

Aproveitamento da Semente da Jaca para a Obtenção de Endoglucanase a partir de *Aspergillus Niger* por Fermentação em Estado Sólido

The Use of Jackfruit Seed for Obtainment of Endoglucanases from *Aspergillus Niger* for Fermentation in Solid State

Clissiane Soares Viana Pacheco^a; Alessandra Nascimento Ferreira^a; Thiago Jose Onorio Rocha^a;

Iasnaia Maria de Carvalho Tavares^a; Marcelo Franco^{a*}

^aUniversidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil.

*E-mail: marcelofranco@pq.cnpq.br

Recebido: 24 de junho de 2011; Aceito: 10 de outubro de 2011.

Resumo

A jaca é alimento consumido por brasileiros sob diferentes formas: *in natura*, doces, conservas, dentre outros. Os resíduos derivados (sementes) desses produtos são ricos em nutrientes tais como proteínas, fibras, sais minerais e ácidos graxos podendo ser utilizados em diferentes alimentos como componentes enriquecedores, minimizando a poluição ambiental. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da variação do teor de água (40%, 50% e 60%), do tempo de fermentação (24h, 48h, 72h e 96h) e da temperatura (25 °C, 30 °C e 35 °C), na produção de endoglucanase do fungo *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, utilizando semente de jaca como substrato. As fermentações ocorreram em estufa bacteriológica, a endoglucanase foi quantificada como carboximetilcelulase utilizando CMC como substrato e o teor de proteína solúvel foi determinado pelo método de Bradford. O melhor resultado, atividade específica de 138,45 (U/mg), foi obtido nas condições de fermentação realizada com 60% do teor de água a 35 °C no tempo de 72h. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a temperatura de fermentação foi o principal fator que afetou a produção da CMCase pelo *Aspergillus niger* a partir do semente de jaca.

Palavras-chave: Artocarpus. Fermentação. *Aspergillus niger*.

Abstract

Jackfruit is a kind of food eaten by many Brazilians in different ways: fresh, sweets, conserves, among others. The residue (seeds) derived from these products is rich in nutrients such as proteins, fibers, mineral salts and fatty acids, and it can be used in different kinds of food as enriching compounds, minimizing environmental pollution. The present study aimed to evaluate the effect of water percentage variation (40, 50, and 60%), time of fermentation (24, 48, 72, and 96 hours), and temperature (25, 30, and 35°C) in endoglucanases production for *Aspergillus niger* fungus, through fermentation in solid state, having jackfruit seed as substratum. The fermentations took place in bacteriological greenhouse; endoglucanases was quantified as carboxymethyl-cellulose using CMC as substratum, and the percentage of solvable protein was determined by Bradford method. The best result, specific activity 138,45 (U/mg), was obtained at the conditions of fermentation realized with 60% of water percentage, at 35°C, in 72 hours. Departing from results, it was possible to conclude that the temperature of fermentation was the main coefficient to affect the production of CMCCase by *Aspergillus niger* from jackfruit seed.

Keywords: Artocarpus. Fermentation. *Aspergillus niger*.

1 Introdução

A crescente preocupação com o meio ambiente incentiva o desenvolvimento de novas tecnologias que caminhem para a sustentabilidade do sistema de produção industrial. Na indústria de alimentos, ao longo da cadeia produtiva, uma série de resíduos é produzida, nesse sentido, aplicar novos processos visando o seu reaproveitamento está se tornando industrialmente interessante¹.

A fruticultura brasileira tem se consolidado como o grande vetor de desenvolvimento do país. Nos últimos anos, o seu crescimento apresentou taxas históricas, principalmente devido ao seu desenvolvimento na região Nordeste do Brasil, onde as condições de luminosidade, umidade relativa e temperatura superam as encontradas nas regiões Sul e Sudeste, tradicionais produtoras de frutas². Essa atividade desenvolvida na região Nordeste contribui para o desenvolvimento econômico regional, sendo que as frutas tropicais impulsionam essas economias historicamente fragilizadas³.

Após o despolpamento para fins industriais ocorre a geração do resíduo que pode acarretar problema ambiental, como a contaminação do solo e corpos d'água superficiais e subterrâneos, a proliferação de vetores e instalação de comunidades de catadores, e geração de gases onde não há nenhum tipo de tratamento que contribua para a melhoria dos danos ambientais e soluções de problemas causados ao homem⁴. Infelizmente, a maior parte desses resíduos agroindustriais é disposta diretamente ao ambiente⁵. Os resíduos compostos por materiais lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo e esta biomassa apresenta um potencial biotecnológico para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas, compostos de aroma, entre outros^{6,7}. O aproveitamento dos resíduos da fruticultura é possível reduzir sua produção industrial⁸. Esses resíduos são fontes de carboidratos e sua bioconversão têm recebido grande atenção nos últimos anos. Processos utilizando esse tipo de resíduo como substrato pode minimizar a dependência

do homem por combustíveis fósseis através da energia renovável na forma de glicose⁹. A produção global anual de biomassa vegetal é de cerca de 2×10^{11} toneladas, sendo que a lignocelulose responde por 90% deste valor¹⁰.

Na natureza, existe grande variedade de micro-organismos celulolíticos, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de produzir celulasas extracelulares¹¹. Os fungos constituem um dos grupos de micro-organismos mais importantes na atividade de decomposição dessa biomassa devido à capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, durante a sua fase vegetativa ou micelial. Nessa fase, dependendo da biomassa, ocorre a produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes lignocelulósicos¹². As enzimas fúngicas dominam as aplicações comerciais, devido ao seu alto nível de expressão e secreção¹³ normalmente são aplicadas em diferentes, como a têxtil, farmacêutica, alimentícia entre outras¹⁴. As enzimas celulolíticas são aplicadas na produção do etanol de segunda geração¹⁵. Elas são formadas por sistemas enzimáticos, nos quais as endoglucanases iniciam a hidrólise fração amorfa da celulose, fator primordial para a atuação das outras enzimas e, conseqüentemente, o aproveitamento dessa biomassa.

A fermentação no estado sólido (FES) é um meio de utilização de diversos resíduos para a obtenção de produtos com alto valor agregado. A cultura em estado sólido é definida como sendo o tipo de cultivo no qual um micro-organismo cresce numa mistura de material sólido (água-insolúvel), na ausência ou presença de limitada quantidade de água livre¹⁶. A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida na superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de água varia entre 30-85% e a atividade de água típica vai de 0,40 - 0,99, o que mimetiza condições encontradas na natureza¹⁷. Os fungos filamentosos, como o *Aspergillus niger*, apresentam grande potencial na degradação de compostos lignocelulósicos, além de requerer pouca água para seu desenvolvimento, o que representa diminuição dos efluentes gerados nos bioprocessos, como também a economia de água.

As enzimas industriais são grandes representantes dos processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos novos, no melhoramento dos processos e no desempenho dos produtos já existentes no mercado. No entanto, o custo de produção das enzimas é um dos principais fatores que determinam o desenvolvimento de novos processos, ou seja, reduzir os custos de produção é fundamental para as possíveis aplicações industriais¹⁸.

A jaca é alimento consumido por brasileiros sob diferentes formas: *in natura*, doces, conservas, dentre outros. Os resíduos derivados (sementes) desses produtos são ricos em

nutrientes tais como proteínas, fibras, sais minerais e ácidos graxos podendo ser utilizados em diferentes alimentos como componentes enriquecedores, minimizando a poluição ambiental¹⁹.

O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da variação da temperatura, tempo de fermentação e teor de água sobre a produção de endoglucanase (CMCase) pelo fungo *A. niger* em fermentação em estado sólido utilizando semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus*).

2 Material e Métodos

O resíduo do qual foi obtido a semente de jaca foi cedido pela indústria Doce Mel na cidade de Ipiau/BA, seco em estufa de secagem e esterilização SOLAB a 70 °C por 24 horas, a umidade obtida após a secagem foi estabelecida a 3% em determinador de umidade por infra-vermelho (MATER ID200). O resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Wiley (ACB LABOR), após o processo de trituração o resíduo foi peneirado a uma granulométrica aproximada de 30 mesh, o que representa 0,6 a 0,7 mm de diâmetro para cada partícula²⁰.

2.1 Obtenção da solução de esporos

A solução de esporos do fungo foi obtida através da inoculação da cepa de *Aspergillus Níger* (doada pela Fundação Oswaldo Cruz/ Rio de Janeiro), em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) HIMEDIA acidificado e incubado a 35 °C por sete dias em estufa bacteriológica (modelo SL 101 SOLAB). A cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC) a 0,01%, sendo nesta efetuada a contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (BIOVAL L1000)²⁰.

2.2 Fermentação em estado sólido

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL, contendo 10 g de resíduos, previamente autoclavados, a este foi adicionada a suspensão de 10^7 esporos por grama de substrato, em seguida foram adicionadas quantidades crescentes de água destilada e estéril até o teor de água desejada (40, 50 e 60%). As incubações foram conduzidas a 25, 30 e 35 °C em incubadora com temperatura controlada (SOLAB, modelo SL 101) e variando-se o tempo de fermentação (24, 48, 72 e 96 horas)²⁰.

2.3 Extração do extrato enzimático

Após o processo fermentativo, foi feita a extração mecânica (filtração) do extrato enzimático com solução tampão de citrato de sódio (VETEC) 50mM, pH 4,8. O extrato enzimático bruto proveniente da fermentação foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos (CETRIBIO modelo 80-2B).

2.4 Análise da atividade enzimática

2.4.1 Atividade de CMCCase

A atividade de CMCCase²⁰ foi quantificada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos pela degradação enzimática da carboximetilcelulose (CMC/COMOLINE) a 2% p/v o qual foi quantificado através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS)²¹. No sistema reacional foram adicionados 0,5 mL de solução tampão citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático bruto e 0,5 mL de CMC (2% p/v), no controle da reação, 0,5 mL do tampão citrato e 0,5 mL de extrato. Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica (QUIMIS) a 50 °C por 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL DNS, em seguida os tubos foram colocados em banho-maria (SOLAB) por 5 minutos, sendo posteriormente adicionados 6,5 mL de água destilada e efetuado a medição de absorbância em 540nm no espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U. A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm. A atividade específica (U/mg) da enzima foi definida como sendo a divisão do valor da atividade enzimática (U) pelo teor de proteína (mg).

2.4.2 Análise do teor de proteína

A quantificação da proteína bruta no extrato enzimático foi efetuada através do método de Bradford²².

2.4.3 Curva de calibração

A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS²¹.

2.5 Análises estatísticas

A produção da enzima foi realizada através do delineamento experimental inteiramente casual (DCL), com três repetições em cada ensaio, as variáveis independentes estudadas foram o tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120 horas), a temperatura de fermentação (25, 30 e 35 °C) e o teor de água (40, 50 e 60%). Os dados foram ajustados a um modelo quadrático completo (todos os efeitos linear e quadrático principal e todas as interações de duas vias) utilizando o software SAEG estatística. A significância estatística de todos os fatores foi então avaliada por análise de variância (ANOVA), usando teste estatístico de Fisher.

3 Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os valores experimentais obtidos durante o experimento.

Tabela 1: Atividades da enzima CMCCase (endoglucanase) em quatro tempos, três teores de água e três temperaturas. Média das três repetições amostrais

Tempo (h)	25 °C			30 °C			35 °C		
	40%	50%	60%	40%	50%	60%	40%	50%	60%
24	53,16	38,80	45,12	52,54	33,93	38,89	87,48	39,82	55,45
48	14,34	45,60	15,56	42,74	18,71	25,96	27,91	18,63	25,25
72	25,66	27,70	37,59	21,18	64,44	30,27	79,61	17,60	138,46
96	10,56	18,38	15,25	29,01	19,61	17,97	24,48	24,72	128,98

Na Tabela 2 encontram-se os resultados dos modelos reduzidos para cada teor de água e temperatura, bem como os coeficientes de

variação para cada equação. Os dados indicam que todos os modelos são estatisticamente significativos (F > valor crítico, valor P < 0,05).

Tabela 2: Modelos de ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA

Atividade de água	Equação	R ²	Coefficiente de Variação	F	P
25 °C					
40%	$5,429x^3 - 54,98x^2 + 164,1x - 111,0$	0,762	34,81	12,33	0,043
50%	$-8,567x^2 + 53,86x - 41,17$	0,875	25,97	8,21	0,045
60%	$-5,865x^2 + 37,37x - 24,76$	0,701	14,21	14,72	0,039
30 °C					
40%	$0,0077x^2 - 1,3025x + 81,453$	0,856	33,87	13,77	0,049
50%	$-0,0018x^3 + 0,3159x^2 - 16,017x + 261,6$	0,779	11,98	14,86	0,047
60%	$0,0003x^2 - 0,2759x + 43,662$	0,748	23,88	11,22	0,042
35 °C					
40%	$-0,002x^3 + 0,475x^2 - 26,09x + 476,3$	0,923	38,98	17,38	0,0448
50%	$-0,000x^3 + 0,038x^2 - 3,059x + 93,16$	0,873	32,87	12,74	0,0487
60%	$0,022x^2 - 0,915x + 52,73$	0,779	26,54	12,43	0,0210

Nas Figuras 1 e 2 estão representados os pontos médios de cada experimento realizado.

Nas Figuras 1, 2 e 3 estão representados o arranjo experimental para a enzima CMCCase para as diferentes temperaturas analisadas (25, 30 e 35 °C), em função da atividade específica (U/mg), teor de água (%) e tempo de fermentação (h).

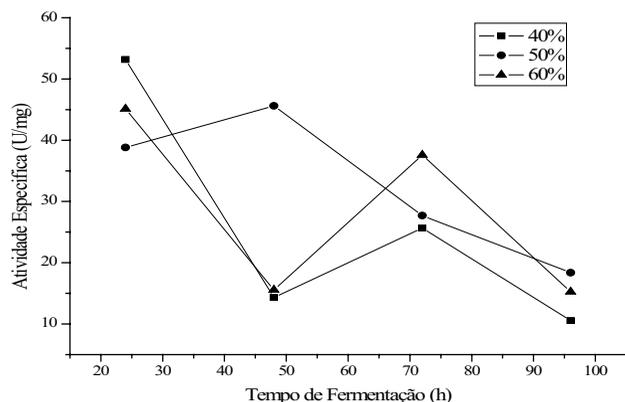


Figura 1: Atividade específica de endoglucanase a 25 °C variando tempo e o teor de água

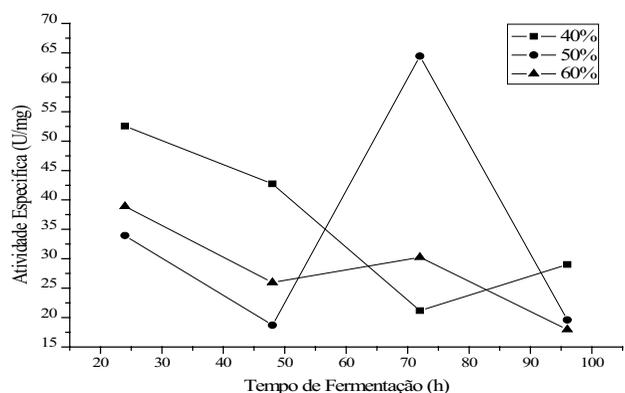


Figura 2: Atividade específica de endoglucanase a 30 °C variando tempo e o teor de água

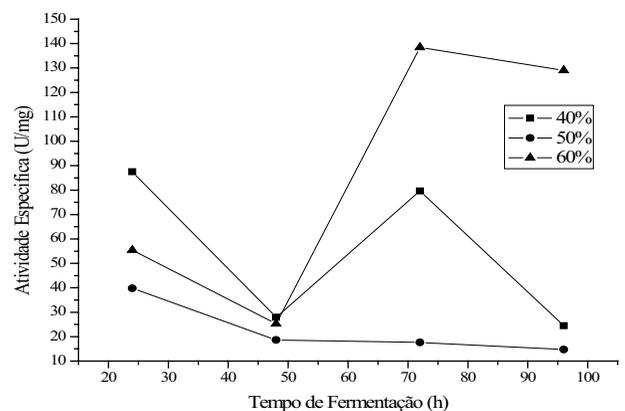


Figura 3: Atividade específica de endoglucanase a 35 °C variando tempo e o teor de água

Durante o processo de fermentação em estado sólido ocorre a secreção de enzimas pelos micro-organismos. Esse processo tem como objetivo converter a biomassa em compostos orgânicos para o crescimento celular²³. A celulose, presente nessa biomassa, é hidrolisada inicialmente por endoglucanases (CMCase), essas enzimas decompõem diversos polissacarídeos.

Observando a Figura 1 a maximização da produção enzimática no tempo de 24 horas de fermentação. Nessa temperatura, a atividade específica de CMCase produzida foi de 53,16 (U/mg) em 40% do teor de água. Observamos na Figura 2 que o incremento de 5 °C na temperatura de fermentação provocou elevação na atividade enzimática. Nessa temperatura (30 °C) o tempo ótimo de produção enzimática ocorreu em 72 horas de fermentação (Figura 2), com atividade de 64,44 (U/mg) em 50% do teor de água. Contrariando os ensaios anteriores (Figura 2), o aumento da temperatura de fermentação para 35 °C (Figura 3) provocou uma elevação na atividade enzimática. Deve ser destacado que nessa temperatura o comportamento em função do teor de água foi irrelevante. Novamente, a maior atividade enzimática foi observada em 72 horas de fermentação, com atividade de 138,46 (U/mg) em 60% do teor de água.

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações $\beta - 1,4$ na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização²⁴. A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para quantificar a atividade dessas enzimas²⁵. A literatura mostra a produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces*, em diferentes substratos, a estirpe de *Streptomyces*, a T3-1, produziu 40,3 U/mL em 1,5% de CMC e sulfato de amônio, ureia e peptona²⁶, porém os nutrientes utilizados não eram substratos de baixo custo. *Streptomyces* sp. isolada de solo do Canadá foi cultivada em uma solução de sais de Mandel contendo peptona, tween 80 em 1,0% de celulose cristalina e produziu 11,8 U/mL de CMCase²⁷ enquanto *Thermomonospora* sp., um actinomiceto alcalotermofílico²⁸, quando cultivado em meio contendo celulose de papel em pó, extrato de levedura e Tween 80, apresentou um pico de atividade de 23 U/mL, enquanto que quando cultivado em farelo de trigo a atividade foi de 8,5 U/mL. A FES é uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a reutilização dos resíduos gerados, diminuindo passivos ambientais bem como a valorização econômica desses rejeitos. O fungo sintetizou a enzima sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além da celulose contida na semente de jaca e água em diferentes concentrações.

4 Conclusão

Os resultados mostraram que a estirpe de *Aspergillus niger* é bastante promissora, no que se refere à obtenção da CMCase. As melhores condições para a produção da CMCase foi 72

horas, 35 °C e teor de umidade de 60%. Nessas condições, a atividade específica foi de 138,45 (U/mg). Notou-se, também, que a temperatura foi a variável mais importante na produção da enzima.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de ITI (Iniciação Tecnológica Industrial) e ao Banco do Nordeste (BNB) pelo apoio financeiro.

Referências

- Pelizer LH, Pontieri MH, Moraes IO. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J Technol Manag Innovat* 2007;2(1):118-27.
- Agriannual 2008: Anuário da Agricultura Brasileira. Santa Cruz do Sul: Gazeta, Santa Cruz; 2008.
- Quintino HMS. Benefícios sociais da política de incentivos à cultura do mamão no Estado do Ceará. 2007. Fortaleza. Dissertação [Mestrado em Economia Rural] - Universidade Federal do Ceará; 2007.
- Silveira AMM. Estudo de peso específico de RSU. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Engenharia Civil] – Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.
- Ojumu TV, Solomon BO, Betiku E, Layokun SK, Amigun B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *Afr J Biotechnol* 2003;2(6):150-2.
- Socol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technol* 2010;101(10):4820-5.
- Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS, Bhat MK. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technol* 2007;98(1):504-10.
- Uchoa AMA, Costa JMC, Maia GA, Silva EMC, Carvalho AFFU, Meira TR. Parametros fisico-química, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais. *Seg Alim Nut* 2008;15:58-65.
- Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35(5):377-91.
- Leathers TD. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. *FEMS Yeast Res* 2003;3(2):133-40.
- Rowell MR, Pettersen R, Han JS, Rowell JS, Tshabalala MA. Cell wall chemistry In: Rowel MR. *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Champagne: CRC; 2007.
- Velazquez-Cedeño MA, Mata G, Savoie JM. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *Word J Microbiol Biotechnol* 2002;18(3):201-7.
- Chang M. Harnessing energy from plant biomass. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11:677-84.
- Lee K, Moon SH. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *J Biotechnol* 2003;102:261-8.
- Socol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technol* 2010;101(10):4820-5.
- Gervais P, Molin P. The role of water in solid-state fermentation. *Bioch Eng J* 2003;13(1):85-101.
- Robison T, Nigam P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residue by solid state fermentation. *Biochem Eng J* 2003;13:197-203.
- Park Y, Kang S, Lee J, Hong S, Kim S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58(6):761-6.
- Borges SV, Bonilha CC, Mancini MC. Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) and pumpkin (*Cucurbitamoschata*) seeds dehydrated at different temperatures and used as ingredients in cookies. *Braz J Food Technol* 2006;17(3):317-21.
- Santos TC, Amorim GM, Bonomo RCF, Franco M. Determinação da Atividade de CMCase e FPase da Estipe Fungica *Rhizopus* sp. Através da Bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias purpurea* L). *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 2011;13(3):145-9.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-254.
- Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 2009;27(2):185-94.
- Dienes D, Egyhazi A, Réczey K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Ind Crops Prod* 2004;20(1):11-21.
- Cao Y, Tan H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydr Res* 2002;337(14):1291-6.
- Jang HD, Chen KS. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World J Microbiol Biotechnol* 2003;19(2):263-8.
- Alani F, Anderson WA, Moo-Young M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett* 2008;30(1):123-6.
- George SP, Ahamad A, Rao MB. Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technol* 2001;77(2):171-5.

