

“Biostoning” de material textil por acción enzimática de celulasas producidas por la cepa IB-105

Biostoning of textiles by celullolitic enzyme produced by a fungal strain IB-105

Gaston Pedro Torrez M.¹, Oscar Cárdenas¹, Karen Cabero², Daysy Torrico², Teresa Alvarez, Enrique Terrazas¹

¹Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Instituto de Investigaciones de Desarrollo de Procesos Químicos (IIDEPROQ)

Dirección para correspondencia: Gastón Pedro Torrez. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.

Email: gaston.genbiotek@yahoo.com

Recibido para publicación en 26/03/10

Aceptado en 02/06/10

RESUMEN

La industria textil emplea piedras pómez para el desgaste de material textil, sin embargo este proceso rudimentario puede ser reemplazado por la tecnología de enzimas. El presente estudio, evaluó la hidrólisis enzimática que se obtiene por resultado de la acción de enzimas celulolíticas de la cepa IB-105 sobre telas de algodón. El fermento liofilizado permitió la liberación de glucosa después del tratamiento enzimático en la tela 1 de 29.21 ± 0.15 mg de glucosa a las 75 horas. Cuando el mismo fermento se empleo en la tela 2 se libero 23.81 ± 0.32 mg de glucosa y la tela 3 libero 40.72 ± 0.31 mg de glucosa a las 60 horas de tratamiento con la enzimas celulolíticas con una actividad de 15 UI/ml. Después de la biocatálisis se observo una pérdida de peso en los textiles. La hidrólisis con una actividad de 15 UI/ml de enzimas celulolíticas proporcionan mayor pérdida de peso tanto para la tela 1 ($25.12 \% \pm 1.27$) a las 75 horas, tela 2 ($17.67 \% \pm 1.33$) a las 90 horas y tela 3 ($25.11 \% \pm 1.07$) a las 75 horas. La medición con el espectrofotómetro de superficie mostro que después del tratamiento enzimático tanto para la tela 1 (60 h), tela 2 (75h) y tela 3 (60h), existe diferencia en la reflectancia pero con sólo una leve diferencia del color y un claro biodesgaste o “biostoning”. El análisis microbiológico y por técnicas de biología molecular mostro que la cepa IB-105 tiene una homología con *Aspergillus sp.* Estos resultados muestran la posibilidad de un futuro empleo de las enzimas producidas por microorganismos en procesos industriales.

Palabras Clave: Biostoning, jean, celulasas, *Aspergillus*

ABSTRACT

The textile industry uses pumice stones for wearing out of textile material, however this rudimentary process can be replaced by the enzyme technology. The present study, evaluates the enzymatic hydrolysis that is obtained by the result of cellulolitic enzyme action of the fungus IB-105 on cotton fabric. The lyophilized ferment allowed the glucose liberation after the enzymatic treatment in yarn 1 of 29.21 ± 0.15 mg of glucose after 75 h of treatment. When the crude enzyme was tested in yarn 2 the released glucose was 23.81 ± 0.32 mg and 40.72 ± 0.31 mg of glucose on yarn 3 after 60 h with 15 UI/ml of enzyme activity. After the biocatalysis the textiles lose weight. The hydrolysis with 15 UI/ml of cellulolitic enzymes as much provides greater lose of weight for yarn 1 ($25.12\% \pm 1.27$) after 75 h, yarn 2 ($17.67\% \pm 1.33$) after 90 hours and yarn 3 ($25.11\% \pm 1.07$) after 75 hours. The measurement with surface spectrophotometer showed after the enzymatic treatment as much for yarn 1 (60 h), yarn2 (75h) and yarn 3 (60h), exists difference in reflectance but exists one slight difference of the color, but a clear biostoning of the yarn. The microbiological analysis and by techniques of molecular biology showed that fungus IB-105 has a homology with *Aspergillus sp.* These results show the possibility of a future use of enzymes produced by microorganisms in industrial processes.

Key Words: Biostoning, denim, cellulases, *Aspergillus*

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe una variedad enorme de reacciones químicas que en su totalidad esta mediada por un conjunto de catalizadores biológicos comúnmente conocidos como enzimas. Si bien éstas están sometidas a las mismas leyes de la naturaleza, difieren de los catalizadores químicos por aumentar la velocidad de reacción, mayor especificidad de reacción y una alta capacidad de regulación¹.

El mercado del “denim” tiene una alta proporción de “productos de apariencia desgastada”. Esta apariencia se alcanza a través de diversos procesos, uno de los más populares es el “stonewashing” en el cual el material recibe un desgaste por piedras. En la industria textil las enzimas celulolíticas son herramientas biotecnológicas que permiten lograr este mismo efecto desgastado, además estas enzimas limpian las pelusas que se forman en la superficie de productos de algodón. Las celulasas también pueden ser usadas en el terminado del jean para crear un aspecto de pre lavado sobre las prendas que es llamado “biostoning”. Las enzimas celulolíticas hidrolizan la celulosa presente en el tejido de algodón y estas enzimas son producidas por una gran variedad de bacterias y hongos, actualmente son importantes industrialmente^{2, 3} con un mercado de 190 millones de dólares⁴.

El amplio espectro de usos industriales para las celulasas, establece una necesidad de obtener celulasas comerciales que puedan actuar efectivamente a diferentes pH y rangos de temperatura, y por tanto ser utilizado ampliamente en la industria. La finalidad del presente estudio fue investigar el efecto “biostoning” de las telas con tejido de algodón (jean) frente a la hidrólisis enzimática utilizando celulasas producidas por la cepa IB-105 a través de métodos cuantitativos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizó la cepa IB-105 la cual fue aislada en un trabajo previo, en de muestras obtenidas del altiplano boliviano⁵. Las cepas fueron conservadas por réplicas en medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (APD) y fueron incubadas a 25° C para su desarrollo.

Aislamiento y purificación de DNA. Para la extracción del material genómico se utilizó un mililitro de una suspensión de esporas del hongo en estudio. Se realizó la precipitación de la suspensión de esporas centrifugando a 6000 rpm por 5 minutos. El precipitado fue resuspendido con 500 µL de una solución de lisis (0.1 M NaCl, 0.5 M pH 8 TrisHCl, 5% SDS), dejando incubar por 1 hora a 65° C. Posteriormente se centrifugó las soluciones 13000 rpm por 10 minutos, para recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo y adicionar mezclando

vigorosamente 50 µL de una solución de Tris 2M (pH 7), 150 µL NaCl (5M).

Los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por el tiempo 10 minutos, para recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo. Se añadió 800 µL de etanol absoluto al sobrenadante y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos. El pellet que fue resuspendido con 200 µL de etanol al 70%, luego se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos. Se repitió este paso tres veces. El pellet fue secado a 55° C por 15 minutos y finalmente se suspendió el material genético con 100 µL de agua estéril libre de DNAsas y fue almacenado a 4°, hasta su posterior utilización.

PCR. Las secuencias de los iniciadores para amplificar la región D1/D2 LSU ribosomal de la cepa en estudio son: F63 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Para la amplificación se utilizó los siguientes pasos en la PCR: 3 min a 95° C; 30 s a 95° C; 30 s a 57° C; 2 min a 72° C, seguido de 30 ciclos, 5 min a 72° C y finalmente tiempo indefinido a 4° C. Se utilizó como control negativo agua de la reacción y como control positivo ADN de *Aspergillus sp.* Para la visualización de los productos obtenidos, se utilizaron geles de agarosa al 1%, preparados con el amortiguador TBE 0,5X con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL y las muestras amplificadas se mezclaron con una solución de cargado (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarosa) para la realización de la electroforesis. Las bandas fueron visualizadas por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm.

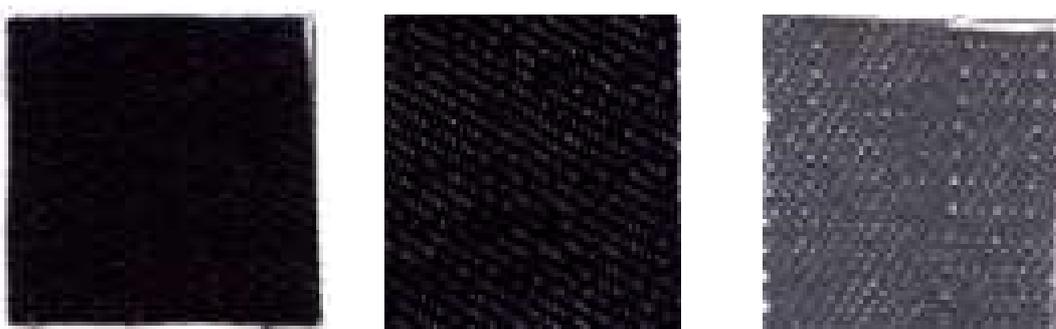
Secuenciación y Análisis de DNA. La secuenciación del fragmento amplificado fue llevada a cabo en la Unidad de Genética de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA. Se purificaron los amplicones utilizando el protocolo de Applied Biosystems y se realizó la secuenciación por el método de Sanger en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit para la obtención de una secuencia consenso y se comparó esta secuencia con las existentes en las base de datos del NCBI considerando además el porcentaje de máximo de identidad. Además se utilizó el programa Mega4 para realización del alineamiento múltiple usando el CLUSTAL W.

Producción y liofilización de enzimas celulolíticas. La producción de enzimas se realizó cultivando la cepa fúngica IB-105 en medio líquido de Mandels Modificado al Medio C de optimización realizado en un anterior estudio^{5, 6}. El mismo se sometió a incubación durante 24 días en medio estático a una temperatura de 25 °C. La liofilización se realizó después de la filtración y de la elijación de esporas el cual se recoge en un frasco limpio y estéril se deja en un refrigerador

convencional a -20°C un día. Posteriormente se somete a -80°C durante otro día y se procede a colocar en el liofilizador (LYOVAC GT2) a 1×10^{-3} mmHg -20°C por aproximadamente 72 horas

Muestra textil. Se evaluó tres tipos de tela jean; la tela 1 color negro corresponde en su composición a 100 %

de algodón, tela 2 color negro a 60 % de algodón y tela 3 color azul a 100 % de algodón (ver Figura 1). Las mismas se cortaron a 2 cm x 2 cm y los mismos se pesaron en una balanza analítica por triplicado hasta alcanzar peso constante.



a) Tela 1 color negro (100 % algodón), b) Tela 2 color negro (60% algodón) c) Tela 3 color azul (100% algodón)
Figura 1. Muestras de los textiles utilizados para el presente estudio

Proceso de “Biostoning”. Se procedió a realizar soluciones con enzimas celulolíticas a las concentraciones de 5 UI/ml, 10 UI/ml y 15 UI/ml, cada solución se alicuotó en tubos de ensayo a un volumen de 2 ml donde se sumergieron cada trozo de tela y se procedió a incubar en Baño Maria a 50°C durante 90 horas.

Métodos de evaluación del proceso de Biostoning. Se utilizó la técnica de DNS (Ácido Dinitrosalicico) correspondiente a la liberación de azúcares reductores por la hidrólisis del algodón presente en la tela de jean⁷. Se determinó la cantidad de peso perdido de la tela jean mediante la determinación cuantitativa en una balanza analítica, de esta manera se procedió a pesar previo a la acción enzimática y después de la misma. Esta determinación se realizó por triplicado hasta alcanzar peso constante. También se realizó la medición espectral de la superficie de la tela con el espectrofotómetro Konica Minolta CM 2600d con las siguientes características:

AREA/ESPEC	M/I+E
COND. UV	UV 100%

ILUM.1	D65
ILUM.2	---
OBSERVADOR	10°
ESP. COLOR	$L^*a^*b^*,E^*$
PROMED. AUT	1
DESV. EST.	SCI---- SCE----1
INTERVALO	0.0s

RESULTADOS

Identificación de la Cepa IB-105. La cepa IB-105 se caracterizó primeramente mediante el crecimiento y desarrollo microscópico en medio APD (Figura 2). De este mismo medio de cultivo, se realizó la caracterización microscópica por observación directa en portaobjetos, identificando hifas y conidios (Figura 3). Las características encontradas en ambos casos fueron similares al del género *Aspergillus*. Con respecto al análisis de secuenciación y el alineamiento (Figura 4) de la secuencia de los nucleótidos según la base de datos NCBI-BLAST se encontró un 98% de similitud con el género *Aspergillus sp.*

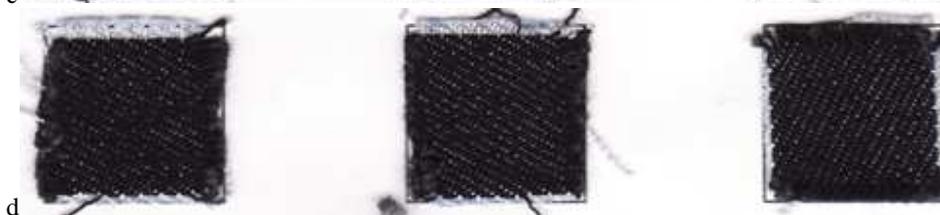
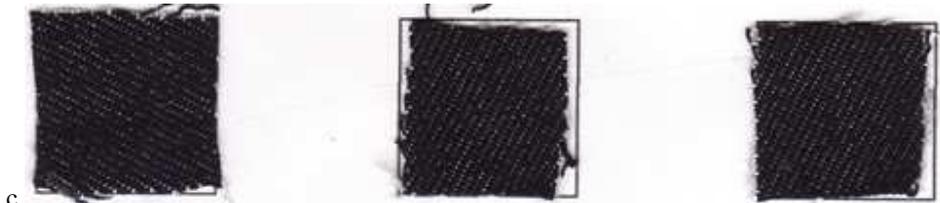
“Biostoning”. Después del tratamiento enzimático a diferentes concentraciones y tiempos de acción se

observó el efecto de desgaste enzimático como se observa en la Figura 5

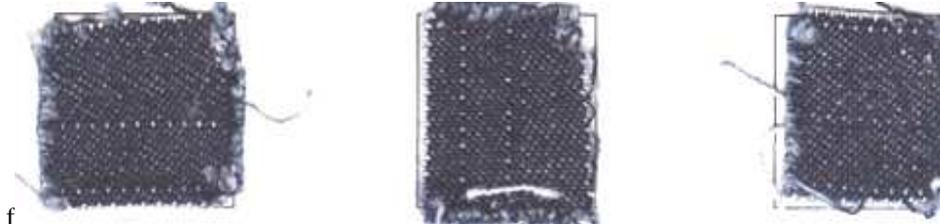
Tela 1



Tela 2



Tela 3



a, c, e corresponden a las telas control para la tela 1, 2 y 3 respectivamente y b, d y f corresponden a las telas tratadas enzimáticamente tela 1 (75 horas), tela 2 (60 horas) y tela 3 (60 horas)

Figura 5 Fotografías de las muestras control y las tratadas enzimáticamente donde se muestra el efecto biostoning

Evaluación de azúcares reductores (Método de DNS).
 La mayor liberación de glucosa después del tratamiento enzimático se observó para el tela 1 a las 75 horas con 29.21 ± 0.15 mg de glucosa en comparación con el tela 2

con 23.81 ± 0.32 mg de glucosa y tela 3 con 40.72 ± 0.31 mg de glucosa. En los últimos casos la concentración de glucosa es a las 60 horas (Figuras 6, 7 y 8).

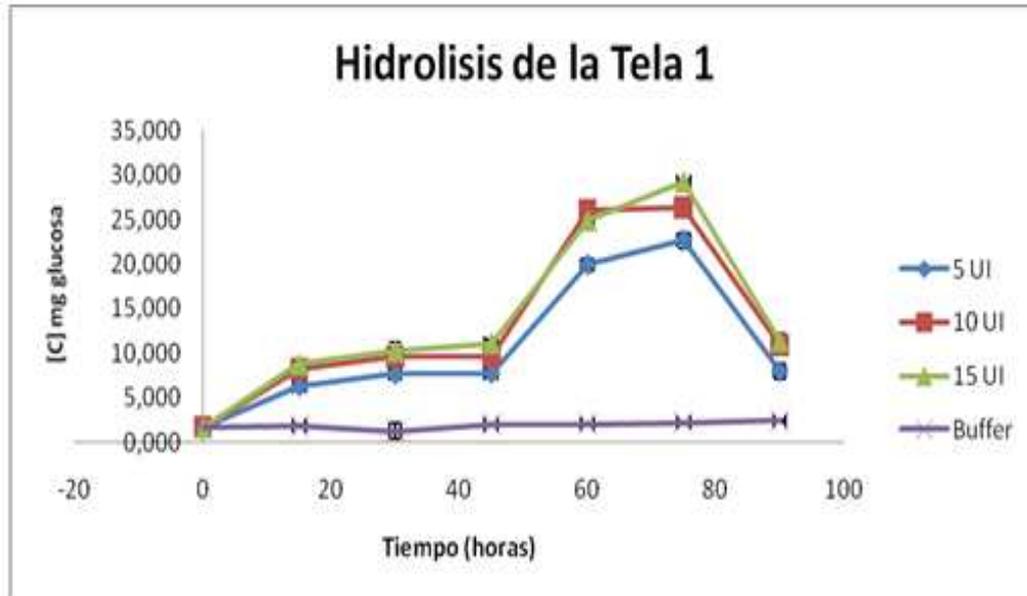


Figura 6. Cinética de hidrólisis enzimática con concentraciones de 5, 10 y 15 UI de celulasas para la tela 1

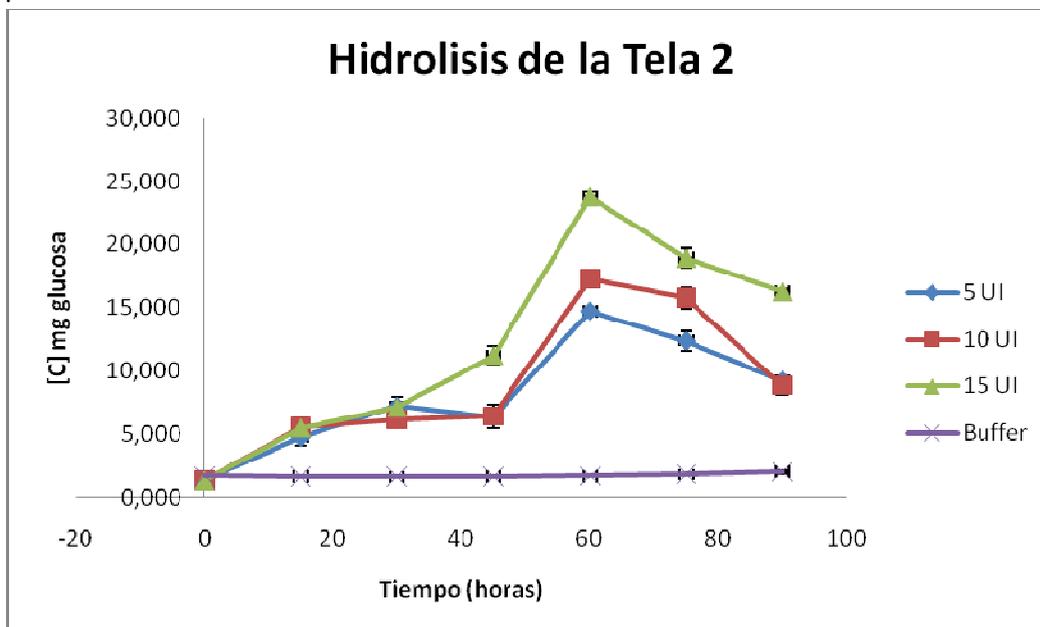


Figura 7. Cinética de hidrólisis enzimática con concentraciones de 5, 10 y 15 UI de celulasas para la tela 2

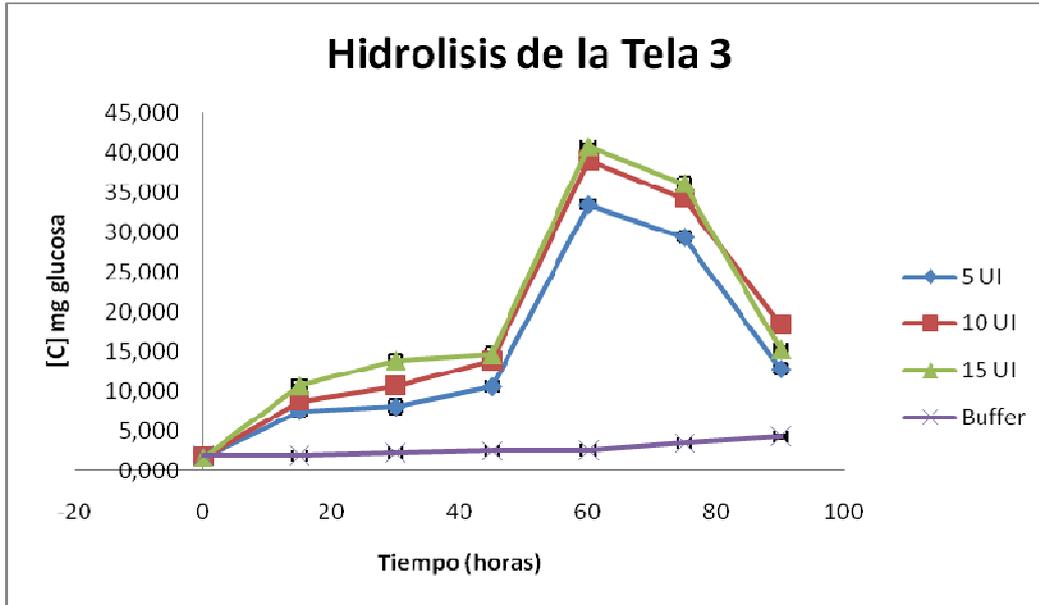


Figura 8. Cinética de hidrólisis enzimática con concentraciones de 5, 10 y 15 UI de celulasas para la tela 3

Determinación de la pérdida de peso después de la hidrólisis enzimática. La mayor cantidad de pérdida de peso se observó para la tela 1 a las 75 horas con $25.11 \pm 1.27 \%$ (75 horas), tela 2 $17.67 \pm 1.33 \%$ (60 horas) y

tela 3 $25.11 \pm 1.07 \%$ (75 horas); en todos los casos se observó la mayor cantidad de peso perdido con la utilización de una concentración de 15 UI/ml de enzimas celulolíticas (Figura 9, 10 y 11).

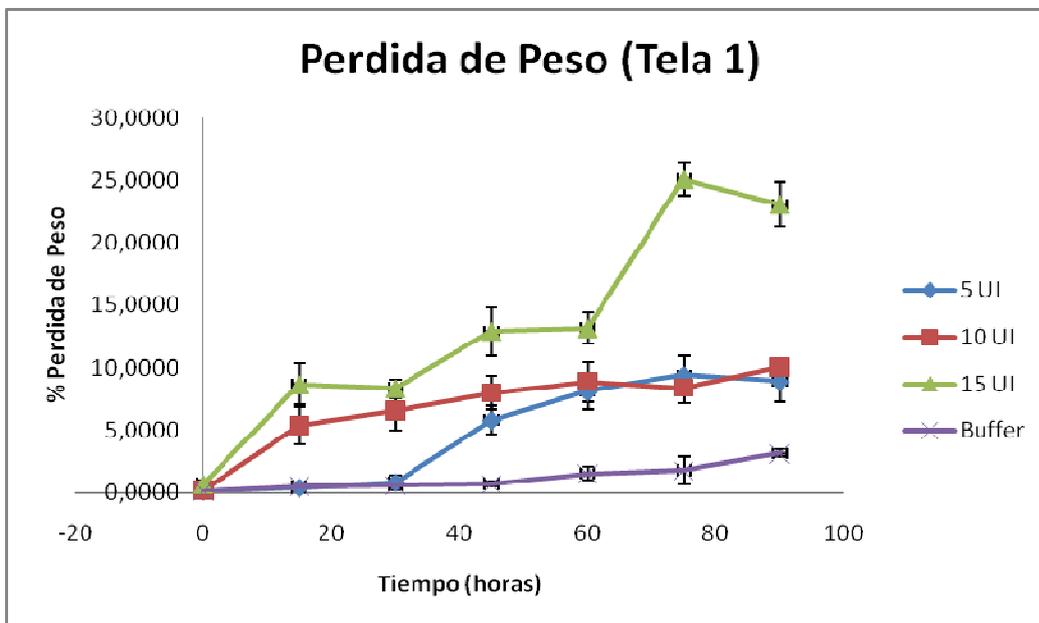


Figura 9. Cinética de pérdida de peso debido a la hidrólisis enzimática con concentraciones de 5, 10 y 15 UI de celulasas para la tela 1

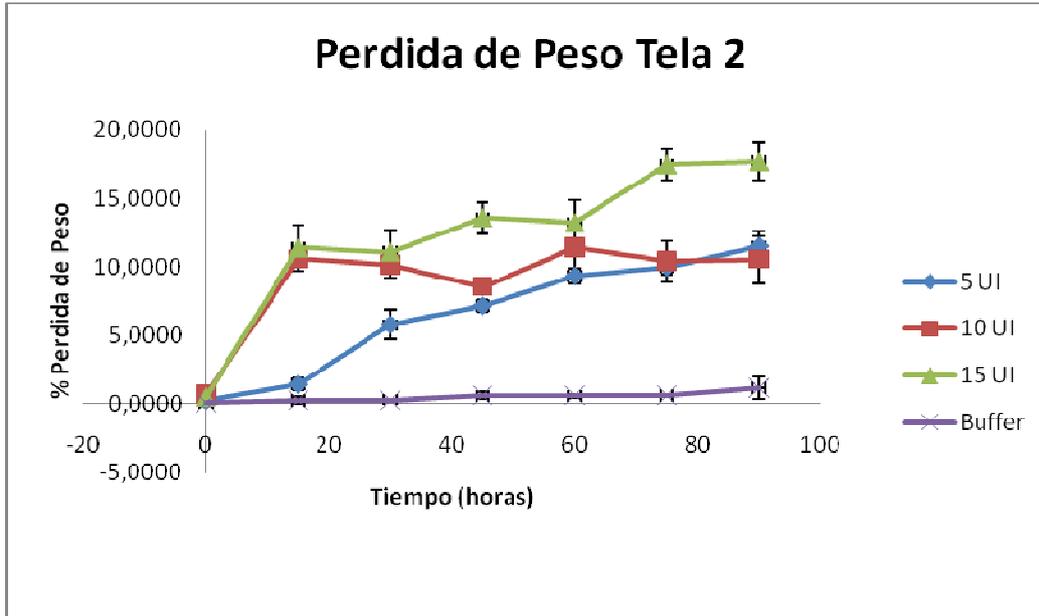


Figura 10. Cinética de pérdida de peso debido a la hidrólisis enzimática con concentraciones de 5, 10 y 15 UI de celulasas para la tela 2

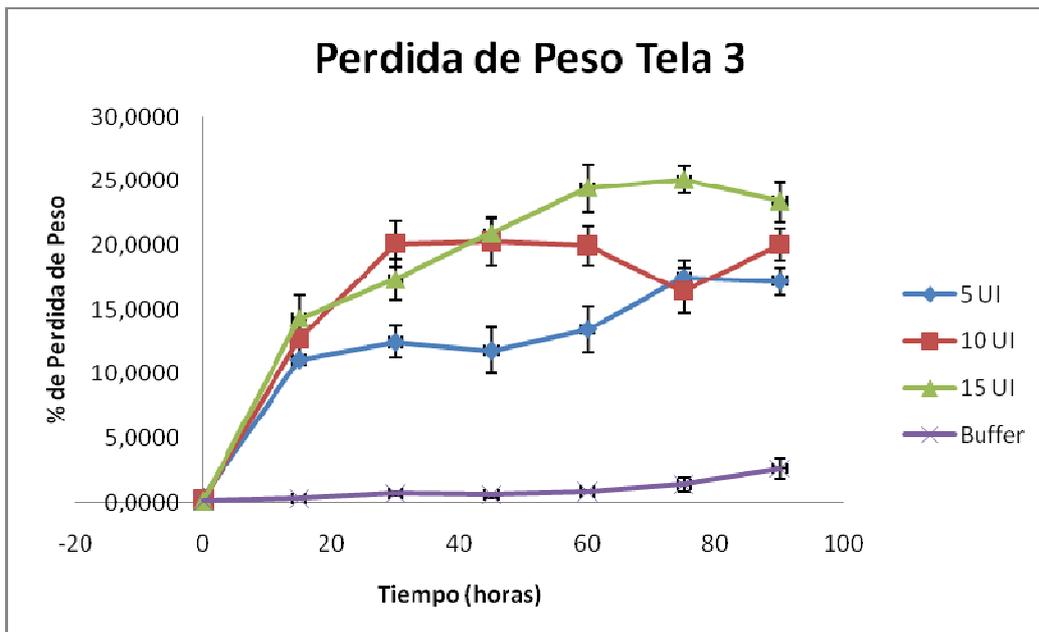
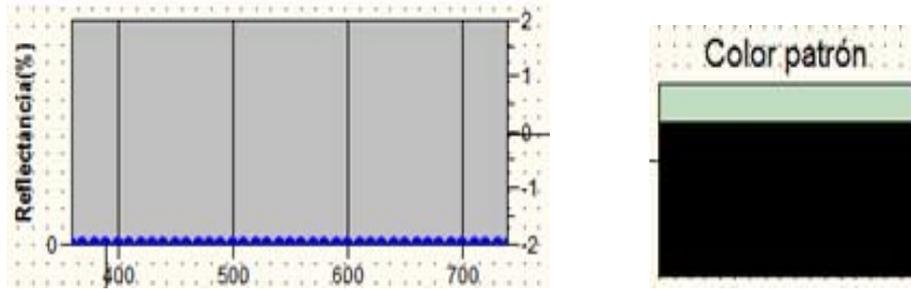


Figura 11. Cinética de pérdida de peso debido a la hidrólisis enzimática con concentraciones de 5, 10 y 15 UI de celulasas para la tela 3

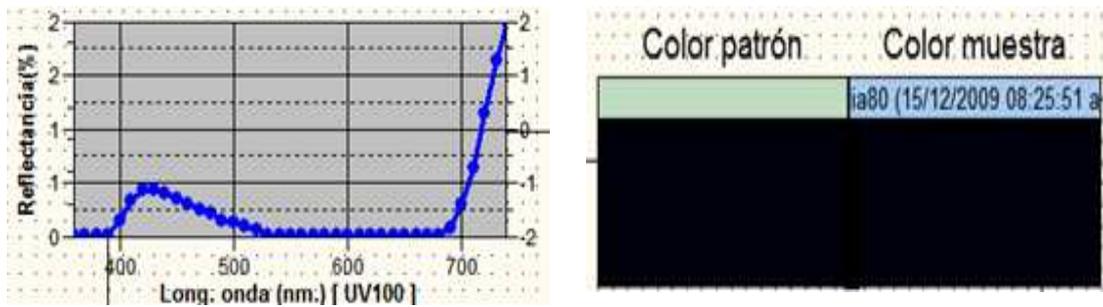
Medición espectral.



a) Reflectancia para la tela 1 (Patrón)

b) Color del patron

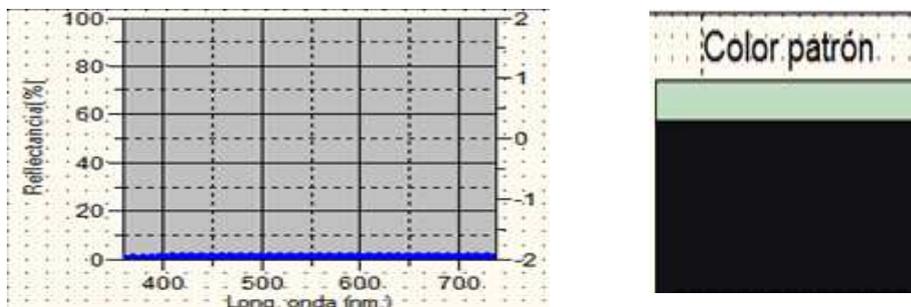
Figura 12. Medición del Patrón de referencia para el textil 1



a) Reflectancia de la tela 1

b) Color del patrón y color de la muestra

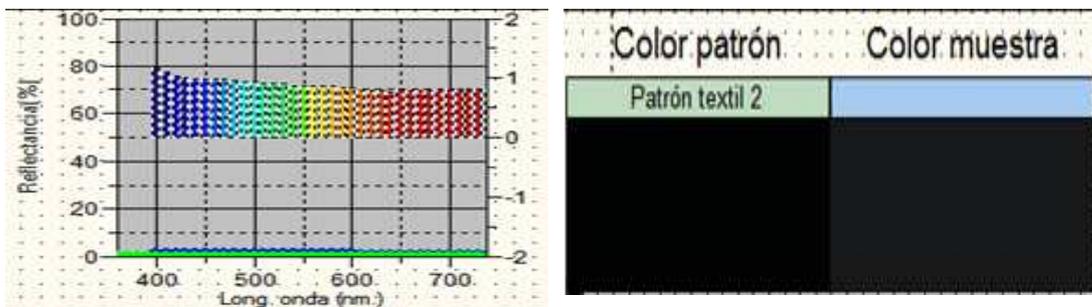
Figura 13. Medición Espectral del textil 1 a las 75 h de acción enzimática



a) Reflectancia para la tela 2 (Patrón)

b) Color del patrón

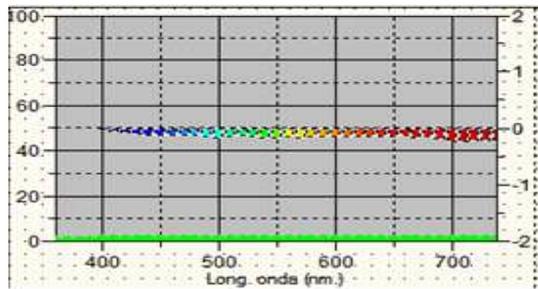
Figura 14. Medición del Patrón de referencia para el textil 2



a) Reflectancia de la tela 2

b) Color del patrón y color de la muestra

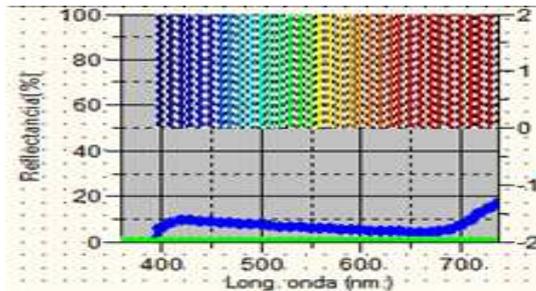
Figura 15. Medición Espectral del textil 2 a las 60 h de acción enzimática



a) Reflectancia para la tela 3 (Patrón)



b) Color del patrón

Figura 16. Medición del Patrón de referencia para el tela 3

a) Reflectancia de la tela 2



b) Color del patrón y color de la muestra

Figura 17. Medición Espectral del tela 3 a las 60 h de acción enzimática

Para la tela 1 se observó que existe una variación en la reflectancia entre 420 nm y a más de 650 nm, con los siguientes valores $L= 0.46$ $*a= 0.99$ $*b= -4.27$. Esta medición corresponde a la medición más representativa del conjunto de muestras y corresponde al tratamiento enzimático al tiempo de 60 h.

Para la tela 2 se observó que la variación de reflectancia no se elevó, en cambio con la anterior muestra hubo una variación en el color ($L = 8,43$ $*a= -0.31$ $*b= -1.74$).

Para la tela 3 se observó la variación en la reflectancia de la misma forma que la tela 1, la cual osciló en 420 nm y a más de 650 nm con los siguientes valores $L= 29.99$ $*a = -2.25$ $*b= -9.36$. Además hubo una variación en el color existiendo el efecto deseado de “desgaste y ligero blanqueamiento” de las fibras de jean.

DISCUSIÓN

- La identificación de la cepa IB105 con respecto al desarrollo del hongo, la observación de las hifas y conidios en el microscopio y la utilización de primers que amplifican un segmento del dominio de las regiones D1/D2 que pertenecen a la sub unidad larga del RNAr

para la respectiva secuenciación, nos demuestra que aparentemente la cepa en estudio pertenece al género *Aspergillus sp.* por las similitudes encontradas en el desarrollo y la observación microscópica, además del alineamiento del segmento amplificado con este género. Sin embargo para mejorar el análisis en la identificación a nivel de especie sería ideal la utilización de otros marcadores, así como la secuenciación de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS), que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del DNAr.

La mayoría de los autores sugieren el empleo de ITS y SSU/LSU para dilucidar relaciones filogenéticas, diferenciación entre especies y diagnóstico^{8, 9, 10, 11, 12} por este motivo la utilización de estas regiones será importante para corroborar los resultados encontrados con la amplificación D1/D2 realizados en este estudio. Aunque la región ITS es la región del DNA de hongos, su utilización es típica para el nivel de especies como método molecular sistémico, pero debido a que existen otras

regiones con más alto grado de variación que otras regiones génicas del DNA ribosomal, sólo se permite observar la amplificación selectiva de las secuencias de hongos, reduciendo el rango de identificación a algunas especies fúngicas utilizando ITS como estudio¹³.

- Se observó una disminución leve en la cantidad de glucosa liberada en el tela 2, esto se puede atribuir que esta tela posee 40 % de polyester, en cambio se observó un aumento en la concentración de glucosa en el tela 3, puesto que la prenda es en su totalidad 100% de algodón, por tanto la enzima tiene mayor sustrato para su actividad.
- Para la determinación de la pérdida de peso se observó el efecto “Backstaining” descrito en otro estudio^{14 15} en el mismo que se observa la tendencia de re-deposición de fibras liberadas durante la acción enzimática. Ellas se depositan sobre la superficie de la tela, bajando el contraste del desgaste de la tela. Este efecto se observa en dependencia del pH ácido donde actúa este tipo de celulasas¹⁶ este efecto se ve disminuido con la utilización de celulasas neutras. Para eliminar este efecto, aunque se sugiere la utilización de agentes anti deposición u otro tipo de enzimas como las enzimas lipolíticas^{17, 18, 19} en el presente estudio se empleó un post lavado, para eliminar las fibras adheridas a la tela, este post lavado consistía en agitar las fibras a 200 rpm, y un tiempo de 10 minutos con el propósito de solubilizar la glucosa liberada durante la hidrólisis, ya que la misma influye en los análisis de determinación de pérdida de peso.
- Aunque cualitativamente se observó un desgaste en la tela no se observó un cambio en el color, sólo un cambio en la reflectancia lo cual indica que existe mayor luminiscencia con valores de L (Unidades de luminiscencia) expresados en el equipo espectrofotométrico (Konica Minolta 3600d), los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la utilización de enzimas celulolíticas ayudan en el desgaste de las fibras de algodón de las telas, y debido a este efecto se observa un ligero blanqueamiento debido a que los agentes que dan color a la tela se encuentran impregnados en dichas fibras^{15, 20}. En cambio en las telas sintéticas como es el caso de la tela 2 los colorantes están impregnados en fibras sintéticas donde las enzimas celulolíticas no tienen acción, por lo mismo no existe un blanqueamiento comprado con las otras dos muestras, por la realización de un bio-blanqueamiento adecuado se sugieren la

utilización de enzimas oxido-reductoras o alguna enzima de origen microbiano capaz de modificar colorantes aromáticos²¹ como el azul índigo utilizado en la telas jean, además se debe evaluar la acción de los colorantes industriales como el azul índigo porque pueden modificar la actividad enzimática de forma sinérgica o antagonica^{22, 23, 24}.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Internacional de Cooperación Sueca ASDI / SAREC, Recursos IDH, PIEB e International Foundation for Science, cuyo apoyo al proyecto de Biodiversidad Microbiana del I.I.F.B. permitió el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Voet. Bioquímica. 3ra ed. Buenos Aires: Panamericana; 2007.
2. Schüle M. Protein engineering of cellulases. *Biochim. Biophys Acta.* 2000; 1543:239 – 252.
3. Coughlan MF. Cellulases: production, properties and applications. *Biochem Soc Trans.* 1985; 13: 405-6.
4. Nierstrsz V, Warmoeskerken M. Process engineering and industrial enzyme applications. In: Cavaco-Paulo A, Gübitz, G. (eds.) *Textile processing with enzymes.* England: Woodhead Publishing Ltd; 2003. p. 120,157.
5. Cabero K. Producción de enzimas celulolíticas a partir de hongos aislados de especies nativas del altiplano. [Tesis de Licenciatura] 2007
6. Mandels M. Applications of cellulases. *Biochem Soc Trans.* 1985; 13(4): 4-5
7. Ghose TK. Measurement of cellulases activities, *Pure & App!. Chem.* 1987; 59(2): 257-268.
8. Lee SB, Taylor JW. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol Biol Evol.* 1992; 9(4): 636-653.
9. Martín FN, Tooley PW. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora nemorosa* and *Phytophthora pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. *Mycol Res.* 2003; 107: 1379-1391.
10. Tooley PW, Bunyard BA, Carras MM, Hatziloukas E. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63 : 1467-1475.
11. Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: Leisinger T, Cook AM, Hunter R, Nuesch J (Eds), *FEMS Symposium 12*, Academic Press, London; 1981: 371-385.
12. Fatima Bisbal, *et al.* ITS-RFLP characterization of black *Aspergillus* isolates responsible for ochratoxin. A contamination in cocoa beans. *Eur Food Res Technol.* 2009; 229:751–755.

13. David S. Hibbet, *et al.* . A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 2007; 111 : 509 – 547
14. Arkady P. Sinitsyn *et al.* . Application of microassays for investigation of cellulase abrasive activity and backstaining, *J Biotechnol.* 2001; 9:233-238.
15. Arja M. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. VTT Publications. 2004; 550.
16. Kochavi D, Videbaek T, Cedroni D. Optimizing processing conditions in enzymatic stonewashing. *American Dyestuff Reporter.* 1990; Sep: 24.28.
17. Tyndall M. Upgrading garment washing techniques. *American Dyestuff Reporter.* 1990; 5 : 22-.30.
18. Needles H, Textile, fibers, dyes, finishes, and processes. New Jersey: Noyes Publications; 1986.
19. Trotman ER, *Dyeing and chemical technology of textile fibres.* London: Edward Arnold; 1993.
20. Aly A, Moustafa A, Hebeish. Bio-technological treatment of cellulosic textiles. *J Clean Prod.* 2004;12(7): 697–705.
21. Nigam P. Color Removal from Textile waste water using bioculture in continuous mode. *Biores Technol.* 2007; 77: 247-255.
22. Banat IM, Nigam P, Marchant R. Microbial decolorization of textile dye containing effluents. *Biores Technol.* 1996; 58: 217-227.
23. Balan D, Monteiro R. Decolorization of textile indigo dye by lignolytic fungi. *J Biotechnol.* 2001; 89: 141 – 145.
24. Minoru Y. *et al.* Mode of action of cellulases on dyed cotton with reactive dye. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69:1:45-50.