

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INTERNOS SIN
FINANCIAMIENTO O AUTOGESTIONADOS**
ANEXO 1 - DATOS INFORMATIVOS

Fecha de presentación (dd/mm/aa): 22/05/2019

Título del proyecto: Estrategias para la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica

TIPOS DE INVESTIGACIÓN

Investigación básica

Investigación aplicada

DEPARTAMENTO(S) Y/O INSTITUTO(S):

1. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología (DECAB)

LÍNEA(S) DE INVESTIGACIÓN (verificable en el SAEW):

1. Tecnología bioquímica
2. Optimización de procesos productivos (332899)
3. Tecnologías emergentes (332899A)

RESUMEN DE INFORMACIÓN DEL DIRECTOR Y COLABORADORES

Director

Apellidos y nombres	No. de Cédula	HSS	Departamento	Título de mayor nivel y mención.
Casa Villegas Mary Fernanda	0502660996	12	DECAB	Doctora en Ciencia Tecnología y Gestión Alimentaria

Colaborador(es)

Apellidos y nombres	No. de Cédula	HSS	Departamento	Título de mayor nivel y mención.
Paéz Lara María Augusta	1716567449	6	DECAB	Máster en diseño e integración de procesos químicos avanzados
Hidrobo Unda Gabriela Cristina	1716512759	6	DECAB	Maestría en Ciencias, especialidad en Manejo de Recursos Naturales
Molina de la Cruz Carla Patricia	1803265733	6	DECAB	Ingeniera Química

Colaboradores Externos

Apellidos y nombres	No. de identificación	HSS	Institución	Título de mayor nivel y mención.

* HSS = Horas Semana Semestre



HOJA DE VIDA DEL DIRECTOR DEL PROYECTO

Datos Personales				
Nombre Completo:	Mary Fernanda Casa Villegas			
No. de Identificación:	0502660996	Nacionalidad:	Ecuatoriana	
Fecha de nacimiento:	21/02/1982	Celular:	0981469572	Ext. EPN: 4316
Correo institucional:	mary.casa@epn.edu.ec			
Cargo Actual en la EPN:	Profesor agregado a tiempo completo (nivel 1, grado 3)			
Facultad:	Ingeniería Química y Agroindustria			
Departamento:	Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología			

Educación universitaria. Proveer el nombre de los títulos de pregrado y postgrado (Ing., Magister, Ph.D.)				
Título	Año	Institución/Universidad	Ciudad/País	Área o línea de investigación de la tesis
PhD. Ciencia Tecnología y Gestión Alimentaria	2018	Universidad Politécnica de Valencia	Valencia / España	Ingeniería molecular de proteínas
Master en Biotecnología Alimentaria	2019	Universidad de Oviedo	Oviedo / España	Código de barras de ADN
Ingeniera Agroindustrial	2005	Escuela Politécnica Nacional	Quito / Ecuador	Desarrollo de productos

Experiencia investigativa y en ejecución de proyectos (cite los tres más relevantes)		
Año	Título del proyecto	Cargo /Actividades realizadas
2017	Producción de nuevos enzimas, conjugados enzimáticos y compuestos bioactivos para aplicaciones alimentarias mediante biología sintética	Colaborador
Septiembre 2014 – Diciembre 2016	Obtención de enzimas de última generación para aplicaciones alimentarias mediante ingeniería de proteínas	Colaborador
2014	PIS 13-17 Evaluación del uso de variedades nacionales de granos como adjuntos en la elaboración de cerveza	Directora

Publicaciones, patentes, prototipos o productos (cite las más relevantes dentro de los últimos cinco años y que se encuentren alineados al proyecto de investigación)	
1.	Casa-Villegas M, Polaina J, Marín Navarro J. 2018. Cellobiose fermentation by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : comparative analysis of intra versus extracellular sugar hydrolysis. <i>Process Biochemistry</i> .
2.	Casa-Villegas M, Marín Navarro J, Polaina, J. 2018. Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides. <i>Amylase</i> . 2.
3.	Casa-Villegas M, Marín Navarro J, Polaina, J. 2017. Synthesis of isomaltooligosaccharides by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells expressing <i>Aspergillus niger</i> alpha-glucosidase. <i>ACS Omega</i> . 2. 8062,8068.
4.	Casa-Villegas M, Marín Navarro J, Polaina J. 2017. Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a <i>Trichoderma reesei</i> enzyme preparation and a recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain. <i>World J Microbiol Biotechnol</i> . 33. 140.
5.	García-Vazquez E., Perez J., Martínez J., Pardiñas A., López B., Karaiskou N., Casa M., Machado-Schiaffino G., Triantafyllidis A. 2011. High level of mislabeling in spanish and greek hake markets suggests the fraudulent introduction of african species. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> . 59. 475,480.
6.	Casa-Villegas M- 2018. Caracterización de glicosidasas y permeasas fúngicas implicadas en el transporte y metabolismo de azúcares. Universidad Politécnica de Valencia. Tesis doctoral.

Experiencia profesional, otros trabajos científicos y técnicos (cite lo más relevante o las más recientes)	
-	Profesor en la Escuela Politécnica Nacional con nombramiento desde 2012 hasta la actualidad. Quito – Ecuador.
-	Profesor en la Escuela Politécnica Nacional con contrato desde 2009 hasta 2011. Quito – Ecuador.
-	Asistente de cátedra en la Escuela Politécnica Nacional desde 2006 hasta 2009. Quito – Ecuador.



HOJA DE VIDA DEL PROFESOR COLABORADOR DEL PROYECTO (1)

Datos Personales				
Nombre completo:	María Augusta Páez Lara			
No. de identificación:	1716567449	Nacionalidad:	Ecuatoriana	
Fecha de nacimiento:	07/01/1987	Celular:	0998551751	Ext. EPN: 4310
Correo institucional:	maria.paez@epn.edu.ec			
Cargo actual en la EPN:	Profesor Ocasional I			
Facultad:	Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria			
Departamento:	Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología			

Educación universitaria. Proveer el nombre de los títulos de pregrado y postgrado (Ing., M.Sc., Ph.D.)				
Título	Año	Institución/Universidad	Ciudad/País	Área o línea de investigación de la tesis
Máster en Ciencias	2015	Universidad de Manchester	Reino Unido	Optimización de procesos biotecnológicos
Ingeniera Química	2011	Escuela Politécnica Nacional	Ecuador	Diseño de procesos biotecnológicos

Experiencia investigativa y en ejecución de proyectos (cite los tres más relevantes)		
Año	Título del proyecto	Cargo /Actividades realizadas
2016	Diseño de una planta para la obtención de concentrado de maracuyá congelado por evaporación osmótica	Colaborador / Revisión y soporte en cálculos de ingeniería básica y de detalle
2015	Multi-objective Optimisation Incorporating Life Cycle Assessment. A Case Study of Biofuels Supply Chain Design	Investigador asociado / Análisis de datos, procesamiento de cálculos de optimización y escritura de publicaciones
2009	Proyecto de Investigación Semilla - Escalado de la producción industrial de levadura de panificación usando dos reactores modelo y un bioreactor prototipo	Investigador asociado / Puesta en marcha de equipos, ejecución de pruebas y validación de resultados

Publicaciones, patentes, prototipos o productos (cite las más relevantes dentro de los últimos cinco años y que se encuentren alineados al proyecto de investigación)	
1.	María Augusta Páez, Fernando D. Mele y Gonzalo Guillén-Gosálbez. (2016) "Multi-objective Optimisation Incorporating Life Cycle Assessment. A Case Study of Biofuels Supply Chain Design", Alternative Energy Sources and Technologies, Springer Cham, on line ISBN 978-3-319-28752-2.
2.	María Augusta Páez. (2013) "Manual para el Estudiante de Diseño de Plantas Industriales", Escuela Politécnica Nacional, ISBN 978-9942-13-194-2
3.	Gastón Guerra, Bolívar Izurieta y María Augusta Páez. (2009) "Escalado de la producción industrial de levadura de panificación usando dos reactores modelo y un bioreactor prototipo", Revista Politécnica, Volumen 30(1).

Experiencia profesional, otros trabajos científicos y técnicos (cite lo más relevante o las más recientes)	
2009 – 2010 Asistente de Catedra de Modelado Matemático, Simulación y Control Automático de Procesos, Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología.	
2012 – 2013 Asistente de la Cátedra de Diseño de Plantas Industriales y Agroalimentarias, Bioingeniería y Biotecnología Agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología.	
2013 – 2014 Asistente de Producción, Edesa S.A., Industria cerámica – Fabricación de sanitarios y lavamanos	



HOJA DE VIDA DEL PROFESOR COLABORADOR DEL PROYECTO (2)

Datos Personales				
Nombre completo:	Gabriela Cristina Hidrobo Unda			
No. de identificación:	1716512759	Nacionalidad:	Ecuatoriana	
Fecha de nacimiento:	29/11/1986	Celular:	0997208509	Ext. EPN: 4314
Correo institucional:	gabriela.hidrobo@epn.edu.ec			
Cargo actual en la EPN:	Profesor Ocasional 1			
Facultad:	Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria			
Departamento:	Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología			

Educación universitaria. Proveer el nombre de los títulos de pregrado y postgrado (Ing., M.Sc., Ph.D.)				
Título	Año	Institución/Universidad	Ciudad/País	Área o línea de investigación de la tesis
Máster en Ciencias	2015	James Cook University	Cairns/Australia	Servicios ambientales: captura de carbono
Ingeniera Agroindustrial	2011	Escuela Politécnica Nacional	Quito/Ecuador	Aprovechamiento de productos forestales no convencionales para aplicación en la industria de alimentos

Experiencia investigativa y en ejecución de proyectos (cite los tres más relevantes)		
Año	Título del proyecto	Cargo /Actividades realizadas
2016	Proyecto de recuperación de del herbario "Flora económica del Ecuador" de la Escuela Politécnica Nacional	Colaboradora / Recopilación de información; preparación de documentación para firma de convenios y obtención de patente de funcionamiento.
2015	Informe sobre el estado de los recursos genéticos en el Ecuador, destinados para la alimentación y la agricultura.	Consultora / Levantamiento de información; reuniones con sectores involucrados; análisis, evaluación y desarrollo del informe final.
2014	Quantifying carbon sequestration using two carbon farming initiative methodologies: a case study from the Atherton Tablelands, Australia	Tesista / Obtención de datos en campo; análisis estadísticos; preparación del documento final.

Publicaciones, patentes, prototipos o productos (cite las más relevantes dentro de los últimos cinco años y que se encuentren alineados al proyecto de investigación)	
1.	PREECE, N., VAN OOSTERZEE, P., HIDROBO, G. & LAWES, M., 2017. National carbon model not sensitive to species, families and site characteristics in a young tropical reforestation project. Forest Ecology and Management. Volume 392 pp. 115-124. http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2017.02.052 .
2.	NIETO, C. e HIDROBO, G., 2011. "La cadena agro-productiva del guarango (<i>Caesalpinia spinosa</i> Kuntze), elementos que resaltan su competitividad". Fundación Desde El Surco. Quito, Ecuador.
3.	HIDROBO, G., 2011. "Desarrollo de un método de extracción, a escala de laboratorio, de gomas provenientes de guarango (<i>Caesalpinia spinosa</i>), para aplicación en la industria alimenticia". Proyecto previo para la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.

Experiencia profesional, otros trabajos científicos y técnicos (cite lo más relevante o las más recientes)	
Experiencia profesional:	
Finca Arte Tierra (2015-2016) Cargo: Técnica de Campo Actividades: Producción de cacao, café y frutas tropicales en el cantón Puerto Quito, provincia de Pichincha.	
FAO – INIAP (2015)	



Cargo: Consultora

Actividades: Informe sobre el estado de los recursos genéticos en el Ecuador, destinados para la alimentación y la agricultura.

HIDROBO S.I. Servicios de Ingeniería (2008-2016)

Cargo: Ingeniera de proyectos

Actividades: Estudios de impacto ambiental en proyectos de agua potable, alcantarillado sanitario y pluvial. Apoyo técnico, logístico y administrativo en estudios y construcción de sistemas de agua potable y alcantarillado.

Crepes & Waffles ASERLACO S.A (2012)

Cargo: Jefe de Aseguramiento de Calidad

Actividades: Control de calidad en la producción, distribución y comercialización de alimentos en planta de producción y puntos de venta. Diseño de programas de manejo de desechos y producción más limpia.

Fundación Desde el Surco (2011)

Cargo: Ingeniera de proyectos

Actividades: Ejecución del proyecto "Producción de especies de propósito múltiple con fines agroindustriales y conservación productiva en el cantón Pedro Moncayo". Apoyo técnico en el proyecto "Determinación del potencial agroindustrial y fomento de la forestación productiva con base en guarango (*Caesalpinia spinosa* K.), para la cuenca media del río Guayllabamba, Fase I".

Escuela Politécnica Nacional - Subdecanato de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria (2009-2010)

Cargo: Ayudante técnico – administrativa

Actividades: Planificación de horarios, aulas y profesores de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Elaboración de presupuestos semestrales para la Facultad.



HOJA DE VIDA DEL PROFESOR COLABORADOR (3) DEL PROYECTO

Datos Personales					
Nombre completo:	MOLINA DE LA CRUZ CARLA PATRICIA				
No. de identificación:	1803265733	Nacionalidad:	Ecuatoriana		
Fecha de nacimiento:	28/01/1987	Celular:	0998716610	Ext. EPN:	4315
Correo institucional:	carla.molina@epn.edu.ec				
Cargo actual en la EPN:	Técnico de Laboratorio del DECAB				
Facultad:	Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria				
Departamento:	Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología				

Educación universitaria. Proveer el nombre de los títulos de pregrado y postgrado (Ing., M.Sc., Ph.D.)				
Título	Año	Institución/Universidad	Ciudad/País	Área o línea de investigación de la tesis
INGENIERÍA	2013	ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL	QUITO/ECUADOR	MICROBIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

Publicaciones, patentes, prototipos o productos (cite las más relevantes dentro de los últimos cinco años y que se encuentren alineados al proyecto de investigación)	
1.	Espín y Molina, "Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Celulolítica y Ligninolítica a partir del crecimiento del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical", Revista Politécnica, Vol. 33, No 1, 2014.

Experiencia profesional, otros trabajos científicos y técnicos (cite lo más relevante o las más recientes)	
Experiencia profesional: Analista Químico de Control de Calidad en FARMACID 2013-2014 Docente de la Escuela Politécnica Nacional 2014-2016 Técnico de Laboratorio del DECAB de la Escuela Politécnica Nacional 2016-al presente	

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INTERNOS SIN ANEXO 2 – DETALLES DE LA PROPUESTA

Investigación Básica <input type="checkbox"/>	Investigación Aplicada <input checked="" type="checkbox"/>
DEPARTAMENTO(S) Y/O INSTITUTO(S):	
1. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología	
LINEA(S) DE INVESTIGACIÓN:	
1. Tecnología bioquímica	
2. Optimización de procesos productivos (332899)	
3. Tecnologías emergentes (332899A)	

DISCIPLINA CIENTÍFICA (Marque X, solamente una opción)	
Ciencias Naturales y Exactas;	
Ingeniería y Tecnologías;	X
Ciencias Médicas;	
Ciencias Agrícolas;	
Ciencias Sociales;	
Humanidades	

OBJETIVO SOCIOECONÓMICO (Marque X, solamente una opción)	
Exploración y explotación del medio terrestre;	
Ambiente;	
Exploración y Explotación del espacio;	
Transporte, telecomunicaciones y otras infraestructuras;	
Energía;	
Producción y tecnología industrial;	X
Salud;	
Agricultura;	
Educación;	
Cultura, ocio, religión y medios de comunicación;	
Sistemas políticos y sociales, estructuras y procesos;	
Defensa;	
Avance general del conocimiento: I+D financiada con los Fondos Generales de Universidades (FGU);	
Avance general del conocimiento: I+D financiados con otras fuentes.	



1 Proyecto de Investigación
Título: Estrategias para la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica.
Resumen del proyecto (máximo 200 palabras) <p>La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza y constituye la principal materia prima de la industria papelera mundial. Sin embargo, la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento y para la degradación de residuos celulósicos es un campo muy activo de investigación. Una alternativa es la generación de cócteles enzimáticos con actividad celulolítica con aplicación en las industrias de biocombustibles, textiles y alimentarias tanto humana como animal. En ese sentido el presente proyecto pretende desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la producción de cócteles con actividad celulolítica a partir de dos tipos de celulosa como sustrato en dos tamaños diferentes, el hongo <i>Trichoderma reesei</i> como agente biológico fermentador y un sistema de fermentación líquida o sólida. El extracto con mejor actividad celulolítica será utilizado para ensayos de degradación de papel reciclado presente en materiales de envases multicapa.</p>
Palabras clave (4-6): Extractos enzimáticos, celulasas, celulosa, <i>Trichoderma reesei</i> .

2 Objetivos, relevancia, productos y resultados esperados de esta propuesta de investigación

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo General

- Desarrollar estrategias tecnológicas para la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica usando celulosa como sustrato

2.1.2 Objetivos Específicos

- a. Obtener extractos enzimáticos con actividad celulolítica usando diferentes tipos de celulosa como sustrato, el hongo *Trichoderma reesei* como agente fermentador y dos tipos de fermentación.
- b. Establecer el mejor proceso *in situ* a escala de laboratorio para la obtención de extractos celulolíticos.
- c. Degradar celulosa usando el mejor extracto celulolítico producido *in situ*.

2.2 Detalle de los resultados esperados

- a. Extractos enzimáticos obtenidos con actividad celulolítica a partir de la fermentación líquida o sólida de diferentes tipos de celulosa utilizando el hongo *Trichoderma reesei*.
- b. Proceso de obtención de extractos celulolíticos *in situ* a escala de laboratorio.
- c. Bioproceso de degradación de la fracción celulolítica presente en ciertos materiales de envases multicapa.

3 Relevancia de la propuesta de investigación y su relación con la(s) líneas de investigación
--

En Ecuador la fabricación de papel y sus derivados generó \$ 404 millones en el año 2016, que representó una participación del 0,58% del PIB. Existen alrededor de 105 empresas entre grandes, medianas y pequeñas dedicadas a esta actividad industrial. Papelera Nacional, Cartopel, Grupo Surpapel e Inacsa son las de mayor capacidad productiva [1]. Los productos principales de la fabricación nacional son el papel tipo kraft sin blanquear, linaje de papel bond de diferentes gramajes y cartón para empaques. Parte de la producción se destina a exportación, aunque del 2013 al 2016 la tendencia ha sido a la baja [1], [2].



La reducción de las exportaciones combinada con la alta importación de productos precursores del proceso de elaboración de papel promueve la balanza deficitaria del sector papelerero en el Ecuador. En agosto del año 2017 se reportaron 229,19 millones de toneladas de papel importadas en forma de papel prensa, papel sulfurado "pergamino vegetal", papel carbón "carbónico", pasta de madera o materias fibrosas celulósicas y papel para reciclar [1]. El incremento de las importaciones responde a la demanda y repercute en mayor cantidad de residuos sólidos generados.

De acuerdo con el Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos (PNGIDS) impulsado por el Ministerio del Ambiente, en Ecuador se generan alrededor de 11 341 toneladas diarias de residuos sólidos, de las cuales 9,4 % corresponden a papel y cartón. En el año 2015, se recolectaron 23 191 toneladas métricas de cartón y 15 169 toneladas métricas de papel blanco [2]. En los centros de acopio, el papel reciclado se somete a una clasificación de papel limpio sin grapas, papel impreso, cajas de cartón y envases multicapa, que contienen cartón, para su posterior comercialización a las industrias papeleras [3]. Estos envases multicapa son de especial interés porque la recuperación del aluminio presente en una de sus capas necesita la remoción de la capa de cartón, que representa el 75% del envase; para retirar la capa de celulosa normalmente se utilizan métodos físico – químicos [4], altamente demandantes de insumos y no siempre amigables con el ambiente.

En este sentido, la degradación biológica de papel para la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica es una estrategia atractiva. El campo de aplicación de estos extractos abarca a las industrias de alimentos, balanceado para animales, textiles y biocombustibles. Particularmente se emplea para mejoramiento de la extracción de color y maceración de uvas para la fabricación de vinos, hidrólisis de material lignocelulósico presente en cereales para facilitar su digestibilidad en los animales, modificación de las fibras celulósicas de manera controlada y en niveles requeridos para mejorar la calidad de los tejidos, y obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósico como residuos agroindustriales [5]–[7].

Para la degradación biológica de papel, uno de los microorganismos más utilizado es el hongo filamentos *Trichoderma reesei* debido a su capacidad de bioconversión de sustratos lignocelulolíticos complejos. De acuerdo con la Asociación de Fabricantes y Formuladores de Productos Enzimáticos (AMFEP), en el año 2014 las celulasas obtenidas de *Trichoderma reesei* representaron el 26,9 % del total de enzimas producidas a escala industrial, por lo que este microorganismo fue catalogado como uno de los más importantes en el mercado [8].

Las estadísticas históricas de comercialización en Ecuador, evidencian que no existe exportación de extractos enzimáticos, mientras que la importación tiene una tendencia al alza; del año 2015 al 2018 se pasó de 9,76 millones a 15 millones de dólares [9]. Este escenario hace que la investigación orientada a la obtención de extractos celulolíticos sea de importancia. En este trabajo se pretende establecer un proceso controlado a escala de laboratorio para la obtención de extractos con actividad celulolítica que utilice la celulosa presente en el papel de filtro o cartón como sustrato y el hongo *Trichoderma reesei* como agente fermentador. Además, los extractos enzimáticos obtenidos se usarán en ensayos preliminares para la degradación de la celulosa presente en envases multicapa.

4 Productos esperados (marcar con una "X" al menos uno de los productos no señalados)

Tipo de Producto:	Marcar con una "X"
a. Disertación a la Comunidad Politécnica (obligatorio);	X
b. Presentación de un artículo en formato de la Revista Politécnica (obligatorio)	X
c. Proyecto de Titulación;	X
d. Aplicación tecnológica construida o implementada;	
e. Patente presentada;	
f. Perfil de proyecto de mayor impacto científico, técnico, pedagógico o de innovación.	



g. Publicaciones científicas indexada en SCIMAGO-SCOPUS/WoS/SCIELO/Latindex Catálogo o un artículo en congreso indexado en SCOPUS.	
--	--

5 Descripción y metodología y diseño del proyecto

5.1 Descripción, metodología y diseño del proyecto (Máximo dos carillas)

5.1.1 Obtención de extractos celulolíticos

Para la obtención del extracto celulolítico se trabajará con una cepa de *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) CECT 2415, equivalente a ATCC 56764 y a NRRL 11236 donada por el Laboratorio de Ingeniería Molecular de Enzimas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España. Se generará un pre inóculo con 2 mL de medio YP (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %) enriquecido con celulosa en forma de papel filtro al 2 %. Los 2 mL de medio se inocularán con 50 μ L de una suspensión de esporas de *T. reesei* de aproximadamente 10^8 conidios/mL y se mantendrán en agitación orbital a 200 rpm a 30 °C durante 72 h. Este precultivo será utilizado para inocular las fermentaciones líquidas o sólidas [10].

Para la fermentación líquida se inocularán 25 mL de medio YP enriquecido con celulosa al 5 %. el cultivo se mantendrá en agitación orbital a 200 rpm a 30 °C durante distintos tiempos (2 – 11 días). Luego, el cultivo será centrifugado y el sobrenadante utilizado como cóctel celulolítico.

Para la fermentación sólida se utilizarán 5 g de celulosa estéril, en un matraz de 250 mL, humedecido con 8 mL de medio YP suplementado con 0.5 % de almidón. Tras el inóculo, los matraces se incubarán sin agitación a 30 °C durante distintos tiempos (6 - 10 días). Para extraer las enzimas del medio sólido fermentado se añadirá medio YP y se mantendrán los matraces en agitación orbital a 200 rpm durante 30 min. El material sólido se eliminará mediante filtrado, a través de un poro de aproximadamente 1 mm, y centrifugación. El sobrenadante obtenido se utilizará como fuente de enzimas celulolíticas.

Tanto para la fermentación líquida como sólida se trabajará con celulosa en forma de papel filtro o en forma de cartón cortado en cuadrados de 25 mm² o de 1 cm².

5.1.2 Determinación de actividad enzimática

La actividad celulolítica se determinará midiendo los azúcares reductores liberados a partir de la hidrólisis de papel de filtro con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Zhang 2009 [11]. La actividad celulolítica se reportará en FPU (filter paper units)/mL que corresponde al equivalente de los μ moles de glucosa generados por minuto de reacción y por mL de extracto enzimático.

El tratamiento fermentativo que genere extractos con mayor actividad celulolítica será escogido para la producción *in situ* de cócteles enzimáticos que serán usados para posteriores ensayos de degradación de celulosa.

5.1.3 Degradación de celulosa

Para la degradación se utilizará celulosa reciclada, que forme parte de ciertos envases multicapa como los Tetra bricks. Los pedazos de envases multicapa serán incubados con el extracto enzimático a 50 °C hasta que el nivel de degradación deje visible a la capa de aluminio del envase.

[1] Corporación Financiera Nacional. (2017). *Ficha sectorial: papel y productos de papel*. Recuperado de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2017/12/Ficha-Sectorial-Productos-de-Papel-dic-2017.pdf> (Marzo, 2019).

[2] Iniciativa Regional para el Reciclaje Inclusivo. (2015). *Reciclaje inclusivo y recicladores de base en el Ecuador*. Recuperado de <https://reciclajeinclusivo.org/wp-content/uploads/2016/04/Reciclaje-Inclusivo-y-Recicladores-de-base-en-EC.pdf> (Marzo, 2019).

[3] Secretaría de Ambiente del Distrito Metropolitano de Quito. (2018). *Manual Quito a reciclar*. Recuperado de http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/images/Secretaria_Ambiente/Quitoa%20Reciclar/Manual%20Quito%20a%20Reciclar_1.pdf (Marzo, 2019).



- [4] Zawadiak, J., Wojciechowski, S., Piotrowski, T., Krypa, A. (2017). Tetra Pak recycling – current trends and new developments. *American Journal of Chemical Engineering*, (5), 37-42. doi: 10.11648/j.ajche.20170503.12
- [5] Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, (18), 355–383. doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0
- [6] Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, (37), 19–27. doi:10.1016/j.renene.2011.06.045
- [7] Kuhad, R. C., Gupta, R., Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Resources*, 1–10. doi:10.4061/2011/280696
- [8] Bischof, R. H., Ramoni, J., Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*, *Microbial Cell Factories*, (15), 106. doi: 10.1186/s12934-016-0507-6
- [9] Trade Nosis. (2016). *Evolución de las importaciones del Ecuador de enzimas y preparaciones enzimáticas no expresadas ni comprendidas en otra parte*. Recuperado de <https://trade.nosis.com/es/Comex/Importacion-Exportacion/Ecuador/enzimas--enzimas-preparaciones-enzimaticas-no-expresadas-ni-comprensidas-en-otra-parte/EC/3507> (Marzo, 2019).
- [10] Casa-Villegas, M., Marín-Navarro, J., Polaina, J. (2017). Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a *Trichoderma reesei* enzyme preparation and a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (33), 140. doi: 10.1007/s11274-017-2308-4
- [11] Zhang, Y. H. P., Hong, J., Ye, X. (2009). Cellulase assays. *Biofuels Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, (581), 213–231. Recuperado de https://pdfs.semanticscholar.org/dc25/ad4d2f1c4c3436974d0721c3de65d9784058.pdf?_ga=2.202520599.703578157.1552061816-120122113.1552061816 (Marzo, 2019).

6 Infraestructura, equipos y fondos adicionales.

6.1 Infraestructura y equipos

Infraestructura	Equipos	
	Nombre del Equipo	Ubicación del Equipo
Laboratorio de Bioprocesos	Incubadora con control de temperatura y agitación	Laboratorio de Bioprocesos, DECAB
	Microcentrífuga	
	Espectrofotómetro	
	Estufa	
	Autoclave	

6.2 Breve justificación del equipo requerido

No se requieren equipos adicionales.

6.3 Fondos Adicionales

No se cuenta con fondos adicionales.



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
Proyecto de Investigación Interno Sin Financiamiento o Autogestionado
ANEXO 3 - CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES DEL PROYECTO



Título del Proyecto:

Estrategias para la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica

		AÑO 1																																															
Nº	Actividad	Mes 1				Mes 2				Mes 3				Mes 4				Mes 5				Mes 6				Mes 7				Mes 8				Mes 9				Mes 10				Mes 11				Mes 12			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Objetivo específico 1: Obtener extractos enzimáticos con actividad celulolítica a partir de diferentes tipos de celulosa como sustrato, el hongo <i>Trichoderma reesei</i> como agente fermentador y dos tipos de fermentación																																																
1.1	Actividad 1: Replicar y mantener al hongo <i>T. reesei</i>																																																
1.2	Actividad 2: Ensayos de fermentación líquida con dos tipos de celulosa y dos tamaños diferentes para la generación de extractos																																																
1.3	Actividad 3: Ensayos de fermentación sólida con dos tipos de celulosa y dos tamaños diferentes para la generación de extractos																																																
1.4	Actividad 3: Análisis de datos y escritura de informe																																																
2	Objetivo específico 2: Establecer el mejor proceso in situ a escala de laboratorio para la obtención de extractos celulolíticos																																																
2.1	Actividad 1: Consolidación de datos y selección del mejor proceso en función de la actividad enzimática																																																
3	Objetivo específico 3: Degradar celulosa usando el mejor extracto celulolítico producido in situ																																																
3.1	Actividad 1: Replicar y mantener al hongo <i>T. reesei</i>																																																
3.2	Actividad 2: Generación del cóctel ceulolítico con las mejores condiciones antes establecidas																																																
3.3	Actividad 3: Ensayos de degradación de celulosa presente en envases multicapa con el us de cócteles enzimáticos																																																
3.4	Actividad 4: Análisis final de datos y escritura de informes finales																																																