucano são os polissacarídeos encontrados em maiores proporções (Figura 9). (27) Eles representam respectivamente uma fração de 25 – 33 % e de 10 – 15 % das paredes celulares de cana-de-açúcar. Ainda, o xiloglucano é encontrado em baixas concentrações (2 – 5 %), além de uma quantidade relativamente alta de compostos fenólicos interligando os polissacarídeos. (28)

Figura 9 - Estrutura química de hemiceluloses. Fonte: Buckeridge et al. 2008 (29)

XIL = xilose, ARA = arabinose, GLC = glicose

A hemicelulose juntamente com a celulose estão relacionadas com a produção de biocombustíveis, através da fermentação por microrganismos, principalmente dos açúcares pentoses e hexoses, C5 e C6, respectivamente, além de serem empregadas na geração de outros bioprodutos em distintas áreas de interesse. No que se refere a produção de etanol é importante salientar que a maioria da energia solar aprisionada na forma de carboidratos pela planta está na forma de açúcar insolúvel, isto é, na parede celular, compreendendo a celulose e a hemicelulose. (30) Neste sentido, o uso das mesmas para geração de etanol, propõe o desafio de transformá-las em formas químicas acessíveis a etapa de fermentação por microrganismos. Escrever a porcentagem da presença de açúcares estruturais e qto há de açúcar solúvel.

1. 2. 3 Lignina

As unidades monoméricas constituintes da lignina não são ordenadas, sendo estruturalmente amorfas, encontrando-se entrelaçadas por diferentes ligações carbono-carbono entre as cadeias alifáticas, entre as cadeias alifáticas e os anéis aromáticos e entre carbonos aromáticos, além de ligações éter envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos .(31 - 33) Os monômeros que formam a lignina são denominados álcoois cumárilicos, diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático. O álcool p-cumarílico, sem substituição é precursor das unidades p-hidroxifenílicas, o álcool coniferílico é precursor das unidades de guaiacil e apresenta substituição com grupo metoxílico na posição 3 do anel aromático. Por fim o álcool sinapílico é precursor das unidades de siringilo e apresenta grupos metoxílicos nas posições 3 e 5 do anel aromático (Figura 10). A proporção destes diferentes teores de grupos alcóolicos e metoxílicos presentes na biomassa é altamente variável principalmente conforme a espécie vegetal e tipo de tecido. (8, 9, 34)

Figura 10 - Unidades fenilpropano precursoras da lignina. Fonte: adaptado de Stark et al., 2016 (35)

Em contraste com a celulose, que é formada em todas as plantas, a formação da lignina só ocorre em plantas vasculares que desenvolvem tecidos especializados em funções tais como transporte de soluções aquosas e suporte mecânico. (6)

A lignina é intimamente ligada aos polissacarídeos da parede celular, celulose e hemicelulose, num complexo lignina-carboidrato. Esta forte interação proporciona rigidez da parede celular de plantas e as protege de ataques químicos e enzimáticos, dificultando o acesso aos polissacarídeos, tornando isto um obstáculo para o acesso enzimático aos carboidratos, no que se refere a aplicação de celulasas na biomassa para obtenção de etanol celulósico. (36 - 38) Neste processo é desejável o fracionamento da lignina frente a parede celular por intermédio de algum procedimento aplicável, como o pré-tratamento da biomassa, de forma a manter sua estrutura o mais intacta possível uma vez que a lignina

representa o maior estoque de compostos aromáticos naturais, sendo uma fonte potencial para diversos insumos e co-geração de energia. (39)

1. 2. 4 Outras substâncias

Para concluir o conteúdo da parede celular de matérias lignocelulósicos, devemos elucidar ainda, os componentes oriundos do metabolismo secundário da planta, como terpenos, compostos aromáticos (flavonoides, lignanas, taninos) e outros, responsáveis por determinadas características, como a cor, o cheiro, o sabor, resistência a certos patógenos e outras propriedades.

Além dessas substâncias, outros compostos orgânicos podem também estar presentes nos extrativos, como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos de baixa massa molar, além de compostos inorgânicos que correspondem as cinzas da matéria. (39) Estes compostos representam cerca de 4 – 10 % da massa seca do bagaço. (39)

1. 3 Cana-de-açúcar

Cuba, Índia, Brasil e África, possuem milhares de produtores de cana-de-açúcar. De fato, houve época em que a produção de açúcar era a maior e mais lucrativa indústria mundial, e sem dúvida, podemos dizer que poucas plantas influenciaram tanto o mundo quanto a cana-de-açúcar. (40)

Originária das florestas tropicais do Sudeste Asiático e da Nova Guiné, a cana-de-açúcar pode ser considerada uma gigante da família das gramíneas, que inclui membros tão diferentes quanto a grama de jardim, os cereais e os lenhosos bambus. (40)

Pertencente a família das Poaceas, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) teve destaque a partir de 327 AEC, quando escribas do exército invasor de Alexandre, o Grande, notaram na Índia que os habitantes “mascavam uma cana maravilhosa, que produzia uma espécie de mel sem a ajuda das abelhas”. Mas foi apenas no século XV que este material lignocelulósico foi expandido, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. (40)

Com ampla aplicação industrial, principalmente como fonte de açúcar, etanol e energia elétrica, a cana-de-açúcar é especificamente um material lignocelulósico de grande interesse

para o Brasil. Devido ao clima tropical do país, no período colonial, no século XVI, a cana-de-açúcar chegou ao nosso país através dos portugueses e proporcionou a maior produção de açúcar ainda no mesmo século. (40)

Ainda no século XXI, esta biomassa continua sendo alvo da economia do país, uma vez que atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. A produção brasileira na safra 2018/2019 foi de mais de 620 milhões de toneladas, em uma área plantada de aproximadamente 9 milhões de hectares, o que representa algo em torno de 12 % da área agrícola em uso no Brasil, de um total de aproximadamente 75 milhões de hectares, conforme dados da Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) e do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (41, 42)

O Brasil é também o maior exportador de açúcar do mundo e o segundo produtor, responsável por aproximadamente 20 % da produção e 40 % das exportações, sendo ainda o segundo maior produtor de etanol. Dados referentes à produção de etanol, mostram que produção da última safra 2018/2019 foi de 33,1 bilhões de litros, dos quais a região Centro-Sul foi responsável por 94 % (31 bilhões de litros). O estado de São Paulo é o que mais se destaca, sendo responsável por mais da metade da produção total de cana e de etanol do país. Além disto, cálculos publicados por Bioeletricidade da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) (43, 44) indicam que o volume de energia elétrica obtido dos resíduos do plantio da cana-de-açúcar, da palha e do bagaço de cana foi equivalente a economizar quase 11 % das águas nos reservatórios das hidrelétricas do submercado Sudeste/Centro-Oeste, o principal do País, responsável por 60 % do consumo de eletricidade. (44)

A produção de energia elétrica e etanol através da cana-de-açúcar e seus resíduos, destaca-se especialmente importante, visto a crise energética do cenário mundial. As preocupações com as mudanças climáticas globais, a busca pela redução das emissões de gases de efeito estufa, a redução de fontes energéticas finitas, modelam um quadro de busca por energias renováveis alternativas e, neste sentido a geração de energia pela biomassa sucroenergética é visto como uma opção potencial. O Brasil se destaca neste cenário por apresentar condições climáticas favoráveis para o plantio da cana-de-açúcar.

1. 4 Produção de bioetanol

Em 2015 foi aprovado o Acordo de Paris, na 21ª Conferência das Partes (COP 21), que busca por objetivo minimizar o aquecimento global. Este acordo teve o apoio de 195 países, incluindo o Brasil e foi considerado um marco nas discussões climáticas, uma vez que todos apresentaram o compromisso para a redução de emissões de gases de efeito estufa, sinalizando um forte movimento global na busca por soluções para os impactos ambientais causados pela ação antropogênica. (44)

No Brasil foi implementado, em dezembro de 2016, o Programa RenovaBio, com o objetivo de estimular a produção de biocombustíveis tais como o etanol, o biodiesel, o biogás e o bioquerosene de aviação, tendo em vista os compromissos assumidos no Acordo de Paris. (44)

O etanol obtido através da cana-de-açúcar é capaz de reduzir em até 78 % as emissões dos gases do efeito estufa, em comparação com a gasolina, enquanto o etanol de segunda geração (E2G), obtido a partir de biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana, permite reduções ainda maiores, chegando a 86 % em relação ao combustível fóssil, fato este, que torna esta fonte energética ambientalmente favorável. (44, 45)

A utilização do bagaço e da palha da cana-de-açúcar representa um potencial que pode chegar a valores próximos a 50 % no aumento da produção de biocombustível a partir da mesma quantidade de matéria-prima empregada hoje na produção convencional. Além disto, a integração entre os processos de primeira e segunda geração permitem uma sinergia que pode elevar de 30 a 40 % a produtividade total em termos de etanol, sem a necessidade de ampliação da área agrícola. (44) Na safra 2018/2019 a empresa Raízen produziu 16,5 milhões de litros de etanol 2G e espera atingir 289 L de bioetanol por tonelada de biomassa seca, palha e bagaço de cana com a capacidade total que possuem. (46) Até 2030 estima-se que a produção deste etanol chegue a 350 L por tonelada. (47)

Como uma das barreiras para a implementação desta tecnologia, temos o custo elevado frente a outros possíveis usos desta biomassa residual. Uma vez que o insumo utilizado é o bagaço e palha de cana, pode haver competição entre a produção de etanol de segunda geração e a geração de bioeletricidade. A biomassa que resulta no excedente de energia elétrica a ser comercializado pode ser direcionada para a produção de etanol celulósico. Cabe neste sentido avaliar o retorno e os benefícios no mercado. Assim, o desafio é tornar o etanol celulósico economicamente viável, uma vez que o processo de

produção do mesmo, requer duas etapas anteriores à fermentação: o pré-tratamento e a hidrólise enzimática. Assim, a escolha de uma tecnologia eficiente de pré-tratamento é imprescindível para a viabilidade econômica do etanol celulósico, uma vez que essa etapa afeta o rendimento de todos os estágios subsequentes.

1.5 Pré-tratamento

Somente o bagaço de cana-de-açúcar proporciona ao Brasil 181 milhões de toneladas anualmente, provenientes da produção de cana no país. (48) Considerando o uso apenas desta biomassa como fonte para a produção de bioetanol, é possível a conversão de até 20 % de seus açúcares disponíveis em biocombustível. No entanto, quando a etapa de pré-tratamento é acrescida a este resíduo agrícola, até 90 % dos açúcares presentes podem ser convertidos em etanol. (49)

A dificuldade relacionada com a acessibilidade enzimática dos polímeros da parede celular para conversão e uso dos mesmos é denominada recalcitrância da biomassa (8) e representa uma barreira considerável para o aproveitamento dos carboidratos derivados das frações celulósicas e hemicelulósicas que compõem a biomassa vegetal. (38, 50) O fracionamento completo e eficiente dos polímeros naturais constituintes das paredes celulares vegetais torna-se essencial para aumento da produção de bioenergia e para gerar produtos de alto valor agregado, sendo assim, pode ser considerado um pré-requisito para o desenvolvimento de uma bioeconomia competitiva. (51)

O processo de pré-tratamento da biomassa tem por finalidade fracionar estes componentes e aproveitar ao máximo os constituintes nela presentes, pois visa a desorganização do material lignocelulósico (Figura 11). Ao final desta etapa, deve ser obtido uma biomassa mais susceptível à hidrólise enzimática, que irá clivar estes polímeros de carboidratos em monômeros, através de uma mistura complexa de enzimas obtidas a partir de secreções fúngicas. (38, 50) Estes açúcares solúveis poderão ser então convertidos, via fermentação, em biocombustíveis, como o bioetanol e em outros bioprodutos. (52)

Figura 11 – Representação do efeito do pré-tratamento na estrutura da parede vegetal do bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: Adaptado de Monlau et al., 2014 (53)

As avaliações tecnológicas e ambientais têm sido cada vez mais utilizadas para comparar diferentes configurações do processo de produção de bioetanol. Conforme Dias e colaboradores, (2012) (54) a etapa que demanda maior custo de produtos químicos é a de pré-tratamento. Há inúmeros pré-tratamentos conhecidos atualmente, de caráter físico, químico ou biológico, alguns muitas vezes são combinados. Por exemplo, os pré-tratamentos físicos como moagem ou trituração têm como finalidade aumentar a área superficial e a acessibilidade da celulose à etapa de hidrólise pela diminuição do tamanho das partículas podem ser muitas vezes aplicados em combinação com outros processos de tratamento, a fim de contribuir para homogeneidade do material e facilitar a hidrólise. (55-56)

O pré-tratamento hidrotérmico, também conhecido como auto-hidrólise ou água quente, consiste na utilização de água a alta temperatura (geralmente entre 160 °C e 220 °C). Períodos de tempo de reação mais curtos, variando de 1 a 20 min e temperaturas inferiores

a 200 °C são mais utilizados de modo a minimizar as alterações na lignina e na celulose. (57) Temperaturas abaixo de 100 °C não hidrolisam a estrutura lignina-carboidrato da biomassa. (58)

Este método leva a uma despolimerização da hemicelulose, que é catalisada pelos íons hidrogênio gerados pela autoionização da água e pelo ácido acético formado na hidrólise do grupamento acetil desta hemicelulose. (59, 60)

Dependendo da severidade do processo (tempo e temperatura), o grau de polimerização da hemicelulose pode aumentar ou diminuir, podendo até mesmo este líquido ser empregado no aproveitamento de xilooligossacarídeos, usados como bioproduto em diversas áreas e com alto valor agregado. (60, 61) Deste processo hidrotérmico obtêm-se uma fase líquida, contendo principalmente hemicelulose, uma mistura de oligossacarídeos, monossacarídeos, ácido acético e derivados furano (furfural e hidroximetilfurfural), que ainda pode sofrer reações de decomposição, produzindo ácido fórmico e ácido levulínico, respectivamente, além de uma fase sólida contendo majoritariamente celulose e lignina. (62) A lignina neste processo, pode sofrer despolimerização e repolimerização, sendo possível a sua visualização, em microscópio, na forma de gotículas depositadas na biomassa. (63, 64)

O processo hidrotérmico não requer o uso de ácidos, reduzindo o custo deste processo com reatores não corrosivos, com etapas de reciclagem do solvente e remoção de precipitados. (62)

Uma abordagem comum para avaliar a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico é o emprego do chamado factor de severidade (R0), definido por Overend e Chornet. (65, 66) Uma vez que R0 depende da temperatura e do tempo, este fator pode ser usado como parâmetro do efeito combinado de ambas as variáveis num dado tratamento. (62)

O pré-tratamento de explosão a vapor e organosolv são outros dois processos considerados eficientes para separar os principais constituintes da biomassa vegetal, aumentando assim a sua suscetibilidade à bioconversão. (67 - 69)

A explosão a vapor é um dos métodos de pré-tratamento mais empregados para o fracionamento dos componentes da biomassa. (70) É utilizado o vapor saturado em um reator fechado por um determinado tempo seguido por uma súbita descompressão que

rompe as ligações que asseguram a coesão da biomassa. Quando este processo ocorre sem a adição de um catalisador exógeno, o processo é também denominado de auto-hidrólise porque assim como no hidrotérmico, o ácido acético é liberado ao meio por hidrólise dos grupos acetilas das hemiceluloses, catalisando as ligações do complexo lignina-carboidrato e solubilizando principalmente a hemicelulose. (71)

Diversos estudos vêm sendo realizados para otimizar o pré-tratamento por explosão a vapor por ajustes nos parâmetros do processo como a temperatura, o tempo de residência do material no reator, a adição de agentes químicos como catalisadores, como ácidos e bases. O aumento de cada um desses parâmetros acarreta no aumento da severidade do pré-tratamento e favorece as reações de hidrólise da celulose e das hemiceluloses, em contrapartida, pentoses e hexoses liberadas no meio reacional podem ser degradadas a inibidores enzimáticos e de fermentação, furfural e HMF, respectivamente (Figura 12). (72)

A escolha do pré-tratamento também deve ser baseada visando a aplicação principal da biomassa e dos seus componentes. Por exemplo, devido a lignina presente no material lignocelulósico ser considerada alta fonte renovável de compostos aromáticos, seu fracionamento intacto é ideal para alta pureza e valorização desta em biorrefinarias. (73) Ao focar no isolamento da lignina uma estratégia é a remoção da lignina antes da conversão de carboidratos através de um fracionamento adequado decorrente do pré-tratamento. Isto permitiria a recuperação de uma fração de lignina de maior pureza, tornando uma matéria-prima mais adequada para produtos químicos e materiais de valor agregado. Idealmente permitindo também a conversão eficientes de carboidratos. Uma escolha de pré-tatamento para este fim é o uso de solventes orgânicos, candidatos promissores a fornecer lignina de maior pureza. (38, 74)

O pré-tratamento com solvente orgânico, denominado de organossolve, pode ser considerado vantajoso no isolamento da lignina de alta qualidade, ou seja, a pureza e a integridade são mantidas. Além de eficiência do fracionamento da hemicelulose e alta pureza na separação da celulose em comparação com tratamentos convencionais e a possibilidade de recuperação dos solventes orgânicos utilizados. (73) Ele pode ser realizado usando várias solventes orgânicos, como o etanol, com ou sem adição de um catalisador (ácido, base ou sal). (75)

1.5.1 Fator severidade

Em pré-tratamentos da biomassa que se utiliza a água como meio reacional, quer seja por processos hidrotérmicos, de explosão a vapor ou o pré-tratamento ácido diluído, a temperatura e o tempo de reação aplicados na operação, são vistos como as principais variáveis que afetam a sua eficácia e consequentemente a hidrólise enzimática deste material. (76) Neste contexto, Overend e Chornet (65) desenvolveram um fator para avaliar e correlacionar diferentes tratamentos individuais, instituindo a ele a denominação de fator severidade. Neste ponto, o fator foi referido como a ordenada da reação. Agora, o fator severidade incorporando uma integração do período de tempo usado no pré-tratamento feito a uma certa temperatura, é geralmente usado para comparação de vários pré-tratamentos (Equação 1.1): (76, 77)

$$\text{Fator de severidade} = \log \left[\sum_{i=1}^n t \cdot \exp \left(\frac{T_i - T_b}{\omega} \right) \right] \quad (\text{Equação 1.1})$$

Onde:

t: tempo de reação do pré-tratamento (min)

T_i: temperatura do pré-tratamento (°C)

T_b: temperatura base, referencial (100 °C)

n: número de estágio do pré-tratamento

ω: parâmetro fixo de 14,75 na maioria dos casos, como uma constante de energia de ativação (76)

1.5.2 Fator severidade combinado

A influência do pH como um importante parâmetro que contribui diretamente na degradação da biomassa, passou também a ser considerada de grande impacto durante o processo de pré-tratamento e concomitantemente combinar os efeitos da temperatura e do tempo de reação em uma única equação, sendo estabelecido o fator de severidade combinado. (77, 78)

Abatzoglou et al. (78) modificaram a Equação 1 adicionando o efeito de um catalisador ácido. Nela é levado em consideração a adição da concentração final de prótons no pré-tratamento.

$$\text{Fator de severidade combinado} = \log \left[\sum_{i=1}^n t \cdot \exp \left(\frac{T_i - T_b}{\omega} \right) \right] - pH \quad (\text{Equação 1.2})$$

No entanto, é uma questão importante analisar se a consideração de três fatores, ou seja, temperatura, tempo de reação e pH, são suficientes para comparar e prever a severidade do pré-tratamento entre diferentes métodos aplicados. Para isto, é necessário um estudo específico comparativo, em resposta aos rendimentos de monossacarídeos obtidos após a etapa de hidrólise enzimática ser sucessivamente realizada. (76)

1. 6 Hidrólise enzimática

A complexa estrutura morfológica, química e física da parede celular torna a biomassa lignocelulósica altamente resistente e recalcitrante, dificultando a transformação de seus polissacarídeos constituintes em monossacarídeos via processo de hidrólise. Este atua por clivar a cadeia longa de carboidratos com adição de uma molécula de água e pode ser catalisado por enzimas ou por reagente químico, como um ácido. A etapa de hidrólise é necessária uma vez que os microorganismos empregados posteriormente na fermentação utilizarão os monômeros do carboidrato do complexo da biomassa como fonte de energia. (79) Desta forma é uma etapa crítica, pois a qualidade do hidrolisado afetará diretamente o processo de fermentação, que se interconecta com a qualidade dos produtos finais, como o etanol. (79)

Neste contexto a hidrólise enzimática apresenta vantagens devido a sua especificidade de atuação e diminuição da formação de inibidores decorrentes do processo, além de contribuir para a não corrosão de equipamentos na escala industrial.

Após a desorganização estrutural do material lignocelulósico, decorrentes do pré-tratamento, os carboidratos ou os substratos que serão utilizados no processo de hidrólise enzimática se tornam acessíveis para a interação com as enzimas aplicadas. Esta etapa dependerá dentre outros fatores, da distribuição dos componentes após o pré-tratamento e afetará diretamente o rendimento da produção do bioetanol. Para degradar o polímero celulolítico, são empregadas enzimas chamadas de celulasas. As enzimas são classificadas com base na sua especificidade por substratos, de acordo com as diretrizes da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB). As celulasas estão agrupadas como hidrolases de glicosídeos (codificação - EC 3.2.1.x, onde x varia com o tipo de celulose. A conversão em monômeros de glicose ocorre por diferentes enzimas celulolíticas com atividade específica: endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -

glucosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases são responsáveis por clivar a região amorfa interna da cadeia celulolítica. As exoglucanases clivam ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, liberando unidades de celobiose. Para completar o processo as β -glucosidase irão atuar nas celobioses, obtendo-se como produtos moléculas de glicose. (18, 80, 81)

Além deste modelo clássico da hidrólise enzimática em celulose, o conhecimento de enzimas acessórias e ativas contra carboidratos ainda está em expansão. Em 2010 duas publicações mudaram a visão sobre depolimerização da biomassa lignocelulósica demonstrando que alguns tipos específicos de metaloenzimas possuem a capacidade de diminuir significativamente estruturas recalcitrantes de polissacarídeos complexos (celulose) usando um mecanismo oxidativo, sendo denominadas de monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs). (82, 83) Além destas, novos horizontes na compreensão de depolimerização enzimática de parede celular de plantas está em desenvolvimento.

A eficiência do processo de hidrólise enzimática dependerá fortemente das características estruturais do material lignocelulósico, sendo assim, o estudo da conformação estrutural da biomassa é uma etapa que favorecerá a elucidação do comportamento hidrolíticos nas condições ideais das enzimas aplicadas.

1. 7 Análises Físicas

A estrutura da parede celular, tanto em aspecto composicional quanto morfológico, interfere diretamente na eficiência da hidrólise enzimática e consequentemente, na produção de etanol de segunda geração, sendo assim, imprescindível o seu estudo. Técnicas físicas podem ser aplicadas neste sentido, a fim de elucidar a arquitetura da parede celular de diferentes biomassas antes e após diversos pré-tratamentos, auxiliando na compreensão do mecanismo de ação do processo enzimático frente as condições presentes no substrato.

1. 7. 1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear consiste em uma técnica espectroscópica com ampla aplicação, como elucidação de estruturas, processos de reconhecimento molecular, além de uso de técnica quantitativas. Na área de bioenergia, podemos utilizar RMN para obter

informações e determinar a composição orgânica e inorgânica da biomassa, caracterizar produtos de pré-tratamentos empregados, além de estudar óleos e biodiesel. (79)

Esta técnica é fundamental nos estudos de interações das macromoléculas e para compreensão de suas atividades biológicas. Em geral, todas essas aplicações envolvem propriedades manifestadas exteriormente pelos núcleos moleculares que podem a princípio, ser explicadas com base na forma como eles se estruturam internamente. (79)

Em resumo, esta técnica é baseada na interação da radiação magnética com a matéria, utilizada para observar a reorientação do spin nuclear sob a aplicação de um campo magnético. (84)

Para sólidos orgânicos, é realizada medida de ressonância magnética nuclear do estado sólido (ssRMN) e umas das interações de spin nuclear que dominam o este espectro é a interações de deslocamento químico, definida pelas características da nuvem eletrônica ao redor do núcleo. Este aspecto a torna sensível a variações na constituição química e na estrutura local das moléculas. (84)

No contexto de caracterização de materiais lignocelulósicos, a técnica de ssRMN é empregada por detectar a nível molecular e atômico, as mudanças estruturais decorrentes do pré-tratamento estudado. Através da atribuição dos deslocamentos químicos, com base nos dados da literatura, é possível averiguar alterações dos componentes presentes. Estes resultados podem ser correlacionados com outras técnicas, fornecendo informações valiosas a respeito da estrutura e morfologia da parede celular, o que contribui para o entendimento de propriedades que influenciam a hidrólise enzimática na produção de etanol celulósico.

1. 7. 2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um instrumento de alta resolução muito versátil e usado para a análise estrutural de materiais sólidos. Na compreensão da morfologia de bagaço de cana-de-açúcar, esta ferramenta é uma poderosa abordagem, principalmente na arquitetura molecular da parede celular do vegetal, através da obtenção de imagens. (85)

As imagens obtidas são provenientes das interações elétron-amostra, o que requer que as amostras eletricamente isolantes sejam recobertas com películas de materiais condutores, como a grafite, o ouro ou uma liga de ouro-paládio. O elétron do feixe eletrônico ao atingir

a superfície da amostra interage com os átomos da amostra, por varrer a superfície da amostra em análise ponto a ponto. As amostras podem ser observadas sob diferentes magnificações e as imagens têm aparência tridimensional, resultado da alta profundidade de campo e dos efeitos de contraste produzidos pelos elétrons. (86, 87)

1. 7. 3 Microscopia de fluorescência confocal

A microscopia confocal baseia-se na iluminação por varredura a laser, ponto-a-ponto, de um espécime biológico tratado ou naturalmente presente com compostos fluorescentes. O princípio de geração de imagens confocais tem sido amplamente aplicado em diversas áreas, como na medicina, biologia e ciência dos alimentos.

A luz refletida pela amostra, sob a forma de fluorescência, atravessa uma abertura mecânica (*pinhole*) que bloqueia feixes provenientes de pontos acima e abaixo do plano focal, eliminando a influência da luz emitida, apenas a luz originada em um único plano focal é observada. (88)

Uma imagem de microscopia confocal irá transmitir a intensidade de cada pixel analisado. A combinação desta análise com uma medida em espectrofotômetro, que apresenta o espectro geral, origina a imagem espectral, proporcionando um espectro para cada pixel. (89)

Em resumo, nas medidas de imagem espectral, para determinada faixa, cada canal da fotomultiplicadora detectará a fluorescência em um determinado comprimento de onda. Se a faixa de detecção cobrir todo o espectro de emissão e o intervalo entre os comprimentos de onda correspondentes aos canais for suficientemente pequeno, a superposição das imagens registradas pelos diferentes canais resultará na imagem de todo o espectro de emissão da amostra, ou seja, a imagem da cor real da fluorescência. Plotando-se a intensidade do pixel em função do comprimento de onda obtém-se o perfil de intensidade de emissão de um fluoróforo localizado neste pico. (89)

No que se refere a pesquisas para melhoria da produção de etanol de segunda geração, esta técnica possibilita correlacionar as propriedades de emissão da lignina, com relação a sua distribuição e arranjo molecular, uma vez que este polímero fluorescente naturalmente como consequência de uma transferência não radioativa de energia de cromóforos excitados pela estrutura dos tipos álcool cinamil, presente na molécula. (88) O intuito é melhorar

compreensão de como este componente afeta a eficiência de hidrólise, além de proporcionar a elucidação do arranjo molecular da lignina após cada pré-tratamento

Nossos estudos anteriores com uso de microscopia confocal permitiram analisar distribuição de componentes celulares em função de pré-tratamento e esta mesma técnica foi aplicada neste trabalho com o mesmo objetivo.

1. 8 Justificativa

Com o aprofundamento dos estudos para viabilização da produção do etanol de segunda geração, entender a estrutura da parede celular, sua modificação decorrente do tratamento empregado e a atuação das enzimas frente a este substrato, deve contribuir com a compreensão da digestibilidade enzimática da biomassa. Nesse sentido, o presente trabalho aborda esta área pela caracterização físico-química da biomassa na investigação de alguns fatores que influenciam na digestibilidade da biomassa via análises biofísicas.

1. 9 Objetivos

1. 9. 1 Objetivo geral

Objetivamos obter informações estruturais e bioquímicas relevantes sobre a ação de diferentes pré-tratamentos frente ao bagaço de cana e o efeito morfológico e físico-químico da depolimerização da parede celular.

1. 9. 2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos das diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico e explosão a vapor sobre a composição química do bagaço de cana-de-açúcar
- Utilizar técnicas de ressonância magnética nuclear do estado sólido para caracterização qualitativa das diferentes amostras
- Avaliar os efeitos dos pré-tratamentos sobre o índice de cristalinidade das amostras
- Detectar alterações morfológicas na estrutura do bagaço de cana-de-açúcar decorrentes dos pré-tratamentos impostos, sendo os mesmos do item anterior, através de microscopia eletrônica de varredura e de fluorescência confocal

- ✚ Analisar e correlacionar a digestibilidade enzimática com o efeito do pré-tratamento empregado

REFERÊNCIAS

- 1 Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., & Cuypers, A. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1867.
- 2 Guerreiro, S. M., & Gloria, B. A. D. (2006). Anatomia vegetal. *COSTA, Cecilia Gonçalves et al. Xilema*, 2.
- 3 Tatout, C., Evans, D. E., Vanrobays, E., Probst, A. V., & Graumann, K. (2014). The plant LINC complex at the nuclear envelope. *Chromosome Research*, 22(2), 241-252.
- 4 Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2001). Biologia vegetal. 6ª edição. Guanabara Koogan SA.
- 5 Himmel, M. E. (2009). *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Wiley-Blackwell.
- 6 Klock, U., Muñiz, G. D., Hernandez, J. A., & Andrade, A. D. (2005). Química da madeira. *Fupef, Curitiba*.
- 7 Pauly, M., & Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 54(4), 559-568.
- 8 Chundawat, S. P., Beckham, G. T., Himmel, M. E., & Dale, B. E. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 121-145.
- 9 Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Plant Physiology Sinauer Associates. Inc., Sunderland, MA.
- 10 Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 301-307.
- 11 Gilbert, H. J. (2010). The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant physiology*, 153(2), 444-455.
- 12 Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850. DOI 10.1038/nrm1746
- 13 O'sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- 14 Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

- 15 Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26(6), 863-871.
- 16 Franssen, M. C., Steunenbergh, P., Scott, E. L., Zuilhof, H., & Sanders, J. P. (2013). Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6491-6533.
- 17 Matthews, J. F., Skopeck, C. E., Mason, P. E., Zuccato, P., Torget, R. W., Sugiyama, J., ... & Brady, J. W. (2006). Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . *Carbohydrate research*, 341(1), 138-152.
- 18 Zhang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), 797-824.
- 19 Zhou, X., Li, W., Mabon, R., & Broadbelt, L. J. (2017). A critical review on hemicellulose pyrolysis. *Energy Technology*, 5(1), 52-79.
- 20 Jeffries, T. W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In *Biochemistry of microbial degradation* (pp. 233-277). Springer, Dordrecht.
- 21 Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61.
- 22 Vargas Betancur, G. J., & Pereira Jr, N. (2010). Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: Part I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(3), 10-11.
- 23 Sella Kapu, N., & Trajano, H. L. (2014). Review of hemicellulose hydrolysis in softwoods and bamboo. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(6), 857-870.
- 24 Wang, S., Ru, B., Dai, G., Sun, W., Qiu, K., & Zhou, J. (2015). Pyrolysis mechanism study of minimally damaged hemicellulose polymers isolated from agricultural waste straw samples. *Bioresource technology*, 190, 211-218.
- 25 Mortimer, J. C., Miles, G. P., Brown, D. M., Zhang, Z., Segura, M. P., Weimar, T., ... & Dupree, P. (2010). Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17409-17414.
- 26 Busse-Wicher, M., Gomes, T. C., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N. J., ... & Dupree, P. (2014). The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79(3), 492-506.
- 27 Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.
- 28 Hsieh, Y. S., & Harris, P. J. (2009). Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. *Molecular Plant*, 2(5), 943-965.

- 29 Buckeridge, M. S., Cavalari, A. A., & Silva, G. B. (2008). Parede celular. *Fisiologia vegetal*, 165-181.
- 30 Crivellari, A. C. (2016). *Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- 31 Morais, S. A. L. D., Nascimento, E. A. D., & Melo, D. C. D. (2005). Análise da madeira do *Pinus oocarpa* parte II: caracterização estrutural da lignina de madeira moída. *Revista Árvore*, 29(3), 471-478.
- 32 Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of biotechnology*, 56(1), 1-24.
- 33 Higuchi, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls; In lignin biodégradation: Microbiology, chemistry and potential applications, v. 1. CRC Press, Inc., Kirk, T.K., Higuchi, T. et Chang, H.-M. (Eds), 1985, 237 pages
- 34 Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant physiology*, 153(3), 895-905.
- 35 Stark, N. M., Yelle, D. J., & Agarwal, U. P. (2016). Techniques for characterizing lignin. *Lignin in polymer composites*, 49-66.
- 36 Chen, F., & Dixon, R. A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature biotechnology*, 25(7), 759-761.
- 37 Fu, C., Mielenz, J. R., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C. Y., Rodriguez, M., ... & Dixon, R. A. (2011). Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3803-3808.
- 38 Ragauskas, A. J.; Beckham, G. T.; Biddy, M. J.; Chandra, R.; Chen, F.; Davis, M. F.; Davison, B. H.; Dixon, R. A.; Gilna, P.; Keller, M.; Langan, P.; Naskar, A. K.; Saddler, J. N.; Tschaplinski, T. J.; Tuskan, G. A.; Wyman, C. E., (2014). Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science*, 344(6185).
- 39 Demirbas, A. (2002). Relationships between heating value and lignin, moisture, ash and extractive contents of biomass fuels. *Energy exploration & exploitation*, 20(1), 105-111.
- 40 CANA-DE-AÇÚCAR: a gramínea gigante. Disponível em: <<http://wol.jw.org/pt/wol/d/r5/lp-t/102000570>> Acesso em: 07 out 2017.
- 41 Nova Cana. Disponível em <https://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-levantamento-final-safra-2018-19-cana-de-acucar-230419>
- 42 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Maio de 2017.
- 43 UNICA. BOLETIM: A Bioeletricidade da Cana em Números – Junho de 2017. Disponível em: <http://www.unica.com.br/documentos/documentos/> pag=1. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

- 44 CADERNOS. FGV energia. Biocombustíveis. AGOSTO 2017 | ANO 4 | Nº 8 | ISSN 2358-5277
- 45 Nguyen, Q. A., Yang, J., & Bae, H. J. (2017). Bioethanol production from individual and mixed agricultural biomass residues. *Industrial crops and products*, 95, 718-725.
- 46 Gomes JR. Raízen avança no etanol de 2ª geração. 2016. In O Estado de S. Paulo. <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,raizen-avanca-no-etanol-de-2-geracao,10000089302>. Accessed 18 out 2017.
- 47 Junqueira, T. L., Chagas, M. F., Gouveia, V. L., Rezende, M. C., Watanabe, M. D., Jesus, C. D., ... & Bonomi, A. (2017). Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 50.
- 48 Santos, V. E. N., Ely, R. N., Szklo, A. S., & Magrini, A. (2016). Chemicals, electricity and fuels from biorefineries processing Brazil' s sugarcane bagasse: production recipes and minimum selling prices. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 1443-1458.
- 49 Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and bioenergy*, 28(4), 384-410.
- 50 Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *science*, 315(5813), 804-807.
- 51 Mosbech, C., Holck, J., Meyer, A., & Agger, J. W. (2019). Enzyme kinetics of fungal glucuronoyl esterases on natural lignin-carbohydrate complexes. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(10), 4065-4075.
- 52 Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., & Ladisch, M. R. (2005). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, 96(18), 1986-1993.
- 53 Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2014). Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 32(5), 934–951.
- 54 Dias, M. O., Junqueira, T. L., Cavalett, O., Cunha, M. P., Jesus, C. D., Rossell, C. E., ... & Bonomi, A. (2012). Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource technology*, 103(1), 152-161.
- 55 da Silva, A. S. A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., & Bon, E. P. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 101(19), 7402-7409.
- 56 Ortiz, P. S., & de Oliveira Jr, S. (2014). Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. *Energy*, 76, 130-138.

- 57 Bezerra, T. L., & Ragauskas, A. J. (2016). A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(5), 634-647.
- 58 Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K., & Overend, R. P. (1992). Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science*, 47(5), 1109-1122.
- 59 Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J. M., Cabañas, A., & Ballesteros, M. (2003). Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. In *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 87-100). Humana Press, Totowa, NJ.
- 60 Ruiz, H. A., Romaní, A., Michelin, M., & Teixeira, J. A. (2013). A importância dos pré-tratamentos no conceito das biorrefinarias. *biotecnologia*, 3.
- 61 Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., ... & Yuan, Z. (2016). Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource technology*, 199, 68-75.
- 62 Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35-51.
- 63 Ko, J. K., Kim, Y., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2015). Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 112(2), 252-262.
- 64 Wang, W., Zhu, Y., Du, J., Yang, Y., & Jin, Y. (2015). Influence of lignin addition on the enzymatic digestibility of pretreated lignocellulosic biomasses. *Bioresource technology*, 181, 7-12.
- 65 Overend, R. P., & Chornet, E. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 321(1561), 523-536.
- 66 Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2014). Severity factor coefficients for subcritical liquid hot water pretreatment of hardwood chips. *Biotechnology and bioengineering*, 111(2), 254-263.
- 67 McIntosh, S., Zhang, Z., Palmer, J., Wong, H. H., Doherty, W. O., & Vancov, T. (2016). Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(4), 346-358.
- 68 Gaur, R., Semwal, S., Raj, T., Lamba, B. Y., Ramu, E., Gupta, R. P., ... & Puri, S. K. (2017). Intensification of steam explosion and structural intricacies impacting sugar recovery. *Bioresource technology*, 241, 692-700.

- 69 Zhang, X., Yuan, Q., & Cheng, G. (2017). Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: correlations between sugar conversion and recalcitrant structures. *Carbohydrate polymers*, 156, 351-356.
- 70 Chen, W. H., Tsai, C. C., Lin, C. F., Tsai, P. Y., & Hwang, W. S. (2013). Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. *Bioresource technology*, 128, 297-304.
- 71 de Albuquerque Wanderley, M. C., Martín, C., de Moraes Rocha, G. J., & Gouveia, E. R. (2013). Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 128, 448-453.
- 72 Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- 73 Zhang, K., Pei, Z., & Wang, D. (2016). Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. *Bioresource technology*, 199, 21-33.
- 74 Nitsos, C., Stoklosa, R., Karnaouri, A., Vörös, D., Lange, H., Hodge, D., ... Christakopoulos, P. (2016). Isolation and Characterization of Organosolv and Alkaline Lignins from Hardwood and Softwood Biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(10), 5181-5193.
- 75 Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., & Sidiras, D. (2017). Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy*, 100, 10-16.
- 76 Pedersen, M., & Meyer, A. S. (2010). Lignocellulose pretreatment severity-relating pH to biomatrix opening. *New biotechnology*, 27(6), 739-750.
- 77 Kim, D. S., Myint, A. A., Lee, H. W., Yoon, J., & Lee, Y. W. (2013). Evaluation of hot compressed water pretreatment and enzymatic saccharification of tulip tree sawdust using severity factors. *Bioresource technology*, 144, 460-466.
- 78 Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K., & Overend, R. P. (1992). Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science*, 47(5), 1109-1122.
- 79 Nascimento, C. (2016). *Ressonância magnética nuclear*. Editora Blucher. São Paulo. 2016
- 80 Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813), 804-807.
- 81 Medie, F. M., Davies, G. J., Drancourt, M., & Henrissat, B. (2012). Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 227-234.

- 82 Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørlie, M., & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330(6001), 219-222.
- 83 Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., Re, E., Navarro Poulsen, J. C., Brown, K., ... & Xu, F. (2010). Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 49(15), 3305-3316.
- 84 Bernadelli, O. D. Estudo espectroscópico da dinâmica molecular e empacotamento em semicondutores orgânicos. 2011, 150 p. Dissertação (Mestrado Física) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 85 Rezende, C. A., de Lima, M. A., Maziero, P., deAzevedo, E. R., Garcia, W., & Polikarpov, I. (2011). Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 54.
- 86 Thornton, P. R., Sulway, D. V., & Shaw, D. A. (1969). Scanning electron microscopy in device diagnostics and reliability physics. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 16(4), 360-371.
- 87 Lawes, G. (1987). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis.
- 88 Coletta, V. C., Rezende, C. A., da Conceição, F. R., Polikarpov, I., & Guimarães, F. E. G. (2013). Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 43.
- 89 Coletta, V.C. Estudo de pré-tratamentos da biomassa e da interação enzimática por meio de técnicas espectroscópicas e de microscopia óptica de alta resolução. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Capítulo 2.

Análise biofísica do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições

Artista: Jean François Millet

Capítulo 2.

Análise biofísica do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é um recurso importante para a produção de açúcar e etanol no Brasil, devido ao seu amplo cultivo no país. Após a moagem, um terço da cana é recuperado como um resíduo fibroso, o bagaço de cana. (1) Em todo o mundo, mais de 500 milhões de toneladas métricas de bagaço são geradas anualmente. (2)

O bagaço de cana é favorecido como matéria-prima para a produção de etanol porque é relativamente rico em carboidratos e possui baixo teor de cinzas. (3) Sua conversão em etanol é um processo que envolve basicamente algumas etapas principais que consiste em pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. (4)

Um dos maiores desafios nesse sistema para a produção de etanol de segunda geração é otimizar o pré-tratamento e o manejo das enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa lignocelulósica, visto que estas etapas terão grande influência nos custos e eficiência da conversão. (5 - 6)

Na parede celular a hemicelulose e a lignina protegem as fibras de celulose da exposição às enzimas celulase (7), necessárias para a conversão do carboidrato em glicose fermentável. O pré-tratamento pode remover essas barreiras solubilizando a hemicelulose e deslocando a fração de lignina permitindo que as enzimas da celulase acessem a celulose. Existem inúmeros métodos de pré-tratamento de relevância industrial variável.

O pré-tratamento hidrotérmico, onde as fibras são aquecidas na água, é de particular interesse, porque o único solvente é a água, que elimina os custos do catalisador e reduz o fluxo de resíduos do processo. (8)

O objetivo deste estudo foi analisar o bagaço pré-tratado em água em tempos de reação variados. Após o pré-tratamento, as frações líquida e sólida foram recuperadas e analisadas. Os sólidos lavados foram posteriormente avaliados quanto à conversão enzimática em

açúcares e sacarificação. Foram realizadas análises biofísicas dos substratos após o pré-tratamento e hidrólise enzimática e seus estudos de composição química foram realizados para fornecer entendimento fundamental das alterações ultraestruturais que ocorrem durante o processo. (9) As análises morfológicas detalhadas foram feitas por microscopia confocal de varredura e microscopia eletrônica de varredura, além de outros estudos estruturais realizados por difração de raios-X e ressonância magnética nuclear de estado sólido (ssNMR), para caracterizar o bagaço diferentemente pré-tratado e hidrolisado no presente trabalho.

Os resultados deste estudo foram aplicados no desenvolvimento de um estudo em colaboração visando o aprimoramento do processo de hidrólise enzimática com a presença de enzimas acessórias, feito juntamente com a Guru Nanak Dev University (Índia). Este trabalho foi importante porque no pré-tratamento hidrotérmico, a hemicelulose solubilizada restante permanece em uma forma oligomérica, que eventualmente se desloca nas superfícies e bloqueia fisicamente o acesso da celulase às fibras de celulose subjacentes. (10 - 11) Foi relatado em passado recente que a suplementação com xilanase aumenta a hidrólise da celulose em materiais lignocelulósicos contendo xilana. (12-13) Portanto, a suplementação das enzimas celulase com as enzimas acessórias, como preparações enriquecidas com xilanase, pode ser considerada uma abordagem adequada para aumentar o rendimento geral de açúcar fermentável. (14 - 15) Todavia a dosagem pode encarecer muito o processo, devendo ser controlado a fim de se desenvolver estratégias apropriadas para atingir altas taxas de rendimentos de açúcares com baixas quantidades de enzima. No trabalho em colaboração foi estudado a possível interação sinérgica da xilanase purificada (GH11) de *T. langunious* (CM11T) com celulasas Cellic CTec 2 durante a hidrólise do bagaço de cana nativo e pré-tratado por processo hidrotérmico. Os resultados foram organizados e submetido, sendo o artigo intitulado: **Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification.**

2. METODOLOGIA

Figura 2. 1 - Fluxograma esquemático da metodologia para caracterização do bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: Elaborado pela autora

2. 1 Biomassa

O material lignocelulósico analisado foi o bagaço de cana-de-açúcar, cedido pela empresa Cosan Group-Raizen (Usina da Serra/ Ibaté-SP), recolhido sem queima prévia do último terno de facas.

As amostras foram lavadas em água à 50 °C e secas em estufa de circulação de ar a 40 °C até teor de umidade satisfatório, inferior a 10 %.

2. 2 Preparação da biomassa

Inicialmente a biomassa foi moída em um moinho de facas, a fim de se obter um material mais homogêneo e com maior superfície de contato para o pré-tratamento. Foi realizado uma pré-seleção através da granulometria, por peneira de 20 *mesh*. Após alguns experimentos serem avaliados, foi averiguado maior perda da biomassa no processo de lavagem para menor granulometria, ou seja, nas amostras previamente moídas, então esta etapa de moagem passou a ser realizada após o pré-tratamento ser aplicado e a fração sólida lavada, antecedendo a etapa de hidrólise enzimática.

Para obtenção quantitativa da fração de sólidos secos totais, fez-se uso de uma balança analítica de infravermelho (Shimadzu - Moisture balance MOC 120H, Quioto, Japão). Esta medida ocorreu a 105 °C por 30 min e esta etapa se repetiu sucessivamente antes da aplicação de cada pré-tratamento.

2. 3 Pré-tratamento

Foram empregues diferentes condições de pré-tratamentos para o bagaço de cana-de-açúcar, todas na configuração de pré-tratamento hidrotérmico, ambos realizados em reatores de aço inox com capacidade para 150 mL fabricados pela oficina do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). Previamente foram feitos diversos testes nestes reatores a fim de se estabelecer as condições de pré-tratamento a serem estudados.

A condição estabelecida para o pré-tratamento hidrotérmico constituiu de 10,0 g de bagaço, massa seca, numa relação sólido/líquido de 1:10. Este experimento teve a concentração de 10 % no tempo reacional como variável, ocorrendo para três diferentes intervalos: 150 s; 300 s e 600 s, a 200 °C. Ao final de cada tempo de reação, os reatores foram inseridos em banho de gelo, para queda brusca de temperatura e ruptura da parede celular.

Cada amostra tratada teve sua fração sólida separada, por filtração com o auxílio de uma bomba a vácuo. O licor resultante da reação foi armazenado para análise posterior de xilooligossacarídeos e o material sólido foi dividido em duas partes, sendo que uma delas

passou por várias lavagens em água, até a obtenção do pH neutro. A outra foi armazenada sem lavagem, ou seja, na presença do licor extraído do pré-tratamento. Sequencialmente, estes foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C e armazenados em temperatura ambiente.

2. 3. 1 Severidade dos pré-tratamentos

O índice de severidade introduzido por Overend e Chornet (1987), deve indicar a relação de parâmetros operacionais de um pré-tratamento, especificamente as variáveis temperatura e tempo, a fim de prever a sua eficiência. (16) Valores entre 0 – 3 são considerados tratamentos brandos e entre 4 – 6 severos. (17)

$$\log R_0 = \log \left[\sum_{i=1}^n t_i \cdot \exp \left(\frac{T_i - T_b}{\omega} \right) \right] \quad (\text{Equação 2.1})$$

Sendo:

$\log R_0$: índice severidade

t : duração do pré-tratamento (min)

T_i : temperatura do pré-tratamento (°C)

T_b : temperatura base, referencial (100 °C)

n : número de estágio do pré-tratamento

ω : parâmetro fixo

Conforme estudos anteriores, dentre as possíveis variáveis, no pré-tratamento hidrotérmico a temperatura é de maior influência para a severidade e determinar a eficiência do processo. (18) Com isto, o parâmetro comumente empregado para ω com o valor 14,75 poderia ser alterado, segundo este trabalho empírico, tendo melhor resposta em 12,1. Deste modo, neste trabalho foi empregado este valor como parâmetro fixo.

2. 4 Análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química de cada amostra, material *in natura* e pré-tratado lavado, foi realizada baseado na metodologia descrita por Rocha e colaboradores (19) desenvolvida especificamente para o bagaço de cana-de-açúcar baseada nos protocolos empregados pelo

Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL do inglês *National Renewable Energy Laboratory*).

2. 4. 1 Extração dos carboidratos solúveis e extrativos

Para a amostra *in natura*, primeiramente houve a remoção de extrativos, uma etapa fundamental que evita a interferência de metabólitos secundários nas análises subsequentes de caracterização. Para este procedimento, foram confeccionados saquinhos de extração, feitos com papel filtro semi-quantitativo. Os mesmos, contendo a biomassa, foram inseridos no extrator *Soxhlet*. A solução de cicloexano-etanol na proporção 1:1, foi aplicado como solvente por 8 h de extração após o primeiro ciclo. Em seguida, este solvente foi substituído por água e aplicados mais 5 ciclos com duração de 8 h cada, até a obtenção da ausência de coloração.

Decorrida esta etapa, o cadinho com a amostra foi colocado na estufa a 100 °C e sua secagem acompanhada a cada 1 hora até obtenção de massa constante. Segundo HOUGHTON e colaboradores, (20) não há interferência na composição química nesta temperatura de secagem. O percentual de extrativos foi determinado pela equação:

$$\%E = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

E: extrativos do bagaço de cana-de-açúcar

M_i: massa seca inicial do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

M_f: massa seca final do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* decorrido a etapa de extração

2. 4. 2 Hidrólise ácida concentrada (H₂SO₄ 72%)

O material lignocelulósico antes e após cada pré-tratamento teve o teor de umidade determinado em balança analítica de infravermelho (Shimadzu - Moisture balance MOC 120H, Quioto, Japão) para a coleta mássica seca de 2,0 g.

Em banho termostatizado a 45 °C (GE-Multi Temp III), em cada amostra, presente em um béquer de 100 mL, foram inseridos 15 mL de ácido sulfúrico 72 % ambientalizado. A reação de hidrólise ocorreu por 7 min sob agitação vigorosa através do uso de um bastão de vidro. Decorrido este tempo, a mesma foi interrompida pela adição de 50 mL de água

destilada a temperatura ambiente. Toda a amostra digerida foi transferida para um *erlenmeyer* de 500 mL e neste foi adicionado mais 225 mL de água destilada.

O *erlenmeyer* foi tampado com papel alumínio e autoclavado a 121 °C por 30 min para hidrólise completa dos oligômeros remanescentes. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram resfriados sob temperatura ambiente. O hidrolisado contendo o resíduo sólido, lignina insolúvel e cinzas, foi filtrado em papel filtro quantitativos para sólidos gelatinosos faixa preta, que possuem a quantidade de cinza pré-determinada (0,00021 g). A fração líquida foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, sendo este volume completado com água. Por fim esta solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel.

O papel de filtro com o resíduo sólido foi lavado com aproximadamente 1,5 - 2,0 L de água destilada até pH neutro, para total remoção do ácido residual, evitando a queima do papel na etapa subsequente. O material retido no papel, juntamente com este, foi transferido para um pesa-filtro e colocados em estufa a 105 °C para secagem até massa constante, sendo posteriormente usado para determinação de lignina insolúvel.

2. 4. 3 Determinação da lignina

2. 4. 3. 1 Fração insolúvel em ácido

A fração sólida residual retida no papel de filtro e seca, foi transferida para cadinhos de porcelana, previamente tarados, e calcinados em mufla a 200 °C por 1 h, seguido de 400 °C por 1 h e finalizado a 800 °C por 2 h. Após o resfriamento, o cadinho foi colocado em um dessecador até a temperatura ambiente, sendo posteriormente medido a massa restante correspondente às cinzas da lignina. O percentual de lignina insolúvel foi determinado pela diferença entre o resíduo sólido e essa massa de cinzas, conforme a equação 2.3.

$$Li = \frac{(Mr - Mp) - (Mcf - Mci)}{Mi} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.3})$$

Onde:

Li: percentual de lignina insolúvel

Mr: massa residual (g)

Mp: massa do papel filtro (g)

Mcf: massa do cadinho final (com cinzas) (g)

Mci: massa cadinho inicial (tarado) (g)

Mi: massa do bagaço seca inicial (g)

2. 4. 3. 2 Fração solúvel em ácido

A quantificação do teor de lignina solúvel foi determinada por análise de absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível (Perkin Elmer - Lambda 25). Uma alíquota de 5 mL de amostra do hidrolisado obtido após a hidrólise ácida foi transferida para em um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 M.

A análise ocorre em condições alcalinas, uma vez que aumenta a intensidade dos espectros de absorção devido ao fato das moléculas se encontrarem desagregadas, prevalecendo em sua forma monomérica. Com isto, o caminho livre da luz é menor e passa a ser absorvida pelas moléculas de lignina. (21) Esta medida, neste comprimento de onda, considera a interferência da absorção devido a possível presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural provenientes do processo de pré-tratamento, pois estes compostos têm uma máxima absorvância de luz em 280 nm.

$$Clig = 4,187.10^{-2} \cdot (A_{280} - A_{pd}) - 3,279.10^{-4} \quad (\text{Equação 2.4})$$

$$A_{pd} = (C_f \cdot \epsilon_f) + (C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF}) \quad (\text{Equação 2.5})$$

Onde:

Clig: Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g.L⁻¹);

Absortividade da lignina: 4,187.10⁻²

coeficiente linear da absortividade da lignina: 3,279.10⁻⁴

A₂₈₀: Absorvância do hidrolisado em 280 nm;

ε_{HMF}: Absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g⁻¹ cm⁻¹),

ε_{Furfural}: Absortividade do furfural (146,85 L.g⁻¹ cm⁻¹),

C_{HMF}: Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g.L⁻¹), determinado previamente;

C_f: Concentração de furfural no hidrolisado (g.L⁻¹), determinado previamente;

2. 4. 3. 3 Lignina total:

$$Lignina = lignina insolúvel + lignina solúvel \quad (\text{Equação 2.6})$$

2. 4. 4 Cinzas totais

Cada material com o teor de massa seca determinado foi colocado em um cadinho calcinado de porcelana a temperatura de 200 °C por 1 h, seguido de 400 °C por 1 h e

finalizado com 2 horas a 800 °C em uma mufla com rampa de aquecimento. Em seguida, foram transferidos ao dessecador até a temperatura ambiente e a massa de cinzas foi determinada pela equação abaixo:

$$C_z = \frac{M_{cf} - M_{ci}}{M_a} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.7})$$

Sendo

Cz: Percentual de cinzas totais

Mcf: Massa do cadinho final (com cinzas) (g)

Mci: massa cadinho inicial (g)

Ma: Massa da amostra seca (g)

2. 4. 5 Análise dos carboidratos, furfural, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos

A fração líquida hidrolisada obtida pela metodologia de caracterização do material lignocelulósico (item 2. 4) e da hidrólise enzimática (item 2. 6), ou seja, os açúcares, ácidos orgânicos e inibidores foram analisados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC do inglês *high performance liquid chromatography*). Todas as amostras foram filtradas em membrana milipore 0,45 µm.

Foi utilizado o cromatógrafo LC-20AT (Shimadzu-Japão) com uma coluna de separação por troca iônica e por exclusão de tamanho Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm Bio-Rad Laboratories Ltd). A fase móvel aplicada foi H₂SO₄ 5 mM com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹ a 65 °C por 50 min. A determinação dos açúcares e ácidos orgânicos foram realizadas utilizando um detector de índice de refração. As concentrações de HMF e furfural ocorreram por um detector de UV-visível acoplado ao aparelho (Shimadzu – SPD 10) em 276 nm. As quantificações de cada componente foram realizadas via conversão das áreas do cromatograma em concentrações por meio de curva de calibração envolvendo soluções padrões de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, HMF e furfural.

Para o balanço de massas, foi considerado o fator de correção (Fc) no cálculo da celulose e hemicelulose (Tabela 2.1) decorrente da inserção de uma molécula de água durante o processo de hidrólise ácida, baseado na estequiometria das reações. (22)

Tabela 2. 1 - Componentes precursores da celulose e hemicelulose com seus respectivos fatores de correção

Componente	Fator de Correção	Polímero
Celobiose	0.95	Celulose
Glicose	0.90	Celulose
Ácido fórmico	3.09	Celulose
Hidroximetilfurfural	1,37	Celulose
Xilose	0.88	Hemicelulose
Arabinose	0.88	Hemicelulose
Ácido acético	0.72	Hemicelulose
Furfural	1,29	Hemicelulose

$$\text{Teor de anidro componente (\%)} = \frac{C_{\text{HPLC}} \cdot V \cdot Fc}{m} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.8})$$

Sendo:

C_{HPLC} : Concentração obtida no HPLC

V: volume do balão em que o hidrolisado foi diluído

Fc: fator de correção aplicados na conversão de açúcares monoméricos em anidromônmeros

m: massa seca aplicada no processo de hidrólise ácida

2. 4. 6 Caracterização da composição química do licor resultante da etapa de pré-tratamento

2. 4. 6. 1 Liofilização e separação das amostras

Frações dos licores resultantes de cada pré-tratamento realizado foram liofilizados e armazenados para o emprego de técnicas físicas, como RMN e microscopia confocal.

2. 4. 6. 2 Hidrólise ácida (H₂SO₄ 4 %)

Para determinar o total de oligômeros presentes na fração líquida obtida em cada etapa de pré-tratamento, seguiu-se o protocolo descrito pelo NREL. (23) As soluções em 4 % de ácido sulfúrico foram autoclavadas por 1 h a 121 °C.

Decorrido a hidrólise ácida, as amostras foram filtradas em membrana milipore 0,45 µm, visando a remoção de partículas sólidas presentes e posteriormente caracterizadas por HPLC, conforme a descrição do item 2.4.5.

2.5 Enzimas

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com o coquetel enzimático Accellerase (Genecor) e β – glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich).

2.6 Hidrólise enzimática da fração sólida

A etapa de pré-tratamento tem como intuito facilitar o acesso enzimático aos carboidratos da matriz lignocelulósia para posterior bioconversão. Uma forma de se avaliar a eficiência do pré-tratamento é pelo rendimento glicosídico, sendo assim, a hidrólise enzimática faz-se necessária. Nesta etapa buscou-se adequar a metodologia nas condições ótimas de ação das enzimas, conforme estudos anteriores. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados seguindo protocolos já estabelecidos, desconsiderando sinergismo.

Para a determinação da atividade da Accellerase[®], foi empregado a metodologia de Mandels e colaboradores (1976), (24) sendo a glicose determinada pelo método do DNS, (25) enquanto que a determinação da atividade de β – glicosidase foi através do protocolo de Mongkolthanaruk e Dharmstithi (2002). (26)

As condições para a reação de hidrólise na concentração de 3.5 % (m.v⁻¹) foram estabelecidas em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,0) sob agitação orbital em *shaker* de 150 rpm a 50 °C por 96 h. Este processo foi analisado em duas condições diferentes para cada amostra, na presença do licor obtido após o pré-tratamento e na sua ausência, após a remoção do mesmo, por lavagem do material pré-tratado em água. Para o estudo da hidrólise enzimática foi empregado crescentes concentrações enzimáticas, sendo 7, 15 e 25 mg de enzima (Accelerase[®]). g⁻¹ de biomassa, suplementado com β – glicosidase contendo o dobro de carga enzimática.

Foram coletadas alíquotas em diferentes intervalos de tempo, após 12, 24, 48, 72 e 96 horas. O hidrolisado foi fervido por 5 min para a interrupção da reação de hidrólise. Este conteúdo foi centrifugado e filtrado em membrana millipore 0,45 μ m para posterior análise em HPLC, conforme a descrição do item 2.4.5. Estes passos foram os mesmos tanto para o

material sólido pré-tratado e lavado, quanto para o material não lavado após o pré-tratamento. A eficiência da conversão enzimática da celulose foi determinada pela equação previamente descrita na literatura. (27)

$$EH = \frac{G}{Cbg \times Ccel \times 1,1} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

EH: eficiência de hidrólise da celulose

G: conteúdo de glicose liberado na hidrólise (g.L⁻¹)

Ccel: % de celulose presente na amostra

Cbg: concentração inicial de biomassa (g.L⁻¹)

1,1: fator de correção baseado na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise

2. 7 Técnicas Físicas

2. 7. 1 Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido ¹³C (ssRMN ¹³C)

Este procedimento foi realizado em colaboração com a doutoranda Isabele Fontana, sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Azevêdo. Foram obtidos espectros de carbono 13 (¹³C) ssNMR, para as biomassas com e sem pré-tratamento, antes e após a lavagem.

Os experimentos de RMN foram realizados utilizando um espectrômetro Bruker Avance 400, equipado com uma sonda de ressonância duplo MAS de Bruker de 4 mm, às frequências de ¹³C e ¹H foram de 100,5 e 400,0 MHz, respectivamente. A frequência de fiação a 14 kHz foi controlada por um sistema pneumático que garante uma estabilidade de rotação superior a ~ 1 Hz. Os comprimentos de pulso $\pi / 2$ típicos de 4 e 3,5 μ s foram aplicados para ¹³C e ¹H, respectivamente. Foi utilizada força de campo de desacoplamento de prótons de $\gamma B_1 / 2\pi = 100$ kHz. Os espectros quantitativos ¹³C foram medidos usando o método de excitação Multi-CP descrito por Johnson e Schmidt-Rohr. (28) Um total de nove blocos de polarização cruzada foram implementados com 1 ms e incremento de amplitude de RF (90 - 100 %), enquanto a polarização cruzada antes da aquisição foi executada com 0,8 ms e o mesmo incremento de amplitude. O atraso de reciclagem foi de 2 s e a duração do período de repolarização t_z foi de 0,9 s. (29) A mudança química foi atribuída com base em estudos publicados. (30 - 38)

2. 7. 2 Análise morfológica

2. 7. 2. 1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras secas pré-tratadas antes e após serem lavadas, bem como o bagaço *in natura*, foram recobertas com ouro em um metalizador Balzers SCD 050 utilizando uma corrente de 40 mA durante 60 s. (9)

As imagens de microscopia eletrônica foram obtidas e analisadas utilizando um microscópio equipado com um canhão de emissão de campo (FEI Quanta 650 FEG, USA), disponível no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM – Campinas-SP), especificamente no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) em colaboração com a Prof^a. Dra Camila A. Rezende.

Diferentes áreas das amostras, com análise de magnificação variável foram capturadas, a fim de se buscar representatividade do espaço amostral.

2. 7. 2. 2 Microscopia Confocal

A técnica de microscopia confocal foi aplicada nos licores obtidos após cada pré-tratamento, bem como nas amostras tratadas antes e após lavagem em água e no bagaço *in natura*.

Esta análise nos permite obter informações químicas do arranjo molecular da lignina através da técnica de contraste por meio da verredura de uma análise local ponto a ponto.

As outras amostras foram suspensas em água sob uma lamínula, para a obtenção de suas imagens em um microscópio confocal Zeiss LSM 780. O total de pixels (pontos) por imagem foi de 1024 x 1024. A área de cada pixel está associada a resolução ótica da objetiva (20x). Procurou-se fazer o ajuste focal de maneira a se obter informação da superfície das fibras, pois este critério pode ser igualmente aplicado a todas as outras amostras estudadas (9, 39).

A excitação por dois fótons da lignina foi feita com um laser pulsado (100 fs, com repetição de 80 MHz) em 800 nm e potência média de 15 mW. Estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Franscisco Guimarães (IFSC-USP), no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização química

As amostras submetidas as diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico na proporção de sólidos de 10 % para os tempos de 150 s, 300 s e 600 s também sofreram hidrólise com ácido concentrado (H_2SO_4 72 %) e foram quantificadas via cromatografia líquida (HPLC) para quantificação de sua composição química (Tabela 2. 2).

Através dos dados dispostos na Tabela 2. 2 foi possível realizar uma comparação direta sobre a composição química dos substratos pré-tratados com a amostra referência, sem tratamento (*in natura*).

Para a determinação de cada componente e medidas em base seca, o teor de umidade foi averiguado em balança de umidade e os valores variaram entre 7 – 10 %.

Tabela 2. 2 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento

Amostra	Composição química (%)					Severidade
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Total	
<i>In natura</i>	36,7 ± 2,2	24,5 ± 0,7	24,5 ± 0,5	5,2 ± 0,2	98,7* ± 4,4	
150 s	45,8 ± 0,2	21,8 ± 2,5	28,9 ± 3,1	3,0 ± 0,4	99,5 ± 6,2	3,43
300 s	49,9 ± 0,4	16,3 ± 0,1	30,4 ± 0,4	3,2 ± 0,7	99,8 ± 1,6	3,79
600 s – 1:10	63,7 ± 5,3	6,5 ± 0,5	28,9 ± 0,8	1,4 ± 1,0	100,5 ± 7,6	4,24

O conteúdo está expresso com base na massa seca (± desvio padrão). * Extrativos 7,8 ± 0,8

Conforme a Tabela 2. 2 os valores da amostra *in natura* estão coerentes com a literatura. (40) Vale ainda ressaltar, que o nível de degradação hidrolítica não é homogêneo para todos os componentes e pré-tratamentos, evidentemente em decorrência a uma série de fatores como: concentração do agente químico de degradação, temperatura, tempo, pressão. De acordo com os dados apresentados, houve solubilização crescente da hemicelulose proporcional ao tempo de reação e uma vez que este carboidrato não possui regiões cristalinas, são mais susceptíveis a degradação sendo afetados pelos mesmos fatores citados. (41 - 43)

A severidade do pré-tratamento para um mesmo reagente está relacionada ao efeito combinado de temperatura da reação e tempo de permanência em uma matéria-prima

lignocelulósica durante uma reação termoquímica. (44) Para as amostras submetidas as mesmas condições de concentração com a variável apenas do tempo, foi possível observar que a solubilização da hemicelulose foi proporcional a severidade.

Quanto ao teor de lignina, a Tabela 2. 2 indica que a solubilização deste componente é bastante resistente à hidrólise com ácido diluído. Uma condição específica para a hidrólise da lignina seria a presença de outros agentes químicos, tais como soluções alcalinas. (45)

3. 2 Hidrólise enzimática

Para a comparação da acessibilidade dos substratos pré-tratados frente à enzima empregada na etapa de hidrólise enzimática, os valores de conversão da celulose em monômeros de glicose proporcionam a resposta da eficácia do pré-tratamento empregado.

A análise comparativa dos preparados enzimáticos em relação à liberação de equivalentes de glicose foi feita tendo como referência o bagaço *in natura*. O rendimento da hidrólise realizado na concentração de 25 mg de enzima (Accelerase®).g⁻¹ de bagaço está ilustrado na Tabela 2. 3, e foi calculado com base na porcentagem de celulose presente em cada amostra apresentados na Tabela 2. 2.

Tabela 2. 3 – Conversão enzimática da celulose

Pré-tratamentos	Conversão na hidrólise enzimática (%)		
	48 h	72 h	96 h
<i>In natura</i>	16 ± 1	16 ± 1	16 ± 1
Hidrotérmico 150 seg	20 ± 4	30 ± 5	30 ± 1
Hidrotérmico 150 seg + licor	25 ± 4	30 ± 5	35 ± 4
Hidrotérmico 300 seg	39 ± 5	41 ± 5	42 ± 5
Hidrotérmico 300 seg + licor	48 ± 3	54 ± 3	58 ± 2
Hidrotérmico 600 seg	65 ± 3	71 ± 3	73 ± 3
Hidrotérmico 600 seg + licor	60 ± 4	61 ± 4	70 ± 4

Este experimento também foi realizado com baixas concentrações enzimáticas de Accelerase em períodos longos de hidrólise enzimática (96 h), porém os resultados de

conversão enzimática foram inferiores a 40 %. Para melhoria desta conversão uma possibilidade seria aplicar um maior tempo de hidrólise.

Qing e colaboradores (2010) (46) demonstraram que a presença de xilose, xilana e xilooligômeros inibem as celulasas na etapa de hidrólise enzimática, sendo estes últimos com maior efeito de inibição do que os primeiros. O resultado da conversão glicosídica decorrente da hidrólise enzimática na presença do licor resultante do pré-tratamento hidrotérmico, rico em componentes da hemicelulose, corroboram com estes dados da literatura para licor com alto teor de hemicelulose, como para as amostras tratadas por mais tempo de reação (600 s) que tiveram mais que 70 % da hemicelulose solubilizada no licor. Portanto, conforme demonstrado pela Tabela 2. 3 a remoção deste licor influencia positivamente o rendimento de conversão de celulose (Tabela 2. 3).

Uma análise preliminar foi realizada no licor após cada condição de pré-tratamento, via cromatografia líquida de alta eficiência e foi observado a presença de xilooligômeros em todos eles, o que explica a inibição das celulasas em sua presença e demonstra ainda o potencial de aplicação destes pré-tratamentos para a produção de xilooligossacarídeos.

Os valores contidos na Tabela 2. 3 em comparação com estudos anteriores nas mesmas condições de hidrólise, (32) para amostras tratadas em ácido sulfúrico 1 % demonstraram ser superiores na taxa de conversão de celulose durante o período de 48 h de hidrólise para as amostras com o tempo igual ou superior a 300 s de tratamento hidrotérmico a 200 ° C. Nas condições de pré-tratamento ácido relatada houve uma conversão de 30 % de celulose em glicose e no hidrotérmico a 300 s foi de 39 %. Isto é interessante notar porque a composição química do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico 1 % demonstra menor fração de hemicelulose presente e teor de lignina e celulose próximos, o que indica que a alteração estrutural e/ou morfológica teve maior influencia no resultado da conversão enzimática, do que apenas a composição. Para verificar isto foi realizado análises físicas.

Visto que o pré-tratamento que demonstrou maior conversão glicosídica foi com o tempo de 600 s, esta amostra foi selecionada para ser estudado a possível interação sinérgica da xilanase com celulasas, especificamente xilanase purificada (GH11) de *T. langunious* (CM11T) com celulasas Cellic CTec 2. Este procedimento foi desenvolvido por Kamalpreet Kaur (Guru Nanak Dev University - Índia) e está apresentado no capítulo 3.

3. 3 Ressonância Magnética Nuclear

A atribuição dos deslocamentos químicos através de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), permite verificar alteração do material de estudo frente a um dado tratamento empregado. Os resultados de espectros obtidos com o experimento de RMN para o estado sólido foi comparado com dados encontrados na literatura para especificar o componente correspondente em cada pico, como detalhado na Tabela 2. 4 e representado no espectro do bagaço pela Figura 2. 2. (30 - 32)

Tabela 2. 4 - Atribuição dos deslocamentos químicos observados por RMN para bagaço de cana-de-açúcar

Pico	Grupo Químico	Deslocamento (ppm)
1	CH ₃ em grupos acetil da hemicelulose	21,5
2	Carbonos metoxil-aril da lignina	56,2
3	C ₆ da celulose amorfa; C ₆ da hemicelulose; carbonos OC _γ H ₂ da lignina	62,5
4	C ₆ da celulose cristalina	64,8
5	C _{2,3,5} da celulose; carbono OC _α H ₂ da lignina	72,5
6	C _{2,3,5} da celulose e hemicelulose	74,4
7	C ₄ da celulose amorfa e hemicelulose; carbonos OC _β H ₂ da lignina	83,5
8	C ₄ da celulose cristalina	87,9
9	Ombro do C ₁ da hemicelulose	101,8
10	C ₁ da celulose	105
11	C ₂ e C ₆ aromáticos do grupo siringil; C ₅ e C ₆ aromáticos do grupo guaiacil	110 – 115
12	C ₂ aromático nos grupos guaiacil	126,6
13	C ₁ e C ₄ aromáticos do grupo siringil	134,5 e 136,9
14	C ₃ e C ₅ aromáticos do grupo siringil; C ₁ e C ₄ aromáticos do grupo guaiacil	148
15	C ₃ e C ₅ aromáticos do grupo siringil	153,5
16	Grupos carboxil da lignina	163 – 180
17	Grupos carboxil da hemicelulose	173,6

Fontes: 30 - 31

De maneira geral, é possível atribuir aos picos na região de 60 a 105 ppm características predominantemente de carbonos da celulose, porém com contribuições de sinais da hemicelulose e lignina.

Figura 2. 2 - Espectro de ^{13}C ssNMR de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Foi realizado a análise por ressonância magnética nuclear do estado sólido (ssRMN), do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo hidrotérmico para as todas as amostras, antes e após a lavagem do material submetido, conforme apresentado na Figura 2. 3.

Figura 2. 3 - Espectros Multi-CP de ^{13}C ssNMR em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e em comparação com o *in natura* (referência). A normalização foi feita pelo pico de celulose em ~105 ppm.

A Figura 2. 3 nos permite observar que não houve diferenças consideráveis entre as amostras que sofreram ou não lavagem após o pré-tratamento, no que diz respeito a aspectos qualitativos. De maneira geral é possível atribuir aos picos 3 e 7 características, respectivamente, de carbonos C6 e C4 da fração amorfa da celulose, enquanto os picos 4 e 8 são característicos aos carbonos C6 e C4 da fração cristalina da celulose. (30 - 32) Para os sinais de lignina que estão distribuídos ao longo de toda região espectral, temos seus picos identificados como 2, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 exclusivamente. Assim como a lignina, a hemicelulose tem sinais distribuídos ao longo de toda região espectral, no entanto, os picos dos carbonos da hemicelulose têm contribuições em 1, 3, 6, 7, 9 e 17. (30 - 32)

Esta medida teve caráter qualitativo e não foi observado a ausência dos picos correspondentes a composição química do bagaço de cana-de-açúcar. Considerando que o espectro de referência corresponde a um espectro de bagaço *in natura*, não foi observado diferenças consideráveis entre a referência e os espectros obtidos após os 3 tempos de tratamento hidrotérmico.

A mesma análise foi atribuída aos licores liofilizados resultantes de cada pré-tratamento empregado (Figura 2. 4).

Figura 2. 4 – Espectros Multi-CP de ¹³C ssNMR em licores obtidos após pré-tratamento hidrotérmico

Os licores foram obtidos do pré-tratamento e então foram liofilizados, é possível notar que os mesmos componentes são liberados em todos eles. Para confirmar a solubilização da hemicelulose durante o pré-tratamento, condizendo com a Tabela 2. 1, foi realizado um espectro de comparação entre o bagaço e o licor extraído (Figura 2. 5).

As setas correspondem aos picos específicos da fração de hemicelulose.
 Figura 2. 5 - Espectros Multi-CP comparativo entre bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e licor resultante do pré-tratamento hidrotérmico por 600 s a 200 °C

A visualização dos espectros procedentes do bagaço *in natura* e do licor resultante do pré-tratamento hidrotérmico, possibilita confirmar que há extração da hemicelulose neste tratamento (Figura 2. 5). Considerando que a liberação destes componentes está associada na literatura com o tratamento ácido, foi feito uma comparação deste material com o licor procedente de pré-tratamento ácido diluído, utilizando ácido sulfúrico 1% como reagente no bagaço, com tempo de reação de 40 min em autoclave (Figura 2. 6).

Figura 2. 6 - Espectros Multi-CP comparativo entre licor resultante de pré-tratamento hidrotérmico por 600 s a 200 °C e licor obtido de pré-tratamento ácido (H₂SO₄ 1%) a 121 °C por 40 min

A comparação entre o licor procedente do pré-tratamento hidrotérmico e o procedente do pré-tratamento ácido demonstram algumas diferenças de componentes presentes em cada um deles (Figura 2. 6). É possível notar que o pré-tratamento hidrotérmico possibilitou a retirada de componentes da hemicelulose que excederam ao que foi possível por meio do pré-tratamento ácido. Através dos sinais característicos dos grupamentos constituintes da hemicelulose e da literatura, (47) vemos que o pré-tratamento ácido aplicado foi eficiente na retirada de xilano, todavia é possível notar que grupos metil acetato, correspondente ao pico 1 (Figura 2. 6), não é observado após o pré-tratamento com ácido sulfúrico 1 %.

Trabalhos anteriores demonstraram que o arabinoxilano que está presente na cana. (48) é composto de xilose na cadeia principal ligada por β -(1 $\rightarrow$ 4) com substituições de arabinose. Esta molécula é parcialmente solúvel em água, sendo este fator dependente das ramificações ou proporção de xilose e arabinose presentes na estrutura. (49) Entre as ramificações, além de monossacarídeos, podem estar ligados ao arabinoxilano, radicais metila. (49) Portanto o pré-tratamento hidrotérmico poder ter atuado especificamente nos grupos metil acetato da hemicelulose, pico 1, no licor extraído do bagaço durante a reação, demonstrando diferença do solubilizado procedente do pré-tratamento hidrotérmico frente ao pré-tratamento ácido. Ainda conforme Simmons e colaboradores (47) o xilano pode estar presente na parede celular por conformações distintas que lhe conferem rigidez e mobilidade, portanto estes pré-tratamentos podem afetar a hemicelulose diferentemente, para isto, mais estudos serão realizados.

3. 4 Análises morfológica

Uma vez que a estrutura das fibras celulósicas naturais é bastante heterogênea, é lógico supor que existem regiões de acessibilidade variável aos pré-tratamentos empregados. (45) Por isto, foram realizadas diversas imagens antes de elaborar determinada conclusão ao resultado do pré-tratamento.

3. 4. 1 Microscopia confocal

A microscopia confocal de varredura é uma técnica de fluorescência que permite por meio da varredura uma análise local ponto a ponto. Para o bagaço de cana-de-açúcar o cromóforo emissor é a lignina, portanto esta técnica permite obter informação química do

arranjo molecular da mesma. (39, 50 - 51) Alterações na estrutura da molécula de lignina ou sua remoção frente ao material que se encontra, pode ser detectado por esta técnica física. Neste trabalho o objetivo de se fazer uso desta técnica é verificar o efeito na lignina decorrente do pré-tratamento, uma vez que estudos anteriores já demonstraram a influência do pré-tratamento nesta molécula. (39)

A combinação de espectros em cada pixel gera cores na imagem que representam à região espectral que está sendo emitida. A amostra não tratada, basicamente emite no azul entre 400 – 500 nm (9, 39) e apresenta homogeneidade em todo o espaço amostral (Figura 2. 7). Isto significa que o arranjo molecular e a composição química da lignina são praticamente o mesmo em todo o espaço amostral.

Figura 2. 7. - Imagens de microscopia confocal de varredura para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Figura 2. 8 - Imagens de microscopia confocal de varredura para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar tratadas pelo processo hidrotérmico em diferentes tempos de reação. A) Hidrotérmico 150 s; B) Hidrotérmico 300 s; C) Hidrotérmico 600 s, todos a 200 °C

A Figura 2. 8 nos permite visualizar que após 150 s de reação (Figura 2. 8 A), a amostra já apresenta alteração da conformação da molécula de lignina e com isto vemos que as amostras passam a emitir na região entre o verde e o vermelho (500 – 700 nm). É possível verificar que as mudanças nas imagens espectrais se acentuam com o aumento do tempo de reação. (Figura 2. 8 C-D). Conforme trabalho anterior, estas emissões em baixa energia estão associadas a formação de complexos e agregados moleculares. (9, 39) Isto demonstra a desconstrução no arranjo estrutural da lignina na parede celular do vegetal, assim como já observado. (52)

Na presença do licor obtido pelo pré-tratamento os espectros de ambas apresentam o mesmo rearranjo da estrutura da lignina devido a desconstrução da parede celular.

O pré-tratamento hidrotérmico após 600 s apresentou maiores alterações morfológicas e composicionais na fibra do bagaço de cana-de-açúcar comparado as outras condições de

tempo de reação empregadas, portanto esta condição foi mais profundamente investigada (Figura 2. 9).

Figura 2. 9 - Imagens de microscopia confocal de varredura para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento hidrotérmico durante 600 s a 200 °C

A Figura 2. 9 demonstra que o interior das fibras de bagaço sofreu alteração morfológica após o pré-tratamento decorrente da deconstrução da parede celular. Conforme a Figura 2. 9 C e E é possível observar que contribuição de agregado de lignina com emissão no vermelho (500 – 700 nm). Isto sugere fortes modificações da lignina apresentadas na fibra decorrente do pré-tratamento, demonstrando efeito mais severo quando comparado ao pré-tratamento hidrotérmico com outros tempos de reação.

3. 4. 2 Microscopia eletrônica de varredura

Para ampliar a observação na morfologia do bagaço de cana antes e após cada pré-tratamento foi empregado microscopia eletrônica neste estudo. As imagens de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FESEM) mostram que as amostras de bagaço *in natura* são formadas por fibras e por resíduos, que corresponde ao material particulado mais facilmente degradada que as fibras. A maioria do material sólido que

resiste ao tratamento é constituída por fibras, por isso, as comparações feitas entre as amostras tratadas são realizadas considerando-se estas regiões.

Em aumentos de baixa magnitude (150 x) não foram observadas diferenças significativas entre as amostras, porém é possível observar que todas possuem resíduos de fibras (Figura 2. 10).

Figura 2. 10 – Imagens da superfície de amostras de bagaço in natura e pré-tratado obtidas por FESEM: – A) *in natura*; B) Hidrotérmico 150 s; C) Hidrotérmico 300 s; D) Hidrotérmico 600 s

Os efeitos da degradação ou modificação da fibra após os pré-tratamentos são evidentes quando a superfície desta é comparada à amostra sem tratamento em aumentos acima de 5000 x, por apresentar maior nitidez.

Figura 2. 11 - Imagens da superfície de amostras de bagaço *in natura* e pré-tratado obtidas por FESEM: – A) *in natura*; B) Hidrotérmico 150 s; C) Hidrotérmico 300 s; D) Hidrotérmico 600 s

Observando as Figuras 2. 11 e 2. 12 é possível notar que os feixes de fibras não são evidentes na amostra *in natura* e aparecem recobertos por uma camada superficial densa. Já para as amostras que sofreram pré-tratamento ocorre o desprendimento dos feixes nas fibras (Figura 2. 11 B – D e Figura 2. 12 B – D).

Um destaque deve ser dado para as amostras cujo o pré-tratamento ocorreu em 600 s de reação (Figura 2. 11 D e Figura 2. 12 D), pois aparenta ter proporcionado separações mais notórias, o que possibilita inferir que à medida que o pré-tratamento hidrotérmico atua, as fibras mais superficiais vão se desprendendo.

Figura 2. 12- Imagens da superfície de amostras de bagaço *in natura* e pré-tratado obtidas por FESEM: A) *in natura*; B) Hidrotérmico 150 s; C) Hidrotérmico 300 s; D) Hidrotérmico 600 s

Ainda para a condição de pré-tratamento por 600 s foi possível verificar depósitos de material na superfície como efeito do tratamento, sendo mais pronunciado no caso do pré-tratamento hidrotérmico (Figura 2. 13 A – B). A quantidade de material particulado depositado na superfície da amostra do indica que essa é uma característica de tratamentos mais severos, já que para o pré-tratamento em menores tempo de reação testados (150 e 300 s) isto não foi perceptível.

Em imagens de microscopia eletrônica de varredura com maiores magnitudes, estes materiais depositados são vistos como glóbulos que parecem lignina, (9) tanto nas amostras tratadas lavadas quanto nas amostras com seu licor extraído. É possível concluir, portanto, que o tratamento hidrotérmico pode acarretar na formação de depósitos de material particulado na superfície, na forma de gotículas ou de gotas maiores (Figura 2. 13). Em particular, os depósitos na forma de gotas, sugerem ser depósitos de lignina, devido a semelhança com a superfície de outras amostras lignocelulósicas pré-tratadas com explosão a vapor, ácido diluído ou tratamentos organosolve. (55 - 58) A formação desses depósitos é atribuída à retirada de lignina do interior da parede celular e a sua reposição na superfície por adsorção.

Figura 2. 13 - Imagens da superfície de amostras de bagaço pré-tratado obtidas por FESEM: A) Hidrotérmico 600 s; B) Hidrotérmico 600 s sem lavar

4. CONCLUSÃO

Os pré-tratamentos hidrotérmicos realizados em 3 diferentes tempos de reação a 200 °C por 150, 300 e 600 segundos demonstraram que a presença do licor no bagaço não afetou a investigação da sua caracterização por análises físicas qualitativas, mas demonstrou que a lavagem do material em água remove possíveis inibidores da digestibilidade enzimática das celulasas, que são decorrentes da presença da solubilização da hemicelulose.

As análises físicas demonstraram que a lignina apesar de não ser removida no pré-tratamento hidrotérmico, nas condições analisadas, sofre alteração estrutural, por condensação e reestruturação que afeta diretamente o acesso enzimático ao substrato, por expor a celulose ao ataque enzimático, gerando um aumento considerável na conversão glicosídica após 72 h de hidrólise de 16 para 71 % comparando a amostra sem tratamento com a tratada a 200 °C por 10 min.

REFERÊNCIAS

- 1 Sun, J. X., Sun, X. F., Sun, R. C., & Su, Y. Q. (2004). Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 195-204. DOI 10.1016/j.carbpol.2004.02.002
- 2 Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., & Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 74(1), 69-80. DOI 10.1016/S0960-8524(99)00142-X
- 3 Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource technology*, 101(13), 4754-4766. DOI 10.1007/s10295-010-0931-2C
- 4 Woiciechowski, A. L., Karp, S. G., Sobral, K., de Carvalho, J. C., Letti, L. A. J., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2014). Pretreatment strategies to enhance value addition of agro-industrial wastes. In *Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals* (pp. 29-49). Springer, New York, NY. DOI 10.1007/978-1-4614-8005-1_2
- 5 Bura, R., Bothast, R. J., Mansfield, S. D., & Saddler, J. N. (2003). Optimization of SO₂-catalyzed steam pretreatment of corn fiber for ethanol production. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 319-335). Humana Press, Totowa, NJ. DOI 10.1007/978-1-4612-0057-4_26
- 6 Ogeda, T. L., & Petri, D. F. (2010). Biomass enzymatic hydrolysis. *Quimica Nova*, 33(7), 1549-1558. DOI 10.1590/S0100-40422010000700023
- 7 Reddy, N., & Yang, Y. (2005). Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23(1), 22-27. DOI 10.1016/j.tibtech.2004.11.002
- 8 Kumar, S., Kothari, U., Kong, L., Lee, Y. Y., & Gupta, R. B. (2011). Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. *Biomass and Bioenergy*, 35(2), 956-968. DOI 10.1016/j.biombioe.2010.11.023
- 9 Santo, M. E., Rezende, C. A., Bernardinelli, O. D., Pereira Jr, N., Curvelo, A. A., Deazevedo, E. R., ... & Polikarpov, I. (2018). Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Industrial crops and products*, 113, 64-74. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.01.014
- 10 Kabel, M. A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A. G., & Schols, H. A. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource technology*, 98(10), 2034-2042. DOI 10.1016/j.biortech.2006.08.006
- 11 Zhang, T., Kumar, R., Tsai, Y. D., Elander, R. T., & Wyman, C. E. (2015). Xylose yields and relationship to combined severity for dilute acid post-hydrolysis of xylooligomers from hydrothermal pretreatment of corn stover. *Green Chemistry*, 17(1), 394-403. DOI 10.1039/C4GC01283F

- 12 Kumar, R., & Wyman, C. E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology progress*, 25(2), 302-314. DOI 10.1002/btpr.102
- 13 Zhang, J., Tuomainen, P., Siika-Aho, M., & Viikari, L. (2011). Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 102(19), 9090-9095. DOI 10.1016/j.biortech.2011.06.085
- 14 Bura, R., Chandra, R., & Saddler, J. (2009). Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnology progress*, 25(2), 315-322. DOI 10.1002/btpr.98
- 15 García-Aparicio, M. P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., & Negro, M. J. (2007). Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. In *Applied biochemistry and biotechnology* (pp. 353-365). Humana Press. DOI 10.1007/978-1-60327-181-3_31
- 16 Overend, R. P., Chornet, E., & Gascoigne, J. A. (1987). *Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments*. *Philos. TR Soc. A* 321, 523-536. DOI 10.1098/rsta.1987.0029
- 17 Heitz, M., Capek-Menard, E., Koeberle, P. G., Gagne, J., Chornet, E., Overend, R. P., ... & Yu, E. (1991). Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource Technology*, 35(1), 23-32.
- 18 Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2014). Severity factor coefficients for subcritical liquid hot water pretreatment of hardwood chips. *Biotechnology and bioengineering*, 111(2), 254-263. DOI 10.1002/bit.25009
- 19 Rocha, G. J. D. M., Silva, F. T., Curvelo, A. A. D. S., & Araujo, G. T. (1997). A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In *Proceedings*.
- 20 Houghton, T. P., Stevens, D. M., Pryfogle, P. A., Wright, C. T., & Radtke, C. W. (2009). The effect of drying temperature on the composition of biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 153(1-3), 4-10. DOI 10.1007/s12010-008-8406-x
- 21 Neilson, J. M., & Shafizadeh, F. (1983). Evaluation of organosolv pulp as a suitable substrate for rapid enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.:(United States)*, 25(2). DOI 10.1002/bit.260250225
- 22 Kaar, W. E., & Brink, D. L. (1991). Summative analysis of nine common North American woods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 11(4), 479-494. DOI 10.1080/02773819108051088
- 23 Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2006). Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *Golden: National Renewable Energy Laboratory*.

- 24 Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (1976, January). Measurement of saccharifying cellulase. In *Biotechnol. Bioeng. Symp.:(United States)* (Vol. 6). Army Natick Development Center, MA..
- 25 Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428. DOI 10.1021/ac60147a030
- 26 Mongkolthanaruk, W., & Dharmsthiti, S. (2002). Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(2), 101-105. DOI 10.1016/S0964-8305(02)00057-4
- 27 Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Santa Anna, L. M. M., De Castro, A. M., ... & Polikarpov, I. (2011). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, 46(5), 1196-1201. DOI 10.1016/j.procbio.2011.01.022
- 28 Johnson, R. L., & Schmidt-Rohr, K. (2014). Quantitative solid-state ¹³C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. *Journal of Magnetic Resonance*, 239, 44-49. DOI 10.1016/j.jmr.2013.11.009
- 29 Bernardinelli, O. D., Lima, M. A., Rezende, C. A., Polikarpov, I., & deAzevedo, E. R. (2015). Quantitative ¹³C MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 110. DOI 10.1186/s13068-015-0292-1
- 30 Wickholm, K., Larsson, P. T., & Iversen, T. (1998). Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 312(3), 123-129. DOI 10.1016/S0008-6215(98)00236-5
- 31 Templeton, D. W., Scarlata, C. J., Sluiter, J. B., & Wolfrum, E. J. (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method uncertainties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 9054-9062. DOI 10.1021/jf100807b
- 32 Rezende, C. A., de Lima, M. A., Maziero, P., deAzevedo, E. R., Garcia, W., & Polikarpov, I. (2011). Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 54. DOI 10.1186/1754-6834-4-54
- 33 Focher, B., Marzetti, A., Cattaneo, M., Beltrame, P. L., & Carniti, P. (1981). Effects of structural features of cotton cellulose on enzymatic hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 26(6), 1989-1999. DOI 10.1002/app.1981.070260622
- 34 Hallac, B. B., Sannigrahi, P., Pu, Y., Ray, M., Murphy, R. J., & Ragauskas, A. J. (2009). Biomass characterization of *Buddleja davidii*: a potential feedstock for biofuel production. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1275-1281. DOI 10.1021/jf8030277
- 35 El Hage, R., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2010). Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. *Polymer Degradation and Stability*, 95(6), 997-1003. DOI 10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.012

- 36 Sannigrahi, P., Miller, S. J., & Ragauskas, A. J. (2010). Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. *Carbohydrate research*, 345(7), 965-970. DOI 10.1016/j.carres.2010.02.010
- 37 Foston, M. B., Hubbell, C. A., & Ragauskas, A. J. (2011). Cellulose isolation methodology for NMR analysis of cellulose ultrastructure. *Materials*, 4(11), 1985-2002. DOI 10.3390/ma4111985
- 38 Martínez, A. T., González, A. E., Valmaseda, M., Dale, B. E., Lambregts, M. J., & Haw, J. F. (1991). Solid-state NMR studies of lignin and plant polysaccharide degradation by fungi. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 45(s1), 49-54. DOI 10.1515/hfsg.1991.45.s1.49
- 39 Coletta, V. C., Rezende, C. A., da Conceição, F. R., Polikarpov, I., & Guimarães, F. E. G. (2013). Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 43. DOI 10.1186/1754-6834-6-43
- 40 de Albuquerque Wanderley, M. C., Martín, C., de Moraes Rocha, G. J., & Gouveia, E. R. (2013). Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 128, 448-453. DOI 10.1016/j.biortech.2012.10.131
- 41 Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., & Ladisch, M. R. (2005). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, 96(18), 1986-1993. DOI 10.1016/j.biortech.2005.01.013
- 42 Ladisch, M. R., Kohlman, K. L., Westgate, P. L., Weil, J. R., & Yang, Y. (1998). *U.S. Patent No. 5,846,787*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- 43 Weil, J., Westgate, P., Kohlmann, K., & Ladisch, M. R. (1994). Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme and microbial technology*, 16(11), 1002-1004. DOI 10.1016/0141-0229(94)90012-4
- 44 Schell, D. J., Farmer, J., Newman, M., & McMILLAN, J. D. (2003). Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 105(1-3), 69-85. DOI 10.1385/ABAB:105:1-3:69
- 45 Klock, U., Muñiz, G. D., HERNANDEZ, J. A., & Andrade, A. D. (2005). Química da madeira. *Fupec, Curitiba*.
- 46 Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource technology*, 101(24), 9624-9630. DOI 10.1016/j.biortech.2010.06.137
- 47 Simmons, T. J., Mortimer, J. C., Bernardinelli, O. D., Pöppler, A. C., Brown, S. P., Deazevedo, E. R., ... & Dupree, P. (2016). Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, 7(1), 1-9. DOI 10.1038/ncomms13902
- 48 Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the

walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30. DOI 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x

49 Crivellari, A. C. (2016). *Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

50 Olmstead, J. A., & Gray, D. G. (1993). Fluorescence emission from mechanical pulp sheets. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73(1), 59-65. DOI 10.1016/1010-6030(93)80033-6

51 Albinsson, B., Li, S., Lundquist, K., & Stomberg, R. (1999). The origin of lignin fluorescence. *Journal of Molecular Structure*, 508(1-3), 19-27. DOI 10.1016/S0022-2860(98)00913-2

52 McDonough, T. J. (1992). The chemistry of organosolv delignification.

53 Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J. M., Cabañas, A., & Ballesteros, M. (2003). Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. In *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 87-100). Humana Press, Totowa, NJ. DOI 10.1007/978-1-4612-0057-4_7

54 Ruiz, H. A., Romaní, A., Michelin, M., & Teixeira, J. A. (2013). A importância dos pré-tratamentos no conceito das biorrefinarias. *Biotecnologia*, 3.

55 Heiss-Blanquet, S., Zheng, D., Ferreira, N. L., Lapierre, C., & Baumberger, S. (2011). Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresource technology*, 102(10), 5938-5946. DOI 10.1016/j.biortech.2011.03.011

56 Selig, M. J., Viamajala, S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E., & Vinzant, T. B. (2007). Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology progress*, 23(6), 1333-1339.

57 Donohoe, B. S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E., & Vinzant, T. B. (2008). Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and bioengineering*, 101(5), 913-925. DOI 10.1002/bit.21959

58 Koo, B. W., Min, B. C., Gwak, K. S., Lee, S. M., Choi, J. W., Yeo, H., & Choi, I. G. (2012). Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the effect on enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 42, 24-32. DOI 10.1016/j.biombioe.2012.03.012

Capítulo 3.

Artigo 1

Artista: Tarsila do Amaral

Capítulo 3.

Artigo 1 - Hidrólise aprimorada do bagaço de cana tratado pelo processo hidrotérmico e estudo das mudanças estruturais visando melhorar o biorrefino

Tendo em vista os resultados adquiridos para as amostras de bagaço de cana pré-tratadas pelo processo hidrotérmico a 200 °C (Capítulo 2) em diferentes tempos, este capítulo foca em analisar a variável concentração de sólidos pelo tempo de 600 s, estudando a aplicação destas amostras no contexto de aprimoramento da hidrólise enzimática. Para isto foi realizado o pré-tratamento hidrotérmico na concentração de sólidos de 1:10 e na concentração de 1:1 (50 % de umidade) usando como referência o bagaço não tratado, seguido pelo processo de hidrólise enzimática, em trabalho colaborativo com a Índia com o Prof. Dr. Bhupinder Singh Chadha, sob os cuidados de sua aluna Kamalpreet Kaur, a fim de se estudar a hidrólise enzimática mediante a aplicação de enzimas acessórias, especificamente a xylanase.

Neste capítulo, em forma de artigo científico, são apresentados os resultados da hidrólise enzimática realizada com coquetel comercial Cellic CTec 2 (Novozymes) e o estudo da aplicação desta suplementada com xylanase derivada do fungo *Thermomyces lanuginosus* CM11T. Este trabalho complementa os estudos iniciados no Capítulo 2, tendo como principal objetivo aprimorar o processo de hidrólise enzimática para a amostra pré-tratada hidrotérmicamente que conforme o capítulo anterior apresentou bons resultados de hidrólise e promissor uso para obtenção de outros bioprodutos.

Artigo 1

Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification

Kamalpreet Kaur Brar, Melissa C. Espirito Santo, Vanessa O.A. Pellegrini, Jefferson G. Filgueiras, Eduardo R. deAzevedo, Francisco E.C. Guimaraes, Igor Polikarpov and Bhupinder Chadha

ABSTRACT

The enzymatic mixture containing Novozyme Cellic CTec2 spiked with xylanase derived from *Thermomyces lanuginosus* (1000 U xylanase per g of substrate) resulted in enhanced saccharification of native, hydrothermally and autohydrolytically pretreated sugarcane bagasse when compared to the benchmark Cellic CTec2. Hydrothermally pretreated bagasse upon hydrolysis with the enzymatic mixture yielded considerably higher levels of sugars as compared to benchmark Cellic CTec2, resulting in saccharification efficiencies of 85.7, 77.8 and 78.9 % at 10, 15 and 20 % (weight per volume) substrate loadings, respectively. Autohydrolysed and native sugarcane bagasse samples had lower saccharification yields, although xylanase addition to the benchmark cocktail still was beneficial. Chemical compositional analysis and detailed morphological examination of the substrates after pretreatments as well as the enzymatic hydrolysis reactions employing confocal laser scanning microscopy (CLSM), field emission scanning electron microscopy (FESEM), X-Ray diffraction (XRD) and solid state nuclear magnetic resonance (ssNMR) provided fundamental insights into the structural changes during deconstruction and shed light on how such changes affected the biomass enzyme hydrolysis.

Keywords: Lignocellulosic biomass, biophysical characterization, hydrolysis, xylanase

1. INTRODUCTION

To produce biofuels, green chemicals and sustainable materials from lignocellulosic biomass is of a great practical interest worldwide because of national energy security, mitigation of climate changes, improved sustainability of agriculture and rural economic development. (1 – 4) Establishment and implementation of renewable energy technologies is a key step in allowing the transition to a low carbon society. (2, 3, 5) Although direct and indirect land-use changes and possible undesired environmental impacts of excessive fertilizer applications on land and water are still a matter of concern, it is becoming increasingly clear that perennial bioenergy crops, including sugarcane, have considerable potential in reducing greenhouse gas emissions and providing sustainable alternative to fossil fuels, if adequate agricultural practices to be implemented worldwide. (4 – 6)

However, one of the tremendous challenges in sustainable biochemical valorization of perennial crops and in establishing of modern biorefineries is a cost-effective bioconversion of lignocellulosic substrates into biofuels and value-added renewable products. The large-scale sugar and ethanol production in Brazil generates huge amounts of a sugarcane industry waste, bagasse. (7) This agro-industrial residue from sugar mills and agricultural processing can be used as a low-cost renewable carbon source in the production of lignocellulosic ethanol, contributing to overall cost-efficiency of the process. (8) However, from the economic standpoint, important bottlenecks in transformation of a plant biomass into biofuels are also related to high energy and cost-intensive pretreatments of the biomass and the costs of enzymes involved in its saccharification. (7) Due to the recalcitrant nature of lignocellulosic biomass, a physicochemical pretreatment process is typically required to open up the tightly packed cell wall structure to facilitate the access of the enzymes to the target polysaccharides (cellulose and hemicellulose). (9 – 13) After relevant pretreatment processes, cellulose accessibility can be increased by solubilizing a large portion of hemicellulose. (12 – 14) However, the partially hydrolyzed and solubilized hemicellulose could remain in an oligomeric form, which eventually relocates to the surface of lignocellulose and physically blocks an access of cellulases to the underlying cellulose fibres. (15 – 17) Reports in the recent past suggest that xylanase supplementation to the benchmark cellulases increases cellulose hydrolysis in xylan-containing lignocellulosic materials. (18, 19) The hemicellulose-degrading enzyme activities detected in most of the commercially available cellulase preparations are too low or catalytically insufficient to achieve high levels of conversion of the residual hemicellulose. (20, 21) Therefore,

supplementation of cellulase mixtures with the accessory enzymes or auxiliary activities, such as xylanases and lytic polysaccharide monooxygenases (AA9) enriched preparations, are considered as promising approaches to increase the overall fermentable sugar yields from pretreated lignocellulosics. (22, 23) Although, accessory enzymes offer a potential to increase substrate digestibility, the high dosages of enzyme supplementation applied in many of the past studies can be difficult to justify because of the incurred increased enzyme costs. Among several factors that hamper our current ability to attain efficient lignocellulosic biomass conversion yields at low enzyme loadings may be attributed to our incomplete understanding of the structural changes that occurs to the substrate during pretreatment and subsequent interaction of different components of enzymatic mixtures acting on pretreated lignocellulosic substrates. Previous studies of xylanase-aided bleaching treatments of Kraft cellulosic pulps showed that the xylanases not only hydrolyzed the re-precipitated xylan on the fiber surface but also increased the pulp fiber porosity, resulting in a substantial increase in the permeability of the cellulosic pulp fibers. (24, 25)

Besides xylanases the synergistic action of different components of hemicellulose-degrading enzymes as well as cellulose-degrading enzymes (exoglucanases and endoglucanases) derived from different microbial sources have also reported so as to reduce the cellulase loading rates. (26, 27) Typically, high enzyme doses with the cellulase loadings of about 15 filter paper units (FPU) per gram cellulose are needed to achieve economically viable sugar yields from pretreated biomass that is equivalent to approximately 30 g of enzyme per L of ethanol. (28) Indeed, enzymatic hydrolysis step alone can amount up to 25% of the total operating and capital cost of lignocellulosic biofuel production. (4) Thus, to meet the enzyme cost goal (\$0.10 per gallon ethanol or less) of the DOE Biomass Program, both the enzymes production cost should be less than \$2 per kg of cellulase mixtures and new strategies must be established aiming to reduce the enzyme loadings needed to reach higher sugar yields. (29, 30) Therefore, it is timely relevant to prospect for new sources of catalytically active auxiliary enzymes and to understand their roles in achieving higher yields of sugars with smaller amounts of enzyme for the viability of this biotechnological approach.

Furthermore, it is increasingly clear that complexity of composition, physical structure and multilevel architecture of plant cell walls strongly contributes to recalcitrance of lignocellulosic biomass and needs to be critically examined and understood for improved biochemical conversion of plant biomass. (9 – 13)

Present work evaluates effects of GH11 xylanase from *T. lanuginosus* (TlXyl) addition on yields of sugarcane bagasse (SCB) saccharification by commercial enzymatic benchmark Cellic CTec2 (termed herein as Cellic CTec2+TlXyl cocktail) and studies the physical changes brought about by using these enzymatic mixtures. A range of advanced physical techniques, including confocal laser scanning microscopy (CLSM), field emission scanning electron microscopy (FESEM), X-Ray diffraction (XRD) and solid state nuclear magnetic resonance (ssNMR) were applied and their combined results were jointly analyzed. Furthermore, we set out to understand chemical and morphological changes in the structure and composition of native sugarcane bagasse (SCB) caused by hydrothermal and autohydrolysis pretreatments and to explore how these changes can be crucial in achieving enhanced level of saccharification through synergistic interactions between studied enzymes. The results obtained could be useful for establishing of efficient recalcitrant plant biomass conversion technologies for biofuels production and in the context of biorefineries.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Pretreatment of substrates and their chemical composition analyses

SCB obtained from Raizen (Usina da Serra, SP, Brazil) was processed by using two different strategies: a hydrothermal and an autohydrolysis pretreatment. The hydrothermal pretreatment was conducted in an in-house batch reactor using 10 g of native SCB mixed with 100 mL of water. The reactor was heated and kept at 200 °C for 10 min at 15.8 atm of pressure. The second, autohydrolysis pretreatment, was performed under the same conditions, but with much less water (10 mL) added to 10 g of bagasse. In both cases, after pretreatment was completed, the reactor was cooled on ice. The pretreated liquor was separated from the solid biomass by filtration using filter paper (Whatman). The solids were washed with water until pH would become neutral (pH 7.0).

All samples before and after the pretreatment were subjected to acid hydrolysis for determination of monosaccharides, acetate and lignin. The sulfuric acid hydrolysis was performed according to Espirito Santo et al. (31) and following the protocol established by Rocha et al. (8) Monosaccharide content of the samples obtained after acid hydrolysis were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Aminex column (HPX-87H, 300 × 7.8 mm, Bio-Rad, USA) in a Shimadzu LC-10AD chromatograph equipped with refractive index and UV-VIS detector. The mobile phase was H₂SO₄ (5.10⁻³ mol L⁻¹) with the flow rate of 0.6 mL min⁻¹. This isocratic condition was maintained for 1 h at 65 °C.

2.2. Effect of spiking Cellic CTec2 with purified xylanase (Tlxyl) on saccharification of native and pretreated substrates

Saccharification of native and pretreated SCB was carried out using a cocktail prepared by adding purified xylanase (TlXyl) to benchmark commercial preparation Cellic CTec2 at different substrate loading rates of 10, 15 and 20 % (w/v). Xylanase was produced by culturing of thermophilic fungi *T. lanuginosus* on a production medium containing 5 % (w/v) corn cobs biomass as a carbon source and 1% (w/v) yeast extract as a carbon and nitrogen source (32) at 45 °C using shake flask cultures for 6 days. The resultant extract was centrifuged, and concentrated using ultrafiltration. The xylanase was purified using two step approach employing DEAE sepharose (weak anion exchanger) and Biogel P-30 (gel

filtration) in a sequential manner as described previously. (33) The enzyme activity of the purified xylanase was estimated using birchwood xylan as a substrate. (34)

Enzymatic hydrolysis reactions were carried out using benchmark Cellic CTec2 as well as a Cellic CTec2 supplemented with the purified thermostable xylanase (CTec2+TiXyl cocktail) at a dosage of 1000 units per g of substrate. Commercial enzyme Cellic CTec2 was diluted suitably so as to have final protein loadings of 6.6, 9.9 and 13.2 (mg per g of substrate) for 10, 15 and 20 % (w/v) substrate loadings, respectively. The final volume was adjusted using sodium citrate buffer (50 mM, pH 5.0) to reach 1 mL and the reaction mixture was incubated at 50 °C for 96 h. The amounts of released glucose and reducing sugars were quantified using glucose oxidase-peroxidase based assay kit (35), dinitrosalicylic acid (36) as well as a high performance liquid chromatography (HPLC).

The enzymatic hydrolysis efficiencies for glucan saccharification and for total reducing sugars production were calculated as follows:

$$\text{Glucan saccharification efficiency (\%)} = \frac{\text{Glucose released during saccharification (g)} \times 100}{\text{Glucan remained after pretreatment (g)} \times 1.11}$$

$$\text{Total saccharification efficiency (\%)} = \frac{\text{Total sugars released during saccharification (g)} \times 100}{\text{Total sugars remained after pretreatment (g)} \times 1.11}$$

2.3. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was used to investigate morphological changes caused in the structure of plant cell walls, before and after pretreatment and enzymatic hydrolysis. All the samples were dried and coated with gold in a SCD 050 sputter coater (Oerlikon-Balzers, Balzers, Liechtenstein). SCB morphology was analyzed with scanning electron microscopy (Sigma; Zeiss, Germany), by collecting a large number of images from different areas of the samples and under several different magnifications.

2.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to obtain information about lignin distribution within bagasse samples before and after the enzymatic hydrolysis. CLSM allows mapping lignin within the biomass samples by measuring its fluorescence emission spectra. (37) Confocal laser scanning microscopy images were collected from the surface of the samples using Zeiss LSM 780 confocal microscope with a Coherent Chameleon laser

(Tisapphire) as a source for two-photon (2 P) excitation experiments and a Plan-Apochromat objective lens (20×), following previously described procedures. (31, 37)

2.5. X-ray diffraction (XRD)

To evaluate crystallinity indices (CrI) of the samples and average cellulose crystallite sizes, X-ray diffraction (XRD) data were collected using Rigaku Rotaflex diffractometer model RU200B (Tokyo, Japan) using monochromatic CuK α radiation (1.54 Å). The measurements were performed in duplicates and the XRD equipment was set to operate at 40 kV and 15 mA. 2 θ scans were measured from 5° to 50° in 0.05° steps with an X-ray exposure of 15 s per step. The CrIs of the samples were calculated by deconvolution of the XRD diffractograms using Peak fitting program (PeakFit; www.systat.com) as previously described. (38, 39) Scherrer equation was used to calculate average crystallite sizes. (40, 41)

2.6. ¹³C Solid-state nuclear magnetic resonance (¹³C ssNMR)

¹³C Solid-state nuclear magnetic resonance analysis were carried out using a Varian Inova spectrometer (Varian, USA) operating in frequencies of 100.5 MHz for ¹³C and 400.0 MHz for ¹H and Jackobsen probe 7 mm double resonance with sample rotation pneumatic system built around the magic angle, as described previously. (42)

The excitation method, CPMAS TOSS pulse sequence, is based on ¹H–¹³C cross-polarization with a radio-frequency (CP: ramped cross-polarization), sample rotation around the magic angle (MAS: magic angle spinning), elimination of sidebands (TOSS: total suppression of spinning sidebands) and heteronuclear uncoupling of the ¹H channel. This contributes to a good signal to noise ratio, combined with a uniform excitation of the different chemical groups and as a result an acquisition of a high resolution ¹³C ssNMR spectra

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and standard error was calculated at 5% level. Data obtained under different pretreatment and saccharification conditions (Cellic CTec2 benchmark and CTec2+TLXyl cocktail) and also changes in crystallinity indices of different samples were statistically evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA).

3. RESULTS & DISCUSSION

3.1 Evaluating potential of *Thermomyces lanuginosus* (CM-11T) as a source of xylanase and auxillary enzymes

A thermophilic strain *Thermomyces lanuginosus* grown on a complex medium containing 5 % (w/v) corn cob produced high levels of xylanase (2700 units per ml) after 6 days of incubation at 45 °C under shaking conditions. The strain being reported here produced much higher levels of xylanase as compared to 1004 units per ml and 132.5 units per ml observed in *T. lanuginosus* by Naveen et al. (43) and Kumar et al. (44), respectively. However, Singh et al. (45) using corn cobs based medium measured 3577 units per ml of xylanase in an indigenous *T. lanuginosus* strain SSBP supernatant. The purified TlXyl has a specific activity of 37,173 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ corresponding to 30-fold purification when compared to crude extract with a specific activity of 1371 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$. The molecular weight and pI of the xylanase were found to be ~24.3 kDa and pI ~3.5, respectively. The purified xylanase from *T. lanuginosus* belongs to GH11 family. (33)

The effect of supplementation of TlXyl (1000 U xylanase per g of substrate) to Cellic CTec2 on saccharification of native, hydrothermally and autohydrolytically pretreated SCB samples at different substrate loading was evaluated (Figure 3. 1). The results shown in Fig. 3.1 shows that the addition of TlXyl led to significantly ($F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$ at $\alpha 0.05$, $p < 0.05$) enhanced hydrolysis of native and pretreated SCB when compared to benchmark commercial Cellic CTec2 at 10, 15 and 20 % (w/v) substrate loadings. Saccharification of native SCB was considerably enhanced by the presence of TlXyl. The observed release of glucose was 10.9 ± 0.1 , 14.3 ± 0.4 and 19.0 ± 0.7 (g/L) after 96 h hydrolysis with commercial Cellic CTec2 which was increased to 15.8 ± 0.5 , 20.7 ± 0.9 and 24.5 ± 0.8 (g/L) for 10 %, 15 % and 20 % (w/v) of substrate loadings, in the presence of TlXyl (Figure 3.1). The total saccharification yields of 16.9 ± 0.4 , 20.7 ± 0.4 and 25.4 ± 1.0 (g/L) for Cellic CTec2 were enhanced to 23.8 ± 0.7 , 28.5 ± 0.9 and 32.2 ± 1.2 (g/L) of total sugars. The saccharification of autohydrolysed sugarcane bagasse samples also showed improved hydrolysis with cocktail (Cellic CTec2 and TlXyl) resulting in glucose levels of 30.1 ± 1.0 , 44.8 ± 1.8 and 56.4 ± 1.8 (g/L) and total sugars corresponding to 38.7 ± 1.5 , 55.8 ± 2.1 and 75.2 ± 3.0 (g/L) at, respectively, 10, 15 and 20 % (w/v) substrate loadings after 96 h of hydrolysis (Fig. 1B). Based on these values the observed fold increase in glucose was 1.13, 1.18 and 1.24 whereas, fold increase in total sugars was 1.17, 1.22 and 1.28 at 10, 15 and

20 % (w/v) substrate loadings, respectively, when compared to a benchmark Cellic CTec2. Finally, hydrothermally pretreated bagasse hydrolyzed by cocktail showed considerably higher levels of glucose in the hydrolysate. For benchmark Cellic CTec2, the observed glucose levels after 96 h of saccharification were 44.1 ± 1.1 , 61.3 ± 1.1 and 90.7 ± 3.2 (g/L) that, with addition of TlXyl, increased to 62.1 ± 1.6 , 84.0 ± 2.6 and 117.8 ± 2.9 (g/L) at 10, 15 and 20 % (w/v) substrate loadings. This corresponds to 1.41, 1.37 and 1.3-fold increase, respectively (Fig. 3.1C). The data clearly suggest that thermostable xylanase from *T. lanuginosus* is catalytically active and promotes more efficient plant biomass hydrolysis when compared to xylanase of other mesophilic fungal sources. (46 – 49) These results demonstrate that applied enzymatic loadings of commercial cocktails could be significantly lowered by addition of auxiliary enzymes such as thermostable xylanases, for example. Previous work has suggested that GH11 can act as an important auxiliary enzyme capable of boosting biomass hydrolysis due to its ability to effectively hydrolyze various xylanolytic substrates. (43, 50, 51) GH11 xylanase, owing its relatively low molecular weight presumably gets an easy access to the xylan backbone in the complex cellulose-hemicellulose-lignin matrix. (52, 53) Of the different studied pretreatments, saccharification of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse resulted in significantly higher levels of glucose and total sugars ($F_{cal} > F_{crit}$ at $\alpha 0.05$, $p < 0.05$) when compared to autohydrolytically pretreated bagasse and can be considered a better pretreatment option.

Figure 3. 1 - Saccharification of (A) native (B) hydrothermally (C) autohydrolytically pre-treated sugarcane bagasse with benchmark (Cellic CTec 2) and cocktail CTec2/Tlxyl of *T. lanuginosus*).

3.2. Effect of pretreatments on sugarcane bagasse chemical composition

Hydrothermal pretreatment utilizes only water as a solvent, and does not require expensive and hazardous chemicals, as compared with the other pretreatment methods. This reduces the corrosion of equipment and avoids the need for solvent recycling and safe handling, thus making it simple, cost effective, and environmentally friendly. (54) At high temperatures acetic acid, generated by the removal of hemicellulose acetyl groups, catalyzes the breakdown of hemicellulose polysaccharides into shorter chain oligosaccharides and simple sugars. (55, 56) Hemicellulose removal and solubilization leads to an increased concentration of cellulose in the remaining solids. Percentage-wise the lignin fraction remains almost unchanged in the remaining solid fraction, which indicates its partial solubilization and removal (Table 3. 1). Furthermore, autohydrolysis pretreatment removes

more hemicellulose than hydrothermal process (Table 3. 1). This fact can be explained by the higher acetic acid concentration in the former pretreatment, since under conditions of the hydrothermal pretreatment ten times more water was applied.

Table 3. 1 - Chemical composition of native and pretreated sugarcane bagasse (SCB)

Composition	SUGARCANE BAGASSE SAMPLES		
	Native	Hydrothermally pretreated	Autohydrolysis pretreatment
Dry mass to pretreatment (g)		10	10
Monomeric compounds in liquor (g)			
Glucose		0.4 ± 0.001	0.4 ± 0.01
Formic acid		0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.001
HMF		0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.001
Xylose		2.4 ± 0.02	2.7 ± 0.03
Arabinose		0.08 ± 0.001	0.1 ± 0.01
Acetic acid		0.3 ± 0.001	0.3 ± 0.01
Furfural		0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.003
MASS RECOVERY IN INSOLUBLE FRACTION (FIBER - g)			
Insoluble solids	10.9	6.5 ± 0.5	6.0 ± 0.2
Extractives	0.9 ± 0.1	-	-
Cellulose	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.3	3.8 ± 0.2
Hemicellulose	2.7 ± 0.1	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.01
Total Lignin	2.7 ± 0.05	1.9 ± 0.04	1.6 ± 0.04
Ashes	0.6 ± 0.02	0.08 ± 0.05	0.3 ± 0.01
Total	10.9 ± 0.5	6.5 ± 0.5	5.9 ± 0.3

3.3. Biophysical analysis of native and pretreated substrates

The effects of each pretreatments on the structure and morphology of the substrates were studied using a number of physical techniques.

3.3.1. Field emission scanning electron microscopy (FESEM) images of substrates

Raw sugarcane bagasse (Figure 3. 2 A) is characterized by the tightly packed fiber bundles covered by a layer of lignin at the surface. Applied pretreatments (Figure 3. 2 B and C) partially remove the surface layer and expose sugarcane bagasse fiber bundles. This effect is probably caused by partial delignification of sugar cane bagasse samples and lignin redeposition caused by pretreatments. Lignin acts as an adhesive that joins the fibers together and, when it is removed, the fibers lose their tightly packed assembly and began to separate. More information about the lignin fraction in the cell wall, was obtained by CLSM technique.

Figure 3. 2 - Scanning electron microscopy field emission source (FESEM) images of (A) raw SCB, (B) hydrothermally pretreated SCB and (C) autohydrolytically pretreated SCB samples.

3.3.2. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analyses of the substrates

To obtain more detailed information about the lignin fraction in the cell wall, before and after pretreatments, we applied CLSM technique. CLSM is a fluorescence imaging technique that allows the chemical mapping of chromophores on the various sample layers, both on the surface and in the inner regions, by adjusting the focal plane. (37) Lignin is a chromophore, and thus its redistribution can be imaged by detection of its intrinsic fluorescence. Here, CSLM images were obtained from the surface of the bagasse samples.

Figure 3.3 shows CLSM images before and after the pretreatments. Each pixel of these images contains the information about emission spectrum of lignin at that particular position. Untreated SCB (Fig. 3.3 A and B) mainly emits fluorescence in a blue range (400–500 nm) of electromagnetic spectrum and very few alterations are observed in replicates images. Pretreated SCB samples (Fig. 3.3 C–F) emit in somewhat longer wavelength regions that vary according to the pretreatment. In hydrothermally pretreated samples (Fig. 3.3 C and D) there is a very slight shift toward longer wavelengths, turning fluorescence emission color green-bluish, whereas notably stronger changes in its fluorescence emission and lignin redeposition are observed in autohydrolytically pretreated samples (Fig. 3.3 E

and F). In the latter case, red fluorescence emission of the lignin redeposited at the surface and within plant cells can be clearly seen. Spectral changes between pretreated and untreated samples are related to deconstruction in the well-structured lignin assembly within the plant cell wall as reported in previous studies. (31, 37)

Figure 3. 3 - CLSM image of untreated SCB (A - B) and the samples after hydrothermal (C - D) and autohydrolytical pretreatment (E - F).

Although large amount of lignin remains in the pretreated samples (Table 3.1), the CLSM images reveal that the pretreatments (particularly autohydrolysis pretreatment) caused its considerable redistribution (Fig. 3.3). Longer emission wavelengths and thus lower energy of electron states are associated with the formation of complex molecular aggregates. (37) High temperatures of pretreatments result not only in a release of acetic acid and consequent hemicellulose hydrolysis, but also in melting down of the native lignin and its considerable redistribution and condensation. CSLM images of autohydrolytically

pretreated bagasse (Fig. 3.3 E and F) clearly show lignin deposits accumulated at the fibers surfaces and also in the middle of the plant cells as a result of condensation and redeposition of melted and modified lignin fragments. (57) Notably, the same is not observed for hydrothermally pretreated samples (Fig. 3.3 C and D). This can be explained by considerably lower amount of water available during autohydrolysis pretreatment conditions which leads to higher concentration of acetic acid derived from acetyl groups of hemicellulose and subsequently stronger hemicellulose catalytic fragmentation and removal (Table 3.1). In addition, hemicellulose and lignin are covalently linked in the native biomass, and relatively high solubility of short-chain hemicellulose oligomers could promote dissociation of the attached lignin fragments. (57) This leads to melted lignin precipitation within the cell walls forming lignin wires and at the surface of the plant biomass in the form of lignin spheres (Fig. 3.3 E and F). To obtain further information on morphological characteristics of the samples, XRD and ssNMR analyses of native and pretreated SCB biomass samples was carried out.

To obtain more information on morphological characteristics of the samples, XRD and ssNMR analyses of native and pretreated SCB biomass samples was carried out.

3.3.3. X-Ray Diffraction of native and pretreated SCB

Crystallinity of a lignocellulosic material is related to its composition wherein most of the hemicellulose and lignin are amorphous, and cellulose is predominantly crystalline. (58) The XRD measurements are based on a comparison of the diffraction intensities from crystalline cellulose and the total amorphous fraction of the biomass including lignin and amorphous hemicelluloses. Table 3.2 shows the crystallinity indices (CrIs) and average crystallite sizes of native and pretreated biomass samples as estimated by XRD technique. The CrIs of the pretreated samples decrease in comparison with native sample (55.9 %), and the lowest CI was observed for hydrothermally pretreated SCB samples (49 %). The cellulose crystallite sizes also were affected by the pretreatments, being high (3.5 ± 0.1 nm) for hydrothermally pretreated SCB samples against 2.7 ± 0.2 nm for the native biomass (Table 3.2). Decrease in crystallinity is directly related to increased amorphization caused by pretreatment which frequently manifests itself in improved enzymatic hydrolysis. Furthermore, pretreatments cause removal of hemicelluloses (Table 3.1) which cover cellulose crystals (59) and are known to be strong inhibitors of cellulases. (60) The

hemicelluloses also act as intercrystallite spacers and their removal promotes direct interfacing between cellulose crystallites. This enables co-crystallization and fusion of crystallites in pretreated biomass samples that result in the crystallites with larger dimensions and partial cellulose de-crystallization in crystallite interface regions. (61, 62) An increase in the crystallite width and the cross-section of crystallite aggregates were shown to be directly related to increase hydration of cellulose bundles (61), therefore improved accessibility to enzymatic attack. Therefore, a combination of hemicellulose removal and an addition of a layer of disordered, hydrated cellulose at crystallite surfaces as a result of the applied pretreatments jointly favour an increased enzymatic digestibility of the pretreated sugarcane bagasse samples.

Table 3. 2 - X-ray diffraction (XRD) experiments data. Crystallinity indices and average crystallite sizes from native and pretreated biomass samples

Sample	Crystallinity index (%)	Crystallite Size (nm)
Native	56 ± 1	2.7 ± 0.2
Autohydrolysis	52 ± 2	3.3 ± 0.3
Hydrothermal	49 ± 1	3.5 ± 0.1

3.3.4. ssNMR analysis of native and pretreated SCB samples.

Next, we applied solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) technique to detect specific changes in the biomass components, by analyzing chemical shifts in correspondent ssNMR spectra. CPMAS TOSS spectrum of native and pretreated SCB signals assigned to cellulose, lignin and hemicelluloses is given in Fig. 3. 4 A. Peaks between 50 and 120 ppm are mainly from cellulose carbons, but some peaks correspond to hemicellulose and lignin groups. (44) Specifically, hemicelluloses peaks are present throughout the spectral region, contributing to peaks identified as 1, 3, 6, 7, 9 and 17 (Fig. 3. 4 A). Peaks 2, 11, 12, 13, 14, 15 and 16 correspond to lignin moieties. (63, 64) CPMAS TOSS spectrum of pretreated bagasse samples show quite considerable changes, revealing that for both of applied pretreatments hemicellulose is removed (peaks 1 and 17 are reduced or absent) as well as a part of lignin fraction (Fig. 3. 4 B). This is consistent with the results of chemical composition (Table 3. 1). Thus, ^{13}C ssNMR spectra (Fig. 3. 4) and a chemical

compositional analysis (Table 3. 1) consistently indicate strong removal of the hemicellulose from the SCB samples by both applied pretreatments.

Figure 3. 4 - CPMAS TOSS spectra of native sugarcane bagasse (A) and after hydrothermal and autohydrolytic pretreatments (B).

Specifically, it is possible to notice that acetyl groups of hemicelluloses were removed (Fig. 3. 4 B, peak 1, at 21 ppm) after the pretreatments, which is consistent with the autocatalytic process involved in the pretreatments. A peak at 180 ppm (Fig. 3. 4) can be attributed in pretreated samples to carbonyl resonance from acetyl groups in aliphatic acids and C-6 of glucuronic acid residues in xylan. Consistently with X-ray diffraction experiments, comparison of peaks 7 and 8 from untreated and pretreated SCB samples (Fig. 3. 4 A and B) suggests that the sample crystallinities were changed by the pretreatments.

3.4. Morphological analysis of the SCB samples after enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis of the native sugarcane bagasse and of the pretreated samples were carried out at low, moderate and high substrate loading corresponding to 10 %, 15 % and 20 % (w/v) of SCB in solution, respectively. Chemical composition and physical structure of the biomass samples have impacts on the yields of enzymatic hydrolysis. For example, lignin structure and deposition have considerable influence on enzymatic hydrolysis yields caused by adsorption of cellulases on lignin from pretreated pulps, which also might be associated with the changes in lignin structure caused by pretreatment. (65) The results shown in Fig. 3. 2, Fig. 3. 3 suggest that lignin fraction suffered much stronger alterations during autohydrolysis pretreatment, which resulted in lower enzymatic hydrolysis yields as compared to those after hydrothermal pretreatment (Figure 3. 1). This

might indicate that cellulases may have been partially adsorbed by condensed and redeposited lignin, which also play a role of a physical barrier that limits an access of enzymes to the pretreated biomass samples. Therefore, we applied the same range of physical techniques to the residual SCB samples remaining after the enzymatic hydrolysis reactions to identify features that possibly impacted observed enzymatic hydrolysis yields (Figure 3. 1).

3.4.1. Enzymatically hydrolysed native SCB samples

3.4.1.1 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS of the native sugarcane bagasse residual remaining after enzymatic hydrolysis

Native SCB samples after enzymatic hydrolysis using CTec2 with or without xylanase reveal similar CLSM images as the ones shown before (compare Fig. S1 and 3.3 A & 3B). Lignin in the samples basically emits in a blue wavelength range, similar to its emission from the native non-hydrolyzed samples. ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS analyses (SM, Fig. S2) also do not reveal significant changes. This is consistent with the low efficiency of enzymatic hydrolysis of the native SCB samples with Cellic CTec2 in the presence or in the absence of TiXyl.

3.4.1.2. FESEM analysis of the native SCB samples subjected to enzymatic hydrolysis

FESEM images of the raw bagasse samples after enzymatic hydrolysis (Figure 3. 5) reveal clear changes caused by the action of the enzymes. It is possible to observe the deconstruction of the fibers and unstructuring of the cellulose bundles that are becoming more exposed under the action of the enzymes. Enzymatic hydrolysis also promoted appearance of holes and cracks which is consistent with the removal of polysaccharides under the action of enzymes (Figure 3. 5). However, differences caused by xylanase addition are not evident from the FESEM images only.

Figure 3. 5 - Scanning electron microscopy field emission source (FESEM) images of the raw bagasse samples after saccharification by CTec 2 at different substrate loading rates A) 10 %; B) 15%; C) 20 % (w/v); CTec 2 supplemented with xylanase D) 10 %; E) 15%; F) 20 % (w/v).

3.4.2 Enzymatically hydrolysed pretreated SCB samples

3.4.2.1 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) of the pretreated sugarcane bagasse subjected to enzymatic hydrolysis

Enzymatic saccharification of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse showed increased levels of modification in the lignin conformation (compare Figure 3. 6 with Figures 3. 3 C and D). Notably all samples after enzymatic hydrolysis start to emit fluorescence in the longer wavelength region (between green and red; 500 – 700 nm). These longer wavelengths are related to unstructuring of the well-organized lignin assembly within the plant cell wall.

Figure 3. 6 - CLSM images from hydrothermally pretreated sugarcane bagasse after enzymatic hydrolysis with CTec 2 at different substrate loading (A - F). A) 10 %; B) 15%; C) 20 % (w/v) loadings of the substrate; CTec 2 supplemented with xylanase D) 10 %; E) 15%; F) 20 % (w/v). CLSM images from autohydrolysis pretreatment in sugarcane bagasse after enzymatic hydrolysis with CTec 2 at different substrate loading. G) 10 %; H) 15%; I) 20 % (w/v) loadings of the substrate; CTec 2 supplemented with xylanase J) 10 %; K) 15%; L) 20 % (w/v).

Interestingly, the surfaces of the samples after enzymatic hydrolysis with Cellic CTec2 supplemented with TlXyl (shown in Fig. 3. 6 F) reveal considerably less homogeneous spectral distribution. The lignin fraction of these samples emits mostly in a red spectral region, but also blue and green emission can be observed in some parts of the samples, which indicates considerable non-homogeneity of lignin structures and its electronic states. In a most part the lignin suffered rearrangements forming modified structures and agglomerates (such as red droplets observed in Fig. 3. 6 F). Nevertheless, in some areas of

the SCB samples the lignin still emits in blue region, which is characteristic of non-modified lignin. This might indicate that TlXyl addition facilitated hydrolysis of xylan backbone and consequent removal of the surface layers of lignin, exposing less modified internal lignin structures, observed in these particular parts of the SCB samples.

Autohydrolysis pretreatment of SCB results in many more lignin dropets both on the surface and within the central cavity of the cell walls than hydrothermal pretreatment (Fig. 3.3 E & F). This could explain higher enzymatic efficiency observed for the hydrothermally pretreated SCB samples as compared to autohydrolytically pretreated ones. Both pretreatments result in practically the same amount of residual lignin in the samples (Table 3.1 and Fig. 3. 4B), but the nature of pretreatments imprints considerably different molecular rearrangements of lignin, with autohydrolysis pretreatment generating higher amounts of modified and aggregated lignin.

In general, lignin displays self-aggregation property resulting in colloidal structures in solution. (66) Solubilized lignin molecules covalently react between themselves to form larger aggregates, thus affecting their molecular structures, which can further self-associate to form even bigger aggregates. (37, 57, 66) Previous studies explained that under acidic conditions, carbonium ion intermediates are formed with a high affinity for nucleophiles within the lignin structure. (67) The same situation holds for autohydrolysis pretreatment, which liberates acetic acid. Hydrolysis leads to depolymerization, while reactions between the carbonium ions and nucleophiles lead to lignin repolymerization and condensation. (68)

Previous studies (65) demonstrated that cellulases can be trapped in the lignin network due to the increased degree of its condensation and this has negative impacts on the efficiency of lignocellulosic biomass enzymatic hydrolysis, since the enzymes non-productively bound to lignin become unavailable for hydrolysis of the carbohydrates. Furthermore, precipitated and surface-aggregated lignin works as a physical barrier that limits access of the enzymes to the polysaccharide fraction of the biomass. Hydrothermally pretreated samples show lower lignin aggregation (Fig. 3. 3 C and D) than those subjected to autohydrolysis pretreatment, which leads to better enzymatic hydrolysis yields of the former samples. Therefore, degree of lignin repolymerization and aggregation seems to have an important impact on cellulase action in enzymatic hydrolysis of the studied SCB samples.

3.4.2.2 FESEM analysis of the pretreated SCB samples subjected to enzymatic hydrolysis

The surface of the pretreated SCB samples after enzymatic hydrolysis is much more heterogeneous as compared to the correspondent pretreated, but not hydrolysed, samples (Figure 3. 7). Xylanase addition leads to larger amounts of small cavities and cracks in the biomass structure (Figure 3. 7 D - F and J - L), which is consistent with higher efficiency of cocktail (Cellic CTec2+xylanase) mixture as compared to benchmark Cellic CTec 2.

Figure 3. 7 - Scanning electron microscopy field emission source (FESEM) images of hydrothermally (A - F) and autohydrolytically (G - L) pretreated SCB samples after enzymatic hydrolysis with CTec 2 at different substrate loadings. A and G) 10%; B and H) 15%; C and I) 20 % (w/v). Enzymatic hydrolysis supplemented with xylanase at different substrate loadings: D and J) 10 %; E and K) 15%; F and L) 20 % (w/v).

This can be explained by the fact that the xylanase addition promotes more efficient removal of the carbohydrate fractions of the pretreated SCB leaving behind less structured and more fragmented lignin-rich residues. On the comparison of the FESEM images of the residual SCB biomass after autohydrolysis pretreatment and enzymatic saccharification with benchmark Cellic CTec2 as well as cocktail (Cellic CTec2+TlXyl), it clearly shows more fragmented structure of the later samples (Fig. 3. 7). TlXyl addition seems to result in more efficient removal of the carbohydrate fractions of the pretreated SCB leaving behind less structured and more fragmented lignin residue.

3.4.2.3. ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS studies of the pretreated SCB samples subjected to enzymatic hydrolysis

Analysis of ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS spectra of hydrothermally pretreated samples reveals that the peaks 2, 3 and 4 (Fig. 3. 8) after enzymatic hydrolysis by benchmark Cellic CTec2 without TlXyl are different in comparison to the samples after enzymatic hydrolysis by Cellic CTec2 in the presence of TlXyl.

Figure 3. 8 - ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS spectra of hydrothermally (HT) pretreated samples after enzymatic hydrolysis. HT + Benchmark denominates ssNMR spectra of the samples after enzymatic hydrolysis with benchmark (Cellic CTec2) and HT + AEX labels the samples enzymatically hydrolyzed by cocktail (Cellic CTec2+ TlXyl) at different substrate loadings. Peaks 2, 3 and 4

indicate the signals from aryl methoxyl carbons of lignin; C6 carbon of non-crystalline cellulose and C6 carbon of hemicelluloses, and C6 carbon of crystalline cellulose, respectively.

For example, a signal from aryl methoxyl carbons of lignin (peak 2) is stronger in residual SCB samples after enzymatic hydrolysis with Cellic CTec2 supplemented with the xylanase as compared to C6 carbon of non-crystalline cellulose and C6 carbon of hemicelluloses (peak 3) and C6 carbon of crystalline cellulose (peak 4). This could be explained by the enhanced hydrolytic action of the enzymes upon polysaccharides (peak 3 and 4), without affecting lignin fraction (peak 2).

^{13}C ssNMR CPMAS TOSS spectra of autohydrolytically pretreated residual samples after saccharification with Cellic CTec2 and CTec2+TlXyl (SM, Fig. S3) showed clear differences in the chemical composition as compared with the non-hydrolyzed sample (Fig. 3.4). This is consistent with the removal of cellulose and hemicellulose fractions and enrichment of the lignin fraction in the remaining solids. However, ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS experiments are not sensitive enough to show the differences in the chemical composition of the samples caused by supplementation with the xylanase.

3.4.2.4. X-ray diffraction experiments of pretreated and enzymatically hydrolyzed samples.

X-ray diffraction data show that cellulose crystallinity in the SCB samples which underwent enzymatic hydrolysis with commercial benchmark (Cellic CTec2) without additional pretreatment step stays practically the same (in 53 – 56 % range for native samples, in 47 – 52 % for autohydrolytically pretreated and 48 – 53 % for hydrothermally pretreated samples; Table 3. 2). Small differences were observed for different samples, but considering the standard errors, it is impossible to confirm that crystallinity indexes changed (compare Table 3. 2, Table 3. 3). However, addition of TlXyl to enzymatic mixture promoted statistically significant decrease in crystallinity indices of the native and autohydrolytically pretreated SCB samples ($F_{\text{cal}} < F_{\text{crit}}$, at $\alpha 0.05$, $p > 0.05$). However, the same was not observed for hydrothermally pretreated samples after enzymatic hydrolysis. This might be related to the fact that hydrothermally pretreated samples prior to enzymatic hydrolysis already had the smallest crystallinity and the largest crystallite size as compared to the native samples and the samples after autohydrolysis pretreatment (Table 3. 2), which were not affected by the enzymatic hydrolysis by Cellic CTec2 + TlXyl.

This might indicate that enzymatic hydrolysis of more efficiently pretreated samples, subjected to hydrothermal pretreatment, is more homogeneous and wears out carbohydrate polymers relatively equally, whereas a more complex and recalcitrant structure of native and autohydrolytically pretreated SCB samples leads to a less homogenous depolymerization; consequently, an increased strain and decreased crystallinity of the samples. This notion is consistent with the results of enzymatic hydrolysis of native and pretreated SCB samples (Fig. 3.1). Indeed, TlXyl addition to the benchmark Cellic Ctec2 resulted in considerable increase of total sugar yields as well as glucan saccharification (Figure 3.1) causing very significant gain in the total release of sugars in the case of hydrothermally pretreated (26 – 37 %) and native (27 – 40 %) SCB samples enzymatic hydrolysis. For the reasons eluded to above, total saccharification yields from the autohydrolytically pretreated SBC samples were less impacted by TlXyl supplementation to Cellic CTec2, resulting in 17 – 28 % gains.

Table 3.3. Crystallinity indices and average crystallite sizes of SCB residual samples after enzymatic hydrolysis as calculated from XRD experiments. AEX stands for a mixture of Cellic CTec 2 supplemented with GH11 xylanase TlXyl.

Sample	Crystallinity index (%)	Crystallite Size (nm)
Native_control10%	53 ± 1	2.9 ± 0.3
Native_control15%	53 ± 3	2.7 ± 0.1
Native_control20%	55 ± 3	2.8 ± 0.1
Native_AEX10%	41 ± 2	2.7 ± 0.1
Native_AEX15%	38 ± 1	2.7 ± 0.2
Native_AEX20%	39 ± 3	2.4 ± 0.3
Hydrothermal_control10%	49 ± 2	2.8 ± 0.1
Hydrothermal_control15%	50 ± 3	2.5 ± 0.2
Hydrothermal_control20%	53 ± 2	2.2 ± 0.1
Hydrothermal_AEX10%	48 ± 1	2.6 ± 0.1
Hydrothermal_AEX15%	49 ± 1	2.4 ± 0.1
Hydrothermal_AEX20%	50 ± 2	2.7 ± 0.1
Autohydrolysis_control10%	50 ± 2	2.8 ± 0.2
Autohydrolysis_control15%	51 ± 1	2.3 ± 0.1
Autohydrolysis_control20%	51 ± 2	2.6 ± 0.3
Autohydrolysis_AEX10%	48 ± 1	2.7 ± 0.1
Autohydrolysis_AEX15%	39 ± 3	2.5 ± 0.3
Autohydrolysis_AEX20%	39 ± 2	2.0 ± 0.2

4. CONCLUSIONS

This study demonstrates a critical role of GH11 TlXyl xylanase from thermophilic *Thermomyces lanuginosus* fungi in enhancing sugarcane bagasse saccharification when added to highly active commercial cellulase benchmark Cellic CTec2. Using a wide range of physical techniques, including confocal laser scanning microscopy, field emission scanning electron microscopy, X-Ray diffraction and solid state nuclear magnetic resonance, it was possible to shed light on the changes in a morphology of the lignocellulosic biomass and its lignin structures which had strong impacts on the enzymatic hydrolysis efficiency. Under applied experimental conditions, hydrothermal pretreatment led to considerably better enzymatic hydrolysis yields as compared to autohydrolytic pretreatment process. This fact is most probably related to the efficient removal of hemicellulose and moderate changes in lignin structure and distribution in the hydrothermally pretreated plant biomass samples that positively impacted an access of enzymes to their insoluble polymeric substrates. Furthermore, detailed studies of chemical composition and physical structure of the SCB samples unveiled important structural and chemical modifications introduced by the pretreatments and also enzymatic hydrolysis in the sugarcane biomass samples. This knowledge can be useful for deeper comprehension of bioconversion processes of different lignocellulosic substrates by themselves and within biorefinery settings.

Acknowledgements

This research was also supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) via grants 405191/2015-4, 140667/2015-6, 158752/2015-5, 303988/2016-9 and 440977/2016-9 and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) via grant #2015/13684-0. The FESEM experiments were carried out with the assistance of MSc. Wagner Rafael Correr, Department of Materials Engineering, University of São Paulo.

REFERENCES

- (1) J. Whitaker, J.L. Field, C. J Bernacchi, C.E. Cerri, R. Ceulemans, C.A. Davies, E.H. DeLucia, I.S. Donnison, J.P. McCalmont, K. Paustian, R.L. Rowe, P. S, P. Thornley, N.P. McNamara. Consensus, uncertainties and challenges for perennial bioenergy crops and land use. *GCB Bioenergy*, 10 (3) (2018), pp. 150-164, 10.1111/gcbb.12488
- (2) L.M. Fulton, L.R. Lynd, A. Körner, N. Greene, L.R. Tonachel. The need for biofuels as part of a low carbon energy future. *Biofuels Bioprod. Bior.*, 9 (5) (2015), pp. 476-483, 10.1002/bbb.1559
- (3) N. Jordan, G. Boody, W. Broussard, J.D. Glover, D. Keeney, B.H. McCown, G. McIsaac, M. Muller, H. Murray, J. Neal, C. Pansing, R.E. Turner, K. Warner, D. Wyse. Sustainable development of the agricultural bio-economy. *Science*, 316 (5831) (2007), pp. 1570-1571, 10.1126/science.1141700
- (4) B.P. Werling, T.L. Dickson, R. Isaacs, H. Gaines, C. Gratton, K.L. Gross, H. Liere, C.M. Malmstrom, T.D. Meehan, L. Ruan, B.A. Robertson, G.P. Robertson, T.M. Schmidt, A.C. Schrotenboer, T.K. Teal, J.K. Wilson, D.A. Landis. Perennial grasslands enhance biodiversity and multiple ecosystem services in bioenergy landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.*, 111 (2014), pp. 1652-1657, 10.1073/pnas.1309492111
- (5) A. Welfle, P. Thornley, M. Röder. A review of the role of bioenergy modelling in renewable energy research & policy development. *Biomass Bioenergy*, 136 (2020), p. 105542, 10.1016/j.biombioe.2020.105542
- (6) G.P. Robertson, S.K. Hamilton, B.L. Barham, B.E. Dale, R.C. Izaurralde, R.D. Jackson, D.A. Landis, S.M. Swinton, K.D. Thelen, J.M. Tiedje. Cellulosic biofuel contributions to a sustainable energy future: choices and outcomes. *Science*, 356 (6345) (2017), 10.1126/science.aal2324eaal2324
- (7) A.K. Chandel, J.Q. Albarelli, D.T. Santos, S.P. Chundawat, M. Puri, M.A.A. Meireles. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. *Biofuels Bioprod. Bior.*, 13 (4) (2019), pp. 994-1014, 10.1002/bbb.1990
- (8) G.J.M. Rocha, C. Martin, I.B. Soares, A.M.S. Maior, H.M. Baudel, C.A.M. de Abreu. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass Bioenergy*, 35 (1) (2011), pp. 663-670, 10.1016/j.biombioe.2010.10.018
- (9) M.E. Himmel, S. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady, T.D. Foust. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzyme for biofuels production. *Science*, 315 (2007), pp. 804-807, 10.1126/science.1137016
- (10) S.P.S. Chundawat, G.T. Beckham, M.E. Himmel, B.E. Dale. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 2 (2011), pp. 121-145, 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205
- (11) D. Humbird, R. Davis, L. Tao, C. Kinchin, D. Hsu, A. Aden, P. Schoen, J. Lukas, B. Olthof, M. Worley, D. Sexton, D. Dudgeon. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment

and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. *National Renewable Energy Laboratory*, Golden (2011). Report No. NREL/TP-5100-47764. <https://www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf>

(12) P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.*, 101 (13) (2010), pp. 4851-4861, 10.1016/j.biortech.2009.11.093

(13) J. Hu, V. Arantes, A. Pribowo, K. Gourlay, J.N. Saddler. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ. Sci.*, 7 (7) (2014), pp. 2308-2315, 10.1039/C4EE00891J

(14) J. Ding, C.G. Yoo, Y. Pu, M. Meng, S. Bhagia, C. Yu, A.J. Ragauskas. Cellulolytic enzyme-aided extraction of hemicellulose from switchgrass and its characteristics. *Green Chem.*, 21 (2019), pp. 3902-3910, 10.1039/C9GC00252A

(15) M.A. Kabel, G. Bos, J. Zeevalking, A.G.J. Voragen, H.A. Schols. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresour. Technol.*, 98 (10) (2007), pp. 2034-2042, 10.1016/j.biortech.2006.08.006

(16) J. Shekiri, E.M. Kuhn, M.J. Selig, N.J. Nagle, S.R. Decker, R.T. Elander. Enzymatic conversion of xylan residues from dilute acid-pretreated corn stover. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 168 (2) (2012), pp. 421-433, 10.1007/s12010-012-9786-5

(17) T. Zhang, R. Kumar, Y.D. Tsai, R.T. Elander, C.E. Wyman. Xylose yields and relationship to combined severity for dilute acid post-hydrolysis of xylooligomers from hydrothermal pretreatment of corn stover. *Green Chem.*, 17 (1) (2015), pp. 394-403, 10.1039/C4GC01283F

(18) R. Kumar, C.E. Wyman. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.*, 25 (2) (2009), pp. 302-314, 10.1002/btpr.102

(19) J. Zhang, P. Tuomainen, M. Siika-aho, L. Viikari. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.*, 102 (19) (2011), pp. 9090-9095, 10.1016/j.biortech.2011.06.085

(20) A. Berlin, V. Maximenko, N. Gilkes, J. Saddler. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 97 (2) (2007), pp. 287-296, 10.1002/bit.21238

(21) K. Öhgren, R. Bura, J. Saddler, G. Zacchi. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.*, 98 (13) (2007), pp. 2503-2510, 10.1016/j.biortech.2006.09.003

(22) R. Bura, R. Chandra, J. Saddler. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnol. Prog.*, 25 (2) (2009), pp. 315-322, 10.1002/btpr.98

- (23) M.P. García-Aparicio, M. Ballesteros, P. Manzanares, I. Ballesteros, A. González, M.J. Negro. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 137 (2007), pp. 353-365, 10.1007/978-1-60327-181-3_31
- (24) A. Suurnäkki, T. Li, J. Buchert. Effects of enzymatic removal of xylan and glucomannan on the pore size distribution of kraft fibres. *Holzforschung-Int. J. Biol. Chem. Phy. Technol. Wood.*, 51 (1) (1997), pp. 27-33, 10.1515/hfsg.1997.51.1.27
- (25) K. Wong, E. de Jong, J. Saddler, R.W. Allison. Mechanisms of xylanase-aided bleaching of kraft pulps. Part I: process parameters. *Appita J.*, 50 (5) (1997), pp. 415-422
- (26) T. Jeoh, D.B. Wilson, L.P. Walker. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. *Biotechnol. Prog.*, 22 (1) (2006), pp. 270-277, 10.1021/bp050266f
- (27) D. Wilson. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1125 (1) (2008), pp. 289-297, 10.1196/annals.1419.026
- (28) A. Aden, M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechura, K. Neeves, J. Sheehan, B. Wallace, L. Montague, A. Slayton, J. Lukas. Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. *National Renewable Energy Laboratory*, Colorado (2002), 10.2172/15001119
- (29) M.E. Himmel, M.F. Ruth, C.E. Wyman. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10 (4) (1999), pp. 358-364, 10.1016/S0958-1669(99)80065-2
- (30) C.E. Wyman. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.*, 25 (4) (2007), pp. 153-157, 10.1016/j.tibtech.2007.02.009
- (31) M. Espirito Santo, C.A. Rezende, O.D. Bernardinelli, N. Pereira, A.A.S. Curvelo, E.R. deAzevedo, F.E.G. Guimarães, I. Polikarpov. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Ind. CropsProd.*, 113 (2018), pp. 64-74, 10.1016/j.indcrop.2018.01.014
- (32) K.G. Sonia, B.S. Chadha, H.S. Saini. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.*, 96 (14) (2005), pp. 1561-1569, 10.1016/j.biortech.2004.12.037
- (33) N.A. Bennett, J. Ryan, P. Biely, M. Vrsanska, L. Kremnický, B.J. Macris, D. Kekos, P. Christakopoulos, P. Katapodis, M. Claeysens, W. Nerinckx, P. Ntauma, M.K. Bhat. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. *Carbohydr. Res.*, 306 (3) (1998), pp. 445-455, 10.1016/S0008-6215(97)10076-3
- (34) P. Biely, D. Kluepfel, R. Morosoli, F. Shareck. Mode of action of three endo- β -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*, *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) - protein Struct. Mol. Enzy*, 1162 (3) (1993), pp. 246-254, 10.1016/0167-4838(93)90288-3
- (35) B. Kaur, M. Sharma, R. Soni, H. Oberoi, B. Chadha. Proteome-based profiling of hypercellulase-producing strains developed through interspecific protoplast fusion between

Aspergillus nidulans and *Aspergillus tubingensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 169 (2) (2012), pp. 393-407, 10.1007/s12010-012-9985-0

(36) G.L. Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31 (3) (1959), pp. 426-428, 10.1021/ac60147a030

(37) V.C. Coletta, C.A. Rezende, F.R. da Conceição, I. Polikarpov, F.E.G. Guimarães. Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biotechnol Biofuels*, 6 (1) (2013), p. 43, 10.1186/1754-6834-6-43

(38) O.D. Bernardinelli, M.A. Lima, C.A. Rezende, I. Polikarpov, E.R. deAzevedo. Quantitative ¹³C MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. *Biotechnol. Biofuels*, 8 (1) (2015), p. 110, 10.1186/s13068-015-0292-1

(39) S. Park, J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla, D.K. Johnson. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels*, 3 (1) (2010), p. 10, 10.1186/1754-6834-3-10

(40) A. Monshi, M.R. Foroughi, M.R. Monshi. Modified scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. *World J. Nano Sci. Eng.*, 2 (3) (2012), pp. 154-160, 10.4236/wjnse.2012.23020

(41) P. Scherrer. Bestimmung der inneren Struktur und der Größe von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. R. Zsigmondy (Ed.), *Kolloidchemie Ein Lehrbuch*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (1912), pp. 387-409, 10.1007/978-3-662-33915-2_7

(42) C.A. Rezende, M.A. Lima, P. Maziero, E.R. de Azevedo, W. Garcia, I. Polikarpov. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels*, 4 (1) (2011), p. 54, 10.1186/1754-6834-4-54

(43) K. Naveen, S.C. Agrawal, P.C. Jain, H.S.G. Vishwavidyalaya. Production and properties of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* NK-2 grown on lignocelluloses. *Biotechnol.*, 5 (2) (2006), pp. 148-152, 10.3923/biotech.2006.148.152

(44) A.K. Kumar, S. Sharma. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour. Bioprocess.*, 4 (1) (2017), p. 7, 10.1186/s40643-017-0137-9

(45) S. Singh, P. Reddy, J. Haarhoff, P. Biely, B. Janse, B. Pillay, D. Pillay, B.A. Prior. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. *J. Biotechnol.*, 81 (2) (2000), pp. 119-128, 10.1016/S0168-1656(00)00279-0

(46) G.A.L. Gonçalves, Y. Takasugi, L. Jia, Y. Mori, S. Noda, T. Tanaka, H. Ichinose, N. Kamiya. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzym. Microb. Technol.*, 72 (2015), pp. 16-24, 10.1016/j.enzmictec.2015.01.007

(47) J. Hu, V. Arantes, J.N. Saddler. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an

additive or synergistic effect? *Biotechnol. Biofuels*, 4 (1) (2011), p. 36, 10.1186/1754-6834-4-36

(48) J. Hu, V. Arantes, A. Pribowo, J.N. Saddler. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnol. Biofuels*, 6 (1) (2013), p. 112, 10.1186/1754-6834-6-112

(49) Q. Qing, C.E. Wyman. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnol. Biofuels*, 4 (1) (2011), p. 18, 10.1186/1754-6834-4-18

(50) J.Y. Sun, M.Q. Liu, Y.L. Xu, Z.R. Xu, L. Pan, H. Gao. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement, *Protein Expr Purif*, 42 (1) (2005), pp. 122-130, 10.1016/j.pep.2005.03.009

(51) K.K. Wong, L.U. Tan, J.N. Saddler. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.*, 52 (3) (1988), pp. 305-317, 10.1128/MMBR.52.3.305-317.1988

(52) E. Bonnin, S. Daviet, J. Sørensen, O. Sibbesen, A. Goldson, N. Juge, L. Saulnier. Behaviour of family 10 and 11 xylanases towards arabinoxylans with varying structure. *J. Sci. Food Agric.*, 86 (11) (2006), pp. 1618-1622, 10.1002/jsfa.2501

(53) L. Viikari, A. Kantelinen, J. Sundquist, M. Linko. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13 (2) (1994), pp. 335-350, 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00053.x

(54) G.D.H. P Garrote, H. Dominguez, J.C. Parajo. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 57 (3) (1999), pp. 191-202, 10.1007/s001070050039

(55) A.A. Roos, T. Persson, H. Krawczyk, G. Zacchi, H. Stålbrand. Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks. *Bioresour. e Technol.*, 100 (2) (2009), pp. 763-769, 10.1016/j.biortech.2008.07.022

(56) M.S. Tunc, A.R.P. van Heiningen. Characterization and molecular weight distribution of carbohydrates isolated from the autohydrolysis extract of mixed southern hardwoods. *Carbohydr. Polym.*, 83 (1) (2011), pp. 8-13, 10.1016/j.carbpol.2010.07.015

(57) C. Liu, C.E. Wyman. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42 (21) (2003), pp. 5409-5416, 10.1021/ie030458k

(58) J. Gabhane, S.P.M. Prince William, A.N. Vaidya, K. Mahapatra, T. Chakrabarti. Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment – a cellulosic ethanol perspective. *Biomass Bioenergy*, 35 (1) (2011), pp. 96-102, 10.1016/j.biombioe.2010.08.026

(59) M. Busse Wicher, T.C.F. Gomes, T. Tryfona, N. Nikolovski, K. Stott, N.J. Grantham, D.N. Bolam, M.S. Skaf, P. Dupree. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 79 (3) (2014), pp. 492-506, 10.1111/tpj.12575

- (60) J. Zhang, M. Tang, L. Viikari. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresour. Technol.*, 121 (2012), pp. 8-12, 10.1016/j.biortech.2012.07.010
- (61) C. Driemeier, F.M. Mendes, B.S. Santucci, M.T.B. Pimenta. Cellulose co-crystallization and related phenomena occurring in hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. *Cellulose*, 22 (2015), pp. 2183-2195, 10.1007/s10570-015-0638-7
- (62) R.L. Silveira, S.R. Stoyanov, A. Kovalenko, M.S. Skaf. Cellulose aggregation under hydrothermal pretreatment conditions. *Biomacromolecules*, 17 (2016), pp. 2582-2590, 10.1021/acs.biomac.6b00603
- (63) D.W. Templeton, C.J. Scarlata, J.B. Sluiter, E.J. Wolfrum. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method uncertainties. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (16) (2010), pp. 9054-9062, 10.1021/jf100807b
- (64) K. Wickholm, P.T. Larsson, T. Iversen. Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS C-13 NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 312 (3) (1998), pp. 123-129, 10.1016/S0008-6215(98)00236-5
- (65) Z. Yu, K.S. Gwak, T. Treasure, H. Jameel, H.M. Chang, S. Park. Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. *ChemSusChem*, 7 (2014), pp. 1942-1950, 10.1002/cssc.201400042
- (66) K.E. Achyuthan, A.M. Achyuthan, P.D. Adams, S.M. Dirk, J.C. Harper, B.A. Simmons, A. K Singh. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. *Molecules*, 15 (12) (2010), pp. 8641-8688, 10.3390/molecules15118641
- (67) H.L. Trajano, N.L. Engle, M. Foston, A.J. Ragauskas, T.J. Tschaplinski, C.E. Wyman. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels.*, 6 (2013), p. 1, 10.1186/1754-6834-6-110110.68
- (68) J. Li, G. Henriksson, G. Gellerstedt. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.*, 98 (16) (2007), pp. 3061-3068, 10.1016/j.biortech.2006.10.018

Supplementary material (SM)

Figure 3. 1 - CLSM image of raw sugarcane bagasse samples after enzymatic hydrolysis at 20 % of substrate loading rates; A) only Cellic CTec 2 B) Cellic CTec 2 supplemented with xylanase

Figure 3. 2 - ^{13}C ssNMR CPMAS TOSS spectra of native sugarcane bagasse after enzymatic hydrolysis. Native_control corresponds to the raw SCB samples which underwent enzymatic hydrolysis with Cellic CTec 2 and Native_AEX to the samples hydrolysed with Cellic CTec 2 supplementation with xylanase at three different substrate loadings (10%, 15%, and 20%).

Figure 3.3 - ^{13}C ssNMR CPMASTOSS spectra of autohydrolytically pretreated samples (Auto) after enzymatic hydrolysis. Pretreated, but not hydrolyzed sample (Auto_10 min) serves as a control. Auto_control and Auto_AEX represent autohydrolytically pretreated samples hydrolysed with CTec 2 only and CTec 2+xylanase at different substrate loadings (10%, 15% and 20%).

Capítulo 4.

Artigo 2

Artista: Octavio Ocampo

Capítulo 4.

Artigo 2 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor sob diferentes condições de severidade, levando a distintos rendimentos de hidrólise enzimática

Nos capítulos anteriores foi demonstrado o resultado da composição química e análise estrutural do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo hidrotérmico, ou seja, apenas por auto-catálise. Todavia um outro processo de pré-tratamento comumente empregado é o de explosão a vapor.

O pré-tratamento por meio de explosão a vapor é um método rápido para afetar a arquitetura da parede celular da planta por meio de uma brusca mudança de pressão em altas temperaturas. Neste capítulo em formato de artigo, será apresentado oito condições diferentes de pré-tratamento por explosão a vapor aplicadas a amostras de bagaço de cana usando a auto-catálise em algumas amostras e um catalisador exógeno em outras, especificamente o ácido sulfúrico.

Assim como no Capítulo 2, aqui também será analisado a interferência da lavagem após o pré-tratamento no processo de hidrólise enzimática, visto que no capítulo 2 houve amostras em que teve efeito negativo e outras em que o efeito foi positivo ou indiferente.

O estudo das diferentes condições de pré-tratamento tem neste capítulo o principal alvo de investigar se há relação direta entre o fator de severidade combinado e o efeito do pré-tratamento no bagaço, no que tange a composição química e estrutural. Sendo posteriormente destacado a ação enzimática frente a estes substratos por conversão glicosídica da celulose pré-tratada.

Artigo 2

Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields

Melissa Cristina do Espirito Santo, Eliano Brito Cardoso, Francisco Eduardo Gontijo Guimaraes, Eduardo Ribeiro deAzevedo, Giovanni Paro da Cunha, Etelvino Henrique Novotny, Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini, Anuj Kumar Chandel, Marcos Henrique Luciano Silveir and Igor Polikarpov

Abbreviations: Steam explosion, STEX; second generation, 2G; first generation, 1G; capital expenses, CAPEX; operational expenses, OPEX; sugarcane bagasse, SCB; combined severity factor, CSF; confocal laser scanning microscopy, CLSM; solid-state nuclear magnetic resonance, ssNMR; high performance liquid chromatography, HPLC; X-ray diffraction, XRD; crystallinity index, CI; Multivariate Curve Resolution, MCR; Principal Component Analysis, PCA; principal component 1, PC1; xylooligosaccharides, XOS.

Abstract

Pretreatment is an important technological step for the lignocellulose conversion into fuels and biochemicals. Steam explosion (STEX) pretreatment is a fast method for affecting of plant cell wall architecture by a sharp pressure change at high temperatures. Here, eight different STEX conditions were applied to sugarcane bagasse (SCB) samples using auto-catalyzed and sulfuric acid catalyzed processes under a range of combined severity factors (CSFs; from 0.37 to 1.34). Our results showed that STEX of auto-catalyzed and sulfuric acid-catalyzed SCB led the removal of 70 – 80 % and 82 – 92 % of xylose, respectively. Enzymatic hydrolysis of auto-catalyzed and sulfuric acid catalyzed bagasse was performed of washed and un-washed pretreated material to access the impact of soluble inhibitors on overall cellulosic sugars recovery. Auto-catalyzed bagasse after washing showed significantly higher glucan conversion (96 %) than washed bagasse after pretreatment (62 %). On the other hand, sulfuric acid-catalyzed bagasse after washing demonstrated 94 % glucan conversion as opposed to unwashed material which again had significantly smaller conversion levels (73 %).

Physical properties and chemical composition were characterized using high performance liquid chromatographic, X-ray diffraction, ^{13}C solid-state nuclear magnetic resonance and confocal microscopy. The obtained results contribute to understanding of an influence of the morphological changes resulting from pretreatments on the efficiency of enzymatic hydrolysis. We show that the changes in physical structure and chemical composition of the pretreated biomass might not be determinate solely by combined severity factor of the pretreatments, but by the whole complexity of chemical modifications that different conditions of pretreatments introduce in the plant biomass samples.

Keywords: Pretreatment; Steam explosion; Biofuels; Sugarcane bagasse; Structural changes

1. INTRODUCTION

Harnessing the potential of lignocellulosic biomass, most abundant renewable biomass on Earth, is absolutely essential for the successful transition from fossil-based economy to biobased economy. (1, 2) The notion of ‘sugar is the next oil’ is only valid if the sugars are derived from lignocellulosic biomass, so called second generation (2G) sugars, which are also employed for fuels and chemicals production in addition to the first generation (1G) sugars. (3) Biobased products derived from renewables globally have the estimated volume of 50 billion kg per year and expected to grow continuously in a future. (4) Global commercial chemical manufacturing players such as DSM, Dow-DuPont, Clariant, Novozyme, Braskem, and many others are steadily progressing over the years in their investments in the development of bio-based products.

Sugarcane bagasse (SCB) is one of the most promising renewable biomass particularly in countries like Brazil, India and China ($> 600 \times 10^6$ t production per year). It has an enormous potential to serve as a starting material for 2G sugars production, which can be used for making chemicals and fuels within the concept of biorefinery platform. (5 - 8) In this context, an effective pretreatment is necessary to improve this bioethanol production. Several physical and chemical methods are available for the pretreatment techniques, which include hydrothermal pretreatment, alkaline, acid hydrolysis, steam explosion, ammonia fiber expansion (AFEX), supercritical fluids, organosolv pretreatments, to name a few. (9 - 12) Steam explosion (STEX) pretreatment is an efficient method for strongly impact plant cell wall architecture by a sharp pressure release at high temperatures. This process is scalable, effective and energy intensive and can be employed using the excess of waste steam generated at sugarcane processing mills. (13 - 14) However, combined severity factor (CSF) that depends on temperature, time and pH, has to be chosen wisely in STEX in order to minimize the inhibitors production and to achieve adequate deconstruction of the cell walls. Combined severity factors play a direct role in the hemicellulose solubilization, sugars derived inhibitors generation and exposing cellulose-lignin complex to cellulolytic enzymes in a subsequent hydrolysis step. Since lignin glass temperature is near 140 °C, it can suffer chemical changes under acidic pressurized severities and thus, steam explosion pretreatment technology is also known for the chemical changes that it can promote on lignin structure. (15) An information concerning local distribution of lignin within the cell wall is of a particular relevance, because similar lignin

amounts, distributed differently within the plant cell wall can have completely different enzymatic hydrolysis. (16)

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) is a technique which can provide important information about spatial distribution and concentration of a molecule that can produce a characteristic fluorescence signal. (17) In this context, CLSM can be applied for the investigation of lignin distribution in untreated (18) and pretreated SCB (16) and its degradation or solubilization in a biomass after pretreatment process. (12, 19 - 21) The lignin distribution can be correlated with the efficiency of enzymatic hydrolysis. (22) Another important technique for elucidation of the effects of pretreatment process on the structure of plant cell walls is a solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR). This technique allows the identification of each biomass components using chemical shift assignments of ssNMR peaks based on the comparison with previously reported NMR spectra. (10)

In this study, different CSFs in STEX of SCB for hemicellulose solubilization and cellulose hydrolysis (washed and unwashed SCB pretreated slurry) using robust enzyme cocktails were evaluated aiming global 2G sugars recovery. Filtration and washing of pretreated slurry after pretreatment have a strong influence on both overall processing cost and process scale up. (23) ssNMR and CLSM techniques were used for the comprehensive structural analysis of the cell wall architecture of steam exploded SCB at various CSFs, assisting to explore the fundamental mechanisms of biomass recalcitrance.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sugarcane bagasse

Sugarcane bagasse was collected from São Manoel mill (São Manoel, São Paulo State, Brazil) right after the milling. It was stored for two days in a cold room at 4 °C until the pretreatment by steam explosion. Sugarcane bagasse was used for steam explosion pretreatment as it was received from the mill.

2.2 Steam explosion pretreatment

Sugarcane bagasse with moisture of 50 % (w/w) was steam exploded at the Pilot Plant of Sugarcane Technology Center (Piracicaba, São Paulo State, Brazil) using a 65 L steam gun. During steam explosion, several variables directly affect the process, and among them time and temperature are known to be the most relevant. The approach in which the acetic acid, formed by acetyl group hydrolysis, drives the pretreatment, is conceptually called auto-hydrolysis catalyzed steam explosion. On the other hand, for sulfuric acid-catalyzed steam explosion, bagasse samples were impregnated with sulfuric acid solutions prior to pretreatment in order to reach concentration of 0.5 % (w/w) of acid per 100-gram dry matter of bagasse. Therefore, the well-known R_0 factor that was originally introduced within pulp and paper industrial model can also be used as a predictive parameter for steam explosion pretreatment, (24) as described below:

$$R_0 = \int_0^t e^{\frac{T-100}{14.75}} dt \quad \text{Equation (1)}$$

Auto- and sulfuric acid catalysis of bagasse were carried out in a range of 0.37 to 1.34 of CSF (combined severity factor). In this case, CSFs were determined by the following equation: (25, 26)

$$CSF = \log_{10} \left[t \times e^{\frac{T-100}{14.75}} \right] - pH \quad \text{Equation (2)}$$

where t is the time of pretreatment in minutes and T the temperature in °C. pH of solution was measured in a liquor after the steam explosion. Table 4. 1 shows the conditions (CSF ranging from 0.37 to 1.34) employed for the STEX of bagasse.

2.3 Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis assays of pretreated bagasse samples were carried out at a substrate ratio of 4 % (w/v) in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), under constant stirring of 150 rpm at 50 °C. The applied enzymatic blend consisted of Accellerase 1500 (Genencor, Rochester, NY, USA) and β -glucanase (Novozym 188; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), with 20 mg of enzyme loading per gram of glucan. The amount of released glucose was measured by high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu), equipped with refraction index detector and UV-VIS spectrophotometer. In this analysis an ion exchange column, Aminex HPX-87 H (Bio-Rad) was used at 65 °C and 5 mM H₂SO₄ solution was utilized as a mobile phase (flow rate 0.6 mL.min⁻¹). Glucose and cellobiose were applied as standards and the cellulose hydrolysis yield was determined as described by Maeda et al. (27)

2.4 Chemical compositional analysis by HPLC

Chemical compositional analysis of all solid fractions was determined by using a modified lab protocol of NREL, (28) in which 300 mg of dry sample was hydrolyzed with 3 mL of sulfuric acid solution (72 % w/w) for 60 min at 30 °C. The resulting slurry was diluted with ultrapure water to make up the final sulfuric acid concentration of 4 % (w/w). Thereafter, samples were boiled in an autoclave for 60 min at 120 °C for complete hydrolysis of polysaccharides. The resulting liquids were filtrated and analyzed by HPLC (Waters Alliance e2695) equipped with refractive index detector for glucose, xylose, arabinose monosaccharides and acetic acid detection and by ultraviolet spectrophotometer (acid soluble lignin), while acid insoluble lignin and ash content was gravimetrically measured as solid residues in crucible, the later after calcination. The loss of sugars was due to their conversion into furan compounds which were measured by using standard solutions. (28)

2.5 X-ray diffraction (XRD) experiments

To evaluate the crystallinity index (CI) in the samples of SCB, X-ray diffraction (XRD) experiments were conducted on Miniflex 600 (Rigaku, Japan) instrument, using Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) at ambient temperature. The XRD equipment was set to operate at 40 kV and 15 mA and 2θ scans were measured from 5 to 50 ° in 0.05-degree steps with an X-ray exposure of 15 s per step.

Individual diffraction peaks were extracted by a curve-fitting process from the experimental diffraction scans to calculate the CIs. Peak fitting program (PeakFit; www.systat.com) was used to assume Gaussian functions for each peak and a broad background distribution with a maximum at around 21.5° was assigned to the amorphous scattering contribution, as described by Park et al. (29)

2.6 Confocal Microscopy

Confocal microscopic analysis was conducted by following the previously described procedures. (12, 16) Native and pretreated SCB samples were dispersed in water and transferred to coverslips to obtain images using a Zeiss LSM 780 confocal microscope equipped with a Coherent Chameleon laser (Tisapphire) as a source for two-photons (2 P) excitation experiments with a Plan-Apochromat objective lens (20X, water immersion, numerical aperture 1.4).

The images were obtained by averaging of three independent scans. The total number of dots per image was 1024 x 1024 and the area of each pixel was associated with the optical resolution of the lens (20 x) used, resulting in a lateral resolution of about 300 nm.

2.7 ^{13}C solid-state Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C solid-state NMR) analysis

^{13}C solid-state Nuclear Magnetic Resonance experiments were performed using a Varian INOVA 400 spectrometer, equipped with a Jackobsen designed 7-mm MAS double-resonance probe, at ^{13}C and ^1H frequencies of 100.5 and 400.0 MHz, respectively. The spinning frequency at 5 kHz was controlled by a pneumatic system that ensures rotation stability higher than ~1 Hz. Typical $\pi/2$ pulse lengths of 4 and 4.5 μs were applied for ^{13}C and ^1H , respectively. Proton decoupling field strength of $\gamma\text{B}_1/2\pi = 62.5 \text{ kHz}$ was used. ^{13}C

CPMAS-TOSS experiments (10, 12, 30 - 31) was used in all acquisitions. The recycle delay was 2 s. Chemical shift was assigned based on published studies. (10, 32 – 39)

2.8 Multivariate Curve Resolution (MCR) analysis of the ^{13}C solid-state NMR data

To enhance the output from the ^{13}C solid-state NMR data, the Multivariate Curve Resolution (MCR) procedure (40) was carried out using the software The Unscrambler® v10.4.1 (CAMO Software AS). MCR allows the determination of the number of components co-existing in a chemical system providing the extraction of the pure spectra of the components (qualitative analysis) as well as the concentration profiles of each component (quantitative analysis). This is achieved by applying a standard Principal Component Analysis (PCA) to estimate the probable number of components in the mixture and then calculating a rotation of the PCs without the orthonormality constraints. It is pertinent to stress that, although PCA produces unique and very useful solutions, they are “abstract” solutions which are not always interpretable easily. Whenever the goals of MCR are achieved, the understanding of a chemical system is dramatically increased and facilitated, avoiding the use of enhanced and much more costly experimental techniques (CAMO Software AS). However, due to the absence of the orthonormality constraints in MCR, it may lead to infinite solutions (ambiguity), and therefore new constraints should be adopted. In the present case: non-negative concentrations; non-negative spectra and closure were applied as constraints. Since the input spectra were area normalized, the sum of the components concentration must be 100 %.

3. RESULTS AND DISCUSSION

STEX is one of the most efficient and promising technologies of plant biomass pretreatment for production of 2G sugars at a commercial scale. (41) Steam explosion deeply affect the internal plant cell structures caused by the abrupt decompression. (42) Its main effect is on the hemicellulose depolymerization which ameliorates the accessibility of remaining cellulose to enzymes. (7) Hemicellulose is hydrolyzed via acid catalysis during steam explosion, since the most labile chemical groups (e.g. arabinosyl and acetyl group) are removed from the hemicellulose first. Therefore, the higher temperature involved in a pretreatment, the more acetic acid is liberated and this enables more efficient hemicellulose removal from the raw material.

3.1 Chemical composition

Under applied conditions STEX led to the removal of 70 – 80 % and 82 – 92 % of anhydrous-xylose in auto-catalyzed and sulfuric acid-catalyzed experiments, respectively (Table 4.1). In average, 70 to 92 % of hemicellulose removal represents 36 – 43 % increase in the total anhydrous-glucose content in the pretreated SCB.

Table 4. 1 - STEX pretreatment of sugarcane bagasse under different conditions

Pretreatment	Time (min)	Pressure (Bar)	CSF
Auto-hydrolysis	15	12	0.37
	8	15	0.53
	10	14	0.47
	8	17	0.76
Sulfuric acid-catalyzed	15	12	1.04
	8	15	1.12
	10	14	1.06
	8	17	1.34

According to Figure 4.1 CSFs had a strong correlation with the xylan content in the SCB after pretreatment. As a result, the remaining cellulose and lignin in fiber became more

exposed to the water solvation and eventually to the acid catalyst used in the pretreatment reaction. (24)

Figure 4.1 – Xylan content in fiber fraction of STEEX sugarcane bagasse: A-D auto-catalyzed, B-E sulfuric acid-catalyzed, C-F for both of them

Figure 4.1 shows that the sulfuric acid-catalysed pretreatment under relatively mild conditions removes about 82 % of total anhydrous-xylose in the raw material. However, another insight from the chemical compositional analysis, is that the acid catalysis led not only to better xylan removal from the fibers (Figure 4.1 and Table 4.1), but also, to a higher amount of monomeric sugars produced in the liquor (Table 4.2). Hemicellulosic sugars from C5 liquor can be processed into value-added chemicals and fuels following different experimental approaches such as separated hydrolysis and fermentation, simultaneous saccharification and fermentation, or even simultaneous saccharification and co-fermentation. (43)

Table 4. 2 - Chemical composition of untreated and steam exploded sugarcane bagasse

PARAMETER OF ASSAY		SUGARCANE BAGASSE SAMPLES								
		Raw material	Steam exploded materials: CSF ^{&} and type of pretreatment (AH* or SC [#])							
			0.37 AH*	0.47 AH	0.53 AH	0.76 AH	1.04 SC [#]	1.06 SC	1.12 SC	1.34 SC
MASS RECOVERY										
Dry mass (g/100g wet sample)			33.3 ± 0.2	34.2 ± 0.7	34.3 ± 0.4	32.5 ± 2.0	25.0 ± 0.1	25.4 ± 0.3	27.9 ± 0.3	26.8 ± 0.1
Soluble solids (g/100g dried sample)			24.0 ± 0.1	26.3 ± 0.1	24.5 ± 0.1	22.4 ± 0.2	24.9 ± 0.1	27.2 ± 0.4	26.9 ± 0.6	23.5 ± 0.4
Insoluble solids (g/100g dried sample)			76.0 ± 0.3	73.7 ± 0.3	75.5 ± 0.2	77.6 ± 0.6	75.1 ± 0.5	72.8 ± 0.6	73.1 ± 1.8	76.5 ± 0.6
INSOLUBLE FRACTION - FIBER										
Cellulose (g/100g fiber)		40.1 ± 0.4	52.3 ± 0.1	54.7 ± 0.9	53.1 ± 0.4	52.8 ± 0.5	54.5 ± 0.3	54.7 ± 0.9	55.6 ± 0.3	57.3 ± 0.9
Anhydrous xylose (g/100g fiber)		21.5 ± 0.1	6.6 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.6 ± 0.3	2.9 ± 0.2	1.8 ± 0.01
Anhydrous arabinose (g/100fiber)		2.3 ± 0.2	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.03	0.5 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.01
Acetyl (g/100fiber)		3.4 ± 0.03	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.5	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.40 ± 0.04	1.1 ± 0.02	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.01
Total Lignin (g/100g fiber)		23.6 ± 2.6	28.8 ± 1.1	29.9 ± 1.6	29.0 ± 1.2	29.4 ± 5.1	30.0 ± 0.4	30.9 ± 2.0	31.4 ± 1.0	31.5 ± 0.6
Insoluble lignin (g/100g fiber)		22.4 ± 2.6	27.9 ± 1.1	29.2 ± 1.5	28.6 ± 1.1	29.1 ± 5.0	29.4 ± 0.3	30.4 ± 1.9	30.3 ± 1.0	30.6 ± 0.6
Soluble lignin (g/100g fiber)		1.2 ± 0.03	0.8 ± 0.04	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.03	0.9 ± 0.03
Ashes (g/100g fiber)		3.5 ± 0.4	11.5 ± 2.7	8.9 ± 0.7	8.8 ± 3.4	8.3 ± 0.6	5.8 ± 1.7	8.5 ± 1.1	10.2 ± 1.1	8.2 ± 0.2
Total		94.4 ± 3.7	101.3 ± 4.1	101.5 ± 3.8	99.1 ± 5.2	95.5 ± 6.4	95.8 ± 2.6	99.2 ± 4.5	101.9 ± 2.9	99.9 ± 1.7

[&]CSF, Combined severity factor; *AH, autohydrolysis; [#]SC, sulfuric acid catalyzed pretreatment.

During hydrothermal pretreatment, reactor temperature and retention time are two crucial parameters which directly relate the biomass conversion. Prunescu and co-workers (44) studied the dynamic modeling and validation of hydrothermal pretreatment aiming the impact of temperature, retention temperature and biomass composition on sugars recovery at demonstration scale. The modeling of the process validated a process temperature range

between 178 and 185 °C. The application utility model predicted the value of the model for simulation, control design, and optimization for full-scale applications. Prathyusha et al. (45) studied the modelling for the pretreatment of sorghum, wheat straw and bamboo based on the parameters such as temperature, alkali peroxide concentration. Model based on the multi-feed stock predicted the delignification with an average absolute deviation (AAD) of 9.29 % and hydrolysis with an AAD of 10.55 %. Further, the kinetic model showed an overall AAD of 7.0 % over the entire data set.

The hydrothermal pretreatment conditions were studied for the scale-up of the pretreatment of agave bagasse by Aguilar et al. (46) The optimum condition (180 °C for 20 min) with the pretreatment severity ($[\log R_0] = 4.11$) showed the saccharification yields of 98.5 and 99.5 % at high-solids loading (10 and 15 %, respectively). Development of efficient process for cellulosic sugars (C5 + C6 sugars) production from lignocellulosic biomass has a central role in industrial biorefinery. Silveira et al. (47 - 2018) investigated the effect of different combined severity factors (CSF) in steam explosion (auto-catalyzed (AC) and sulfuric acid catalyzed (SC)) for sugarcane bagasse (SB) pretreatment on xylose and oligosaccharides recovery along with inhibitors characterization. Auto catalyzed-steam explosion of SB (CSF- 0.37) showed lower xylose (15 g/L) amount and higher xylo- and cello-oligosaccharides (60 g/L) than SC-Steam exploded SB (CSF-1.12) showing 40 g/L xylose and xylo- and cello-oligosaccharides (14 g/L).

Composition changes after steam explosion treatments were also probed by ^{13}C ssNMR. The acquired spectra are shown in Figure 4. 2. Signals assigned to cellulose, lignin and hemicelluloses are indicated and the assignments of the signals to specific chemical group can be found in references. (10, 34, 38) The signals at 21.5 ppm, 101.8 ppm and 173.6 ppm are reduced upon the STEx treatment. This indicates that the main modification induced by the steam explosion is the reduction of the relative content of hemicellulose. The above-mentioned signals are attributed to CH_3 in acetyl groups, C1 carbons and carboxyl carbons of hemicelluloses, respectively. The spectra also show that the spectral resolution in the region from 60 to 100 ppm increases with the CSF, which can be attributed to the reduction of broad signals from C2, C3, C4, C5 and C6 of carbohydrates present on the spectra of the untreated sample. It is also clear (see for instance the signal at 21.5 ppm), that the removal of the hemicellulose components progressively increases with the increase in CSF and is similar for both auto-catalyzed and sulfuric catalyzed treatments. The higher efficiency concerning the hemicelluloses removal is observed for sulfuric acid catalyzed sample with

SFC of 1.34, where the hemicellulose signals are not observed, i.e., they are below the detection limit of our ssNMR experiments, which is estimated to be about 3 % within the observed signal to noise ratio. The ssNMR spectra show subtle changes in the shape of the lignin signals. It is well known that ssNMR chemical shifts are affected by packing and conformational changes. Therefore, the observed shape modifications may be associated to the rearrangement and aggregation of lignin upon the steam explosion treatments which are also observed by confocal microscopy. Nevertheless, no significant change in the relative amount of cellulose and lignin is detected in the samples.

3.2 Principal component analysis (PCA)

To provide a more clear and systematic analysis of the global variability of the ssNMR data, a PCA was performed for the set of the spectral data. The PCA results undoubtedly separate the treated samples from the untreated ones (by principal component 1, PC1) and the positive loading of the PC1 are associated with the hemicelluloses peaks. This indicates that the variability of the ssNMR spectra among the samples can be explained considering two main components. This information was used in a multivariate curve resolution (MCR) procedure in the full set of ssNMR spectra, which allowed predicting the NMR spectra which allowed predicting the NMR spectra associated to each of these components. The estimated spectra are shown in Figure 4. 2. The spectra at the bottom is highly consistent with the spectra expected for hemicelluloses, mostly xylan and arabinan, (10, 48) with signals at 21 ppm (CH_3 in acetyl groups), 63 ppm (C6 carbon), 74 ppm (C2, C3 and C5 carbons), 83 ppm (C4 carbon), 103 ppm (C1 carbon) and 173 ppm (carboxyl carbon). There are also signals at 56 ppm (lignin methoxyl carbon) and 152 ppm (lignin aryl carbons). The appearance of these signals may be related with the changes in the line shape due changes in molecular conformation of lignin upon aggregation and thus, the concentration of the altered lignin is strongly correlated with the hemicellulose content since both increase simultaneously under the applied experimental conditions and quantified by CSF. The estimated spectra of Figure 4. 2 C (top) can be almost totally attributed to cellulose and intact lignin with all signals appearing at the expected positions. (10) Therefore, ssNMR fully supports our previous statement that the steam explosion treatment strongly reduces the relative amount of hemicellulose. Moreover, the MCR analysis also provides the relative fractions of each component, i.e., hemicellulose and cellulose + lignin, for each sample

(Figure 4. 2 D). Even under the mildest condition, the steam explosion treatment is highly effective in removing the hemicellulose, but its efficiency only slightly increases with an increase of CSF. The actual percent values of hemicelluloses seem to be slightly higher than those from the composition analysis shown in Table 4. 1, which is partially because the ^{13}C solid-state NMR experiment has lower sensibility and also do not probe the ashes content. The renormalization of the data presented in Table 4.1 not considering the ashes content increase the values of the hemicellulose related fractions to about 5 %. Despite the marginal difference, considering uncertainties of $\sim 3\%$, the relative hemicellulose removal is systematically greater in the sulfuric-catalyzed samples. Finally, we should point out that the 100 % of removal observed in the sample 1.34 SC means that the hemicelluloses percentage is below the detection limit of 3 %.

Figure 4. 2 - Summary of the solid-state NMR results of (untreated) and steam exploded bagasse samples. A) Solid-state NMR spectra of auto-catalyzed samples with different CSF values indicated in the right side of the spectra. B) Solid-state NMR spectra sulfuric-catalyzed samples with different CSF values indicated in the left side of the spectra. C) Estimated spectra obtained from the two component model MCR. D) Percentage variation as a function of the CSF of the steam explosion treatment obtained from the MCR analysis.

In order to provide a more comprehensive and holistic view of the results in function of the pretreatments a PCA was performed using all data of Tables 4. 1 and 4. 2 along with the MCR results (estimated relative concentration of each component), while the CSF was used as a supplementary variable. CSF was not used in the analysis, but was projected in the resulting vector subspace allowing its visualization within the data set variables (Figure 4. 3). Note, that the PC1 clearly discriminate samples that underwent harsher (large CSF) and more moderate (small CSF) pretreatments. Such data interpretation can be done considering the vectors representing the alternations of each variable of Table 4. 1 and 4. 2 along with those representing the NMR components extracted from the MCR analysis. Simply put, vectors approximately pointing to the same direction means that those components are correlated. Therefore, Figure 4. 3 suggests that more severe treatments correlate with the increase in the relative amount of the cellulose + lignin (from the NMR and MCR) as well as with HMF, furfural, cellulose and, obviously, with insoluble and soluble lignin. On the other hand, softer treatments correlate with the reduction in the relative amount of hemicellulose (from the NMR/MCR) and with the presence of acetyl and hemicelluloses components as xylose, arabinose, soluble glucose, formic acid.

Figure 4. 3 - PCA plot of the data presented in Table 1 and 2 along with the MCR results of the solid-state NMR data. Vectors represent the variability direction of each component. Vectors associated with the composition data of Table 1 and 2 are given in blue; the data taken from the MCR of the solid-state NMR results are shown in green; the vector associated with the CSF is in black.

Additionally, according to our PCA, the CSF increase, especially under the conditions of sulfuric acid addition, results in an increasing content of cellulose plus lignin and relative concentration of total and insoluble lignin, due to the removal of hemicellulose. Furthermore, it results in the increase of by-products such as furfural and hydroxymethylfurfural. On the other hand, milder pretreatment conditions (low CSF under conditions of auto-hydrolysis) lead to higher concentration of hemicellulose (as detected by ssNMR) and their monomers xylose and arabinose; acetic acid and acetyl (as observed by HPLC). The maximum CSF in auto-hydrolysis samples results in highest formic acid and arabinose concentration.

3.3 Enzymatic hydrolysis

It was expected that stronger hemicellulose removal, turn the remaining fraction of the lignocellulose more accessible to the hydrolytic enzymes eventually yielding higher conversion in comparison with the samples which suffered smaller removal of hemicellulose. However, the industrial separation of resulting fibers and C5 liquor consumes considerable amounts of energy and results in more cumbersome operational steps, thus increasing the total operational costs of the whole process. On the other hand, enzymatic hydrolysis of integral material (non-drained and unwashed) could be severely affected by the presence of solubilized inhibitors such as oligomeric saccharides, furan compounds and/or acid-soluble lignin fragments in the reaction mixture. Therefore, we investigated the accessibility of steam exploded SCB under these two approaches, carrying out enzymatic hydrolysis of washed and unwashed steam exploded SCB (Figure 4. 4 and Supplementary Materials).

Figure 4.4 - Enzymatic hydrolysis profile of washed (WS) (A and B) and unwashed (UW) (C and D) auto-catalyzed (CSF of 0.37, 0.47, 0.53 and 0.76, respectively) and sulfuric acid-catalyzed (CSF of 1.04, 1.06, 1.12 and 1.34) steam exploded sugarcane bagasse samples.

Comparing the higher glucan conversion after 72 h of enzymatic hydrolysis of the washed materials, auto-hydrolysis reveals itself as a better approach than sulfuric acid-catalyzed steam exploded SCB pretreatment. In addition, it is possible to identify the differences in glucan conversion due to the higher severity of pretreatment for auto-catalyzed steam exploded materials, with the best result for the sample pretreated with CSF of 0.76 (Figure 4. 4). On the other hand, for unwashed materials, sulfuric-catalyzed SCB samples revealed higher glucan conversions (72 % for the samples pretreated with CSFs of 1.06 or 1.34) after 72 h of hydrolysis. Chemical compositions of liquors obtained after steam explosion of SCB show considerably higher quantity of solubilized xylan fragments in auto-catalyzed samples than in sulfuric acid-catalyzed pretreated biomass (Table 4. 3). It is known that auto-catalyzed pretreatment results in a production of xylooligosaccharides (XOS) that are strong inhibitors of cellulases. (49 - 50) Furthermore, auto-hydrolysis of SCB leads to lower concentrations of soluble lignin in the resulting insoluble fibrous fraction as compared to the sulfuric acid-catalyzed samples (Table 4. 1). This indicates stronger removal of the soluble lignins during AH pretreatment and their accumulation in the liquid supernatant fraction.

Table 4. 3. Chemical composition liquors obtained after steam explosion of sugarcane bagasse.

Steam exploded sample, CSF	Monomeric compounds in liquor (g/L)						
	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic Acid	Formic acid	HMF	Furfural
0.37 (AH)	8.7 ± 0.01	55.2 ± 0.2	1.8 ± 0.01	5.9 ± 0.01	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.03	1.3 ± 0.04
0.47 (AH)	10.7 ± 0.2	67.6 ± 0.9	2.9 ± 0.1	7.8 ± 0.2	2.2 ± 0.03	0.8 ± 0.03	1.6 ± 0.1
0.53 (AH)	9.4 ± 0.01	60.6 ± 0.2	2.0 ± 0.1	6.9 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.6 ± 0.02	1.4 ± 0.04
0.76 (AH)	8.4 ± 0.01	37.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	5.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.6 ± 0.02	2.6 ± 0.1
1.04 (SC)	5.5 ± 0.01	20.4 ± 0.01	0.8 ± 0.1	4.2 ± 0.01	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.02	1.9 ± 0.1
1.06 (SC)	5.7 ± 0.01	21.1 ± 0.1	1.6 ± 0.01	4.6 ± 0.01	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.02	2.0 ± 0.1
1.12 (SC)	5.9 ± 0.1	19.1 ± 0.01	1.1 ± 0.01	4.5 ± 0.01	1.1 ± 0.04	1.00 ± 0.03	2.1 ± 0.1
1.34 (SC)	4.3 ± 0.01	6.3 ± 0.1	2.0 ± 0.2	3.1 ± 0.01	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1

CSF, Combined severity factor; AH, autohydrolysis; SC, sulfuric acid catalyzed pretreatment.

Lignin fragments have been shown to bind and strongly inhibit and deactivate cellulases leading to decrease in the efficiency of enzymatic hydrolysis. (51 - 52) Finally, sulfuric acid pretreated materials have slightly higher insoluble lignin concentration in the insoluble

fibrous fractions. This again can lead to non-productive absorption of cellulases and decrease in efficiency of enzymatic hydrolysis. (53 - 54) All these factors could influence enzymatic hydrolysis of the pretreated SCB, favoring sulfuric acid pretreated samples.

In general, hydrolysis of the washed materials only evaluates the accessibility of cellulose within the pretreated fibrous material. Therefore, higher severity could make pretreated SCB samples more accessible to the enzymes. This is clearly the case for auto-hydrolysis pretreated samples (Figure 4. 4 A) since all the samples have very similar low hemicellulose content and thus might have similar level of cellulose exposure. However, for sulfuric acid-catalyzed samples this tendency is not so clear (Figure 4. 4 B). Changes in temperature and time in SC steam explosion experiments did not lead to significant gain in the efficiency of cellulose hydrolysis, although the initial hydrolysis rates and time to reach the maximum hydrolysis yields for each pretreatment seem to be affected (Figure 4. 4 B).

In addition, the inhibition effect of the soluble compounds was strong enough to overbalance the accessibility gain of cellulose in the pretreated SCB samples due to the higher severity of auto-catalyzed steam explosion (compare Figure 4. 4 A and C with the Figure 4. 4 D which shows glucan conversion in sulfuric-catalyzed steam exploded materials). Here, the difference of temperature and time of pretreatment led to the differences in glucan accessibility and cellulose hydrolysis yields, since sulfuric acid catalysis is known to predominantly produce monomeric xylose instead of XOS, which is much weaker inhibitor of cellulases and xylanases. (49) In general, the solubilized hemicellulose during auto-hydrolysis catalyzed steam explosion are inhibitory enough to just hydrolyze the most accessible cellulose and reach the same conversion yields when CSFs of pretreatment conditions vary from 0.37 to 0.76 (Figure 4. 4 C). On the other hand, CSF affects the conversion of the solubilized hemicellulose and its inhibition effect for sulfuric acid catalyzed steam explosion (Figure 4. 4 D).

3.4 Structural changes

It is known that lignin suffers chemical changes, which could interfere with enzymatic hydrolysis and saccharification yields under steam explosion and/or acid pretreatment conditions. (55) To gain further insights into modifications of lignin structure and distribution we conducted confocal laser scanning microscopy (CLSM), that provided

important information about the concentration and the spatial distribution of the lignin within studied samples.

Despite complex structure of the sugarcane cell wall, the results of CLSM also make evident a strong correlation between the structure lignin fluorescence and its structural re-arrangement within the cell wall. Samples with similar amounts of lignin may present distinct hydrolysis yields, as a consequence of different lignin distributions. (16)

Untreated SCB lignin emits fluorescence in the blue range of electromagnetic spectrum (Figure 4. 5). This indicates that the lignin is organized in well-organized nano-environment that favor a very low level of interaction between the molecules. (16) Each pixel of the confocal fluorescence image reports on a characteristic broad emission spectrum, but it is sensitive enough to provide information on the fluorophore concentration and its chemical modifications.

Lignin emission changes after the pretreatments, indicating that the natural lignin arrangement in the untreated bagasse has been strongly modified by both the autohydrolysis and sulfuric acid catalyzed pretreatments. Our experiments indicate that a considerable disorder in lignin structure occurs during acid pretreatment because solubilized lignin fragments tend to re-aggregate and re-precipitate at the surface of the fibers (56) thus affecting the molecular structure of this macromolecule and its stable or metastable conformations at a nanoscale. Similarly, during auto-hydrolytic pretreatments that proceed at high temperatures, resulting in a release of acetic acid which catalyze hemicellulose hydrolysis and lignin restructuring and modification (Figure 4. 5). Previous studies also revealed that the hydrothermal treatment causes considerable redistribution of lignin. (12) Both autohydrolysis and sulfuric acid catalyzed pretreatments result in aggregates of modified lignin thus creating different nano-environments around precipitated lignin.

Figure 4. 5 - Confocal images of untreated and pretreated sugarcane bagasse: Auto-catalyzed (top row) and sulfuric-catalyzed (bottom row) steam exploded materials. CSF values are given in each panel

Important spectral changes manifest themselves in the true color image resulting from the pixel-by-pixel overlapping of the spectrally resolved emission light. The image of the sample pretreated under CSF of 0.34 reveals fluorescence emission at the longer wavelength and considerable and inhomogeneous redistribution of lignin (Figure 4. 5). In the samples that underwent pretreatments with the combined severity factors of 0.47 – 1.34, the lignin fluorescence from the inner part of the cell wall turns green-blue while the outermost region emits yellowish light characteristic of lignin aggregates. (16) The SCB samples pretreated with the combined severity factors of 0.76, 1.06, 1.12 and 1.34 clearly show the lignin accumulation along the external border of the fibers (Figure 4. 5). Longer wavelengths and thus lower energies of fluorescence emitted by the samples are associated with the formation of complex molecular aggregates of lignin fragments. These spectral changes report a deconstruction in the well-structured lignin structures within the plant cell wall. (12, 16)

It is possible to conclude that changes in lignin fluorescence are generally proportional to the severity of the steam explosion pretreatments. The higher the severity used in the steam explosion and thus stronger chemical modifications introduced in the lignin structure, the more frequently the lignin clusters emitting in yellow and red are observed in the samples. (12, 16) This fact corroborates the lower enzyme accessibility during glucan hydrolysis of washed sulfuric-catalyzed materials (Figure 4. 4 B). However, comparing autohydrolysis and sulfuric acid catalyzed pretreatments, it is possible to note that the CFS value it is not directly proportional to the changes introduced by different pretreatment. For example, changes in lignin fluorescence imaged by CLSM (Figure 4. 5) in the sample pretreated with CSF of 0.76 are stronger than for the sample after pretreatment with CSF of 1.04, which reflects on their enzymatic hydrolysis yields (Figure 2 and Supplementary material). This indicates that CSF alone might not capture the whole complexity of the chemical modifications that different types of pretreatments introduce to the plant biomass samples. On the other hand, Log (R_0) does this, indicating that time and temperature are the predominant factors that affect lignin distribution and its chemical modifications.

Finally, we determined crystallinity of the studied steam-exploded sugarcane bagasse samples using X-ray diffraction measurements. Crystallinity indices (CIs) of the pretreated samples varied from 37 % to 43 %, which are higher than the CI of *in natura* bagasse (31

%). This indicates that partial removal of hemicellulose and lignin, induced by the pretreatments, promoted decrease of amorphous fraction of the biomass. However, it did not affect the yields of enzymatic hydrolysis, indicating that other factors (such as porosity and cellulose accessibility, for example) have stronger effects on the efficiency of enzymatic hydrolysis of the pretreated samples. (57)

4. CONCLUSIONS

Steam explosion pretreatments of SCB in the presence and absence of sulfuric acid covering a wide range (0.37 to 1.34) of combined severity factors (CSFs) led the efficient removal of xylan (from 70 % to 92 %) and considerable re-arrangements of both lignin and cellulose. Efficiencies of enzymatic hydrolysis of SCB pretreated under optimal conditions and washed were very high (up to 96 %), whereas unwashed materials hydrolyzed under the same conditions revealed much lower enzymatic hydrolysis yields (73 % and 62 % for sulfuric acid catalyzed and auto-catalyzed SCB, respectively). Structural analysis by confocal microscopy revealed marked changes in lignin fluorescence showing variation in chromatic shifts following pretreatments, whereas X-ray diffraction analyzes reported on reorganization of cellulose fibril structure. Finally, solids state NMR analysis confirmed efficient removal of hemicellulose as well as changes in lignin structure, promoted by the applied pretreatments allowing for PCA of modifications in specific components of the sugar cane cell wall.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) via research grants 2015/13684 and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) via grants #405191/2015-4, 303988/2016-9, 423693/2016-6, 440977/2016-9 and 9423693/2016-6. AKC is grateful to the CAPES, Brazil for the financial assistance through visiting professor and researcher program (Process USP number: 15.1.1118.1.0).

REFERENCES

- 1 Eerhart, A. J. J. E., Faaij, A. P. C., & Patel, M. K. (2012). Replacing fossil based PET with biobased PEF; process analysis, energy and GHG balance. *Energy & environmental science*, 5(4), 6407-6422. [https://doi.org/ 10.1039/C2EE02480B](https://doi.org/10.1039/C2EE02480B).
- 2 Moghaddam, L., Zhang, Z., Wellard, R. M., Bartley, J. P., O'Hara, I. M., & Doherty, W. O. (2014). Characterisation of lignins isolated from sugarcane bagasse pretreated with acidified ethylene glycol and ionic liquids. *Biomass and bioenergy*, 70, 498-512. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.030>.
- 3 Sanford, K., Chotani, G., Danielson, N., & Zahn, J. A. (2016). Scaling up of renewable chemicals. *Current opinion in biotechnology*, 38, 112-122.. [https://doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.008](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.008).
- 4 de Jong, E., Higson, A., Walsh, P., & Wellisch, M. (2012). Bio-based chemicals value added products from biorefineries. *IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery*, 34. <https://www.ieabioenergy.com/publications/bio-based-chemicals-value-added-products-from-biorefineries> (accessed 22 March 2019).
- 5 Serpa, V. I., & Polikarpov, I. (2011). Enzymes in bioenergy. In *Routes to Cellulosic Ethanol* (pp. 97-113). Springer, New York, NY.
- 6 Chandel, A. K., da Silva, S. S., Carvalho, W., & Singh, O. V. (2012). Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(1), 11-20. <https://doi.org/10.1002/jctb.2742>.
- 7 Silveira, M. H. L., Morais, A. R. C., da Costa Lopes, A. M., Oleksyszyn, D. N., Bogel-Łukasik, R., Andraus, J., & Pereira Ramos, L. (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*, 8(20), 3366-3390. [https://doi: 10.1002/cssc.201500282](https://doi.org/10.1002/cssc.201500282).
- 8 da Costa Lopes, A. M., Brenner, M., Falé, P., Roseiro, L. B., & Bogel-Łukasik, R. (2016). Extraction and purification of phenolic compounds from lignocellulosic biomass assisted by ionic liquid, polymeric resins, and supercritical CO₂. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(6), 3357-3367. [https://doi: 10.1021/acssuschemeng.6b00429](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00429).
- 9 Balan, V., Bals, B., Chundawat, S. P., Marshall, D., & Dale, B. E. (2009). Lignocellulosic biomass pretreatment using AFEX. In *Biofuels* (pp. 61-77). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8_5
- 10 Rezende, C. A., de Lima, M. A., Maziero, P., Ribeiro deAzevedo, E., Garcia, W., & Polikarpov, I. (2011). Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-54>.
- 11 Serna, L. D., Alzate, C. O., & Alzate, C. C. (2016). Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 199, 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.078>

12 Santo, M. E., Rezende, C. A., Bernardinelli, O. D., Pereira Jr, N., Curvelo, A. A., Guimarães, F. E., & Polikarpov, I. (2018). Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Industrial crops and products*, 113, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.014>.

13 Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26(6), 863-871. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015>.

14 Rita de Cássia, L. B., Rocha, G. J., Rodrigues Jr, D., Helcio Filho, J. I., Maria das Graças, A. F., & Pessoa Jr, A. (2010). Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). *Bioresource technology*, 101(4), 1247-1253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.034>.

15 Shevchenko, S. M., Beatson, R. P., & Saddler, J. N. (1999). The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 867-876). Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/ABAB:79:1-3:867>.

16 Coletta, V. C., Rezende, C. A., da Conceição, F. R., Polikarpov, I., & Guimarães, F. E. G. (2013). Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-43>.

17 Gerritsen, H. C., Draaijer, A., Van den Heuvel, D. J., & Agronskaia, A. V. (2006). Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopy. In *Handbook of biological confocal microscopy* (pp. 516-534). Springer, Boston, MA.

18 Sant'Anna, C., Costa, L. T., Abud, Y., Biancatto, L., Miguens, F. C., & de Souza, W. (2013). Sugarcane cell wall structure and lignin distribution investigated by confocal and electron microscopy. *Microscopy research and technique*, 76(8), 829-834. <https://doi.org/10.1002/jemt.22235>.

19 Singh, A. P., Schmitt, U., Möller, R., Dawson, B. S., & Koch, G. (2006). Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. *Wood science and technology*, 40(1), 16. <https://doi.org/10.1007/s00226-005-0056-3>.

20 Speranza, M., Gutierrez, A., del Río, J. C., Bettucci, L., Martinez, A. T., & Martínez, M. J. (2009). Sterols and lignin in *Eucalyptus globulus* Labill. wood: Spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses. *Holzforschung*, 63(3), 362-370. <https://doi.org/10.1515/HF.2009.041>

21 Chundawat, S. P., Donohoe, B. S., da Costa Sousa, L., Elder, T., Agarwal, U. P., Lu, F., Ralph, J., Himmel, M.E., Balan, V. & Dale, B. E. (2011). Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy & Environmental Science*, 4(3), 973-984. <https://doi.org/10.1039/C0EE00574F>.

- 22 Yu, Z., Gwak, K. S., Treasure, T., Jameel, H., Chang, H. M., & Park, S. (2014). Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. *ChemSusChem*, 7(7), 1942-1950. [https://doi: 10.1002/cssc.201400004](https://doi.org/10.1002/cssc.201400004).
- 23 Guilherme, A. D. A., Dantas, P. V. F., Soares, J. C. J., dos Santos, E. S., Fernandes, F. A. N., & de Macedo, G. R. (2017). Pretreatments and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse aiming at the enhancement of the yield of glucose and xylose. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(4), 937-947. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170344s20160225>.
- 24 Overend, R. P., & Chornet, E. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 321(1561), 523-536. <https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>.
- 25 Chum, H. L., Johnson, D. K., & Black, S. K. (1990). Organosolv pretreatment for enzymic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. *Industrial & engineering chemistry research*, 29(2), 156-162. <https://doi.org/10.1021/ie00098a003>.
- 26 Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K., & Overend, R. P. (1992). Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science*, 47(5), 1109-1122. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)80235-5](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80235-5).
- 27 Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Santa Anna, L. M. M., De Castro, A. M., Driemeier, C. E., Pereira Jr. N. & Polikarpov, I. (2011). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, 46(5), 1196-1201. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.022>.
- 28 Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617, 1-16. <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf> (accessed 22 Oct 2018).
- 29 Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 10. [https://doi: 10.1186/1754-6834-3-10](https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10).
- 30 Da Silva, S. S., & Chandel, A. K. (2014). Biofuels in Brazil. *Switzerland: Springer International Publishing*. [https://doi:10.1007/978-3-319-05020-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05020-1).
- 31 Lima, M. A., Gomez, L. D., Steele-King, C. G., Simister, R., Bernardinelli, O. D., Carvalho, M. A., Rezende, C., Labate, C., deAzevedo, R.E., McQueen-Mason S.J., & Polikarpov, I. (2014). Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 10. [https://doi: 10.1186/1754-6834-7-10](https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-10).

- 32 Focher, B., Marzetti, A., Cattaneo, M., Beltrame, P. L., & Carniti, P. (1981). Effects of structural features of cotton cellulose on enzymatic hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 26(6), 1989-1999. <https://doi.org/10.1002/app.1981.070260622>.
- 33 Martínez, A. T., González, A. E., Valmaseda, M., Dale, B. E., Lambregts, M. J., & Haw, J. F. (1991). Solid-state NMR studies of lignin and plant polysaccharide degradation by fungi. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 45(s1), 49-54. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1991.45.s1.49>.
- 34 Wickholm, K., Larsson, P. T., & Iversen, T. (1998). Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 312(3), 123-129. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00236-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00236-5).
- 35 Hallac, B. B., Sannigrahi, P., Pu, Y., Ray, M., Murphy, R. J., & Ragauskas, A. J. (2009). Biomass characterization of *Buddleja davidii*: a potential feedstock for biofuel production. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1275-1281. . <https://doi.org/10.1021/jf8030277>.
- 36 El Hage, R., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2010). Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. *Polymer Degradation and Stability*, 95(6), 997-1003. . <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.012>.
- 37 Sannigrahi, P., Miller, S. J., & Ragauskas, A. J. (2010). Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. *Carbohydrate research*, 345(7), 965-970. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.02.010>.
- 38 Templeton, D. W., Scarlata, C. J., Sluiter, J. B., & Wolfrum, E. J. (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method uncertainties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 9054-9062. <https://doi.org/10.1021/jf100807b>.
- 39 Foston, M. B., Hubbell, C. A., & Ragauskas, A. J. (2011). Cellulose isolation methodology for NMR analysis of cellulose ultrastructure. *Materials*, 4(11), 1985-2002. <https://doi.org/10.3390/ma4111985>.
- 40 Novotny, E. H., Hayes, M. H., Madari, B. E., Bonagamba, T. J., Azevedo, E. R. D., Souza, A. A. D., Song, G., Nogueira, C. M., & Mangrich, A. S. (2009). Lessons from the Terra Preta de Índios of the Amazon region for the utilisation of charcoal for soil amendment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), 1003-1010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000600002>.
- 41 Avellar, B. K., & Glasser, W. G. (1998). Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 205-218. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)10043-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)10043-5).
- 42 Chen, J., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, Q., & Huang, H. (2014). Screw extrude steam explosion: a promising pretreatment of corn stover to enhance enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 161, 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.043>.

- 43 Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>.
- 44 Prunescu, R. M., Blanke, M., Jakobsen, J. G., & Sin, G. (2015). Dynamic modeling and validation of a biomass hydrothermal pretreatment process—a demonstration scale study. *AIChE Journal*, 61(12), 4235-4250. <https://doi.org/10.1002/aic.14954>
- 45 Prathyusha, N., Kamesh, R., Rani, K. Y., Sumana, C., Sridhar, S., Prakasham, R. S., ... & Kumar, M. P. (2016). Modelling of pretreatment and saccharification with different feedstocks and kinetic modeling of sorghum saccharification. *Bioresource technology*, 221, 550-559. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.007>
- 46 Aguilar, D. L., Rodríguez-Jasso, R. M., Zanuso, E., de Rodríguez, D. J., Amaya-Delgado, L., Sanchez, A., & Ruiz, H. A. (2018). Scale-up and evaluation of hydrothermal pretreatment in isothermal and non-isothermal regimen for bioethanol production using agave bagasse. *Bioresource technology*, 263, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.100>
- 47 Silveira, M. H. L., Chandel, A. K., Vanelli, B. A., Sacilotto, K. S., & Cardoso, E. B. (2018). Production of hemicellulosic sugars from sugarcane bagasse via steam explosion employing industrially feasible conditions: Pilot scale study. *Bioresource Technology Reports*, 3, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.07.011>
- 48 Simmons, T. J., Mortimer, J. C., Bernardinelli, O. D., Pöppler, A. C., Brown, S. P., Dupree, R., & Dupree, P. (2016). Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature communications*, 7, 13902. <https://doi.org/10.1038/ncomms13902>.
- 49 Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO* (pp. 1115-1126). Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/ABAB:115:1-3:1115>.
- 50 Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource technology*, 101(24), 9624-9630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.137>.
- 51 Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., & Ladisch, M. (2010). Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3-4), 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.001>.
- 52 Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., & Ladisch, M. (2011). Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and microbial technology*, 48(1), 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006>.
- 53 Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., & Saddler, J. (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of biotechnology*, 125(2), 198-209. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021>.

- 54 Ko, J. K., Kim, Y., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2015). Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 112(2), 252-262. <https://doi.org/10.1002/bit.25349>.
- 55 Nakagame, S., Chandra, R. P., Kadla, J. F., & Saddler, J. N. (2011). Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin. *Biotechnology and bioengineering*, 108(3), 538-548. [https://doi: 10.1002/bit.22981](https://doi.org/10.1002/bit.22981).
- 56 Liu, C., & Wyman, C. E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(21), 5409-5416. [https://doi: 10.1021/ie030458k](https://doi.org/10.1021/ie030458k).
- 57 Bernardinelli, O. D., Lima, M. A., Rezende, C. A., Polikarpov, I., & Ribeiro deAzevedo, E. (2015). Quantitative ^{13}C MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0292-1>.

Supplementary material

Figure 4.1 SM - Total cellulose conversion after 72 hours enzymatic hydrolysis for untreated sugarcane bagasse, auto- (CSF of 0.37, 0.47, 0.53 and 0.76, respectively) and sulfuric acid-catalyzed (CSF of 1.04, 1.06, 1.12 and 1.34) steam exploded sugarcane bagasse samples. The error bars are standard deviations from the average values.

Capítulo 5.

Artigo 3

Artista: Edvard Munch

Capítulo 5.

Artigo 3 - Técnicas físicas lançam luz sobre as diferenças na estrutura e composição do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes condições de pré-tratamentos por explosão a vapor, sob equivalente fator de severidade combinado

No capítulo anterior foi analisado o efeito do pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar sob diferente fator de severidade. Neste, o objetivo é investigar o fator de severidade combinado como um parâmetro comparativo mediante diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor. Para isto, o fator de severidade combinado foi fixado como uma constante, sendo a temperatura, o tempo e o pH as variáveis neste processo.

Através de diversas técnicas biofísicas foram caracterizadas as amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas a explosão a vapor catalisadas por ácido fosfórico, ácido sulfúrico e na ausência de catalisadores exógenos, sob equivalente fator de severidade combinado. Em forma de artigo, o resultado desta pesquisa está apresentado neste capítulo 5.

Por meio deste estudo, buscamos identificar o impacto do fator de severidade combinado na biomassa e sua relação no processo de hidrólise enzimática visando a conversão glicosídica.

Artigo 3

Physical techniques shed light on the differences in structure and composition of sugarcane bagasse subjected to different steam explosion pretreatments at equivalent combined severity factors

Melissa C. Espírito Santo, Douglas H. Fockink, Vanessa O. Arnoldi Pellegrini, Francisco E.G. Guimaraes, Eduardo R. deAzevedo, Luiz Pereira Ramos and Igor Polikarpov

ABSTRACT

Significant improvements and a deeper understanding of changes in the physical structure and chemical composition of pretreated lignocellulosic materials pretreatment are required to guarantee the technical and economic sustainability of second-generation ethanol technologies. In present work, several biophysical techniques were applied to characterize sugarcane bagasse samples that have been subjected to autocatalytic, phosphoric acid and sulfuric acid catalyzed steam explosion under equivalent combined severity factors (CSF). Confocal laser scanning microscopy and fluorescence lifetime imaging studies demonstrated unequal changes in lignin distribution in the plant cell wall that could be nicely correlated with substrate accessibility to enzymatic hydrolysis. Furthermore, solid state nuclear magnetic resonance corroborated these observations by showing the differences in biomass composition primarily associated with hemicellulose removal, whereas X-ray diffraction analysis revealed changes in crystallinity indexes and average crystallite sizes. Thus, the impact of pretreatment temperature on the physical structure and chemical composition of CSF-equivalent steam-exploded sugarcane bagasse was identified as the key parameter for developing substrate accessibility. This calls for caution in using combined severity factor as a chief parameter for comparison of different pretreatment conditions.

Keywords: Sugarcane bagasse; Pretreatment; Combined severity factor; Biophysical studies.

1. INTRODUCTION

Sugarcane bagasse is an abundant resource of lignocellulosic biomass in Brazil and other parts of the world that can be used for the production of renewable fuels, green chemicals and sustainable materials. Cell walls of sugarcane bagasse are composed of a complex matrix of biopolymers, forming lignin–carbohydrate complexes whose elevated recalcitrance represents an obstacle for enzymatic hydrolysis into monomeric sugars, which can be further fermented to produce bioethanol or upgraded into green chemicals. (1 – 3) One of essential prerequisites for the valorization of lignocellulosic biomass is its efficient pretreatment. (4) One of the well-studied pretreatment technologies that has a high potential for integration into existing first-generation sugarcane mill technologies is steam explosion. (5 – 6) Such pretreatment includes exposure of the biomass to a high-pressure saturated steam for a short period of time, followed by a sudden release of pressure that results in structural and compositional changes of the plant cell wall. (7 – 9)

Steam explosion causes deacetylation of hemicelluloses, with a concomitant release of acetic acid in the reaction media that causes partial autocatalytic hydrolysis of acid-labile polysaccharides (mainly hemicellulose). (5, 10) This process allows a high recovery of hemicelluloses as soluble mono- and oligosaccharides, while most of both cellulose and lignin are recovered in the solid fraction as a fiber slurry. (11 – 12)

Exogenous mineral acid catalysts such as sulfuric (H_2SO_4) and/or phosphoric (H_3PO_4) acids can be added to the biomass to increase pretreatment efficiency. (13, 14) The addition of exogenous acid catalysts can also contribute to decreasing the time and temperature required for optimal pretreatment. (15) However, addition of acids must be well-controlled to avoid degradation of pentoses into furfural and hexoses into 5-(hydroxymethyl)-furfural (HMF), which are deleterious to yeast and could be detrimental to the fermentability of biomass hydrolysates. (16, 17)

To predict outcomes and to compare efficiencies of pretreatments conducted under different experimental conditions, the severity factor ($\log R_0$) is often used. (18) This factor corresponds to the logarithm of the reaction ordinate (R_0), which combines pretreatment temperature and residence time into a single parameter on the basis of the Arrhenius Law.

$$R_0 = \int_0^t e^{\frac{T-100}{14.75}} dt \quad \text{Equation (1)}$$

To take into account the influence of acid catalysis, Eq. 1 can be further extended by introducing the pretreatment pH as described by the combined severity factor (CSF). (19, 20)

$$CSF = \log_{10} \left[t \times e^{\frac{T-100}{14.75}} \right] - pH \quad \text{Equation (2)}$$

In both cases, t is the pretreatment time in minutes and T is the temperature of pretreatment in °C. Both $\log R_0$ and CSF have been widely used for years to provide a direct comparison among results of biomass pretreatments that were conducted under different experimental conditions. (12, 21 – 23)

In our previous study, (9) steam explosion of sugarcane bagasse at equivalent CSF values using three different experimental conditions, autocatalysis (referred to as SEB), dilute H_2SO_4 (SEB/SA) and dilute H_3PO_4 (SEB/PA) were analyzed. Steam-exploded materials showed similar chemical composition and susceptibility to enzymatic hydrolysis, except for two experiments that were carried out using sulfuric acid at lower temperatures and shorter reaction times. This was a clear indication that different pretreatment conditions could only be equalized by CSF if the temperature was high enough to promote lignin coalescence and changes in lignin chemistry and distribution. However, no attempt was made in that work to characterize fiber morphology and composition using biophysical methods, and to correlate these with developments in substrate accessibility.

To reveal differences in physical structure of the plant biomass imprinted by different pretreatment conditions with the same CSF, we set out to study the physical structure of the pretreated samples and to correlate changes in fiber morphology, substrate composition, and lignin structure and distribution with their accessibility to enzymatic hydrolysis.

^{13}C solid-state nuclear magnetic resonance (^{13}C ssNMR), X-ray diffraction and confocal laser scanning microscopy (CLSM) techniques were used and their results were critically compared with changes in chemical composition that were introduced by the applied pretreatment conditions and with the observed hydrolysis yields. This study aimed to reveal the complexity of chemical reactions and physical rearrangements caused by pretreatments, shedding light on the molecular reasons behind the development of substrate susceptibility to bioconversion.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Sugarcane bagasse was obtained from the São Martinho Mill (São Paulo, SP, Brazil). Cellic CTec 3 was donated by Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brazil). All solvents, reagents, and chromatographic standards were obtained in analytical grade and used as received.

2.2 Pretreatment

Seven experiments were designed to operate at the same combined severity factor (CSF) of 0.76 ± 0.02 . Three autocatalytic steam-exploded bagasse (SEB), three dilute sulfuric acid-impregnated steam-exploded bagasse (SEB/SA) and one dilute phosphoric acid-impregnated steam-exploded bagasse (SEB/PA) were used as described by. (9)

To choose CSF for each pretreatment, a reference value was established. To select this value, a reaction condition obtained from previous optimization studies, considered as best for sugarcane bagasse was reproduced. It consists of exposing the biomass for 7.5 min to 195 °C in the presence of 9.5 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ dry matter (SEB/PA with a CSF of 0.75). (14, 24) Six other conditions involving three autocatalytic (SEB-1 to SEB-3) and three dilute H_2SO_4 (SEB/SA-1 to SEB/SA-3) were designed to achieve equivalent CSF (Table 5. 1).

Table 5. 1. Experimental conditions applied to sugarcane bagasse for the autocatalytic and acid-catalyzed steam explosion (adapted from 9).

Pretreatment	Experimental conditions			pH	log Ro	CSF
	T (° C)	t (min)	[H ⁺] (mg.g ⁻¹ DS)			
SEB/PA	195	7.5	9.5	2.93 ± 0.04	3.67	0.75
SEB-1	195	15	-	3.18 ± 0.04	3.97	0.79
SEB-2	205	7.5	-	3.18 ± 0.03	3.97	0.79
SEB-3	200	10.5	-	3.19 ± 0.04	3.97	0.78
SEB/SA-1	195	7.5	2.5	2.93 ± 0.04	3.67	0.74
SEB/SA-2	170	7.5	9.5	2.18 ± 0.05	2.94	0.76
SEB/SA-3	180	4	9.5	2.22 ± 0.04	2.96	0.74

SEB/PA - steam-exploded bagasse catalyzed by phosphoric acid;

SEB - steam-exploded bagasse (autocatalysis);

SEB/S - steam-exploded bagasse catalyzed by sulfuric acid;

T - temperature; t, residence time; [H⁺], concentration of the exogenous acid (mg acid. g⁻¹ dry substrate);

pH values were measured in pretreatment water-solubles;

R_0 - reaction ordinate; $\log R_0$ - severity factor (18);

CSF - combined severity factor (19)

2.3 Chemical composition of the biomass samples

The chemical composition of the biomass before and after pretreatment was determined using NREL (National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA) analytical procedures as described in (9). Percentages of cellulose, hemicelluloses and lignin were calculated on a dry basis. Glucans (mostly cellulose) were reported by summing up glucose and glucose equivalents coming from cellobiose and HMF that were quantified by high pressure liquid chromatography (HPLC). Hemicelluloses were reported by grouping together xylose, arabinose, acetic acid, and furfural (expressed as pentose equivalents), while total lignin resulted from the summation of acid-soluble and acid-insoluble lignins. Ash contents were obtained by measuring the remaining inorganic fraction after carbonizing the samples in a muffle at high temperature.

2.4 Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis of steam-exploded materials was performed to assess substrate accessibility according to NREL. (25) The experiments were carried out in 50 mmol L⁻¹ sodium acetate buffer (pH 5.2) with the enzyme cocktail (Cellic CTec 3) loading of 60 FPU g⁻¹ glucans and the substrate total solids of 2 wt.% for a final reaction volume of 50 mL. All hydrolysis experiments were carried out at 50 °C and 150 rpm in 125 mL Erlenmeyer flasks. Total cellulase activity was measured as filter paper unit (FPU) according to literature. (26, 27) Aliquots were collected and analyzed by HPLC to quantify glucose and cellobiose and these were accounted together as glucose equivalents. Hydrolysis yields were calculated in relation to the carbohydrate content of the pretreated materials.

2.5 ¹³C Solid-state nuclear magnetic resonance (¹³C ssNMR)

¹³C Solid-state nuclear magnetic resonance (¹³C ssNMR) experiments were performed using a Varian INOVA 400 spectrometer, equipped with a Jackobsen designed 7-mm Magic Angle Spinning double-resonance probe head operating at ¹³C and ¹H frequencies of 100.5 and 400.0 MHz, respectively. The spinning frequency at 5 kHz was controlled by a

pneumatic system that ensures rotation stability higher than ~ 1 Hz. Typical $\pi/2$ pulse lengths of 4 and 4.5 μs were applied for ^{13}C and ^1H , respectively. Proton decoupling field strength of $\gamma B_1/2\pi = 62.5$ kHz was used. ^{13}C . CPMAS-TOSS experiments was used in all acquisitions. Recycle delays were set at 2 s.

2.6 X-Ray diffraction

X-ray diffraction (XRD) experiments were performed using a Rigaku Rotaflex diffractometer model RU200B (Tokyo, Japan) with monochromatic $\text{CuK}\alpha$ radiation (1.54 Å) at ambient temperature. The substrates were placed in a sample holder and the XRD equipment was set to operate at 40 kV and 15 mA. 2 θ scans were measured from 5 to 50° in 0.05° steps with an X-ray exposure of 15 s per step. Experiments were always carried out in duplicate.

Crystallinity indices (CrIs) were determined by Segal's empirical method (28) whereas average crystallite sizes were calculated using the Scherrer's equation, which takes into account the width of the diffraction peaks at a half maximum height. (29, 30)

2.7 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

To obtain information about lignin distribution within the cell wall before and after pretreatment, confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used. This technique maps lignin distribution by measuring its fluorescence emitting spectra. (31) CLSM images were collected from the surface of the samples using a Zeiss LSM 780 confocal microscope with a Coherent Chameleon laser (Tisapphire) for a two-photons (2P) excitation and a Plan-Apochromat objective lens (20x) as described previously. (31, 32)

3. RESULTS AND DISCUSSION

Pretreatment conditions in which H_2SO_4 was used at lower reaction temperatures (SEBA/S-2 and SEB/SA-3 in Table 5. 1) produced SEB/SA fractions with higher hemicellulose contents (7.6 and 6.9 wt.%, respectively), indicating that temperature was critical for its effective removal from the substrate chemical composition. On the other hand, pretreatment at temperatures above 195 °C resulted in similar chemical compositions and accessibilities to enzymatic hydrolysis (Table 5. 2 and Figure 5. 1). This is aligned with the hypothesis that pretreatment at high temperatures and short residence times are better than low temperatures and long residence times because the latter conditions tend to accumulate fermentation inhibitors in the form of organic acids, furan compounds (furfural and HMF) and phenolic acids, and to elicit unwanted side reactions leading to yield losses such as condensation involving carbohydrate and lignin derivatives to form humins and pseudo-lignin, respectively. (33, 34) Besides, low pretreatment temperatures may not be good enough to remove most hemicelluloses from steam-treated materials and to reach the transition point of cellulose and lignin, leading to undercooked materials whose susceptibility to enzymatic hydrolysis is relatively low. (35) Indeed, this was the case for SEB/SA-2 and SEB/SA-3 which, by operating at lower temperatures at the same CSF of other pretreatment experiments, ended up producing the worst substrates for hydrolysis even in the presence of catalytic concentrations of sulfuric acid (Figure 5. 1 and Table 5. 2).

Table 5. 2 - Chemical composition, crystallinity and enzymatic hydrolysis of the samples pretreated by steam explosion

Material	Composition ^a (%)				Crystallinity index ^b (%)		Cellulose crystallite width ^c (nm)	Enzymatic hydrolysis ^d (72 h)
	Glucans	Hemicellulose	Total lignin	Ashes	Segal et al. [28]	¹³ C NMR		
SEB/PA	50.2 ± 0.9	2.7 ± 0.5	35.2 ± 0.7	10.3 ± 0.5	56 ± 1	45 ± 2	4.1 ± 0.1	91 ± 4
SEB-1	51.3 ± 0.6	3.3 ± 0.6	34.6 ± 0.9	10.6 ± 0.2	51 ± 2	42 ± 2	4.4 ± 0.1	92 ± 3
SEB-2	50.2 ± 0.7	3.2 ± 0.2	34.9 ± 0.4	10.7 ± 0.3	57 ± 2	49 ± 2	4.3 ± 0.1	94 ± 2
SEB-3	52.0 ± 0.4	3.9 ± 0.6	33.1 ± 0.6	10.5 ± 0.5	46 ± 1	50 ± 2	3.9 ± 0.2	96 ± 2
SEB/SA-1	49.9 ± 0.6	3.8 ± 0.4	35.2 ± 0.9	10.4 ± 0.4	56 ± 2	46 ± 2	3.9 ± 0.1	89.2 ± 0.1
SEB/SA-2	48.4 ± 0.5	7.6 ± 0.6	33.3 ± 0.9	9.4 ± 0.9	38 ± 1	37 ± 2	3.0 ± 0.1	68 ± 2
SEB/SA-3	50.5 ± 0.2	6.9 ± 0.3	30.8 ± 0.6	10.9 ± 0.3	39 ± 2	38 ± 2	3.3 ± 0.1	72 ± 2

^a Adapted (9)

^b Crystallinity indexes were determined according (28) and ¹³C NMR method;

^c Crystal width was calculated using the Scherrer equation (29 – 30)

^d Substrate accessibility, expressed as glucose yields according to (25)

Figure 5. 1 - Glucan conversion during enzymatic hydrolysis of steam-exploded cane bagasse using Cellic CTec 3 at low substrate total solids and high enzyme loadings (NREL's substrate accessibility assay). Bars with the same letter above do not differ significantly according to the Tukey's test ($p > 0.05$).

In order to better evaluate the pretreatment effect on the structure and composition of sugarcane bagasse, biophysical analyses such as XRD, ^{13}C ssNMR and CLSM made themselves necessary. It is well known that acid pretreatments do not alter the crystallinity of cellulosic materials, which allomorphic form remains as native cellulose, but cause a significant change in their corresponding crystallinity index (CrI) and this effect is mostly due to hemicellulose removal. (36) Indeed, several authors have shown that CrI changes linearly with pretreatment severity, and in most of these studies CrI was calculated using the Segal's equation. (37 – 38) In this work, changes in substrate CrI were also evaluated by the Segal's empirical method and the results were compared to those obtained by ^{13}C ssNMR (Table 5. 2). CrI readings based on the Segal's equation agreed relatively well with the changes in hemicellulose content. Samples pretreated using the same CSF at temperatures above 195 °C (SEB1 to SEB3, SEB/PA and SEB/SA-1) had similar Segal's CrI averaging 52 ± 4 %, whereas lower CrI values were observed for SEB/SA-2 and SEB/SA-3 which had higher hemicellulose content. Likewise, changes in average crystal width could be associated to a more extensive removal of amorphous hemicellulose and the consequent collapse and recrystallization of cellulose fibrils forming larger crystalline

structures. Indeed, average crystal widths were particularly small for SEB/SA-2 and SEB/SA-3, that have higher hemicellulose contents as compared to SEB, SEB/PA and SEB/SA-1 (Table 5. 2). CrI values were also evaluated using ^{13}C ssNMR. This was done by analyzing the signals at 83.5 and 87.9 ppm (inserts of Figure 5. 4), which arise from C4 carbon in the amorphous (surface cellulose and hemicelluloses) and crystalline (bulk cellulose) regions, respectively. Thus, CrI was calculated by dividing the peak intensity at 87.9 ppm by the sum of both peak intensities. As usually observed, the CrI values obtained from ^{13}C ssNMR are somewhat smaller than those obtained from the Segal's empirical method. (39) Despite that, the CrI values measured by ^{13}C ssNMR depict the same trends as those obtained from Segal's empirical method, being significantly smaller for SEB/SA-2 and SEB/SA-3 compared to other pretreatment conditions (Table 5. 2). Peaks 1 and 17 in the ^{13}C ssNMR spectra of SEB/SA-2 and SEB/SA-3 were more intense than those found in the corresponding spectra of other pretreated materials (Figure 5. 4). These peaks correspond to CH_3 moieties in acetyl groups and to the carboxyl carbon atoms in uronic acid moieties of hemicelluloses, (40) respectively, therefore correlating with the higher hemicellulose content of both SEB/SA-2 and SEB/SA-3 pretreated materials. Thus, the smaller CrI values of SEB/SA-2 and SEB/SA-3 was probably a result of their higher hemicelluloses content. On the other hand, average crystal widths are clearly smaller for SEB/SA-2 and SEB/SA-3 and this once again is consistent with higher hemicellulose content in the samples (Table 5. 2). Larger crystallite widths in SEB/PA, SEB-1, SEB-2, SEB-3 and SEB/SA-1 nicely correlate with stronger hemicellulose removal at higher pretreatment temperatures, with the subsequent co-crystallization of cellulose chains leading to bigger cellulose crystals. Hemicellulose removal promotes direct interfacing between cellulose crystallites, enabling co-crystallization that results in larger crystallite lateral dimensions. (41) Smaller crystal widths of both SEB/SA-2 and SEB/SA-3 fibers are consistent with limited removal of hemicellulose fraction from these samples and their lower accessibility to enzymatic hydrolysis.

Furthermore, ^{13}C ssNMR was used to reveal changes in the chemical composition of cellulosic materials that were produced at the five pretreatment conditions that are described in Table 5. 1. One advantage of using this analytical technique is that chemical changes are assessed directly without any need of sample fractionation, hydrolysis or derivatization for chromatographic or spectroscopic analysis.

In addition, the intensity ratio of peaks 15 (C3 and C5 aromatic carbons of syringyl units in lignin) and 14 (C3 and C5 aromatic carbons of syringyl and C1 and C4 aromatic carbons of guaiacyl units in lignin) was higher for SEB/SA-2 and SEB/SA-3 compared to SEB and SEB/PA fibers. This indicates that lignin in both SEB/SA-2 and SEB/SA-3 contained higher amounts of syringyl monolignols, or a higher syringyl-to-guaiacyl (S/G) ratio. Although yet to be confirmed by other analytical techniques, it seems that lignin was undercooked under pretreatment temperatures lower than 195 °C, therefore preserving the higher S/G ratios that are typical in untreated cane bagasse. (42) Observations like this imply once again that lignin composition have an important effect in saccharification yields, (43) since SEB/SA-2 and SEB/SA-3 were the worst substrates for enzymatic hydrolysis (Figure 5. 1).

In general, analysis by ^{13}C ssNMR evidenced important differences in the chemical composition of both SEB/SA-2 and SEB/SA-3 compared to SEB, SEB/PA and SEB/SA-1 fibers.

Figure 5. 2 - ^{13}C ssNMR CPMASTOSS spectra of CSF-equivalent steam-exploded bagasse fibers, with all spectra normalized in relation to the C1 carbon of cellulose (peak 10). SEB, autocatalytic steam explosion; SEB/SA, dilute H_2SO_4 -catalysed steam explosion; and SEB/PA, H_3PO_4 -catalysed steam explosion (used as reference for the calculation of CSF).

It is well known that lignin undergoes chemical changes as a result of steam explosion, and that this may have severe implications in the susceptibility of pretreated substrates to enzymatic hydrolysis. (44 – 46) Hydrolysis of aryl-ether linkages prevails at lower pretreatment severities causing a decrease in lignin average molar mass, (13) whereas condensation involving aliphatic and aromatic carbon atoms requires more drastic conditions of temperature, time and acid strength to occur. (47, 48)

In this study, CLSM-FLIM was used to visualize the distribution and structure of lignin in steam-exploded substrates that had similar lignin contents (Table 5. 2) because they were produced using the same CSF, both in the absence (autocatalysis) and presence of dilute H_2SO_4 and H_3PO_4 as exogenous acid catalysts (Figure 5. 3). The lignin component of raw sugarcane bagasse emitted a blue spectrum (400 – 500 nm range) and its fluorescence emission was very homogenous (Figure 5. 3 A). By contrast, the fluorescence of fibers that were pretreated under the same CSF at temperatures above 195 °C (SEB-1 to SEB-3, SEB/PA and SEB/SA-1) (Figures 5. 3 B to F) was clearly more heterogeneous, emitting at the longer wavelengths between green and red (500 – 700 nm). Lignin fluorescence in this region has been associated to the formation of molecular aggregates due to the lignin coalescence particularly at the compound middle lamellae, which is consistent with its pseudoplastic behavior when exposed to high temperatures. (31) However, we hypothesize that this red shift could also be due to the formation of stronger chromophores due mostly to the partial oxidation of lignin substructures. In addition, lignin coalescence in the compound middle lamellae produced water-insoluble fragments that are either deposited on the fiber surface or released free from any fiber interactions, particularly after long-term agitation of thick fiber slurries.

Figure 5. 3 - Confocal laser scanning microscopy images of (A) native sugarcane bagasse, (B) SEB/PA, (C) SEB-1, (D) SEB-2, (E) SEB-3, (F) SEB/SA-1, G) SEB/SA-2, and (H) SEB/SA-3 fibers.

Lignin is covalently linked to arabinoxylans in the native cell wall of sugarcane bagasse fibers (49) and this represents a considerable barrier for the mode of action of cellulytic enzymes (50). However, exposure to high pretreatment temperatures disrupt this macromolecular arrangement by removing hemicellulose and redistributing lignin, with a concomitant effect on glucans (mostly cellulose) accessibility. For example, when the reaction temperature was as high as 190 °C, the hemicellulose component of sugarcane bagasse was almost completely hydrolyzed to water-soluble sugars. (14, 51 – 53) Also, several studies have shown that lignin droplets are formed at high pretreatment temperatures and these remain partly adhered to the surface of pretreated fibers. (32, 46, 54) This

reprecipitated lignin emits in CLSM-FLIM at the longer wavelength region, as observed in Figures 5. 3 B - F in red.

To observe pretreated samples in more detail, CLSM was used to image isolated fibers as shown in Figure 4. SEB/PA, SEB and SEB/SA-1 (Figures 5. 4 A to 5. 4 E) reveal the accumulation of a large quantity of lignin agglomerates inside the fibers, as a result of its reallocation caused by pretreatment. It is important to note that these samples are those that were pretreated at temperatures ≥ 195 °C and had a relatively low hemicellulose content in their chemical composition (Table 5. 2). On the other hand, SEB/SA-2 and SEB/SA-3 fibers had higher hemicellulose content (Table 5. 2), smaller changes in the lignin fluorescence spectra and limited melting and aggregation of lignin within the fiber cell walls because they were produced at lower pretreatment temperatures (170 °C and 180 °C, respectively). More importantly, lignin in these fibers emitted primarily in the green spectral regions, suggesting lower agglomeration and migration in and out of the fiber cell wall, where it was found more evenly distributed compared to fibers derived from higher pretreatment temperatures.

Figure 5. 4 - Confocal laser scanning microscopy image of isolated fibers. (A) SEB/PA, (B) SEB-1, (C) SEB-2, (D) SEB-3, (E) SEB/SA-1, (F) SEB/SA-2, and (G) SEB/SA-3 fibers.

Formation of lignin droplets within the internal cavity of the cell wall was evident in SEB/PA, SEB and SEB/SA-1 fibers (Figures 5. 4A to 4E). This phenomenon cannot be attributed to the coalescence of lignin (or lignocarbhydrate complexes) in the compound middle lamella, but to the migration of protolignin existing in the S2 layer towards the cell lumen, where it may have combined with waxy materials belonging to the S3 (or warty) layer. Such migration may have been induced by fiber cracks and defects that were caused by high pressure steaming as well as by the acid hydrolysis of hemicelluloses. Brunecky et al. (55) analyzed the distribution of xylans within the cell wall during dilute acid pretreatment using CLSM and observed a loss of xylan antibody signal from the center of the cell wall and an increase or at least a signal retention at the lumen and middle lamella. Hemicellulose removal would increase fiber porosity and facilitate lignin migration out of

the S2 layer towards the cell lumen, where it might have been involved in condensation reactions leading to the accumulation of coalesced droplets of different sizes, emitting in the yellow and red region of the fluorescence spectrum.

By contrast to SEB/PA, SEB and SEB/SA-1, SEB/SA-2 (Figures 5. 3 G and 4 F) and SEB/SA-3 fibers (Figures 5. 3 H and 4 G) emitted mostly in green spectral region, indicating smaller levels of lignin agglomeration. Furthermore, lower lignin aggregation and droplet formation was observed, and this was readily attributed to the lower temperatures used for pretreatment, regardless of these being carried out at the same CSF. Changes in lignin autofluorescence wavelength have been observed previously, with the longer wavelengths being associated to the use of higher pretreatment temperatures. (12, 32)

Taken together, our studies suggest that the lower accessibilities of SEB/SA-2 and SEB/SA-3 fibers are associated with differences in their hemicellulose content as well as their lignin structure and distribution, (9) and that temperatures around 195 °C were required to disrupt the structural organization of lignin-carbohydrate complexes which act as barriers for developing accessibility in autohydrolytic or mineral acid-catalyzed steam-exploded sugarcane bagasse.

4. CONCLUSION

Out of all cane bagasse samples pretreated by steam explosion at a fixed CSF, temperatures lower than 195 °C resulted in steam-exploded fibers with the highest hemicellulose content and the lowest impact on lignin structure and distribution, producing substrates with relatively low accessibility to enzymatic hydrolysis. Nevertheless, these samples had the lowest Segal's crystallinity indexes and the smallest average crystallite sizes, suggesting that structural parameters such as these are not critical for hydrolysis when high loadings of Cellic CTec 3 are used at low substrate total solids. The observation that samples pretreated at the same CSF value had differences in physical structure, chemical composition and substrate accessibility suggests that CSF may not be robust enough to reliably predict the effects of acid-catalyzed steam explosion, particularly when temperatures below ~195 °C are applied.

Acknowledgments. The financial support of the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 551404/2010-8, 309506/2017-4, 303988/2016-9, 440977/2016-9, 405191/2015-4 and 423693/2016-6) and Sao Paulo Research Foundation (FAPESP; grant number 15/13684-0) is greatly acknowledged. We thank Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brazil) for donating the enzymes used for hydrolysis. This work was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

- 1 Qi, B., Chen, X., & Wan, Y. (2010). Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(13), 4875-4883. DOI 10.1016/j.biortech.2010.01.063
- 2 Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675-685. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- 3 Bragatto, J., Segato, F., & Squina, F. M. (2013). Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. *Industrial Crops and Products*, 51, 123-129. DOI 10.1016/j.indcrop.2013.08.062
- 4 Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861. DOI 10.1016/j.biortech.2009.11.093
- 5 Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26(6), 863-871. DOI 10.1590/S0100-40422003000600015
- 6 Rocha, G. J., Martín, C., da Silva, V. F., Gómez, E. O., & Gonçalves, A. R. (2012). Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. *Bioresource Technology*, 111, 447-452. DOI 10.1016/j.biortech.2012.02.005
- 7 Zheng, Y., Pan, Z., & Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(3), 51-68. DOI 10.3965/j.issn.1934-6344.2009.03.051-068
- 8 Fockink, D. H., Urio, M. B., Sánchez, J. H., & Ramos, L. P. (2017). Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties. *Energy & Fuels*, 31, 6211-6220. DOI 10.1021/acs.energyfuels.7b00818

- 9 Fockink, D. H., Sánchez, J. H., & Ramos, L. P. (2018). Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H_3PO_4 and H_2SO_4) at equivalent combined severity factors. *Industrial Crops and Products*, 123, 563-572. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.07.017
- 10 Langan, P., Petridis, L., O'Neill, H. M., Pingali, S. V., Foston, M., Nishiyama, Y., Schulz, R., Lindner, B., Hanson, B. L., Harton, S., Heller, W.T., Urban, V., Evans, B. R., Gnanakaran, S., Ragauskas, A. J., Smith, J. C., & Davison, B. H. (2014). Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, 16(1), 63-68. DOI 10.1039/C3GC41962B
- 11 Michelin, M., Ruiz, H. A., Maria de Lourdes, T. M., & Teixeira, J. A. (2018). Multi-step approach to add value to corncob: production of biomass-degrading enzymes, lignin and fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 247, 582-590. DOI 10.1016/j.biortech.2017.09.128
- 12 do Espírito Santo, M. C., Cardoso, E. B., Guimaraes, F. E. G., deAzevedo, E. R., da Cunha, G. P., Novotny, E. H., Pellegrini, V. O. A., Chandel, A. K., Silveira, M. L. & Polikarpov, I. (2019). Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields. *Industrial Crops and Products*, 139, 111542. DOI 10.1016/j.indcrop.2019.111542
- 13 Emmel, A., Mathias, A. L., Wypych, F., & Ramos, L. P. (2003). Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technology*, 86(2), 105-115. DOI 10.1016/S0960-8524(02)00165-7
- 14 Pitarelo, A. P., Fonseca, C. S. D., Chiarello, L. M., Gírio, F. M., & Ramos, L. P. (2016). Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(10), 1889-1898. DOI 10.5935/0103-5053.20160075
- 15 Bondesson, P. M., Galbe, M., & Zacchi, G. (2013). Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 11. DOI 10.1186/1754-6834-6-11
- 16 Akhtar, N., Gupta, K., Goyal, D., & Goyal, A. (2016). Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(2), 489-511. DOI 10.1002/ep.12257
- 17 Zhou, Z., Lei, F., Li, P., & Jiang, J. (2018). Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. *Biotechnology and Bioengineering*, 115 (11), 2683-2702. DOI 10.1002/bit.26788
- 18 Overend, R. P., & Chornet, E. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 321(1561), 523-536. DOI 10.1098/rsta.1987.0029
- 19 Chum, H. L., Johnson, D. K., Black, S. K., & Overend, R. P. (1990). Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied biochemistry and biotechnology*, 24(1), 1. DOI 10.1007/BF02920229

- 20 Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K., & Overend, R. P. (1992). Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science*, 47(5), 1109-1122. DOI 10.1016/0009-2509(92)80235-5
- 21 Chen, S. F., Mowery, R. A., Chambliss, C. K., & van Walsum, G. P. (2007). Pseudo reaction kinetics of organic degradation products in dilute-acid-catalyzed corn stover pretreatment hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(6), 1135-1145. DOI 10.1002/bit.21480
- 22 Kabel, M. A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A. G., & Schols, H. A. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, 98(10), 2034-2042. DOI 10.1016/j.biortech.2006.08.006
- 23 Pedersen, M., & Meyer, A. S. (2010). Lignocellulose pretreatment severity–relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, 27(6), 739-750. DOI 10.1016/j.nbt.2010.05.003
- 24 Aguiar, R. S., Silveira, M. H. L., Pitarelo, A. P., Corazza, M. L., & Ramos, L. P. (2013). Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 147, 416-423. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.067
- 25 Selig, M., Weiss, N., & Ji, Y. (2008). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, NREL/TP-510-42629. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, USA. *Laboratory analytical procedure (LAP)*, 1617
- 26 Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268. DOI 10.1351/pac198759020257
- 27 Schwald, W., Chan, M., Breuil, C., & Saddler, J. (1988). Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. *Applied Microbiology Biotechnology*, 28, 398-403. DOI 10.1007/BF00268203
- 28 Segal, L. G. J. M. A., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29 (10), 786-794. DOI 10.1177/004051755902901003
- 29 Scherrer, P. (1912). Bestimmung der inneren Struktur und der Größe von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. In *Kolloidchemie Ein Lehrbuch* (pp. 387-409). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-662-33915-2_7
- 30 Monshi, A., Foroughi, M. R., & Monshi, M. R. (2012). Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2(3), 154-160. DOI 10.4236/wjnse.2012.23020
- 31 Coletta, V. C., Rezende, C. A., da Conceição, F. R., Polikarpov, I., & Guimarães, F. E. G. (2013). Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 43. DOI 10.1186/1754-6834-6-43

- 32 Santo, M. E., Rezende, C. A., Bernardinelli, O. D., Pereira Jr, N., Curvelo, A. A., Guimarães, F. E., & Polikarpov, I. (2018). Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 113, 64-74. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.01.014
- 33 Damay, J., Duret, X., Ghislain, T., Lalonde, O., & Lavoie, J. (2018) Steam explosion of sweet sorghum stems: Optimisation of the production of sugars by response surface methodology combined with the severity factor. *Industrial Crops & Products*, 111, 482-493. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.11.006
- 34 Wang, Z., Wu, G., & Jönsson, L. J. (2018). Effects of impregnation of softwood with sulfuric acid and sulfur dioxide on chemical and physical characteristics, enzymatic digestibility, and fermentability. *Bioresource Technology*, 247, 200-208. DOI 10.1016/j.biortech.2017.09.081
- 35 Pielhop, T., Amgarten, J., Rohr, P. R. V., & Studer, M. H. (2016). Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, 9(152), 1-13. DOI 10.1186/s13068-016-0567-1
- 36 Ma, X.J., Cao, S.L., Lin, L., Luo, X.L., Hu, H.C., Chen, L.H., & Huang, L.L. (2013). Hydrothermal pretreatment of bamboo and cellulose degradation. *Bioresource Technology*, 148, 408-413. DOI 10.1016/j.biortech.2013.09.021
- 37 Kim, S. B., Lee, S. J., Lee, J. H., Jung, Y. R., Thapa, L. P., & Kim, J. S. (2013). Pretreatment of rice straw with combined process using dilute sulfuric acid and aqueous ammonia. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 109. DOI 10.1186/1754-6834-6-109
- 38 Kapoor, M., Raj, T., Vijayaraj, M., Chopra, A., Gupta, R. P., & Tuli, D. K. (2015). Structural features of dilute acid, steam exploded, and alkali pretreated mustard stalk and their impact on enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Polymer*, 124, 265-273. DOI 10.1016/j.carbpol.2015.02.044
- 39 Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 10. DOI 10.1186/1754-6834-3-10
- 40 Rezende, C. A., de Lima, M. A., Maziero, P., deAzevedo, E. R., Garcia, W., & Polikarpov, I. (2011). Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 54. DOI 10.1186/1754-6834-4-54
- 41 Driemeier, C., Mendes, F. M., Santucci, B. S. & Pimenta, M. T. B. (2015). Cellulose co-crystallization and related phenomena occurring in hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. *Cellulose*, 22, 2183–2195. DOI 10.1007/s10570-015-0638-7
- 42 Del Río, J. C., Lino, A. G., Colodette, J. L., Lima, C. F., Gutiérrez, A., Martínez, A. T. Lu, F., Ralph, J., & Rencoret, J. (2015) Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy*, 81, 322-338. DOI 10.1016/j.biombioe.2015.07.006

- 43 Zeng, J., Tong, Z., Wang, L., Zhu, J. Y., & Ingram, L. (2014). Isolation and structural characterization of sugarcane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 154, 274-281. DOI 10.1016/j.biortech.2013.12.072
- 44 Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., & Zacchi, G. (2007). Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98(13), 2503-2510. DOI 10.1016/j.biortech.2006.09.003
- 45 Yoshida, M., Liu, Y., Uchida, S., Kawarada, K., Ukagami, Y., Ichinose, H., Kaneko, S., & Fukuda, K. (2008). Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 805-810. DOI 10.1271/bbb.70689
- 46 Yu, Z., Gwak, K. S., Treasure, T., Jameel, H., Chang, H. M., & Park, S. (2014). Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. *ChemSusChem*, 7 (7), 1942-1950. DOI 10.1002/cssc.201400042
- 47 Chandra, R., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2012). Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production. *Applied Energy*, 94, 129-140. DOI 10.1016/j.apenergy.2012.01.027
- 48 Li, J., Henriksson, G., & Gellerstedt, G. (2007). Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology*, 98, 3061-3068. DOI 10.1016/j.biortech.2006.10.018
- 49 Bian, J., Peng, F., Peng, X., Xu, F., Sun, R., & Kennedy, J. F. (2012). Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. *Carbohydrate Polymers*, 88, 638-645. DOI 10.1016/j.carbpol.2012.01.010
- 50 Jeoh, T., Ishizawa, C. I., Davis M. F., Himmel, M. E., Adney, W. S., & Johnson, D. K. (2007). Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol Bioeng*, 98(1):112–122. DOI 10.1002/bit.21408
- 51 Chen, W. H., Tu, Y. J., & Sheen, H. K. (2011). Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*, 88(8), 2726-2734. DOI 10.1016/j.apenergy.2011.02.027
- 52 Rocha, G. J., Silva, V. F., Martín, C., Gonçalves, A. R., Nascimento, V. M., & Souto-Maior, A. M. (2013). Effect of xylan and lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. *Sugar Tech*, 15(4), 390-398. DOI 10.1007/s12355-013-0218-9
- 53 Vallejos, M. E., Felissia, F. E., Kruyeniski, J., & Area, M. C. (2015). Kinetic study of the extraction of hemicellulosic carbohydrates from sugarcane bagasse by hot water treatment. *Industrial Crops and Products*, 67, 1-6. DOI 10.1016/j.indcrop.2014.12.058
- 54 Donohoe, B. S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E., & Vinzant, T. B. (2008). Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(5), 913-925. DOI 10.1002/bit.21959

55 Brunecky, R., Vinzant, T. B., Porter, S. E., Donohoe, B. S., Johnson, D. K., & Himmel, M. E. (2009). Redistribution of xylan in maize cell walls during dilute acid pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1537-1543. DOI 10.1002/bit.22211

Capítulo 6.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Artista: Candido Portinari

Capítulo 6

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS

Na busca por tecnologia que visa a produção de bioenergia, especificamente biocombustíveis, há diversos pré-tratamentos disponíveis para os fracionamentos dos componentes da biomassa, mas a escolha deste está intimamente relacionada ao uso que se dará aos componentes fracionados.

Em muitos trabalhos se tem o coeficiente de severidade como um parâmetro para se estimar o quanto um dado pré-tratamento pode atuar fortemente na biomassa e isto muitas vezes é relacionado a eficiência enzimática, no entanto, este trabalho demonstrou que este fator isolado não deve ser considerado diretamente proporcional a eficiência de pré-tratamento e consequentemente relacionado a conversão glicosídica.

Estudos estruturais da biomassa pré-tratada são fundamentais para a compreensão de como o pré-tratamento e a conversão enzimática estão interligados, neste aspecto o uso de técnicas físicas clareia este conhecimento. No capítulo 2 foram apresentadas alterações estruturais, morfológicas e composicionais introduzidas pela ação enzimática no contexto de parede celular, mas ainda há ampla investigação neste aspecto que deve ser realizada no processo da interação enzima-biomassa, sendo esta sujeita (ou não) aos pré-tratamentos. Um trabalho focado nesta interação pode isto ser muito informativa para desenvolver novas estratégias de otimização de depolimerização da biomassa lignocelulósica, sendo assim este estudo deve ser continuado com foco na ação direta das enzimas ao substrato.

Outras colaborações

Artigos publicados

Crystal structure of β 1 $\rightarrow$ 6-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* S17: trimeric architecture, molecular determinants of the enzymatic activity and its inhibition by α -galactose. Godoy AS, Camilo CM, Kadowaki MA, Muniz HD, Espirito Santo M, Murakami MT, Nascimento AS, Polikarpov I. The FEBS Journal (Print), v. 283, p. 4097-4112, 2016.

Targeted metatranscriptomics of compost derived consortia reveals a GH11 exerting an unusual exo-1,4- β -xylanase activity. Bruno L. Mello; Anna M. Alessi; Diego M. Riaño-Pachón; Eduardo R. deAzevedo; Francisco E.G. Guimarães; Melissa C. Espirito Santo; Simon McQueen-Mason; Neil C. Bruce; Igor Polikarpov.(2017). Biotechnology for Biofuels.

Biochemical characterization and low-resolution SAXS shape of a novel GH11 exo-1, 4- β -xylanase identified in a microbial consortium. Evangelista, D. E., Pellegrini, V. D. O. A., Santo, M. E., McQueen-Mason, S., Bruce, N. C., & Polikarpov, I. (2019).. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(19), 8035-8049.

Characterization of pretreated fractions and cellulosic ethanol production from steam-exploded *Eucalyptus urograndis*". Chiarello, L. M., Arnt Ramos, C. E., dos Santos, L. F., Silveira, M. H. L., Zaccaron, S., Schiehser, S., Santo, E.M., Guimarães, F.G., Azevedo, E. R., Polikarpov, I., Potthast, A., Ramos, L.P (2019). Characterization of pretreated fractions and cellulosic ethanol production from steam-exploded *Eucalyptus urograndis*. *Energy & Fuels*.