



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INTERNOS SIN FINANCIAMIENTO O AUTOGESTIONADOS

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	

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: Biopulpeo de envases multicapa Tetra Pak® reciclados	
Resumen del proyecto (máximo 200 palabras) <p>Los envases multicapa Tetra Pak® utilizados para contener alimentos líquidos, una vez que han cumplido su función, pueden ser procesados para la separación y reutilización de sus componentes: polietileno, aluminio y cartón. Normalmente el primer paso en el proceso es la remoción de la capa de cartón (pulpeo) con métodos tradicionales demandantes de agua, energía o sustancias químicas. En este proyecto se plantea el desarrollo de dos alternativas biotecnológicas a escala laboratorio para el biopulpeo de estos envases. La primera implica la acción directa, en un sistema de fermentación líquida, del hongo celulolítico <i>Trichoderma reesei</i> sobre la celulosa contenida en los envases multicapa Tetra Pak®. La segunda opción contempla la utilización de los extractos enzimáticos producidos por <i>T. reesei</i> en acción conjunta con células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para degradar y remover la celulosa de estos envases. Los resultados de las dos opciones serán comparados y analizados para seleccionar la mejor alternativa de biopulpeo.</p>	
Palabras clave (4-6): Tetra Pak, celulosa, <i>Trichoderma reesei</i> , envases multicapa, biopulpeo	

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

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo General

- Establecer las mejores condiciones de biopulpeo a escala laboratorio de envases multicapa Tetra Pak® reciclados.

2.1.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar condiciones de biopulpeo de la celulosa de envases multicapa Tetra Pak® reciclados mediante la acción directa del hongo *Trichoderma reesei*.
- b. Determinar condiciones de biopulpeo de la celulosa de envases multicapa Tetra Pak® reciclados mediante la acción conjunta de los extractos enzimáticos de *T. reesei* y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- c. Seleccionar las mejores condiciones de biopulpeo para envases multicapa Tetra Pak® reciclados.

2.2 Detalle de los resultados esperados (con relación a los objetivos)

- a. Condiciones de biopulpeo a escala laboratorio para la remoción de la capa de celulosa presente en envases multicapa reciclados por acción directa del hongo *Trichoderma reesei*.
- b. Condiciones de biopulpeo a escala laboratorio de la celulosa de envases multicapa reciclados Tetra Pak® mediante la acción conjunta de los extractos enzimáticos de *T. reesei* y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- c. Mejores condiciones de biopulpeo para envases multicapa Tetra Pak® reciclados establecidas.



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

A partir del año 2010, la empresa Tetrapak ha promovido la iniciativa Recupera y Recicla en Ecuador en asociación con la Secretaría del Ambiente y la adición de las empresas privadas. A través de este programa se pretende crear valor agregado para los envases multicapa y evitar que lleguen a los rellenos sanitarios luego de ser utilizados. En este sentido, se han recuperado 2500 toneladas en 2018 y se pretende alcanzar una tasa de reciclaje del 40% para el 2020 [1].

La particularidad de los envases multicapa Tetra Pak® para almacenar alimentos líquidos es que todos sus componentes, polietileno, aluminio y celulosa pueden ser recuperados [1], [2]. El primer paso en el proceso de recuperación normalmente implica el pulpeo o remoción de la capa de celulosa que representa alrededor del 75 % (p/p) del envase y que al estar constituida por extensas fibras se puede reciclar varias veces [1], [3]. Los métodos tradicionales de remoción son por lo general altamente demandantes de agua, energía o de sustancias químicas [3] - [6].

Una alternativa al pulpeo convencional es el empleo de métodos biotecnológicos. Estos métodos, en procesos industriales, a pesar de que suelen demandar más tiempo de proceso, son una alternativa que podrían aumentar la calidad del producto, reducir costos de producción, optimizar el consumo de recursos y mitigar el impacto ambiental [7].

Las estrategias biotecnológicas utilizan agentes biológicos como microorganismos o enzimas por su capacidad para realizar transformaciones químicas muy específicas en condiciones de reacción moderadas, lo que implica una menor generación de residuos y subproductos, así como un menor consumo de energía [8], [9]. En Ecuador, son escasas las propuestas biotecnológicas y la generación de este tipo de productos. A modo de ejemplo se puede citar que, para cubrir la demanda nacional de enzimas, el país recurre a la importación. En el 2018, Ecuador destinó aproximadamente 14 millones de USD para la adquisición de este rubro [10].

En este contexto, el presente proyecto propone alternativas biotecnológicas a escala laboratorio para la remoción de celulosa de los envases multicapa Tetra Pak® reciclados. De esta manera, se aportaría con nuevas alternativas tecnológicas para la gestión integral de este tipo de envases.

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;	
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)

Cepas microbianas, medios de cultivo y materia prima

Los microorganismos a utilizar son el hongo *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) CECT 2415, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, ambos donados por el Laboratorio de Ingeniería Molecular de Enzimas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España.

Los medios de cultivo a utilizar son: YP (extracto de levadura 1,0 %; peptona 2,0 %), YPS (YP; almidón 0,5 %), YP2F (YP; papel filtro 2%)

Los envases multicapa reciclados Tetra Pak® se los recuperará de la basura doméstica, serán lavados y cortados en cuadrados de 1 cm de lado.

Determinación de las condiciones de biopulpeo de la celulosa presente en la capa de cartón de los envases multicapa Tetra Pak® reciclados mediante la acción directa del hongo *Trichoderma reesei*

Para determinar las condiciones de biopulpeo mediante la acción directa de *T. reesei* se utilizará un sistema de fermentación líquida (FL) y 3 concentraciones de celulosa contenida en los envases Tetra Pak® reciclados. Para ello, en 25 mL de medio YPS se adicionará 2,5 %, 5 % o 7,5 % de celulosa, contenida en los envases Tetra Pak®, y se inoculará con 2 mL de preinóculo para arrancar el proceso fermentativo a 30 °C y 200 rpm.

Para la preparación del preinóculo, 2 mL de medio YP2F estéril se inocularán con 10 µL de una suspensión de esporas de *T. reesei* de alrededor de 10⁸ esporas/mL y se colocarán en una incubadora con agitación orbital a 30 °C y 200 rpm por 72 h [11].

Durante la fermentación, a diferentes intervalos de tiempo, se medirá la actividad celolítica en el sobrenadante del cultivo mediante un método que se basa en determinar los azúcares reductores liberados a partir de una cantidad conocida de papel filtro por acción de las celulasas luego de un tiempo de reacción. La actividad celolítica se reportará en FPU (filter paper units)/mL, que equivale a los µmoles de glucosa generados por minuto de reacción por mL de extracto enzimático [12].

En los mismos intervalos de tiempo se cuantificará por diferencia de peso el porcentaje de celulosa removida de los envases y liberada al medio de cultivo, así como los azúcares reductores presentes en el sobrenadante. El proceso fermentativo se detendrá cuando el porcentaje de celulosa removida se estabilice en el tiempo.

La cuantificación de los azúcares reductores se realizará por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). El ensayo consistirá en colocar reactivo DNS a las muestras, las mismas que se llevarán a ebullición por 15 min en un baño maría, las muestras se centrifugarán a 13 000 g por 5 min, se realizará una dilución del sobrenadante de cada muestra y se medirá la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. Los azúcares reductores generados se calcularán por interpolación en una recta patrón de glucosa [12] - [14].

Las condiciones de biopulpeo, entendidas como la concentración de celulosa inicial y el tiempo de fermentación con las que se consiga la mayor remoción de celulosa del envase Tetra Pak® serán seleccionadas.



Determinación de las condiciones de biopulpeo de la celulosa presente en la capa de cartón de los envases multicapa Tetra Pak® reciclados mediante la acción conjunta de los extractos enzimáticos de *T. reesei* y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

Para determinar estas condiciones de biopulpeo se obtendrán extractos enzimáticos de *T. reesei* con actividad celulolítica y se incubarán con 3 concentraciones de celulosa contenida en los envases Tetra Pak® reciclados en ausencia y presencia de células de *S. cerevisiae*. La levadura consumirá la glucosa liberada al medio producto de la hidrólisis de la celulosa, disminuyendo así la inhibición de las celulasas [11].

Para ello, al extracto enzimático celulolítico de *T. reesei* con y sin inóculo de levadura se añadirá 2,5%, 5 % o 7,5% de celulosa, contenida en los envases multicapa Tetra Pak®, y se incubará a 30 °C y 200 rpm por un tiempo de 48 horas. Para los ensayos con inóculo de levadura se partirá con una densidad óptica de 0.2.

Durante el proceso a diferentes intervalos de tiempo se medirá la actividad celulolítica en los sobrenadantes, el porcentaje de celulosa removida y liberada al medio por diferencia de peso, y los azúcares reductores liberados (según los métodos descritos en el apartado anterior).

Los extractos enzimáticos celulolíticos a utilizar se obtendrán por fermentación sólida (FS) del hongo *T. reesei* utilizando papel filtro como fuente de carbono. Para ello, 5 g de papel de filtro estéril, cortado en cuadrados de 25 mm², se colocarán en un matraz de 250 mL, se humectarán con 8 mL de medio YPS y se inocularán con una suspensión de esporas previamente activadas. Tras el inóculo, los matraces se incubarán sin agitación a 30 °C durante 9 días [11]. Al final del proceso fermentativo, los extractos enzimáticos se obtendrán por adición de 10 mL de medio YP, agitación y filtración.

Las condiciones de biopulpeo, entendidas como la concentración de celulosa inicial colocada en el extracto enzimático y la presencia o no de *S. cerevisiae*, que permitan la mayor remoción de celulosa del envase Tetra Pak® serán seleccionadas.

Selección de las mejores condiciones de biopulpeo para envases multicapa reciclados Tetra Pak®

Las condiciones de biopulpeo seleccionadas con los dos apartados anteriores serán evaluadas y analizadas en conjunto para realizar una selección final. En la determinación de las mejores condiciones de biopulpeo será muy importante el porcentaje de celulosa removida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Tetra Pak. (2020). *Tetra Pak fue reconocida por su proyecto de reciclaje en Ecuador*. <https://www.tetrapak.com/sustainability>
- [2] Karoboyaci, M., Gizem, G., Kilic, M., y Sencan, A. (2017). Process Design for the Recycling Of Tetra Pak Components. *EJENS, European Journal of Engineering and Natural Sciences*, 2(1), 126–129.
- [3] Martínez-López, M., Martínez-Barrera, G., Barrera-Díaz, C. E. y Ureña-Nuñez, F. (2015). Materiales provenientes del reciclamiento de envases de Tetra Pak y su uso en concreto. *Omnia Science*, 123–143. <https://doi.org/10.3926/oms.247>
- [4] Lokahita, B., Aziz, M., Yoshikawa, K. y Takahashi, F. (2017). Energy and resource recovery from Tetra Pak waste using hydrothermal treatment. *Applied Energy*, 207, 107–113.



<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.05.141>

- [5] Turrado, J., Dávalos, M., Fuentes, F. y Saucedo, A. (2012). Envases de cartón para líquidos como fuente de fibra secundaria. *Informacion Tecnologica*, 23(3), 59–66. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000300008>
- [6] Zawadiak, J., Wojciechowski, S., Piotrowski, T. y Krypa, A. (2017). Tetra Pak Recycling – Current Trends and New Developments. *American Journal of Chemical Engineering*, 5(3), 37–42. <https://doi.org/10.11648/j.ajche.20170503.12>
- [7] Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia. (2003). *Aplicaciones de la biotecnología en la industria*. www.cprac.org.
- [8] Casas, L., y Sandoval, G. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *Revista Digital Universitaria*, 15(12), 1–15.
- [9] Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., y Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), 8–11. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- [10] Trade Nosis. (2019). *Comercio exterior Ecuador-enzimas*. <http://trade.nosis.com>
- [11] Casa-Villegas, M., Marín-Navarro, J., y Polaina, J. (2017). Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a *Trichoderma reesei* enzyme preparation and a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 33(7), 140. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2308-4>
- [12] Zhang, Y., Hong, J., y Ye, X. (2009). Cellulase assay. *Biofuels: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 581, 213–231. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8>
- [13] Ávila, N. R., Rivas, P. B., Hernández, M. R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90424216002>
- [14] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

6	Infraestructura, equipos y fondos adicionales.
----------	---

6.1 Infraestructura y equipos

Infraestructura	Equipos	
Laboratorio de	Nombre del Equipo	Ubicación del Equipo
Bioprocesos	Agitador orbital con control de temperatura	Laboratorio de Bioprocesos, DECAB
	Estufas	
	Espectrofotómetro	
	Autoclave	
	Balanza analítica	
	Microcentrífuga	

6.2 Breve justificación del equipo requerido

- Justificar la infraestructura y equipos **solicitados** para la ejecución del proyecto e indicar el departamento en el cual se ubicará dicho equipamiento.

6.3 Fondos Adicionales

- Otros fondos de otros organismos (si los hubiere)



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y VINCULACIÓN





PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INTERNOS SIN FINANCIAMIENTO O AUTOGESTIONADOS

ANEXO 4 - DECLARACIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigación básica

Investigación aplicada

TÍTULO DEL PROYECTO

Biopulpeo de envases multicapa Tetra Pak® reciclados

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DEL PROYECTO

El equipo de investigadores, representado por el Director del Proyecto declara lo siguiente:

- Que el presente proyecto es una creación original de mi autoría y del equipo de investigadores, y por tanto asumimos la completa responsabilidad legal en caso de que un tercero alegue la titularidad de los derechos intelectuales del proyecto, exonerando a la EPN de cualquier acción legal que se derive por esta causa.
- Que el presente proyecto no ha sido presentado en ninguna convocatoria de otra institución pública o privada. El incumplimiento será causal para que el proyecto no sea tomado en consideración.
- Que todos los bienes adquiridos en proyecto permanecerán bajo la custodia y responsabilidad del director de proyecto durante la ejecución del mismo.
- Que si el proyecto genera algún producto o procedimiento susceptible de obtener derechos de propiedad intelectual, de los cuales se deriven beneficios, aceptamos que éstos serán compartidos entre los investigadores y la institución o las instituciones participantes en el proyecto, conforme a lo establecido en el COESC.
- Que el equipo de investigadores y/o instituciones participantes se comprometen a mantener la confidencialidad de la información si ésta podría ser susceptible de protección por patentes, y solicitar la valoración de propiedad intelectual respectiva previa a cualquier publicación o difusión.
- Que para el caso de derechos de autor otorgamos una licencia de uso exclusivo con fines académicos para la o las instituciones participantes en el proyecto.

Firma del Director del Proyecto
Nombre: Mary Casa Villegas
C.I.: 0502660996



DECLARACIÓN DEL JEFE DE DEPARTAMENTO

Esta propuesta ha sido aprobada y avalada por el Consejo del Departamento de, en sesión del día mediante resolución No.

Las instalaciones, incluyendo personal, edificios, equipo y recursos financieros están a disposición del proponente y sus colaboradores de acuerdo con las especificaciones que se encuentran en esta propuesta.

Firma del Jefe del Departamento
Nombre: Edwin Vera
C.I.: