



AVALIAÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO DE FOSFATASE ÁCIDA PRODUZIDA POR *Trichoderma harzianum* EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA

Laís Ribeiro Pampanini ¹

Jussara Maria Martins de Almeida Afonso ²

Frederico Alves Lima ³

Amanda Carmelo da Rocha ⁴

Miriam Maria de Resende ⁵

Reutilização e Tratamento de Resíduos (sólidos e líquidos)

Resumo

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações químicas em organismos vivos. Entre elas, as fosfatases são notáveis por participarem de vários processos metabólicos. Microrganismos, especialmente fungos, têm uma notável capacidade de produzir fosfatases pela solubilização do fósforo inorgânico e da mineralização do fósforo orgânico, gerando fosfato solúvel, o qual é utilizado pelas plantas para seu crescimento. O objetivo de se imobilizar enzimas é obter maiores vantagens no seu uso em contraposição às desvantagens de alto custo e baixa estabilidade das preparações. Vários métodos de imobilização são conhecidos, e neste trabalho, objetiva-se a imobilização da enzima fosfatase ácida por adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite A-568. A produção de fosfatases ácidas deu-se por meio de fermentação sólida, utilizando farelo de soja como substrato e o fungo *Trichoderma harzianum*. Para a fermentação, foram inoculados 20 mL de água destilada estéril com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios/mL com 100 g de substrato. A resina Duolite A-568 foi ativada com 1M de ácido clorídrico na razão de 10 mL por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa a 50 rpm. O substrato utilizado foi o caldo fermentado em tampão acetato pH 4,5 na concentração de 5mg/mL. Obteve-se, para a enzima imobilizada no tempo de 4 horas, atividade enzimática de 18 U. mL⁻¹. Nesse substrato, após imobilização com o suporte Duolite® A-568 a pH 5, obteve rendimento de imobilização de 27% e uma a atividade enzimática de 97%, em 4 horas.

Palavras-chave: Fósforo; Fermentação; Fosfatase ácida; Imobilização.

¹ Laís Ribeiro Pampanini: Graduanda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, laisrpampanini@ufu.br.

² Jussara Maria Martins de Almeida Afonso: Doutoranda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, jussarammartins@live.com.

³ Frederico Alves Lima: Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, alveslimafrederico@gmail.com.

⁴ Amanda Carmelo da Rocha: Pós Doutoranda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia, Núcleo de Processos Biotecnológicos, amanda.rocha@ufu.br.

⁵ Prof. Dr. Miriam Maria de Resende da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica, Núcleo de Processos Biotecnológicos, mresende@ufu.br.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um importante macronutriente usado por todos os organismos vivos para a biossíntese de diferentes moléculas, incluindo DNA, RNA, fosfolipídios e ATP. Na natureza, compostos de fosfato são encontrados em rochas sedimentares e são liberados naturalmente através do intemperismo e, assim, lixiviados para águas superficiais e solos (Silva, 2022).

A absorção de compostos fosfatados ocorre no solo por meio das plantas e, conseqüentemente, são transferidos para outras formas de vida ao longo da cadeia alimentar (Silva, 2022). As limitações na disponibilidade de P no início do ciclo vegetativo podem resultar em restrições no desenvolvimento, das quais a planta não se recupera posteriormente, mesmo aumentando o suprimento de P a níveis adequados. O suprimento adequado de P é, pois, essencial desde os estádios iniciais de crescimento da planta (Gonçalves et al., 2023).

A quantidade acessível de fósforo é restrita pelo fato de este estar presente nos solos de forma inorgânica, principalmente em compostos minerais insolúveis, tornando-o inacessível às plantas (Parasana, Shah e Unnarkat, 2022). Microrganismos, tanto as bactérias quanto os fungos, convertem as formas insolúveis de fósforo em uma forma acessível para o crescimento e a sobrevivência das plantas (Behera et al., 2017). Um dos principais mecanismos de solubilização P empregados por microrganismos inclui a liberação de enzimas extracelulares para degradação enzimática. Entre os microrganismos solubilizantes de fosfato, as estirpes dos gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e fungos tais como *Aspergillus* sp., *Humicola* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Metarhizium* sp. e *Trichoderma harzianum* são poderosos solubilizantes de fosfato (Guimarães et al., 2004; Boyce e Walsh, 2007; Leitão, et al., 2010).

A assimilação de fósforo por microrganismos depende de enzimas específicas, incluindo fosfatases, as quais hidrolisam moléculas contendo fósforo. As fosfatases ácidas (ACPs, E.C. 3.1.3.2) são uma classe de diversas enzimas que catalisam a clivagem de ligações monoéster fosfóricas em compostos organofosforados (Gonçalves et al., 2023). Essas enzimas são responsáveis pela mineralização do fosfato orgânico quando os níveis de fosfato inorgânico livre no solo são baixos (Navroski et al., 2016).



A produção de enzimas de interesse biotecnológico por microrganismos tem sido realizada utilizando-se dois tipos de processos, a Fermentação Submersa (FSbm) e a Fermentação em Estado Sólido (FES) (Sankar et al., 2023). A fermentação em estado sólido é a mais utilizada, devido ao fácil controle de processos e possibilita a sua utilização em escalas industriais (Liu et al., 2020), para este tipo de fermentação utiliza-se água, que permite minimizar os gradientes de temperatura, concentrar os nutrientes (Silva et al., 2019), além de ser possível a realização de aeração, agitação e controle do pH (Ramamoorthy et al., 2019).

Enzimas possuem a habilidade de catalisar uma reação em soluções aquosas neutras sob temperaturas e pressões normais com alto grau de especificidade. O desenvolvimento da técnica de imobilização enzimática para aplicação em processos químicos teve início em 1960 (Souza et. al., 2017). A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma técnica essencial para criar biocatalisadores que mantenham sua atividade e estabilidade ao longo do processo, permitindo sua reutilização (Gonçalves et al., 2023).

De acordo com (Grossová et al., 2008) a imobilização enzimática permite o processamento de grandes quantidades de substrato, proporciona um maior controle do processo catalítico, flexibiliza o projeto do reator, a enzima não contamina o produto, promove a reutilização e permite um grande aproveitamento econômico. Ademais, após a imobilização, as propriedades físicas das enzimas podem sofrer modificações, as quais são evitadas ou diminuídas pela escolha criteriosa do método de imobilização e suporte adequados (Souza et. al., 2017).

Assim, o método de imobilização por ligação iônica envolve a mistura do suporte que possui grupos funcionais ionizáveis característicos, os quais irão interagir especificamente com grupos da enzima sob condições adequadas, seguida da separação do suporte contendo a enzima adsorvida do meio reacional (Fernandes, Lima e Lopes, 2010). Neste contexto, o presente trabalho aborda o processo de imobilização da enzima fosfatase ácida por adsorção, utilizando resinas de troca iônica Duolite A-568 como suporte.



METODOLOGIA

Microrganismos

Os fungos da espécie *Trichoderma harzianum* foram isolados/coletados no Complexo Mineralógico de Araxá (Vale Fertilizantes), Minas Gerais. O isolado de fungos foi identificado por testes bioquímicos de taxonomia convencional, pela Fundação André Tosello para Pesquisa e Tecnologia (Campinas-SP). Estas culturas fúngicas pertencem ao banco de microrganismos do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e são mantidos preservados pelo método de Castellani. A ativação do microrganismo foi realizada pelo repique das culturas, anteriormente preservadas, em placas de Petri contendo meio Czapek (Figura 1), meio de cultivo utilizado para ativação dos conídios preservados com a seguinte composição em g/L: NaNO₃ 2,0, K₂HPO₄ 1,0, MgSO₄ 0,5, KCl 0,5, FeSO₄ 0,01, Sacarose 30,0 e Ágar 20,0 (adaptado de Araújo, 2014).



Figura 01: Fungo *Trichoderma harzianum* ativado em placa Petri.

Fermentação Sólida (FES)

Inóculo

Inóculo: Raspou-se as placas Petri obtidas na etapa anterior com 20 mL de água destilada estéril pH 5. A seguir estas células foram utilizadas nas FES visando à produção de complexo enzimático.



FES

As fermentações sólidas foram realizadas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume). Foi inoculado 20 mL de água destilada estéril pH 5 com células de *Trichoderma harzianum* na concentração de $3,0 \times 10^8$ conídios/mL com 100 g de farelo de soja previamente esterilizados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 30 minutos. A FES foi realizada por sacrifício, ou seja, para cada ponto amostral foi descartado um reator estático. Efetuou-se o controle para cada ponto amostral. Os reatores estáticos foram adicionados na incubadora de BOD – 150 litros ALFA MARE AM5020 em temperatura de 24°C. Esses mesmos procedimentos foram aplicados nas FES de controle, mas sem a adição de células de *Trichoderma harzianum*.

Extração de enzimas

A extração das enzimas foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo. O meio extrativo utilizado foi o Tween 80 a 1% em água pH 4. Após a adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

Determinação do pH

O pH foi medido em pHmetro Gehaka de bancada, previamente calibrado.

Ensaio enzimático

A atividade da fosfatase ácida foi medida de acordo com Leitão et al. (2010), que utilizaram como substrato fosfato de p-nitrofenilo sal disódico hexahidratado (p-NPP) (Sigma Aldrich™). A mistura para o ensaio consistiu em 50 µL do extrato enzimático, 100 µL da solução de (p-NPP) concentração 5 mmol/L e 350 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L e pH 5,00. Após a adição dos reagentes, incubou à 45°C em banho termostático por 15 min. Por fim, depois deste período, a reação foi interrompida com a adição de 1000 µL de NaOH na concentração de 0,1 mol/L. A quantidade de (p-NP) liberada foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a 405 nm de comprimento de onda. Uma unidade (1U) de atividade da fosfatase ácida foi definida como 1 µM de p-nitrofenol (p-NP) formado por minuto (Ames, 1966).



Suporte para imobilização

Para imobilização da enzima fosfatase ácida o suporte utilizado foi a resina de troca iônica Duolite® A-568 (Rohm Haas), doada pela Dow Chemical Company. A resina pode ser vista na Figura 1.



Figura 02: Resina Duolite® A-568.

A resina Duolite® A-568 é um trocador aniônico fracamente básico e tem como princípio a ligação cruzada fenol-formaldeído. É utilizada como suporte (orgânico sintético) de enzimas em bioprocessos cujas principais características indicadas pelo fabricante são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 01: Características da Resina Duolite® A-568 (Rohm Hass)

CARACTERÍSTICAS	PROPRIEDADES DA RESINA
Estrutura Hidrolítica	Matriz: Fenol-formaldeído Grupo funcional: Amina Terciária Forma física: Granular
Alta Porosidade	Cor: Verde a cinza
Distribuição do tamanho e volume dos poros	Tamanho do poro: 15 a 25 nm Volume do poro: 0,78 a 1 mL/g Densidade: 1,10 a 1,14 g/mL Capacidade total de troca iônica: $\geq 1,20$ equivalente/L



Ativação do suporte

A resina Duolite A568 foi ativada de acordo com a metodologia do fabricante: ácido clorídrico 1 M, na razão de dez volumes de solução por volume de resina, durante 30 minutos em incubadora rotativa a 50 rpm. A seguir foi adicionado hidróxido de sódio 1 M, nas mesmas condições e procedimento realizados para o tratamento ácido. A resina foi lavada com água destilada entre os tratamentos. No final do processo a resina foi lavada com água destilada, filtrada à vácuo por 15 minutos e secas à temperatura ambiente.

Substrato

Foi usado como substrato o caldo fermentado em tampão acetato pH 4,5.

Imobilização enzimática

O processo de imobilização consistiu na adsorção da enzima na resina de troca iônica Duolite A-568. Uma massa de 0,5 g da resina Duolite A-568, previamente ativada conforme item anterior, foi incubada em 10 mL de solução enzimática com concentração de 5mg/mL preparada em tampão acetato de pH 4,5 sob agitação de 100 rpm em incubadora rotativa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas. Retiraram-se amostras do branco sobrenadante e suspensão, em diferentes tempos, para determinar a atividade catalítica do processo.

O rendimento de imobilização define-se como a quantidade de enzima unida ao suporte, calculada como a relação entre as atividades enzimáticas do sobrenadante e do branco inicial, descrito na equação 1. A atividade expressada (Equação 2) é a atividade final do biocatalisador, e se calcula como a relação da atividade na suspensão final depois do processo de imobilização e a atividade do branco inicial (Trobo-Maseda et al., 2020).

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Atividade final sobrenadante } \left(\frac{U}{mL}\right)}{\text{Atividade inicial } \left(\frac{U}{mL}\right)} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Atividade expressada (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Atividade suspensão } \left(\frac{U}{mL}\right)}{\text{Atividade inicial } \left(\frac{U}{mL}\right) \times \text{Rendimento}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imobilização foi realizada com a enzima fosfatase ácida de trigo (ACPase) produzida por fermentação sólida. A Figura 1 mostra a imobilização da enzima ACPase em função do tempo em temperatura ambiente.

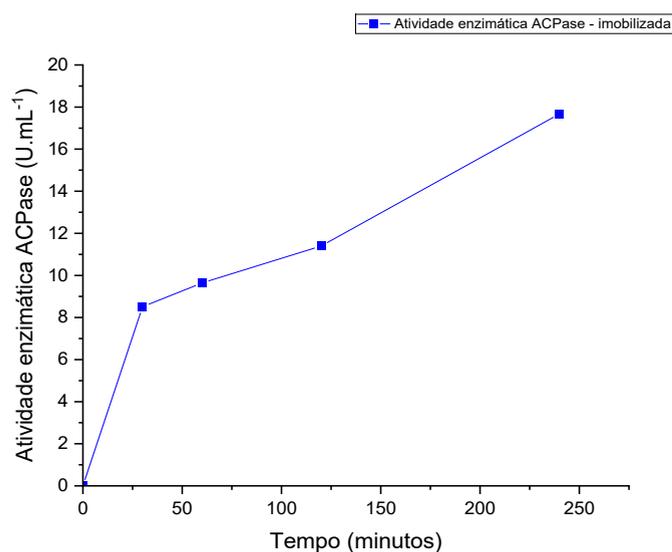


Figura 03: Cinética da atividade da fosfatase ácida para a enzima fosfatase ácida.

Para a enzima imobilizada no tempo de 15 minutos foi possível obter uma atividade de aproximadamente 9 U. mL⁻¹. No valor de pH 5 a enzima imobilizada apresentou bom desempenho nas primeiras horas, manteve-se com atividade enzimática crescente ao longo do período analisado.

Foi testado o suporte de interação iônica Duolite® A-568 para a imobilização e foi feito um controle com a mesma quantidade de enzima, no mesmo ambiente reacional e com a mesma solução tampão e manteve atividade enzimática constante ao longo do tempo. A Tabela 1 mostra o resultado obtido após imobilização da enzima ACPase produzida a partir de fermentação sólida para o tempo final de 4 horas o qual apresentou maior atividade da enzima imobilizada.

Tabela 01: Imobilização da fosfatase ácida em suporte Duolite® A-568.

Rendimento da imobilização (%)	Atividade expressada (%)
27	97



A fosfatase ácida de germen de trigo (ACPase) alcançou um rendimento de imobilização de 27% e uma atividade expressada de 97% (Tabela 1). Lima et al. 2023, em seu estudo utilizando diferentes suportes de troca iônica para imobilização de fosfatase ácida derivada de germen de trigo obteve para Toyopearl DEAE 650s pH 7, 1h (apenas imobilizado) rendimento de 99,37% e atividade expressada de 96,98%; Toyopearl DEAE 650s tratamento com NaIO₄ e NaBH₄ um rendimento de 97,34% e atividade expressada de 73,31%; DEAE Sepharose 6BC pH 7 overnight um rendimento de 99,15% e atividade expressada de 2,76% e MANAE Agarose 6BC pH 7 overnight um rendimento de 98,08 % e atividade expressada de 3,21 %. Para esses resultados observa-se uma grande variação nos valores de rendimento e atividade expressada indicando uma eficiência elevada na imobilização para todos os suportes utilizados. No entanto, a atividade expressada varia significativamente, sugerindo que fatores adicionais, como interações desfavoráveis com o suporte ou alterações conformacionais da enzima, podem estar reduzindo drasticamente a atividade da enzima imobilizada.

Para esse estudo, utilizando como suporte Duolite® A-568, operando em pH 5, há menor rendimento de imobilização (27%). No entanto, a atividade expressada é a mais alta (97%), indicando que, embora menos enzima seja imobilizada, a atividade da enzima que é imobilizada é muito bem preservada. Este resultado sugere que o Duolite® A-568 a pH 5 oferece um ambiente mais favorável para a manutenção da atividade enzimática, mesmo que a eficiência de imobilização não seja a maior. A imobilização nesse suporte é promissora devido à exposição dos grupos reativos em sua superfície externa, o que facilita uma rápida interação e adesão.

CONCLUSÕES

O método de imobilização da enzima fosfatase ácida, produzida por fermentação sólida, em resina Duolite® A-568 mostrou-se eficaz, apresentando uma atividade enzimática de aproximadamente 18 U.mL⁻¹ após 4 horas de imobilização. O rendimento de imobilização foi de 27%, com uma atividade expressa de 97%. Esses resultados indicam que a imobilização em Duolite® A-568 é uma abordagem promissora para aplicações envolvendo esta enzima.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ - 00874-18), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AMES, B. N. **Assay of inorganic phosphate and phosphatases**. *Methods Enzymol.* 1966; 8:115–118. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08014-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08014-5).

ARAÚJO, T. R. **Reaproveitamento de glicerol para produção de bioprodutos: biopolímeros**. 82f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BEHERA, B. C.; YADAV, H.; SINGH, S. K.; MISHRA, R. R.; SETHI, B. K.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. (2017). **Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India**. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169–178. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>.

BOYCE, A. & WALSH, G. **Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis***. *Journal Biotechnology*, v. 132(1), p. 82–87, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.028>.

FERNANDES, K. F., LIMA, C. S., & LOPES, F. M. **Técnicas de imobilização de enzimas**. *Revista Processos Químicos*, artigo 4, p. 53-58, 2010.

GONÇALVES, E. V.; MARTINS, M. D.; SANTOS, S. X.; BORGES, L. L.; CARAMORI, S. S. **Fungos imobilizados em espuma comercial de poliuretano removem fósforo de efluentes domésticos em curto prazo**. *Desafios Ambientais*, v. 11, 100693, 2023. doi.org/10.1016/j.envc.2023.100693

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. **Perspectives and Applications of Immobilized B-galactosidase in Food Industry - a Review** *Czech Journal of Food Science*, Praha, vol. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. de L.T. **Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus***. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 40, p. 201-207, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/ba20030208>.



SOUZA, L. T., VERÍSSIMO, L. A., PESSELA, B. C., SANTORO, R. R., RESENDE, R. R., & MENDES, A. A. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte.** *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*, capítulo 15, p. 529 – 568, 2017.

LEITÃO, V.O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. **Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum***, *Biotechnology Letters*, v. 32(8), p. 1083-1088, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0264-2>.

LIMA, F. A.; MARTINS, P. A.; MORAIS JR, W. G.; RIBEIRO, E. J.; GUISÁN, J. M.; RESENDE, M.M. **Immobilization of commercial acid phosphatases from wheat germ and potato onto ion exchangers.** *Korean J. Chem. Eng.*, 40(1), 1-8 (2023) DOI: 10.1007/s11814-023-1458-3.

LIU, JIAWEN et al. **Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation.** *International journal of biological macromolecules*, v. 152, p. 288-294, 2020.

NAVROSKI, D.; COLOZZI FILHO, A.; MOREIRA, A.; GRANGE, L. **Atividade da enzima fosfatase ácida em diferentes manejos de solo na região oeste do Paraná.** XX RBMCSA Reunião Brasileira de manejo e conservação do solo e da água, Curitiba, anais, p. 738 – 740, 2016.

PARASANA, N., SHAH, M. & UNNARKAT, A. **Avanços recentes no desenvolvimento de sorventes inovadores para remoção de fósforo – perspectivas e oportunidades.** *Environ Sci Pollut Res* 29, 38985–39016 (2022). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19662-5>.

RAMAMOORTHY, N. K.; SAMBAVI, T. R.; RENGANATHAN, S. **A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes.** *Process Biochemistry*, v. 83, p. 148-158, 2019.

SANKAR, M.; MATHEW, R. M.; PUTHIYAMADAM, A.; SREEJA-RAJU, A.; CHRISTOPHER, M.; GOKHALE, D. V.; SUKUMARAN, R. K. **A comparação dos secretomas derivados da fermentação submersa e no estado sólido do hipercelulolítico *Penicillium janthinellum* NCIM 1366 revela as mudanças responsáveis pelas diferenças no desempenho hidrolítico.** *Tecnologia de recursos biológicos*, v. 371, 128602, 2023. doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128602

SILVA, A. F. V.; SANTOS, A.L.; VALENCA, R.B.; PORTO, T.S.; DA MOTTA SOBRINHO, M.A.; GOMES, G.J.C.; JUCÁ, J.F.T.; SANTOS, A.F.M.S. **Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 6, p. 103510, 2019.

SILVA, M. M. **Desenvolvimento de biossorvente a partir de lodo anaeróbio granular para aplicação em sistemas de remoção de fosfato e em sistemas para a remoção de íons metálicos,** 2022, 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022.



21º Congresso Nacional de
MEIO AMBIENTE

de Poços de Caldas
22 a 25 DE OUTUBRO | 2024

EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

TROBO-MASEDA, L., ORREGO, A. H., GUI SAN, J. M., ROCHA-MARTIN, J. **Coimmobilization and colocalization of a glycosyltransferase and a sucrose synthase greatly improves the recycling of UDP-glucose: Glycosylation of resveratrol 3-O- β -D-glucoside.** International Journal of Biological Macromolecules, 157, pp. 510-521, 2020.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.120.