

УДК 547.458.8+577.152

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ АМОРФНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ВЫСОКОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ГИДРОЛИЗУЕМОСТЬЮ

© *М.Я. Иоелович**, *Э.А. Мораг*

*Designer Energy Ltd, 2 Bergman st., Rehovot 76100 (Israel),
e-mail: ioelovichm@gmail.com*

В данной работе изучен метод получения аморфной целлюлозы путем обработки исходного целлюлозного материала (МСС и смешанной бумажной макулатуры) холодным растворителем, содержащим 7% NaOH и 12% мочевины, при различных соотношениях растворителя к целлюлозе (R), мл/г. С помощью дифракции рентгеновских лучей было обнаружено, что после обработки МСС растворителем при $R=3$ кристаллическая модификация (СМ) С1 исходной целлюлозы превращается в СМ СП с низкой степенью кристалличности. В том случае, когда исходную целлюлозу обрабатывают растворителем при $R \geq 5$, образуется полностью аморфная целлюлоза (АС). Благодаря высокой гидролизуемости, АС с концентрацией 50 г/л практически полностью превращается в глюкозу в течение 48 ч под действием ферментного препарата СТес-3 при дозе 30 мг/г сухого субстрата. Полученный образец АС может быть использован в качестве аморфного стандарта при исследовании кристалличности и ферментативного гидролиза различных видов целлюлозы и лигноцеллюлозы. Установлено, что наиболее выгодно проводить ферментативную сахарификацию АС при повышенной концентрации субстрата, 150 г/л. Из-за высокой стоимости МСС, для промышленного производства АС и глюкозы предпочтительно использовать дешевое целлюлозное сырье, такое например, как смешанная бумажная макулатура.

Ключевые слова: целлюлоза, растворитель, декристаллизация, аморфная целлюлоза, ферментативный гидролиз, глюкоза.

Введение

Одним из наиболее распространенных способов получения аморфной целлюлозы (АС) является ее регенерация из разбавленного раствора (2.3 масс.% или 40 г/л) микрокристаллической целлюлозы (МСС) в 85% ортофосфорной кислоте [1, 2]. Этот вид АС (РАС), характеризуется низкой кристалличностью и высокой способностью к осахариванию под действием целлюлолитических ферментов [3, 4]. Однако этот способ получения АС имеет два основных недостатка. Первой проблемой является низкая производительность процесса из-за использования слишком разбавленного раствора целлюлозы, а вторая проблема – это повышенная стоимость даже технической ортофосфорной кислоты, составляющая порядка \$1 за кг.

Такие же проблемы возникают, если вместо о-фосфорной кислоты используются дорогостоящие органические растворители, такие как ионные жидкости (IL) [5], NMMO [6], смеси DMSO/PFA [7], DMSO/DEA/SO₂ [8], DMAA/LiCl₂ [9] и др. Так, согласно каталогу Alibaba, средняя цена DMSO, DEA и DMAA составляет \$1.5–2.0 за кг, NMMO \$10–20 за кг, а IL \$100–150 за кг.

Известные промышленные растворители целлюлозы, такие как купроксам и система NaOH/CS₂, используемые в XX веке для производства искусственных целлюлозных волокон и пленок, в настоящее время запрещены из-за высокой токсичности и опасности для окружающей среды.

Самым дешевым растворителем целлюлозы, вероятно, является водный раствор, содержащий 7% NaOH и 12% мочевины [10–12], стоимость которого оценивается в \$0.05 за кг благодаря низкой цене используемых коммерческих химикатов. Проблема использования такого растворителя состоит в том, что только

Иоелович Михаил Яковлевич – доктор химических наук, профессор, e-mail: ioelovichm@gmail.com
Мораг Эли Алекс – доктор биологических наук, e-mail: elymorag11@gmail.com

разбавленный 3–4 масс.% раствор МСС в этом растворителе может быть получен, что усложняет процесс регенерации и снижает производительность получения АС. Цель этого исследования состоит в

* Автор, с которым следует вести переписку.

том, чтобы оптимизировать процесс получения АС, используя обработку исходных целлюлозных материалов при наиболее низком соотношении растворителя.

Экспериментальная часть

Материалы и химикаты. Объектами исследования являлись МСС Avicel PH-101 (FMC Co., Princeton, USA) и смешанная бумажная макулатура (MWP), содержащая отходы бумажных полотенец, бумажных салфеток и промокатальной (абсорбирующей) бумаги, взятых в равных массовых долях (Amnir Recycling Co., Hadera, Israel). Гидроксид натрия и мочевины были получены из Sigma-Aldrich Co. Эти химические вещества были использованы для приготовления растворителя – водного раствора, содержащего 7% NaOH и 12% мочевины.

Обработка исходной целлюлозы растворителем. Приблизительно 10 г исходного целлюлозного материала (порошок МСС или кусочки MWP, размером 10–15 мм) помещали в стеклянный стакан, охлаждаемый смесью льда и соли до температуры $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем добавляли холодный растворитель при соотношении растворителя к целлюлозному материалу (R) от 3 до 10 мл/г при периодическом перемешивании в течение 1 ч, после чего оставляли на ночь в морозильной камере при температуре $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Обработанные образцы целлюлозного материала вынимали из морозильной камеры и смешивали с 10-кратным объемом воды. Гелеобразные образцы отделяли от жидкой среды с помощью вакуумного стеклянного фильтра №1, промывали водой, нейтрализовали 1% HCl до pH 6–7, и затем дополнительно промывали водой, которую отсасывали в вакууме до 20–25 масс.% содержания сухого вещества.

Ферментативный гидролиз. Исходные и обработанные образцы гидролизовали коммерческим ферментом препаратом Cellic CTec-3 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark), содержащим комплекс ферментов: эндо-1,4-глюканазы (ЭНГ), экзо-1,4-глюканазы (ЭКГ) и β -глюкозидазы (ВГЛ). Ферменты ЭНГ разрушают химические (гликозидные) связи преимущественно в аморфных доменах микрофибрилл целлюлозы, в результате чего микрофибриллы расщепляются с образованием мелких частиц с пониженной степенью полимеризации. Ферменты ЭКГ отщепляют от концов образовавшихся частиц олигомерные продукты – олигосахариды, содержащие преимущественно целлобиозу. И наконец, ферменты ВГЛ гидролизуют целлобиозу и другие олигосахариды и превращают их в глюкозу.

Доза Cellic CTec-3 при ферментативном гидролизе составляла 30 мг на 1 г сухого образца. Гидролиз образцов проводили в 50-мл РР-пробирках. Образцы, содержащие 1 г сухого вещества и 1 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH = 4.8), помещали в пробирки. Добавляли необходимое количество фермента, и затем дополнительное количество буфера для получения концентрации целлюлозного субстрата (C_0) от 50 до 150 г/л. Пробирки, закрытые крышками, помещали в инкубатор при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выдерживали при встряхивали в течение 48 ч.

Анализ образцов. Структурные исследования образцов проводили методом рентгеновской дифракции [13]. Концентрацию глюкозы (C_g , г/л) в гидролизате после ферментного гидролиза определяли с помощью ВЭЖХ (Agilent Technologies 1200 Infinity Series). Использовали колонну Amines HPX-87H. Анализа проводили при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$; подвижная фаза – 0.005 М серная кислота; скорость потока – 0.6 мл/мин. Образцы гидролизата предварительно фильтровали через 0.45 мкм – нейлоновый фильтр. Степень гидролиза (HD, %) образцов рассчитывали по уравнению:

$$HD = 90 (C_g/C_0) \quad (1)$$

Обсуждение результатов

Рентгенографическое исследование исходного образца МСС показало, что этот тип целлюлозы представляет собой кристаллическое вещество со степенью кристалличности (DCr) 75% (рис. 1, табл. 1). После обработки МСС растворителем при $R = 3$, кристаллическая модификация (СМ) С1 исходной целлюлозы превращается в СМ СII с низким значением DCr, 28% (рис. 2). Однако, когда МСС обрабатывали растворителем при $R \geq 5$, то образуется целлюлоза с полностью аморфной структурой (АС). Таким образом, минимальная величина R, необходимая для получения АС путем обработки исходного образца МСС растворителем, составляет около 5. Такое же минимальное соотношение ($R = 5$) требуется и для получения АС путем обработки растворителем смешанной бумажной макулатуры – MWP (табл. 1).

Таблица 1. Степень кристалличности (DCr), степень аморфности (DAm) и тип кристаллической модификации (CM) образцов

Образец	DCr, %	DAm, %	CM
Исходный образец MCC	75	25	CI
Исходный образец MWP	60	40	CI
MCC, обработка растворителем при R=3	28	72	СII
MCC, обработка растворителем при R=5	0	100	–
MCC, обработка растворителем при R=10	0	100	–
MWP, обработка растворителем при R=5	0	100	–

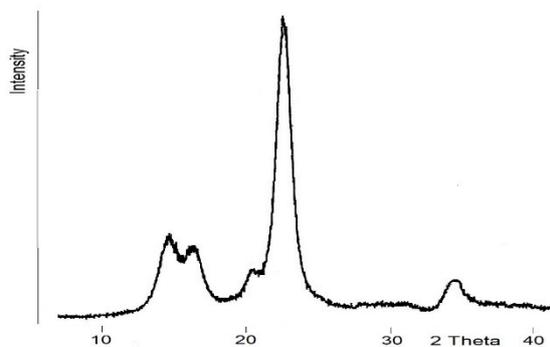


Рис. 1. Рентгенограмма исходного образца MCC

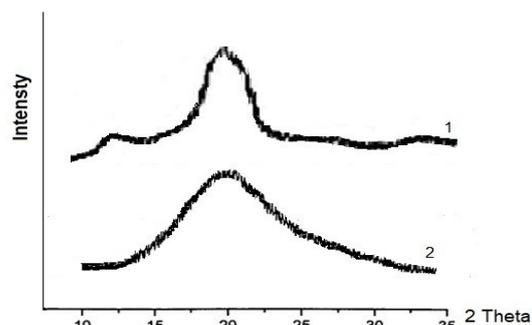


Рис. 2. Рентгенограммы MCC, обработанной растворителем при R=3 (1) и R=5 (2)

Данные рентгеноструктурного анализа подтверждаются результатами ферментативного гидролиза образцов целлюлозы. Как показано на рисунке 3, после ферментативного гидролиза при концентрации субстрата $C_0 = 50$ г/л степень гидролиза исходного образца MCC является относительно низкой, 40%. В отличие от исходного высококристаллического образца MCC, степень гидролиза низко-кристаллического образца СII достигает 80%, а образцы аморфной целлюлозы, АС1 и АС2, гидролизуются ферментом практически полностью.

Как известно, кристалличность является одним из основных факторов, затрудняющих ферментативный гидролиз целлюлозы [14, 15]. Поэтому закономерно, что снижение DCr и, соответственно, увеличение DAm будет способствовать повышению гидролизуемости образцов целлюлозы (рис. 4).

Если концентрация АС при ферментативном гидролизе составляет 50 г/л, то ферментативная гидролизуемость этого образца достигает 100% в течение 48 ч при дозе фермента 30 мг/г. Такой образец можно использовать в качестве аморфного стандарта вместо дорогостоящего образца РАС при исследовании кристалличности и ферментативного гидролиза различных целлюлозных и лигноцеллюлозных материалов.

Хотя увеличение концентрации АС при ферментативном гидролизе приводит к снижению степени гидролиза (рис. 5), концентрация полученного сахара (глюкозы) при этом повышается (рис. 6).

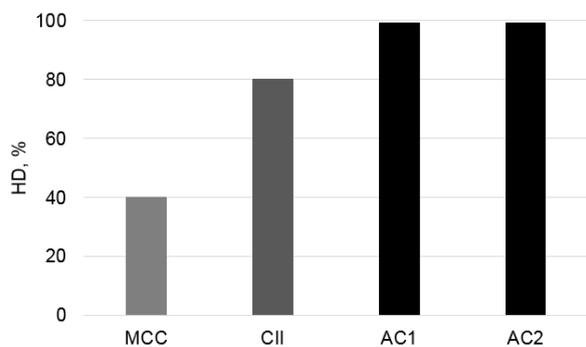
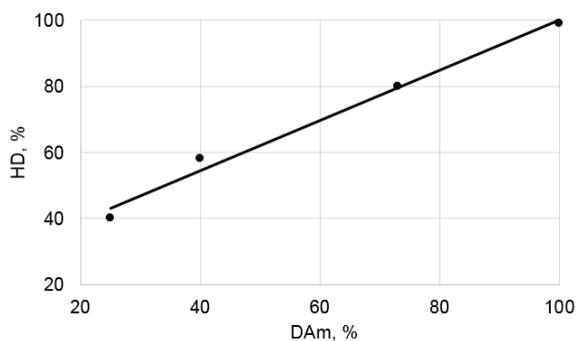


Рис. 3. Степень гидролиза (HD) исходной MCC и образцов целлюлозы, обработанных растворителем при R=3 (CII), R=5 (AC1) и R=10 (AC2)

Рис. 4. Зависимость степени гидролизуемости (HD) от степени аморфности (DAm) образцов целлюлозы при $C_0=50$ г/л

Поскольку МСС является дорогостоящим целлюлозным материалом (\$4–5 за кг), его нецелесообразно использовать в качестве сырья для промышленного производства АС и последующего производства глюкозы. Для этой цели желательно использовать дешевое сырье, такое, например, как смешанная бумажная макулатура (MWP), поставляемая по цене \$50/тонну. Как следует из полученных результатов (рис. 7, 8), аморфная целлюлоза, полученная обработкой такого дешевого сырья растворителем при $R = 5$, легко гидролизуется и дает повышенное количество глюкозы после ферментативного гидролиза при $C_0 = 50$ г/л. Повышение концентрации АС при ферментативном гидролизе снижает гидролизуемость, но приводит к возрастанию концентрации получаемой глюкозы.

Таким образом, для увеличения концентрации глюкозы наиболее выгодно проводить ферментативную сахарификацию при повышенной концентрации субстрата (АС), 150 г/л (рис. 8). Этот вывод согласуется с литературными данными [16].

Полученная глюкоза может найти применение в биотехнологии в качестве питательного вещества для различных микроорганизмов при производстве этанола [17], уксусной, молочной и лимонной кислот [18], кормовых белков, дрожжей и ферментов [19–21], бактериальной целлюлозы [22] и полигидроксиалканоатов [23], и других ценных продуктов. Биотехнологическое использование дешевой целлюлозной глюкозы, полученной путем ферментативного гидролиза АС из макулатуры, вместо пищевой глюкозы, может способствовать уменьшению площади посевов энергетических культур, снижению расхода агрохимикатов и воды, что в конечном счете может предотвратить повышение цен на продовольствие и его дефицит.

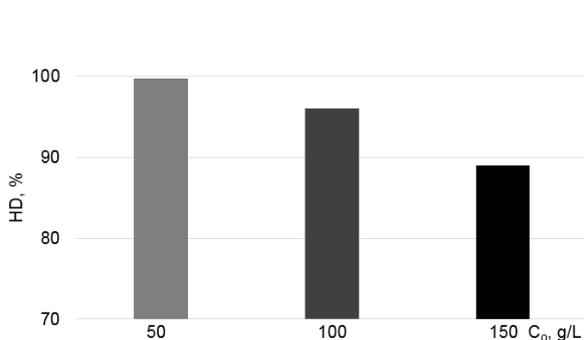


Рис. 5. Зависимость степени гидролизваемости (HD) образца АС1 от концентрации целлюлозного субстрата (C_0)

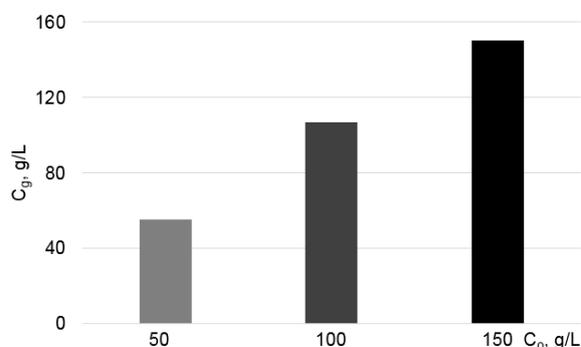


Рис. 6. Зависимость концентрации глюкозы (C_g) от концентрации целлюлозного субстрата (C_0) при ферментативном гидролизе образца АС1

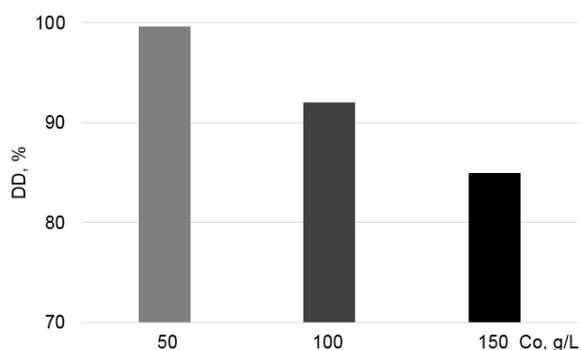


Рис. 7. Зависимость степени гидролизваемости (HD) образца АС, полученного из MWP, от концентрации целлюлозного субстрата (C_0)

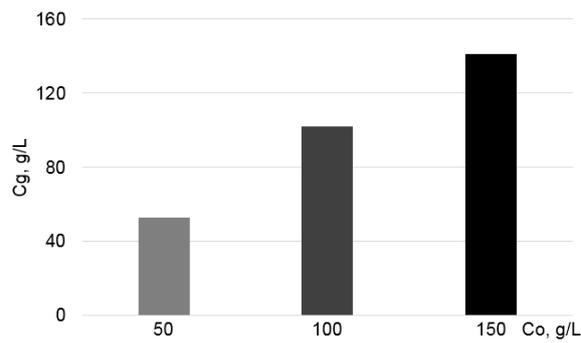


Рис. 8. Зависимость концентрации глюкозы (C_g) от концентрации целлюлозного субстрата (C_0) при ферментативном гидролизе образца АС, полученного из MWP

Выводы

Разработан оптимальный способ получения аморфной целлюлозы (АС) путем обработки исходного целлюлозного материала холодным растворителем – водным раствором, содержащим 7% NaOH и 12% мочевины, при низком соотношении растворителя к целлюлозе, 5 мл/г. Благодаря высокой гидролизуемости, АС с концентрацией 50 г/л практически полностью превращается в глюкозу в течение 48 ч под действием

ферментного препарата СТес-3 при дозе 30 мг/г. Полученный образец АС может быть использован в качестве аморфного стандарта при исследовании кристалличности и ферментативного гидролиза различных целлюлозных и лигноцеллюлозных материалов. Снижение кристалличности и увеличение аморфности образцов целлюлозы способствуют их ферментативному расщеплению. Повышение концентрации АС при ферментативном гидролизе снижает гидролизуемость, но приводит к возрастанию концентрации получаемой глюкозы. Установлено, что для увеличения выхода глюкозы наиболее выгодно проводить ферментативный гидролиз при повышенной концентрации целлюлозного субстрата (АС), 150 г/л. Из-за высокой стоимости МСС для промышленного производства АС и глюкозы предпочтительно использовать дешевое целлюлозное сырье, такое как смешанная бумажная макулатура.

Список литературы

1. Walseth C.S. Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms // TAPPI. 1952. Vol. 35. Pp. 228–233.
2. Zhou Sh., Ingram L.O. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulose // Biotechnology Letters. 2001. Vol. 23. Pp. 1455–1462.
3. Zhang Y.H.P., Cui J., Lynd L.R., Kuang L.R. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure // Biomacromolecules. 2006. Vol. 7. Pp. 644–648.
4. Zhang Y.H.P., Ding S.Y., Mielenz J.R., et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions // Biotechnol. Bioeng. 2007. Vol. 97. Pp. 214–223.
5. Anantharam P.D., Sasidhar V., Constance A.S. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step // Biotechnol. Bioeng. 2006. Vol. 95. Pp. 904–910.
6. Roseneau T., Potthast A., Sixta H., Kosma P. The chemistry of side reactions and by-product formation in the system NMMO/cellulose (Lyocell process) // Prog. Polym. Sci. 2001. Vol. 26. Pp. 1763–1837.
7. Schroder L.R., Gentile V.M., Attala R.H. Non-degradative preparation of amorphous cellulose. IPC technical paper series. No 152. Appleton: The Institute of Paper Chemistry. 1985. 14 p.
8. Ciolacu D., Ciolacu F., Popa V.I. Amorphous cellulose – structure and characterization // Cellulose Chem. Technol. 2011. Vol. 45. Pp. 13–21.
9. Zhang Ch., Liu R., Xiang J., et al. Dissolution mechanism of cellulose in *N,N*-Dimethylacetamide/Lithium Chloride: revisiting through molecular interactions // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118. Pp. 9507–9514.
10. Egal M., Budtova T., Navard P. The dissolution of microcrystalline cellulose in sodium hydroxide-urea aqueous solutions // Cellulose. 2008. Vol. 15. Pp. 361–370.
11. Luo X., Liu S., Zhou J., Zhang L. In situ synthesis of Fe₃O₄/Cellulose microspheres with magnetic-induced protein delivery // J. Mater. Chem. 2009. Vol. 19. Pp. 3538–3545.
12. Duchemin B., Le Corre D., Leray N., et al. All-cellulose composites based on microfibrillated cellulose and filter paper via a NaOH-Urea solvent system // Cellulose. 2015. Vol. 23. Pp. 593–609.
13. Ioelovich M., Leykin A., Figovsky O. Study of cellulose paracrystallinity // Bioresources. 2010. Vol. 5. Pp. 1393–1407.
14. Hall M., Bansal P., Lee J., et al. Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate // FEBS Journal. 2010. Vol. 277. Pp. 1571–1582.
15. Ioelovich M., Morag E. Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis // Bioresources. 2011. Vol. 6. Pp. 2818–2834.
16. Ioelovich M., Morag E. Study of enzymatic hydrolysis of pretreated biomass at increased solids loading // Bioresources. 2012. Vol. 7. Pp. 4672–4682.
17. Kang A., Lee T.S. Converting sugars to biofuels: ethanol and beyond // Bioengineering. 2015. Vol. 2. Pp. 184–203.
18. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шунаева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов. Тамбов, 2007. 80 с.
19. Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A.A. Production of food grade yeasts // Food Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 44. Pp. 407–415.
20. Anderson C., Longton J., Maddix C., et al. The growth of microfungi on carbohydrates // Single-Cell Protein. MIT Press. Cambridge, 1975. Pp. 314–329.
21. Junker B., Mann Z., Seeley A., et al. Use of glucose feeding to produce concentrated yeast cells // Appl. Biochem. Biotechnol. 2002. Vol. 97. Pp. 63–78.
22. Molina-Ramírez C., Castro M., Osorio M., et al. Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter Medelinensis* // Materials. 2017. Vol. 10. Pp. 1–13.
23. Reddy C.S.K., Ghai R., Kalia V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview // Bioresource Technology. 2003. Vol. 87. Pp. 137–146.

Поступила в редакцию 11 октября 2019 г.

После переработки 16 октября 2019 г.

Принята к публикации 20 октября 2019 г.

Для цитирования: Иоелович М.Я., Морэг Э.А. Оптимизация условий получения аморфной целлюлозы с высокой ферментативной гидролизуемостью // Химия растительного сырья. 2020. №1. С. 19–24. DOI: 10.14258/jcrpm.2020016579.

*Ioelovich M.Ya.**, *Morag E.A.* OPTIMIZATION OF PRODUCTION CONDITIONS OF AMORPHOUS CELLULOSE WITH A HIGH ENZYMATIC HYDROLYZABILITY*Designer Energy Ltd, 2 Bergman st., Rehovot 76100 (Israel), e-mail: ioelovichm@gmail.com*

In this paper, a method for producing amorphous cellulose (AC) was studied by treatment of initial cellulosic materials (MCC and mixed paper waste paper) with a cold solvent, containing 7% NaOH and 12% urea, at different solvent to cellulose (R) ratios, ml/g. Using X-ray diffraction, it was found that after treatment of MCC with the solvent at $R = 3$, the crystalline modification (CM) of CI of the initial cellulose is converted to CM CII, having a low crystallinity degree. In the case, where the initial cellulose is treated with the solvent at $R \geq 5$, a completely amorphous cellulose (AC) is formed. Due to its high hydrolyzability, the AC with concentration of 50 g/L is converted into glucose almost completely within 48 hours under the action of the CTec-3 enzyme preparation at a dose of 30 mg/g dry substrate. The obtained AC sample can be used as an amorphous standard in the study of enzymatic hydrolysis of various types of cellulose and lignocellulose. It was found that the most beneficial enzymatic saccharification of AC is carried out at increased concentration of the cellulosic substrate, 150 g/L. Due to the high cost of MCC, it is preferable to use low-cost cellulosic raw material, such as mixed waste paper, for the industrial production of AC and glucose.

Keywords: cellulose, solvent, decrystallization, amorphous cellulose, enzymatic hydrolysis, glucose.

References

1. Walseth C.S. *TAPPI*, 1952, vol. 35, pp. 228–233.
2. Zhou Sh., Ingram L.O. *Biotechnology Letters*, 2001, vol. 23, pp. 1455–1462.
3. Zhang Y.H.P., Cui J., Lynd L.R., Kuang L.R. *Biomacromolecules*, 2006, vol. 7, pp. 644–648.
4. Zhang Y.H.P., Ding S.Y., Mielenz J.R., et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, vol. 97, pp. 214–223.
5. Anantharam P.D., Sasidhar V., Constange A.S. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, vol. 95, pp. 904–910.
6. Roseneau T., Potthast A., Sixta H., Kosma P. *Prog. Polym. Sci.*, 2001, vol. 26, pp. 1763–1837.
7. Schroder L.R., Gentile V.M., Attala R.H. *Non-degradative preparation of amorphous cellulose. IPC technical paper series. No 152*. Appleton: The Institute of Paper Chemistry, 1985, 14 p.
8. Ciolacu D., Ciolacu F., Popa V.I. *Cellulose Chem. Technol.*, 2011, vol. 45, pp. 13–21.
9. Zhang Ch., Liu R., Xiang J., et al. *J. Phys. Chem. B*, 2014, vol. 118, pp. 9507–9514.
10. Egal M., Budtova T., Navard P. *Cellulose*, 2008, vol. 15, pp. 361–370.
11. Luo X., Liu S., Zhou J., Zhang L. *J. Mater. Chem.*, 2009, vol. 19, pp. 3538–3545.
12. Duchemin B., Le Corre D., Leray N., et al. *Cellulose*, 2015, vol. 23, pp. 593–609.
13. Ioelovich M., Leykin A., Figovsky O. *Bioresources*, 2010, vol. 5, pp. 1393–1407.
14. Hall M., Bansal P., Lee J., et al. *FEBS Journal*, 2010, vol. 277, pp. 1571–1582.
15. Ioelovich M., Morag E. *Bioresources*, 2011, vol. 6, pp. 2818–2834.
16. Ioelovich M., Morag E. *Bioresources*, 2012, vol. 7, pp. 4672–4682.
17. Kang A., Lee T.S. *Bioengineering*, 2015, vol. 2, pp. 184–203.
18. Muratova E.I., Zyuzina O.V., Shunayeva O.B. *Biotekhnologiya organicheskikh kislot i belkovykh preparatov*. [Biotechnology of organic acids and protein preparations]. Tambov, 2007, 80 p. (in Russ.).
19. Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A.A. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, vol. 44, pp. 407–415.
20. Anderson C., Longton J., Maddix C., et al. *Single-Cell Protein*, MIT Press. Cambridge, 1975, pp. 314–329.
21. Junker B., Mann Z., Seeley A., et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, vol. 97, pp. 63–78.
22. Molina-Ramirez C., Castro M., Osorio M., et al. *Materials*, 2017, vol. 10, pp. 1–13.
23. Reddy C.S.K., Ghai R., Kalia V.C. *Bioresource Technology*, 2003, vol. 87, pp. 137–146.

Received October 11, 2019

Revised October 16, 2019

Accepted October 20, 2019

For citing: Ioelovich M.Ya., Morag E.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 1, pp. 19–24. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpr.2020016579.

* Corresponding author.