

Evaluación del complejo enzimático celulasa en hongos nativos del Perú

Evaluation of the cellulase enzymatic complex in native fungi of Peru

Henry Frans Llacza Ladera¹, Pedro Luis Castellanos Sánchez², Patricia Meza Mendoza³

Recibido: 14/06/2021 - Aprobado: 25/10/2021 – Publicado: 23/12/2021

RESUMEN

En el Perú información sobre el potencial biotecnológico de los hongos nativos para la degradación de la celulosa presenta escasos registros. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad celololítica de hongos aislados en los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín y Huánuco. 289 especies de hongos fueron sometidos a reactivación después de un periodo de conservación de 7 años empleando papel filtro y caldo Czapeck, evaluados de manera semicuantitativa empleando la técnica de difusión radial en agar Czapeck Na-CMC para luego seleccionar cinco cepas que fueron identificadas morfológicamente y también se determinó su capacidad celololítica por el método de Somogyi-Nelson. Se reactivaron 90% (260) de los hongos que pasaron por evaluación semicuantitativa, seleccionando cinco cepas por su mayor área de aclaramiento: 14.9, 12.5, 12.0, 14.4 y 12.7 x 10² mm²; SA 726 (*Paecilomyces sp.*), SA 668 (*Paecilomyces sp.*), SA 651 (*Paecilomyces sp.*), SA 683 (*Fusarium sp.*) y HN 566 (*Aspergillus sp.*) con AE de: 0.048, 0.042, 0.042, 0.080 y 0.048 UI/ml respectivamente. Las cepas nativas evaluadas mantienen una buena viabilidad en el tiempo y conservan la capacidad para degradar celulosa. Estas cepas pueden ser empleadas en procesos biotecnológicos para el tratamiento de efluentes agroindustriales.

Palabras claves: Actividad enzimática; Celulasas; Czapeck; Difusión radial; Somogyi-Nelson.

ABSTRACT

In Peru, information on the biotechnological potential of native fungi for the degradation of cellulose presents few records. This work aimed to evaluate the cellulolytic activity of isolated fungi in the departments of Cajamarca, Lima, Junín and Huánuco. 289 species of fungi were subjected to reactivation after a conservation period of 7 years using filter paper and Czapeck broth, evaluated semi-quantitatively using the radial diffusion technique on Czapeck Na-CMC agar to then select five strains that were morphologically identified and its cellulolytic capacity was also determined by the Somogyi-Nelson method. 90% (260) of the fungi that underwent semi-quantitative evaluation were reactivated, selecting five strains for their greater clearance area: 14.9, 12.5, 12.0, 14.4 and 12.7 x 10² mm²; SA 726 (*Paecilomyces sp.*), SA 668 (*Paecilomyces sp.*), SA 651 (*Paecilomyces sp.*), SA 683 (*Fusarium sp.*) and HN 566 (*Aspergillus sp.*) with EA of: 0.048, 0.042, 0.042, 0.080 and 0.048 IU / ml respectively. The native strains evaluated maintain good viability over time and retain the ability to degrade cellulose. These strains can be used in biotechnological processes for the treatment of agroindustrial effluents.

Keywords: Enzymatic activity; Celulasas; Czapeck; Radial diffusion; Nelson-Somogyi.

1 Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Lima, Perú. Egresado de la Maestría en Ciencias Ambientales.

Autor para correspondencia: flacza@gmail.com - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6994-3347>

2 Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Biología., Lima, Perú. Docente de la Laboratorio de Micología Aplicada.

E-mail: pcastellanos@unmsm.edu.pe – ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2965-174X>

3 Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Lima, Perú. Egresada.

E-mail: mezamendoza.p@gmail.com

I. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza la celulosa es la molécula principal de la lignocelulosa polímero orgánico abundante de la tierra (Singh A. & Hayashi K., 1995) su acumulación en grandes cantidades se convierte en un problema ambiental en zonas urbanas, por la contaminación visual y aparición de plagas, del mismo modo el vertimiento alto contenido de celulosa a los cuerpos de agua por la industria papelera. Organismos como bacterias, actinomicetos, hongos y protozoarios se encargan de degradar la celulosa en la naturaleza, de estos microorganismos, el reino fungí presenta una alta capacidad para propagarse en sustratos lignocelulósicos dependiendo de la humedad del ambiente y una variedad de moléculas que excretan al medio extracelular entre ellas el complejo enzimático celulasa, todos con la finalidad de obtener glucosa, la fuente energética. Las beta-glucosidasas, endoglucanasas y exoglucanasas son las principales enzimas del complejo degradador de la celulosa (Hernández A. et al., 1999).

Este trabajo muestra la capacidad de reactivación y evaluación de la actividad enzimática de cepas nativas aisladas en los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín y Huánuco, después de un periodo de 7 años de conservación.

II. METODOS

2.1. Reactivación de hongos filamentosos

Se reactivaron 289 hongos aislados de muestras de broza de las regiones: 50 - Huarochirí, 82 - Satipo, 59 - Huancayo, 68 - Cajamarca y 30 - Tingo María. Preservadas en viales conteniendo Agar Papa Dextrosa (APD) a temperatura de ambiental, por un periodo de conservación de 7 años (2003 – 2010). Reactivamos las cepas agregando a cada vial 170 microlitros de caldo Czapeck al cual no le agregé glucosa, se esterilizó papel filtro para agregarlo como fuente de carbono y se dejó incubar por 5 días a temperatura ambiente, con un asa de siembra se cogió micelio que creció sobre el papel filtro y se colocó en APD ver figura 1 (Vilches L. 2002).

2.2. Método de difusión radial Czapeck carboximetilcelulosa

Los hongos reactivados fueron evaluados de manera semicuantitativa en agar Czapeck – incorporando N-carboximetilcelulosa a una concentración del 0.1g/l con un tiempo de incubación de cinco días. Para revelar los halos de aclaramiento, se vertió 10ml de rojo de congo a 0.5 g/l sobre el agar Czapeck reposando 15 minutos, luego se agregó repetidamente solución de cloruro de sodio 40g/l hasta observar el aclaramiento ver figura 2 (Hendricks et al., 1995); (Zhang P. et al., 2006).

2.3. Selección por el método semicuantitativo

Para la selección se tomó como variable en área de la corona circular, la cual se obtiene de la diferencia de una circunferencia mayor (radio de las enzimas extracelulares) y otra menor (radio de micelio) mediante la siguiente formula, ver figura 2:

$$A = \pi (R^2 - r^2) \text{ mm}^2$$

(A= corona circular; R= Radio enzimas extracelulares; r = Radio micelio)

Se realizaron tres evaluaciones con método de difusión radial en agar Czapeck carboximetilcelulosa, los resultados se procesaron por el programa Microsoft Excel para obtener los valores máximos, mínimo, media y media aritmética para interpretar y tomar criterios de selección (Kasana R. et al., 2008), en cada evaluación la media aritmética fue el valor mínimo para la selección.

2.4. Identificación morfológica de hongos seleccionados

Los hongos que presentaron mayor valor en el área de hidrólisis de la corona circular por la actividad enzimática en medio Czapeck-CMC fueron identificados empleando claves taxonómicas de acuerdo con la morfología de sus estructuras reproductivas (Barnett H. & Hunter B., 1998).

2.5. Evaluación cuantitativa del complejo enzimático celulasa por el método Somogyi – Nelson

Cada cepa seleccionada fue propagada en frascos de 500 ml conteniendo APD en pico de flauta, sembrada por estría e incubadas a temperatura ambiental por un periodo de ocho días, cumplido el tiempo se incorporó 50ml de tween a 0.1%, homogenizamos suspendiendo los conidios. Se inoculó 1 ml del homogenizado a una concentración 10^6 conidios/ml en 9 ml de caldo Czapeck – papel filtro a un pH 4.5, después de cinco días de incubación a temperatura ambiental a 180 RPM se obtuvo las enzimas celulasas extracelulares.

Se elaboró una curva patrón de 100, 80, 60, 40, 20 μ g/ml de glucosa, para extrapolar la glucosa producida por los hongos seleccionados, el método de Somogyi – Nelson fue empleado para determinar la actividad enzimática de las celulasas, los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI) (Vilches L. 2002).

III. RESULTADOS

3.1. Reactivación de hongos filamentosos

Se recuperó el 90 % (260) del 100% (289) de hongos trabajados: 50 de Huarochirí, 82 de Satipo, 59 de Huancayo, 68 de Cajamarca y 30 Tingo María. Todas presentaron crecimiento filamentosos sobre papel filtro, ver tabla 1 y figura 1.

3.2. Selección por el método semicuantitativo

Primera evaluación: Se evaluaron 260 hongos empleando el método de difusión radial empleando como medio de cultivo agar Czapeck y como fuente de carbono la carboximetilcelulosa. Las áreas de hidrólisis presentaron los siguientes resultados: media aritmética 5.6, media 4.42, máxima 15.6, mínima 0 y $x 10^2 \text{ mm}^2$. Se seleccionó 78 cepas para la segunda evaluación.

Segunda evaluación: Se aplicó el mismo procedimiento del agar Czapeck-CMC para 78 hongos filamentosos seleccionadas, se obtuvo los siguientes resultados: media aritmética de 8.74, media 8.74, máximo 16.8 y mínimo $4.7 x 10^2 \text{ mm}^2$. 29 cepas fueron seleccionadas, ver tabla 3.

Tercera evaluación: 29 cepas seleccionadas de la segunda evaluación presentaron los siguientes resultados: media aritmética de 9.5, media 9.39, máximo 16.1, mínimo 5.8, x 10² mm², seleccionando 12 cepas, ver tabla 2 y 3, figura 2.

3.3. Hongos seleccionados

Seleccionamos cinco hongos que presentaron mayor área de aclaramiento promedio en las tres evaluaciones, 14.9 (SA - 726); 14.4 (SA - 683); 12.7 (HN - 566); 12.5 (SA - 668); 12.0 (SA - 651) todos x 10² mm², ver tabla 4.

3.4. Identificación morfológica de los hongos seleccionados

Se identificaron tres géneros fúngicos en los hongos seleccionados: SA 726, SA 668, SA 651 pertenecientes

al género *Paecilomyces*; SA 683 a *Fusarium* y HN 566 *Aspergillus*.

3.5. Evaluación cuantitativa del complejo enzimático celulasa por el método Somogyi – Nelson

En la prueba cuantitativa a los hongos seleccionados se obtuvo los siguientes valores: 0.080 (SA 683), 0.048 (SA 726), 0.042 (SA 668), 0.042 (SA-651) y 0.048 UI (HN 566), ver tabla 5.

IV. DISCUSIÓN

1. Reactivación de hongos filamentosos

El porcentaje de reactivación total de las muestras que se trabajaron y estuvieron conservadas a temperatura

Tabla 1. Reactivación de hongos filamentosos según las regiones muestreadas

Región	Huarochiri		Satipo		Huancayo		Cajamarca		Tingo María		Total, de regiones	
	Hongos	%	Hongos	%	Hongos	%	Hongos	%	Hongos	%	Hongos	%
Reactivados	43	86	78	95	54	92	58	85	27	90	260	90
No Reactivados	7	14	4	5	5	8	10	15	3	10	29	10
Total	50	100	82	100	59	100	68	100	30	100	289	100



Figura 1. Crecimiento del hongo *Paecilomyces* sp. SA 726 en Czapeck – papel filtro, el hongo se muestra como cobertura de color blanco de textura sacaroidea sobre el papel filtro rectangular.

Tabla 2. Resultados de las áreas de aclaramiento en las tres evaluaciones

	AA Menor (10 ² mm ²)	AA Mayor (10 ² mm ²)	AA Selección (10 ² mm ²)
Tercera evaluación	5.8	16.1	9.5
Segunda evaluación	4.7	16.8	8.7
Primera evaluación	0	15.6	5.6

AA: Área de aclaramiento.

Tabla 3. Selección de hongos filamentosos por lugar de procedencia en las tres evaluaciones por el método semicuantitativo

Evaluación Procedencia	1 ^{ra}		2 ^{da}		3 ^{ra}	
	Hongos	%	Hongos	%	Hongos	%
Huancayo	18	23.1	7	24.1	3	25
Tingo María	4	5.1	3	10.3	1	8.3
Satipo	34	43.6	16	55.2	6	50
Cajamarca	11	14.1	0	0.0	0	0
Huarochiri	11	14.1	3	10.3	2	16.7
Total	78	100	29	100	12	100

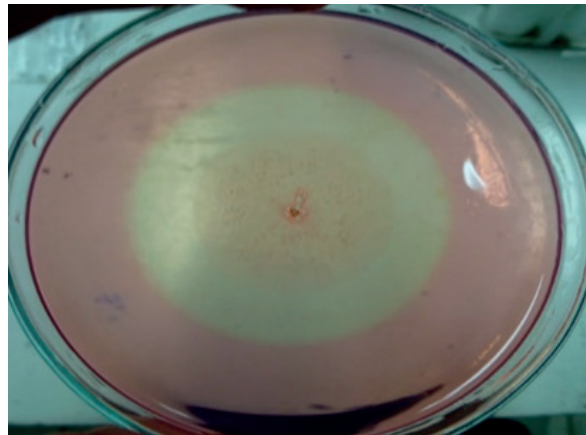


Figura 2. Área de hidrolisis o aclaramiento producida por enzimas extracelulares, se observa corona circular, *Paecilomyces* sp. SA 726.

Tabla 4. Selección de hongos con mayor área de aclaramiento promedio en tres evaluaciones

N	Hongo	Área de aclaramiento en 10 ² mm ²			Promedio
		Primera	Segunda	Tercera	
1	SA-726	15.6	15.1	14.1	14.9
2	SA-683	11.8	16.8	14.7	14.4
3	HN-566	11.4	14.1	12.5	12.7
4	SA-668	10.1	11.3	16.1	12.5
5	SA-651	11.0	13.1	11.8	12.0

Tabla 5. Evaluación cuantitativa del complejo enzimático celulasa de cinco cepas seleccionadas

Nº	Hongo	Inoculo	A	Glc	AE
1	SA – 683	11.4	0.039	14.5	0.080
2	HN – 566	15.7	0.029	8.7	0.048
3	SA – 726	10.4	0.029	8.7	0.048
4	SA – 651	18.1	0.027	7.5	0.042
5	SA – 668	23.8	0.027	7.5	0.042

A: Absorbancia

Inoculo: 10⁶ Conidios/ml

Glc: Glucosa 10-3 mg/ml

AE: Actividad Enzimática en UI

ambiental por un periodo de 7 años en APD fue del 90% (260 cepas), ver tabla 1. Resultados semejantes obtuvo (Vilches L. 2002) quien también encontró porcentajes de reactivación superiores al 77%, en hongos que estuvieron conservados por 12 años en las mismas condiciones ambientales. Comparado con el método de conservación en agua destilada estéril empleado por (Bueno et al., 1998) el método de conservación en APD es ligeramente menor ya que lograron reactivar el 100% de sus hongos, teniendo en cuenta que el periodo de conservación fue de dos años, lo cual podría estar influyendo en los resultados. La incertidumbre de no saber que método se puede emplear cuando se desea conservar hongos es un problema constante en los laboratorios (Ryan M. et al., 2000) desarrollaron un trabajo en donde recomiendan una serie de características que debe cumplir el hongo para poder elegir

un método de conservación adecuado, en este trabajo los hongos presentan esporas asexuales y no son móviles, por lo que según Ryan M. et al.,(2000) se pueden conservar en los métodos de: Liofilización, bajo agua estéril, bajo aceite, refrigeración 5°C, cultivos sub continuos o crio preservación en nitrógeno. A estos métodos podríamos agregar la conservación en APD que también presenta buenos resultados en la reactivación de hongos.

4.2. Selección por el método semicuantitativo

Cinco cepas fueron seleccionadas empleando la técnica de difusión radial en agar Capeck - carboximetilcelulosa con las siguientes áreas de aclaramiento: 14.9 (SA 726), 14.4 (SA 683), 12.7 (HN 566), 12.5 (SA 668) y 12.0 x 10² mm² (SA 651), método empleado por Zhang P. et al., (2006), de esta selección nos podemos dar cuenta que

hay una gran cantidad de hongos que pueden degradar la celulosa, pero una baja cantidad puede producir alta actividad enzimática extracelular tal como lo menciona (Saddler 1982). Bacterias, actinomicetos, levaduras entre otros microorganismos también pueden ser evaluados semicuantitativa-mente por la técnica de difusión radial en agar Czapeck-carboximetilcelulosa (Gaitan D. & Perez L., 2007; Lu W. et al., 2005),

4.3. Hongos seleccionados

Los cinco hongos seleccionados fueron identificados como: *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp y *Paecilomyces* sp, en la búsqueda por encontrar un hongos que presente elevada actividad enzimática lleva a los investigadores a encontrarse con géneros recurrentes como es el caso de *Aspergillus* el cual es comúnmente reportado y encontrarlo en trabajos de optimización de cultivos, Cruz N. et al., (2009) y Urbay P. et al., (2005) lo han reportado en trabajos de evaluación semicuantitativa presentando resultados prometedores en la degradación de la celulosa. Del mismo modo el género *Fusarium* sp ha sido reportado por (Vilches L., 2002) y (Li L et al., 2008) presenta enzimas lignocelulósicas y actividad exoglucanasa respectivamente. (Rautela G. & Cowling E., 1966) trabajaron con el hongo del género *Paecilomyces* sp presentando una buena actividad celulolítica. Se debe indicar que cada hongo segrega enzimas con característica única.

4.4. Evaluación cuantitativa del complejo enzimático celulasa por el método Somogyi – Nelson

La evaluación por el método de método de Somogyi-Nelson reporto los siguientes valores en las cepas seleccionadas: 0.080 (SA 683 - *Fusarium*), 0.048 (SA 726 - *Paecilomyces*), 0.048 (HN 566 - *Aspergillus* sp), 0.042 (SA 668 - *Paecilomyces*) y 0.042 UI/ml (SA 651 - *Paecilomyces*). Vilches Paz, (2002) reporta valores: 0.120 (HU 216 *Chrysosporium* sp), 0.137 (HU 218 D *Fusarium* sp) y 0.112 UI/ml (HU 251 *Fusarium* sp) del mismo Urbay P. et al. (2005) reporta valores de: 1.21 (UC10 - *Penicillium*) y 0.18 UI/mg (UC3 - *Trichoderma*). Se puede observar valores superiores con respecto a este trabajo, lo cual podría estar explicado por las condiciones de ensayo como la temperatura, tiempo de incubación entre otros, así como el prolongado tiempo que estuvieron en conservación. Para el mejoramiento de la actividad enzimática se han realizado diferentes variaciones en los medios de cultivos como la variación de la fuente de nitrógeno y carbono (Abrha B. & Gashe B., 1995), suplementar el medio de cultivo con lactosa, surfactante y vitaminas (Ceroni A. & Gutierrez C., 1988) y variación de la concentración de esporas en el inóculo (Izarra M. et al., 2012), todas las variaciones tienen como objetivo elevar la producción de enzimas o elevar la actividad enzimática.

Este trabajo muestra la alta viabilidad de los hongos nativos del Perú conservados en medio APD, la practicidad de método semicuantitativo, agar Czapeck-carboximetilcelulosa, para evaluar grandes cantidades de hongos. Podemos decir que existen hongos nativos con potencial biotecnológico para el tratamiento de efluentes agroindustriales residuales de la industria del papel con alto contenido de residuos lignocelulósicos.

V. CONCLUSIONES

- Se reactivaron 260 (90%) hongos de un total de 289 (100%) después de un periodo de conservación de 7 años en APD, por lo que podemos decir que los hongos de reproducción asexual aislados en las regiones descritas presentan una alta viabilidad con un método de conservación económico y sencillo de emplear.
- El método de difusión radial en agar Czapeck-carboximetilcelulosa es práctico y sencillo para la evaluación de grandes cantidades de hongos filamentosos que presenten actividad celulolítica y que puede ser empleado para seleccionar hongos con enzimas extracelulares por simple observación.
- Los hongos reactivados presentaron una actividad enzimática máxima 0.080 UI/ml obtenido por el género *Fusarium* sp - SA 683, revelando que la actividad enzimática aún se mantiene después de un periodo prolongado de conservación.

VI. REFERENCIAS

- Abrha B. & Gashe B. (1995). Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(164–166). <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01195839>
- Barnett H. & Hunter B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi-fourth edition*. The American Phytopathological Society. https://www.academia.edu/35499449/illustrated_genera_of_imperfect_fungi-fourth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf.pdf
- Bueno, L., Gallardo, R., Lourdes, D., & Rosell, B. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*, 15, 166–168.
- Ceroni A., & Gutierrez C. (1988). Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. *Boletín de Lima*, 55, 13–20. https://www.academia.edu/598690/Producci%C3%B3n_de_celulasas_por_hongos_estudios_cin%C3%A9ticos_en_hongos_silvestres
- Cruz N., Castellanos D., & Argüello H. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2). https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_horticolas/article/view/1215
- Gaitan D., & Perez L. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*dendranthema grandiflora*)*. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8296>
- Hendricks C., Doyle J., & Hugley B. (1995). *A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil | Applied and Environmental Microbiology*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.61.5.2016-2019.1995?permanently=true&>

- Hernández-Santoyo, A., García-Hernández, E., & Rodríguez-Romero, A. (1999). Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Revista de La Sociedad Química de México*, 43, 137–142.
- Izarra M., Santayana M., Villena G., & Gutierrez M. (2012). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 139–150. <https://core.ac.uk/display/220253150>
- Kasana R., Salwan D., Dhar H., Dutt S., & Gulati A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr Microbiol*, 57(5), 503–507. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18810533/>
- Li L, Li XZ, Tang W., Zhao J., & Qu YB. (2008). Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 415–420. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02447.x>
- Rautela G., & Cowling E. (1966). Simple Cultural Test for Relative Cellulolytic Activity of Fungi. *American Society for Microbiology*, 14(6), 892–898. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1058439/>
- Ryan M., Smith D., & Jeffries P. (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 183–186. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008910006419>
- Saddler J. (1982). Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 4(6), 414–418. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0141022982900734>
- Singh A., & Hayashi K. (1995). Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties, and Biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology*, 40, 1–44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065216408703629?via%3Dihub>
- Urbay P., González L., Navarro C., Manso M., & Díaz F. (2005). Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de Hyphomycetes nativos de la provincia de Villa Clara. *Revista Centro Agrícola*, 32. <http://cagricola.uclv.edu.cu/index.php/es/volumen-32-2005/numero-3-2005/678-aislamiento-caracterizacion-y-determinacion-de-la-actividad-celulolitica-de-hyphomycetes-nativos-de-la-provincia-de-villa-clara>
- Vilches Paz, L. (2002). *Determinación de la actividad de Exoglucanasas de cepas fungicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz*. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1406>
- Zhang P., Himmel M., & Mielenz J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5), 452–481. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975006000413>