Hidrólise Enzimática de Carboidratos Restos na Biomassa de Microalga *Chlorella vulgaris*

Enzymatic Hydrolysis of Residual Carbohydrates from Microalgal Biomass Chlorella vulgaris

Jorge Luis Sánchez Ortega^{a,*} Jorge Enrique Lopez Galán^b

^a Universidad del Cauca, Departamento de Agroindústria, Campus Las Guacas, Popayán, Colômbia

^b Universidad del Valle, Faculdade de Engenharia, Campus Melendez, Cali, Colômbia.

*E-mail: jlsanchez@unicauca.edu.co

Submetido em: 2 de Abril de 2021

Aceito em: 8 de Abril de 2021

Publicado online: 21 de Setembro de 2021

Nowadays, it is important to search for new alternatives that allow to find added value of microalgae biomass and thus, maximize economic scenarios of the biological refineries. The study of the residual biomass as a product of the previous lipid separation is interesting to take advantage of remaining carbohydrates, hydrolyzing them. The aims of this study were to define conditions of enzymatic hydrolysis of the carbohydrates included in the residual biomass of *Chlorella vulgaris* after lipid extraction. Firstly, the microalgae were grown, secondly, the lipids were extracted from the harvested biomass and finally, the residual biomass was pretreated through chemical hydrolysis. Considering the results of the acid pretreatment and the structural aspects of the microalgae, we used the chemical and enzymatic hydrolysis. The glucose, xylose, arabinose and hydrolysates were measured by using chromatography. The final outcomes were between 86.8 and 151.8 mg of reducing sugars (RS)/g of residual biomass on dry basis (brs). The previous chemical hydrolysis reached values between 11.1%-43.5% and the enzymatic between 34.4%-40.2%, together they achieved global values of up to 81% of saccharification. The high concentration of acid and the high enzyme/substrate ratio, increased the dose of pectinase, leading to higher yields of sugars released, with values above 140 mg/g brs. The enzymatic hydrolysis was enhanced with chemical pretreatment, being its contribution on average 58% of global saccharification. The outcomes were comparable with reports indicating a positive effect of pectinases on the degradation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides using pretreatment, with saccharification of up to 80%.

Keywords: Bio-refinery; cellulases; enzymatic hydrolysis; saccharification.

1. Introdução

Nas últimas décadas, houve uma demanda crescente por novas fontes de energia. Foram realizados estudos que utilizam diferentes tipos de biomassa potencial para convertê-la principalmente em combustíveis líquidos ou gasosos capazes de gerar energia, dentre os quais estão os de desperdício de alimentos e resíduos agrícolas. Estes são considerados como tendo um impacto significativamente positivo em termos ambientais, por esse motivo, o uso de algas como fonte de petróleo e biogás para fins energéticos recentemente surgiu como uma alternativa.¹

As informações relatadas da composição para várias espécies de microalgas deixam aberta a possibilidade de buscar alternativas tecnológicas que promovam o uso desses microrganismos, no caso de *Chlorella vulgaris*, com conteúdo protéico em torno de 51%, carboidratos entre 12 e 17% e lipídios entre 14-22%.² É evidente que o uso de microalgas do ponto de vista econômico é mais atraente se a maioria dos compostos presentes for considerada, sejam lipídeos, carboidratos ou proteínas, orientada para setores como farmacológico, combustíveis e até alimentos.

Essas microalgas após a extração de óleo podem produzir co-produtos valiosos, como proteínas e biomassa residual, que podem ser usados como alimentos ou fertilizantes ou fermentados para produzir bioetanol ou biometano.¹ Muitos dos estudos relacionados ao uso de biomassa de microalgas foram direcionados à produção de biodiesel a partir de lipídeos nele armazenados; deixando de lado outras alternativas de uso para a biomassa residual obtida no final dos processos de extração da fração lipídica e das proteínas das microalgas, por exemplo, a hidrólise dos carboidratos restantes usando enzimas, pode facilitar a fermentação para obter álcool.

Isso sugere a falta de informações para a integração do conceito de biorrefinaria no estudo de operações unitárias que possam estar presentes no processo de transformação da biomassa de microalgas, onde a abordagem produtiva se baseia na variedade de componentes dessa matéria-prima de origem biológica e o valor agregado que pode ser gerado em cada etapa do processo de transformação de microalgas.

O objetivo foi buscar alternativas e condições que permitam gerar valor agregado à biomassa de microalgas, para maximizar economicamente todo o processo de transformação. Nesse caso, foi estudado a biomassa residual resultante da separação de lipídeos, aproveitando a fração correspondente dos carboidratos restantes, hidrolisando-os com enzimas.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção, caracterização da microalga concentrada

A biomassa de microalgas utilizada neste trabalho foi obtida de uma cultura em que a microalga *Chlorella vulgaris* foi inoculada em um tanque, injetando ar no interior por meio de sopradores, com uma razão de tempo de on/off de 45/15 minutos. O meio de cultura foi a água potável enriquecida com micronutrientes de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e cálcio. A biomassa coletada foi armazenada em recipientes de plástico e imediatamente armazenada em um freezer. Uma amostra das microalgas concentradas colhidas foi submetida a um processo térmico em autoclave para enfraquecer a estrutura celular das microalgas, depois secas a peso constante. A quantidade de nitrogênio total foi quantificada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2002). Além disso, celulose, hemicelulose e materiais insolúveis foram determinados pela técnica de Van Soest,³ no laboratório de serviços analíticos do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Valle del Cauca, Colômbia).

2.2. Extração de lipídios da biomassa concentrada

A biomassa colhida no tanque de cultura com um teor de umidade entre 80-90% foi centrifugada para concentrar a biomassa. Seguindo a metodologia estabelecida pelo grupo de pesquisa GRUBIOC, a biomassa foi ajustada para um pH ligeiramente abaixo de três usando ácido sulfúrico (H₂SO₄). A biomassa foi então submetida a um processo térmico em autoclave a 105 °C por cinco minutos, com o objetivo de enfraquecer a parede celular e facilitar a extração de lipídeos. Após a auto-pregagem, a biomassa foi tratada com uma mistura de solventes hexano-isopropanol (proporção de três para dois, respectivamente).⁴ Por fim, as fases resultantes da extração líquido-líquido foram separadas, em uma fase rica em lipídeos e a outra esgotada em lipídeos, levando-as a realizar a separação de proteínas.

2.3. Caracterização residual da biomassa de microalga

Para a caracterização da biomassa residual pobre em lipídeos e proteínas, a celulose, hemicelulose e não solúvel foram quantificadas pela técnica de Van Soest,³ em um dispositivo RAYPA COMÉRCIO de “Teste de fibra”.

2.4. Hidrólise enzimática

Testes preliminares foram realizados com misturas enzimáticas de celulasas e hemicelulasas na biomassa residual de *Chlorella vulgaris*; os rendimentos de açúcares liberados foram baixos. Considerando os resultados inicialmente obtidos, decidiu-se aplicar um pré-tratamento químico ácido antes da hidrólise enzimática, além disso, a mistura enzimática foi complementada com a adição de uma pectinase.

2.4.1. Pré-Tratamentos químicos

Considerando a possibilidade de utilizar diferentes pré-tratamentos antes de hidrolisar enzimaticamente a biomassa residual, foram realizados dois testes comparativos, realizando hidrólise química ácida e básica na biomassa residual de *Chlorella vulgaris*.^{5,6}

2.4.2. Hidrólise enzimática com hidrólise química anterior

Levando em consideração o resultado obtido no pré-tratamento químico ácido e aspectos estruturais, como a possível presença de pectinas nas microalgas, foi realizado um projeto central composto,⁷ com dois fatores de experimentação: relação enzima-substrato (mL/g), usando uma enzima adicional (pectinase) e concentração de H₂SO₄ (% v/v) na hidrólise química como pré-tratamento (consulte a Tabela 1).

Como variável de resposta, a concentração de três açúcares nos hidrolisados químicos e enzimáticos, glicose, xilose e arabinose, expressos em unidades de mg/mL, foi medida por cromatografia HPLC. A biomassa residual foi hidrolisada quimicamente, a biomassa restante foi lavada e hidrolisada enzimaticamente por dosagem da enzima Pectinex Ultra SP-L (empresa produtora da Novozyme), com atividade declarada de pectinase de 3800 PGNU/mL e a mistura Celluclast-Viscozyme (veja a Figura 1).

A sacarificação global, considerando a hidrólise química e enzimática, foi calculada segundo a Equação 1.

$$\%SG = \left[\frac{\left(\frac{HQ + HE}{1000} \right)}{(C + H)} \right] \times 100 \quad (1)$$

onde: HQ: mg de carboidratos liberados por hidrólise química.
HE: mg de carboidratos liberados por hidrólise enzimática.
C + H: g de celulose e hemicelulose em biomassa residual.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da biomassa de microalgas concentradas

Estima-se que os carboidratos da biomassa concentrada de microalgas obtidos nos sistemas de cultivo do grupo de pesquisa de biocombustíveis GRUBIOC da Universidad del Valle são de aproximadamente 39,70% (em base seca),

Tabela 1. Projeto experimental de hidrólise química e enzimática.

Relacionamento [E/S] (v/p)	Concentração H ₂ SO ₄ (% v/v)	Variável normalizado	Variável normalizado
0.5	5.0	+1	+1
0.5	1.0	+1	-1
0.3	1.0	-1	-1
0.3	5.0	-1	+1
PONTO CENTRAL x 3			
0.4	3.0	0	0
PONTOS DE ESTRELA			
0.54	3.0	1.414	0
0.26	3.0	-1.414	0
0.4	5.8	0	+1.414
0.4	0.2	0	-1.414

[E/S]: Enzima- Substrato

Fonte: Jorge Luis Sánchez (2021)

Figura 1. Hidrólise química e enzimática

considerando a quantidade de celulose e hemicelulose. A fração de hemicelulose é equivalente a aproximadamente 84% dos carboidratos quantificados pelo método Van Soest.³ O nitrogênio total quantificado pela técnica de Kjeldhal é de cerca de 120 g/kg de biomassa seca concentrada.⁸ O fator de conversão para microalgas é geralmente menor do que o fator tradicional de 6,25, e que, entre várias espécies de microalgas consideradas, varia entre 2,7 e 5,4, considerando o valor médio de 3,68, o cálculo aproximado para a proteína presente na biomassa concentrada de nossas culturas de microalgas deve ser de cerca de 44,15% em base seca.^{9,10}

3.2. Caracterização da biomassa de microalgas residuais

Partindo de uma quantidade de 1 kg de biomassa concentrada (umidade aproximada de 90%), a extração

de lipídeos e proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita. De acordo com a análise de Van Soest da biomassa residual, os carboidratos restantes estão em torno de 38%, assim discriminados: 7% de celulose e 31% de hemicelulose. Como resultado das operações de extração das frações lipídica e proteica, ocorre uma diminuição de 1,70% de carboidratos; essa redução pode ser considerada baixa, tendo em vista que o processo de extração de proteínas foi realizado em meio alcalino e que, na presença de NaOH, as paredes celulares das microalgas podem sofrer ruptura e divisão das ligações intermoleculares entre a hemicelulose e outros componentes polímeros,^{5,11} o que implicaria a solubilização de uma parte da hemicelulose.¹²

A hemicelulose é o polissacarídeo mais representativo que constitui cerca de 82% dos carboidratos quantificados na biomassa residual de *Chlorella vulgaris*.

O resultado da caracterização do lote de biomassa utilizado para os testes de hidrólise enzimática com hidrólise química anterior foi de 19% de carboidratos, considerando celulose e hemicelulose em base seca.

3.3. Hidrólise enzimática

Pré-tratamentos químicos. Nos testes exploratórios de hidrólise química usando H_2SO_4 a 1% (v/v), foi obtido um rendimento de aproximadamente 32%, enquanto na hidrólise com NaOH a 0,75% (p/v), foi alcançado um rendimento aproximado de 7%, em relação a 38% do total de carboidratos (celulose e hemicelulose), que possuíam biomassa residual. A hidrólise química dos polissacarídeos liberou açúcares como glicose, xilose e arabinose (Tabela 2). Nos dois casos, a hidrólise ácida e básica, a arabinose foi o carboidrato que apresentou a menor concentração de hidrolisados (entre 0,148 e 0,247 mg/mL). Por outro lado, glicose e xilose, foram concentradas três vezes mais com hidrólise ácida do que com hidrólise com NaOH (cerca de 0,716 mg/mL para cada monossacarídeo).

O resultado obtido para a hidrólise ácida da biomassa residual de *Chlorella vulgaris* nesta investigação é comparável com outros resultados,¹³ onde o rendimento de açúcares redutores usando pré-tratamento com ácido H_2SO_4

(1% v/v) por 1 hora a 100 °C em microalgas *U. fasciata*, foi de 113,68 mg/g, considerando que a composição de carboidratos de *U. fasciata* foi de cerca de 43%.

Hidrólise química ácida e enzimática com Celluclast/Viscozyme adicionando pectinase. Os resultados no final do pré-tratamento químico e da hidrólise enzimática variaram entre 86,8 e 151,8 mg RS/g brs (Tabela 3). A hidrólise química anterior apresentava uma porcentagem de hidrólise na faixa de 11,1 a 43,5% e a hidrólise enzimática uma porcentagem de hidrólise na faixa de 34,4% a 40,2%. Juntos, eles atingiram valores globais de até aproximadamente 81% de sacarificação (Tabela 3).

Dentro das faixas testadas para as duas variáveis de controle (relação enzima-substrato (v/p) e concentração de H_2SO_4 % v/v), verificou-se que a concentração de ácido sulfúrico no pré-tratamento químico foi a que mais influenciou a quantidade total de açúcares liberados nos processos de hidrólise, sendo as quantidades de carboidratos afetadas maiores para a hidrólise, na região próxima ao nível mais alto de concentração de ácido sulfúrico (Tabela 4).

As regiões de alta concentração de ácido sulfúrico no pré-tratamento químico e alta relação enzima-substrato na hidrólise enzimática, fornecem os maiores rendimentos de açúcares liberados, acima de 140 mg/g brs. No entanto, a concentração de ácido sulfúrico não deve exceder 5%, pois

Tabela 2. Concentração de açúcar na hidrólise ácida

Açúcar	Tempo de retenção (min)	Concentração (mg/mL)
Glicose	9.36	0.720
Xilose	10.43	0.713
Arabinose	11.56	0.247

Fonte: Relatório padrão de HPLC, Universidade San Buenaventura

Tabela 3. Desempenho de hidrólise enzimática com hidrólise química anterior

VARIÁVEIS NORMALIZADAS						
Enzima - Substrato p/v	Concentração H_2SO_4 % v/v	Açúcares liberados mg RS/g brs		% HQ	% HE	% Sacarificação Global
		Hidrólise química	Hidrólise enzimática			
1	1	76.8	74.4	40.9	39.6	80.6
1	-1	43.6	75.4	23.3	40.2	63.4
-1	-1	53.3	73.1	28.4	39.0	67.4
-1	1	81.6	70.2	43.5	37.4	80.9
0	0	71.7	70.7	38.2	37.7	75.9
0	0	58.7	71.3	31.3	38.0	69.3
0	0	48.1	64.6	25.6	34.4	60.0
1.414	0	50.0	67.2	26.6	35.8	62.4
-1.414	0	46.4	70.1	24.7	37.4	62.1
0	1.414	47.8	75.3	25.4	40.1	65.6
0	-1.414	20.8	66.1	11.1	35.2	46.3

mg RS/g brs: miligramas de açúcares liberados por grama de biomassa residual em base seca

%HQ: porcentagem de hidrólise química

%HE: porcentagem de hidrólise enzimática

Fonte: Jorge Luis Sánchez (2021)

os açúcares presentes podem produzir compostos inibitórios no processo de fermentação.¹⁴

Quando a dosagem da enzima pectinase é aumentada, na faixa de 0,3 a 0,5 mL por grama de biomassa residual, os rendimentos do processo de hidrólise enzimática também aumentam.

O exposto acima prova que, além da celulose e hemicelulose, as microalgas são constituídas por estruturas complexas, como as pectinas, e que, por exemplo, possivelmente devido à ação da pectinase sobre elas, a arabinose liberada aumentou, como consequência da degradação dos arabinanos presentes na estrutura principal das pectinas.

A mistura enzimática Pectinex-Celluclast-Viscozyme, provavelmente permitiu atacar estruturas de pectinas e

ácidos poligalacturônicos, de modo a melhorar a interação entre enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e celulose e hemicelulose presentes na biomassa residual, aumentando as quantidades de glicose e xilose. Os rendimentos da hidrólise química anterior, em média, para glicose, tiveram um rendimento de 21,4 mg/g de brs, para xilose de 20,3 mg/g de brs e para arabinose de 12,7 mg/g de brs (Tabela 4).

Enquanto na hidrólise enzimática, em média, a glicose teve um rendimento de 32,6 mg/g de brs, xilose de 20,3 mg/g de brs e arabinose de 42,0 mg/g de brs, que em geral são mais altos. Pode-se presumir que o pré-tratamento químico potencializou a ação de enzimas no substrato de biomassa residual, levando em consideração que, em média, a hidrólise enzimática representava cerca de 58% da sacarificação global obtida (Figura 2).

Tabela 4. Resultados Hidrólise química e enzimática por HPLC

Relação Enzima-Substrato (v/p)	Concentração H ₂ SO ₄ %v/v	Hidrólise química			Açúcares totais [mg/mL]	Hidrólise enzimática			Açúcares totais [mg/mL]
		Concentração de açúcar por HPLC [mg/mL]				Concentração de açúcar por HPLC [mg/mL]			
		Glicose	Xilose	Arabinose		Glicose	Xilose	Arabinose	
1	1	0.212	0.190	0.146	1.151	0.524	0.334	0.636	1.494
1	-1	0.192	0.206	0.117	0.654	0.551	0.339	0.624	1.514
-1	-1	0.231	0.255	0.138	0.799	0.536	0.326	0.607	1.469
-1	1	0.205	0.174	0.114	1.223	0.488	0.309	0.612	1.409
0	0	0.228	0.213	0.127	1.091	0.508	0.310	0.625	1.443
0	0	0.185	0.174	0.104	0.880	0.503	0.308	0.621	1.432
0	0	0.212	0.210	0.117	0.728	0.411	0.257	0.641	1.309
1.414	0	0.212	0.217	0.119	0.745	0.441	0.289	0.613	1.343
-1.414	0	0.198	0.203	0.115	0.697	0.469	0.269	0.647	1.385
0	1.414	0.169	0.154	0.104	0.717	0.516	0.312	0.694	1.522
0	-1.414	0.130	0.084	0.092	0.312	0.422	0.298	0.611	1.331

Fonte: Jorge Luis Sánchez (2021)

Figura 2. Participação química e enzimática na sacarificação global

Assim, nos experimentos realizados com concentrações de H_2SO_4 inferiores a 1% e até 3% (níveis -1,414, -1 e 0 de concentração de ácido), observou-se que a proporção de hidrólise enzimática em comparação à química em geral foi maior, contribuindo com mais de 50% da sacarificação global.

Em outro trabalho, as pectinases tiveram um efeito significativo na degradação dos polissacarídeos de microalgas de *C. vulgaris* em biomassa com e sem moagem como pré-tratamento, atingindo rendimentos de sacarificação de aproximadamente 79%,¹⁵ eles também relatam hidrólise de cerca de 10% usando celulasas e xilanases, todos esses resultados são comparáveis aos obtidos nesta pesquisa em que foram utilizadas as enzimas Celluclast, Viscozyme e Pectinex Ultra.

Da mesma forma, os resultados obtidos nesta pesquisa são comparáveis aos apresentados em trabalhos onde misturas enzimáticas foram utilizadas para hidrolisar açúcares e proteínas com pré-tratamentos de moagem úmida, com açúcares em licores de extração representando cerca de 74% da fração inicialmente presente nas microalgas *Chlorella*.¹⁶

4. Conclusão

A perda de carboidratos após extrações de lipídios e proteínas é de cerca de 2% da fração inicial de carboidratos na biomassa concentrada, sendo as hemiceluloses o polissacarídeo mais representativo (cerca de 82%) dos carboidratos quantificados na biomassa residual de *Chlorella vulgaris*.

Foi adicionada uma etapa de hidrólise química, antes da hidrólise enzimática da biomassa residual de *C. vulgaris*, em função dos resultados obtidos em testes preliminares com H_2SO_4 , onde foi obtida uma concentração de açúcares redutores de 112,00 mg/g (base seca).

A hidrólise enzimática foi potencializada com o pré-tratamento da hidrólise química. A contribuição da hidrólise enzimática, em média, foi de 58% da sacarificação geral obtida, quando uma hidrólise anterior é feita com 5% de H_2SO_4 .

O processo completo de hidrólise química e enzimática, resultou na sacarificação próxima a 80%. Esse foi o resultado mais eficiente na obtenção de licores açucarados com baixo conteúdo lipídico, a partir da biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris*.

Referências Bibliográficas

1. Singh, J.; Gu, S.; Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2010**, *14*, 2596. [CrossRef]

2. Becker, E. W.; Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* **2006**, *25*, 207. [CrossRef]
3. Van Soest, P. J.; Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of AOAC International* **1963**, *46*, 829. [CrossRef]
4. Palomino M, A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidad del Valle, 2013. [Link]
5. Harun, R.; Jason, W. S. Y.; Cherrington, T.; Danquah, M. K.; Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy* **2010**, *3*. [CrossRef]
6. Harun, R.; Danquah, M. K.; Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* **2011**, *46*, 304. [CrossRef]
7. Montgomery, D. C.; Runger, G. C.; *Applied statistics and probability for engineers*, 3rd ed, John Wiley & Sons Inc: Nova Iorque, 2002.
8. Thiex, N. J.; Manson, H.; Anderson, S.; Person, J.; Determination of Crude Protein in Animal Feed, Forage, Grain, and Oilseeds by Using Block Digestion with a Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* **2002**, *85*, 309. [CrossRef]
9. Slocombe, S. P.; Ross, M.; Thomas, N.; McNeill, S.; Stanley, M. S.; A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology* **2012**, *129C*, 51. [CrossRef]
10. Lourenço, S. O.; Barbarino, E.; Marquez, U. M. L.; Aidar, E.; Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen to protein conversion factors. *European Journal of Phycology* **2004**, *39*, 17. [CrossRef]
11. Zheng, Y.; Pan, Z.; Zhang, R.; Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* **2009**, *2*, 51. [Link]
12. Salcedo, J. G.; *Tese de Doutorado*, Universidad del Valle, 2013. [Link]
13. Trivedi, N.; Gupta, V.; Reddy, C. R. K.; Jha, B.; Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. *Bioresource Technology* **2013**, *150*, 106. [CrossRef]
14. Nur Meinita, M. D.; Kang, J.; Jeong, G.; Koo, H. M.; Park, S. M.; Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Journal of Applied Phycology* **2012**, *24*, 857. [CrossRef]
15. Kim, K. H.; Choi, I. S.; Kim, H. M.; Wi, S. G.; Bae, H.-J.; Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology* **2014**, *153*, 47. [CrossRef]
16. Alavijeh, R. S.; Karimi, K.; Wijffels, R. H.; van den Berg, C.; Eppink, M.; Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology* **2020**, *309*, 123321. [CrossRef]