

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**POTENCIAL DEGRADADOR DE UN ASCOMICETO ANTÁRTICO EN RESIDUOS
SÓLIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR:

STEVEN ALEXANDER PADILLA DURAN

DIRECTOR:

Ing. Santiago Zárate. MSc

**Ibarra – Ecuador
2021**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
ESCUELA DE INGENIERIA EN
BIOTECNOLOGÍA

“POTENCIAL DEGRADADOR DE UN ASCOMICETO ANTÁRTICO EN RESIDUOS SÓLIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN”

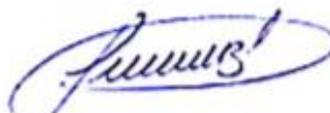
Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación
como requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADO:

Ing. Santiago Zárate, MSc

DIRECTOR



FIRMA

Msc. Tania Oña

ASESORA



FIRMA

Ing. Sania Ortega, MSc

ASESORA



FIRMA



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004491641		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Padilla Durán Steven Alexander		
DIRECCIÓN:	Cananvalle		
EMAIL:	sapadillad@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062542351	TELÉFONO MÓVIL:	0960187997

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	POTENCIAL DEGRADADOR DE UN ASCOMICETO ANTÁRTICO EN RESIDUOS SÓLIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN
AUTOR (ES):	Steven Padilla
FECHA: DD/MM/AAAA	19/09/1996
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Santiago Zárate, MSc

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 16 días del mes de agosto del 2021

EL AUTOR



Nombre: Padilla Durán Steven Alexander
CI: 100449164-1

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Universidad Técnica del Norte por posibilitar mi formación académica en la gloriosa carrera de Ingeniería en Biotecnología, a mis docentes quienes desde primer nivel me brindaron el conocimiento necesario para cumplir mi meta de ser ingeniero.

A mi director de investigación, magister Santiago Zárate por su apoyo, comprensión e instrucción impartida, con gran anhelo y motivación seguiré sus pasos aportando a la sociedad mediante la enseñanza. A mis asesores magister Sania Ortega y magister Tania Oña por su tiempo y consejos, que me ayudaron a culminar este arduo trabajo de investigación.

A mis queridos familiares quienes desde pequeño me guiaron y educaron. A mi hermano Ariel y hermana Oda, por apoyarme y entenderme siempre. A mi padre Sgto. Rubén Padilla por su dedicación, guía y motivación para a cumplir todas mis metas. A mis tíos y abuelos por su apoyo incondicional y creer en mis capacidades. A Vane Negrete por darme su mano, amarme y estar a mi lado en el camino de la vida. A mis amigos, mis colegas de carrera Ronny, Dani, Gigi, Tefy, Mary, Mara, Sharon y Javi muchas gracias por su valiosa amistad, no lo hubiera logrado sin su apoyo.

A mi madre, Lcda. Sintia Durán, mi sustento, mi razón de seguir adelante cada día y por quien culminé esta carrera. A mi hijo Neithan, por quien continuare mi educación, aunque me encuentre trabajando y ocupado, no hay nada que no haría por él, este triunfo te lo dedico a ti hijo mío.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I	13
INTRODUCCIÓN	13
1.1. Antecedentes	13
1.2. Definición de problema	14
1.3. Justificación	15
1.4. Pregunta directriz	16
1.5. Objetivos	16
1.5.1 Objetivo general	16
1.5.2 Objetivos específicos.....	16
1.6. Hipótesis	16
1.7. Marco legal	16
CAPÍTULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
2. Revisión de literatura	18
2.1. Desechos sólidos contaminantes	18
2.1.1. Polímeros sintéticos.....	18
2.1.2. Polietileno.....	19
2.2. Técnicas de degradación en residuos sólidos	20
2.2.1. Microorganismos degradadores de polímeros	20
2.3. Antártida	21
2.3.1. Microorganismos antárticos	22
2.4. Caracterización de microorganismos eucariontes	23
2.4.1. Identificación microbiana mediante características morfológicas.....	23
2.4.2. Identificación microbiana mediante pruebas bioquímicas	24

2.4.3.	Identificación fúngica mediante métodos moleculares	28
2.5.	Proceso de fermentación sumergida.....	30
2.5.1.	Ventajas de la fermentación sumergida.....	30
2.5.2.	Condiciones de la fermentación sumergida.....	30
2.5.3.	Limitantes en la fermentación sumergida.....	31
2.6.	Métodos para analizar el polímero residual.....	31
2.6.1.	Envejecimiento térmico.....	31
2.6.2.	Respirometría.....	32
CAPÍTULO III.....		34
MATERIALES Y MÉTODOS		34
3.1	Representación del sitio de estudio.....	34
3.1.1	Obtención de muestra biológica	34
3.1.2.	Aislamiento y conservación del ascomiceto antártico.....	35
3.2.	Identificación de microorganismos eucariontes.....	36
3.2.1.	Identificación microbianas mediante características morfológicas	36
3.2.2.	Identificación microbiana mediante pruebas bioquímicas	37
3.2.3.1.	Ensayo enzimático extracelular ureasas.....	37
3.2.2.2.	Ensayo enzimático extracelular lipasas	37
3.2.2.3.	Ensayo enzimático extracelular estereasas	38
3.2.2.4.	Ensayo enzimático extracelular celulasas.....	38
3.2.2.5.	Ensayo enzimático extracelular pectinasas.....	38
3.2.2.6.	Ensayo enzimático extracelular amilasas.....	38
3.2.3.	Identificación microbiana mediante prueba molecular	39
3.3.	Preparación de residuo sólido.....	39
3.3.1.	Tratamiento de envejecimiento térmico estandarizado	39
3.3.2.	Medio y condiciones para la fermentación sumergida.....	40
3.3.3.	Estandarización de medios para fermentación sumergida.....	40
3.3.4.	Producción del inóculo para la fermentación	40
3.3.5.	Dimensiones y parámetros de operación en la fermentación	41
3.3.6.	Medición de la producción de CO ₂	43
3.4.	Análisis del escenario para el aprovechamiento del microorganismo	44
3.4.1.	Análisis estadístico	45

CAPÍTULO IV	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1. Caracterización de ascomiceto antártico	46
4.1.1. Identificación morfológica del hongo antártico.....	46
4.1.2. Identificación molecular del hongo antártico	48
4.1.3. Identificación bioquímica de hongo antártico	49
4.2. Análisis de parámetros involucrados en la degradación de residuo sintético	53
4.2.1. Evaluación del crecimiento fúngico en medios estandarizados	53
4.2.2. Tratamiento de envejecimiento térmico estandarizado	54
4.2.3. Análisis de factores físicos durante la fermentación	54
4.2.4. Cuantificación de CO ₂ mediante titulación.....	56
4.3. Análisis del escenario para el aprovechamiento del microorganismo	58
4.3.1. Comercio de lipasas.....	59
4.3.2. Perspectiva del emprendedor.....	59
4.3.3. Inoculación previa a la producción de lipasas	60
4.3.4. Microorganismos productores de lipasas	60
4.3.5. Residuos agroindustriales en Imbabura.....	61
4.3.6. Fermentación	62
4.3.7. Implicaciones legales y ambientales sobre productos biotecnológicos en el Ecuador65	
4.3.8. Manejo del impacto ambiental en el Ecuador	65
4.3.9. Control de desechos y riesgos en el ambiente de trabajo	67
4.3.10. Gestión de productos en el sistema ecuatoriano de calidad.....	68
CAPÍTULO V	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5.1 Conclusiones	70
5.2 Recomendaciones	71
REFERENCIAS	73
ANEXOS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Metodología general para observar actividad enzimática extracelular	28
Figura 2 Variables en degradación de residuos mediante fermentación.....	33
Figura 3 Ubicación general de la investigación en la Antártida	35
Figura 4 Diseño de biorreactor e instrumentos utilizados para la fermentación sumergida.....	42
Figura 5 Caracterización morfológica del microorganismo antártico	46
Figura 6 Resultados correspondientes al microorganismo antártico, en medios de cultivo selectivos.....	50
Figura 7 Cinética de crecimiento del microorganismo con diferentes porcentajes de carbono....	53
Figura 8 Variación de pH del medio durante la fermentación.....	55
Figura 9 Análisis de CO ₂ entre el control y la degradación con <i>Penicillium</i> sp.	56
Figura 10 Bioprocesos para la obtención de enzimas.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estructura química del polietileno	19
Tabla 2 Microorganismos con potencial degradador en distintos polímeros	20
Tabla 3 Secuencias de los cebadores ITS universales	29
Tabla 4 Resumen de la caracterización molecular analizada por IDGEN.....	48
Tabla 5 Aplicaciones industriales de lipasas	59
Tabla 6 Microorganismos involucrados en la producción de lipasas	61
Tabla 7 Variables operativas presentes en la producción de lipasas a escala laboratorio	62
Tabla 8 Resumen de los lineamientos emitidos por organizaciones ecuatorianas.....	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Diagrama de procesos en la producción enzimática	100
Anexo 2 Observación del gel de electroforesis donde se identifica los amplicones obtenidos de la PCR con marcadores moleculares ITS	101
Anexo 3 Prueba estadística de chi cuadrado empleado en las pruebas bioquímicas	101
Anexo 4 Pruebas de actividad enzimática extracelular.....	102
Anexo 5 Prueba estadística de esfericidad aplicada en los datos de medios de cultivo con ausencia de carbono	102
Anexo 6 Prueba de efectos dentro de sujetos aplicado a los datos de crecimiento	103
Anexo 7 Evaluación de factores internos de un reactor industrial.....	104
Anexo 8 Análisis de la varianza para la medición de CO ₂	105

RESUMEN

El incremento de residuos sólidos contaminantes como el plástico afecta muchos ecosistemas y también afecta a la salud humana porque se acumula en botaderos, rellenos sanitarios y en el ambiente (Muthukumar y Veerappapillai, 2015). Anualmente en el Ecuador se registran alrededor de 200.000 toneladas de residuos plásticos. Por esta razón se efectúan métodos (reciclaje, incineración, etc.) para reducir el agente contaminante sin embargo son costosos. El problema fomenta el estudio de mecanismos menos contaminantes y económicos para degradar este tipo de materiales. Por ello en esta investigación se analizó el potencial de un microorganismo antártico para degradar este residuo. En primer lugar, se produjo un cultivo fúngico donde se evaluó sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares con el fin de identificar las propiedades que este posee. Se elaboraron 3 reactores por triplicado controlando los parámetros físicos. Al mismo tiempo, las muestras de polímero sintético fueron extraídas de bolsas plásticas y se les aplicó un protocolo de asepsia. Para facilitar la biodegradación se realizó el pretratamiento de envejecimiento térmico estandarizado. Así como también, la adaptación del *Penicillium* sp., al medio de cultivo dentro del reactor. Se calcularon en el reactor diferentes medidas como temperatura, caudal, y masa de CO₂. Finalmente, se estipuló que la biodegradación obtuvo un P valor mayor a 0,05, por lo tanto los resultados no fueron estadísticamente significativos. No obstante el análisis bioquímico comprobó que el *Penicillium* sp., tiene una tendencia a producir lipasas motivo por el cual se construyó un apartado teórico para el aprovechamiento de este microorganismo integrando bioprocesos, características financieras, mercado e implicaciones legales.

Palabras clave: Residuos, CO₂, bioquímicas, biodegradación, *Penicillium* sp., lipasas.

ABSTRACT

The increase in polluting solid waste such as plastic affects many ecosystems and also affects human health because it accumulates in dumps, landfills and in the environment (Muthukumar y Veerappapillai, 2015). About 200,000 tons of plastic waste are recorded annually in Ecuador. For this reason methods (recycling, incineration, etc.) are carried out to reduce the pollutant but are costly. The problem encourages the study of less polluting and economical mechanisms to degrade this type of materials. Therefore, in this research the potential of an Antarctic microorganism to degrade this residue was analyzed. First, a fungal culture was produced where its morphological, biochemical and molecular characteristics were evaluated in order to identify its properties. 3 reactors were developed in triplicate, controlling the physical parameters. At the same time, the synthetic polymer samples were extracted from plastic bags and an asepsis protocol was applied to them. To facilitate biodegradation, standardized thermal aging pretreatment was performed. As well as the adaptation of *Penicillium* sp., to the culture medium inside the reactor. Different measurements such as temperature, flow rate, and mass of CO₂ were calculated in the reactor. Finally, it was stipulated that biodegradation obtained a P value greater than 0.05, therefore the results were not statistically significant. However, biochemical analysis showed that *Penicillium* sp., has a tendency to produce lipases, which is why a theoretical section was built for the use of this microorganism integrating bioprocesses, financial characteristics, market and legal implications.

Keywords: Waste, CO₂, biochemistry, biodegradation, *Penicillium* sp. lipases.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En la anterior década, la industria produjo una gran cantidad de polímeros gracias a los derivados petroleros. Los materiales sintéticos son ampliamente usados en diferentes campos pues son la materia prima de innumerables productos (Peraza, 2017). La síntesis de aquellos materiales comprende un alta gama de recursos y actualmente es una de las industrias con magníficos ingresos produciendo toneladas del residuo sintético (Plastics Europe, 2015).

La producción actual del polímero está ocasionando grandes acumulaciones en el ecosistema. El principal problema es que los plásticos son contaminantes al volverse desechos porque su composición química no les permite ser degradados naturalmente y en periodos cortos de tiempo. La mayor parte de residuos sintéticos desechados yace en botaderos rellenos sanitarios y en ecosistemas tanto marinos como terrestres (Reyes et al., 2020).

Existen varios estudios sobre el tratamiento para reducir o alterar el material sintético (Espinoza, 2018; Jalil et al., 2013; Shah et al., 2008; A. B. Silva et al., 2018). Sin embargo, los mecanismos de reciclaje no son suficientes para la cantidad de plástico que se produce y desecha. Por lo tanto, se necesita de métodos más eficientes capaces de degradar el residuo sintético. En consecuencia, se desarrolló un procedimiento más económico denominado biodegradación, no obstante, es dificultoso hallar microorganismos que presenten dicha característica (Tokiwa et al., 2009). Asimismo, existen otros parámetros como las condiciones y el medio que se va a emplear para que el microorganismo se desarrolle (Krüger et al., 2012).

Se presentan estudios donde aplican tratamientos antes de la degradación biológica para que el microorganismo asimile más rápido el material (Mejias et al., 2010; Osswald, 2016). Los

pretratamientos permiten que los microorganismos accedan a su estructura molecular y lo utilicen como nutriente. El objetivo de la investigación es evaluar la capacidad del ascomiceto antártico para degradar residuos sintéticos mediante la fermentación a escala laboratorio, es importante mencionar que el sistema se encuentra en ausencia de nutrientes como carbono porque son remplazadas por el plástico.

1.2. Definición de problema

En las últimas décadas, la industria del plástico ha incrementado 12% su producción a nivel mundial, lo cual genera una mayor contaminación ambiental (Muthukumar y Veerappapillai, 2015). Estos residuos sintéticos son perjudiciales para el ecosistema y la salud debido a que su paradero final son rellenos sanitarios, botaderos y ecosistemas marinos (García et al., 2006; Ramaswamy y Sharma, 2011; Reyes et al., 2020). Por esta razón, es considerado un contaminante global, y aunque solo el 10% se recicla, sus moléculas siguen siendo tóxicas (Hidalgo, 2019).

En el Ecuador, se produjo un incremento en el uso de fundas plásticas, estas, así como también otros residuos equivalen al 11% de la basura total generada (Hidalgo, 2019). Al mismo tiempo, se encuentra en botaderos al ambiente y su tiempo estimado para una degradación natural requiere entre 500 y 3 000 años (Hapuarachchi et al., 2016).

Debido al tiempo tan extenso para una degradación natural se deben presentar nuevos tratamientos que aceleren el periodo degradativo (Wei y Zimmermann, 2017). Por esta razón, aunque los métodos físicos y químicos que usan catalizadores y altas temperaturas para reducir la estructura de los polímeros, no es suficiente pues el resto del material no tratado sigue siendo un contaminante (Vidya y Growth, 2017). Por esta razón, es necesaria la búsqueda de métodos que reduzcan o eliminen este tipo de material.

1.3. Justificación

Los polímeros sintéticos poseen una estructura química compleja (Coutinho et al., 2003). Son materiales con atractivo industrial debido a que es requerido y utilizado en una inmensidad de actividades (Espinoza, 2018). Asimismo, sus propiedades le otorgan cierta resistencia y elasticidad, por ello, realizar una descomposición natural es dificultoso (Shah et al., 2008).

Los métodos convencionales para reducir la estructura del plástico tienden a ser lentos, costosos y no se efectúa un resultado completo (Hayden et al., 2013). En el caso del reciclaje, es un método eficiente para reducir los materiales sintéticos, no obstante, aquel proceso industrial es de alto costo y no sustentable para economías limitadas como en nuestro país (Espinoza, 2018; European Commission DG ENV, 2011; Shah et al., 2008).

La biodegradación es un procedimiento económico y eficaz para minimizar el impacto generado por actividades antropogénicas (Hayden et al., 2013; Tokiwa et al., 2009). También, al compararlo con otras técnicas, la biodegradación no produce sustancias nocivas pues utiliza microorganismos que asimilan el material como fuente de nutrientes (Akhtar et al., 2016). En igual forma, conocer el campo enzimático de los microorganismos empleados en degradación es muy importante porque al modificarlo se puede acelerar la reacción en fermentadores (Wierckx et al., 2018). Sin embargo aunque existen hongos y bacterias con potencial degradador de materiales sintéticos, requieren de condiciones adecuadas y equipos específicos para su desarrollo (Hazen et al., 2010; A. B. Silva et al., 2018).

El tratamiento es una alternativa para reducir los desechos sintéticos (Shah et al., 2008). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, la presente investigación evalúa la capacidad de un microorganismo antártico para degradar plástico en fermentación. Asimismo, se desarrolla a escala laboratorio sometido a condiciones específicas, para establecer si existe degradación.

1.4. Pregunta directriz

¿El ascomiceto antártico propicia algún efecto degradativo en residuos sólidos?

1.5. Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el potencial degradador de un ascomiceto antártico en residuos sólidos mediante fermentación.

1.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar bioquímicamente el ascomiceto antártico.
- Establecer el potencial degradador del ascomiceto en distintos residuos sólidos.
- Plantear un escenario teórico para el aprovechamiento biotecnológico del ascomiceto.

1.6. Hipótesis

El microorganismo tiene la capacidad de degradar los residuos sólidos por fermentación.

1.7. Marco legal

De acuerdo con las leyes estipuladas en la Constitución de la República del Ecuador, se menciona las siguientes normas que deberán tomarse en cuenta para el desarrollo del marco legal correspondiente al tema de investigación, los cuales son los siguientes:

Art. 15 En donde menciona que el Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias.

Art.25 El cual menciona que se tiene el derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico.

Capítulo séptimo: Derechos de la naturaleza

Art. 71 Ratifica que la naturaleza o Pacha Mama, donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia y el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales, estructura, funciones y procesos evolutivos.

Art. 73 Detalla que se deberán aplicar medidas de precaución sobre actividades que causen deterioro en el ecosistema y alteraciones en los ciclos vitales.

Objetivo 3: Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones.

Promover buenas prácticas ambientales que aporten a la disminución de la contaminación, la conservación, la mitigación y la adaptación a los efectos del cambio climático, e impulsar las mismas en el ámbito global.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2. Revisión de literatura

2.1. Desechos sólidos contaminantes

Los plásticos en muchos países se clasifican como desechos sólidos (Li et al., 2019). El manejo de los desechos contaminantes generados es de gran importancia a nivel internacional (Pita y Díaz, 2012). Debido a las descargas de desechos sólidos en regiones costeras y botaderos, algunos países han puesto en acción medidas para reducir la contaminación (García et al., 2006). Sin embargo, al modificar su estructura puede generar monómeros y otro ingredientes nocivos para la salud y el ambiente.

El escaso proceso de recolección y la inadecuada manipulación final de residuos son un grave problema (Reyes et al., 2020). Asimismo, los sistemas como reciclado y la incineración para tratar los desechos sólidos minimizan el daño ligeramente (Chaves, 2001). No obstante, el resultado de los métodos convencionales para eliminar los remanentes genera partículas que se dispersan en el ambiente (Jambeck et al., 2015). De hecho, existen herramientas innovadoras que generan estrategias para la adecuada gestión de los desechos.

Los residuos sólidos urbanos contienen muchos elementos, en su mayor parte polímeros correspondientes a polietileno, polipropileno y cloruro de polivinilo (Arandes et al., 2004). También, son muy utilizados por sus propiedades en la industria química, suministro médicos, operaciones industriales, etc., (Otero, 2003; Reyes et al., 2020; Rochman et al., 2013).

2.1.1. Polímeros sintéticos

Los polímeros son un conjunto de moléculas unidos por enlaces covalentes (Gomis, 2012). También, los polímeros sintéticos son de origen industrial (D. Zapata et al., 2012). A su vez,

existen polímeros naturales como la celulosa, quitina, almidón, etc., (Cartaya et al., 2009). A diferencia de los sintéticos, los naturales son extraídos fácilmente y no perjudican al medio ambiente.

Al acumular monómeros se generan polímeros de estructura compleja y difícil de observar (Rochman et al., 2013). Existen metodologías donde alteran la composición molecular del polímero para su estudio pero cabe recalcar que depende del tipo de polímero (García et al., 2006).

2.1.2. Polietileno

El polietileno es una molécula formada por monómeros de eteno (Tabla 1) (Guevara et al., 2002). Su estructura es sencilla y no polar, sus enlaces intermoleculares y su temperatura de fusión son débiles (GOMIS, 2012). También, son polímeros de bajo peso molecular Y permite la penetración de moléculas en su composición e influye directamente en su resistencia (Coutinho et al., 2003; D. Zapata et al., 2012).

Tabla 1

Estructura química del polietileno

Definición	Fórmula
Estructura del eteno	$H_2C = CH_2$
Polietileno polimerizado	$\leftarrow -CH_2 - CH_2 - \rightarrow$
Polietileno molecular reducido	$[CH_2 - CH_2]_n$

Nota: Adaptado de Espinoza (2018)

Los polietilenos de baja densidad son muy comunes, por ejemplo, se encuentran como bolsas plásticas, de manera que son benévolos con el ambiente, debido a su estructura y baja densidad (Rochman et al., 2013). Por lo tanto, a pesar de su propiedad hidrófoba y su resistencia a temperaturas elevadas, el polietileno puede ser atacado por agentes oxidantes (Coutinho et al.,

2003). Sin embargo, la acumulación de los elementos da como resultado una contaminación ambiental.

2.2. Técnicas de degradación en residuos sólidos

Los métodos para tratar los residuos sólidos consisten en estrategias físicas y químicas (Arandes et al., 2004). Existen muchos métodos que son basados en el tratamiento mecánico de materiales desechados disminuyen su estructura molecular (Varjani, 2017). Algo similar ocurre con el proceso químico, se aplica reactivos en la materia prima transformando sus elementos en componentes menos volátiles (Arandes et al., 2004).

2.2.1. Microorganismos degradadores de polímeros

La biodegradación es una técnica económica y ecológica que permite gestionar la contaminación (Varjani, 2017). Un aspecto importante de los microorganismos degradadores es el uso de fuentes de carbono para su desarrollo (Diorio et al., 2003). De manera que pueden actuar con fuentes renovables, las cuales proceden de plantaciones agrícolas o residuos sólidos contaminantes (tabla 2).

Tabla 2

Microorganismos con potencial degradador en distintos polímeros

Polímeros sintéticos	Microorganismos
Polietileno	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
	<i>Rhodococcus rubber</i>
	<i>Penicillium simplicissimum YK</i>
Copoliéster	<i>Comamonas acidovorans TB-35</i>
	<i>Thermomonosporafusca</i>
Poli-cloruro de vinilo	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
	<i>Pseudomonas putida AJ</i>
Cloruro de polivinilo plastificado	<i>Pseudomonas fluorescens B-22</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i>

Poliuretano*Curvularia senegalensis**Fusarium solani**Aureobasidium pullulans**Cladosporium sp*

Nota: Tomado de la investigación de Shah et al. (2008)

Se han realizado varios estudios para evaluar la capacidad degradadora microbiana donde se observa el empleo de las actividades enzimáticas fabricadas por los microorganismos pero el proceso requiere de condiciones específicas para su desarrollo porque al modificar su entorno los procesos bioquímicos pueden presentar resultados diferentes a los esperados (Akhtar et al., 2016; Emadian et al., 2017; Muthukumar y Veerappapillai, 2015; Saraswat et al., 2014).

2.3. Antártida

Es un continente inhóspito que cuenta con condiciones climáticas extremas y se encuentra muy aislado de los otros territorios (Izzaguirre y Malatoni, 2000). Por otra parte, cuenta con una superficie de 14 millones km², contempla temperaturas que varían entre -30°C a -65°C y un máximo de 5°C a 15°C (Núñez y Barrientos, 2018). El clima es fuertemente influenciado por las zonas de baja presión (Teixeira et al., 2010). Se encuentra cubierto por nieve, el clima disminuye en la zona costera y es separada por profundos mares a su alrededor (Corsolini, 2009).

El Ecuador pertenece al Tratado Antártico y cuenta con la estación Pedro Vicente Maldonado que funciona desde marzo de 1990. Se encuentra en la isla Greenwich dirigido por el Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada del Ecuador (INOCAR) donde ejecuta proyectos de investigación con instituciones privadas y públicas (Ordóñez et al., 2008).

En la región Antártica se reportan contaminantes originados por actividades antropogénicas, metales pesados, los cuales son trasladados mediante corrientes de agua y aire, a su vez con la incorrecta gestión de residuos (Corsolini, 2009; Núñez y Barrientos, 2018). Es

imprescindible el desarrollo de herramientas biológicas que permitan reducir el impacto de las acciones humanas en el ecosistema antártico (Teixeira et al., 2010).

2.3.1. Microorganismos antárticos

A pesar de las condiciones climáticas y limitaciones en aquel continente, la cantidad de nutrientes y agua líquida permite el desarrollo de organismos en la Antártida (Camacho y Fernández, 2005). Al igual que, la variación en la estructura atmosférica, las bajas y extensas temperaturas son relevantes debido a que determinan la formación de microorganismos, su proliferación y la colonización en lugares específicos (Mario Comerio y Mac Cormack, 2004). De modo que, existen grandes colonias de microorganismos que se desenvuelven en zonas con fuentes nutritivas limitadas donde llevan a cabo sus funciones vitales (Bordese, 2008).

La mayor parte de la biodiversidad en la Antártida se desarrolla en áreas fraccionadas libres de hielo y limitadas de nutrientes (Ji et al., 2016). Algo similar ocurre en estudios donde afirman que los microorganismos antárticos utilizan la biomasa que se concentra en su ecosistema (Pointing et al., 2009; Teixeira et al., 2010). Regiones tan restringidas no pueden ser estudiadas a profundidad debido a que cualquier perturbación puede alterar su desarrollo.

2.3.1.2. Bacterias antárticas

Los ambientes extremófilos son sistemas inusuales para el desarrollo de comunidades bacterianas de modo que las limitaciones de nutrientes y temperatura permiten a los microorganismos desarrollar características complejas y metabolitos secundarios que aseguran su supervivencia en el hábitat (Núñez y Barrientos, 2018). También juegan un papel importante en los ecosistemas debido a su capacidad de fijar nitrógeno y reducir los sulfatos presentes en el sistema marino (Bordese, 2008). Estudios muestran que los grupos bacterianos observados en la

ubicación pertenecen a *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* (Chong et al., 2009; Pointing et al., 2009; Yergeau et al., 2007).

2.3.1.3. Hongos antárticos

Las limitaciones de fuentes nutritivas en los ambientes obligan al hongo a vivir en simbiosis con otros microorganismos (liquen y bacteria) (Ji et al., 2016). Por lo tanto, la tolerancia de hongos a condiciones ambientales extremas se debe a sus caracteres fenotípicos para persistir en escenarios hostiles y a su capacidad de metabolizar los nutrientes de compuestos que los rodean (T. H. da Silva et al., 2020; Selbmann et al., 2013). Asimismo, en estudios sobre grupos eucariotas se identifican comúnmente *Basidiomycota* y *Ascomycota* (Pointing et al., 2009; Selbmann et al., 2013).

Las comunidades microbianas extremófilas presentan una baja similitud filogenética con respecto a otros taxones en bases de datos mundiales (Pointing et al., 2009; Silva et al., 2020; Selbmann et al., 2013). La detección y estudio de hongos capaces de producir metabolitos de interés y desarrollarse en condiciones no adecuadas para otros es crucial (Sergio Ortega et al., 2012). A pesar de la literatura sobre microorganismos antárticos, el conocimiento para aprovechar al máximo los organismos eucariontes es limitado.

2.4. Caracterización de microorganismos eucariontes

2.4.1. Identificación microbiana mediante características morfológicas

Los sistemas tradicionales de caracterización fenotípica se basan en observación superficial de los microorganismos (Bou et al., 2011). Establecer los datos macroscópicos identificados en la placa es de gran importancia porque se definen detalles del hongo en el medio tales como su morfología y desarrollo (Yanes, 2013). Aquellas características no son suficientes para identificar

un organismo eucarionte, por ende, se efectúan otros procesos más minuciosos como la revisión microscópica.

Un proceso tradicional es la observación microscópica donde se fija la muestra microbiana con calor en el portaobjetos y se visualizan sus detalles (Ñangada et al., 2010). También, se aplican técnicas de tinción que revelan la forma, estructura y tamaño del microorganismo en el microscopio (Bou et al., 2011). Se examina a profundidad con el lente de aumento de 100 X y aceite de inmersión (Luján y Pajuelo, 2005).

Este método permite la identificación de especies basándose en los resultados determinados en el microscopio tales como estructura, filamentos y esporas (Yan et al., 2016). Comparado con otras técnicas, aunque su desarrollo es sencillo y económico, la identificación con bases morfológicas no es confiable porque produce datos insuficientes para determinar especies (Bandh et al., 2011). Existen otros métodos como el bioquímico y molecular que son mucho más eficaces que la microscopia pero los reactivos y equipos a utilizar son costosos.

2.4.2. Identificación microbiana mediante pruebas bioquímicas

Existen numerosos equipos automáticos que determinan con múltiples pruebas enzimáticas en sustratos el microorganismo de estudio (Bou et al., 2011). Por otra parte, las herramientas son para microorganismos específicos debido a que poseen un sistema informático donde se evalúa los resultados (Bolaños et al., 2004). Aunque proporciona datos precisos, requieren de una base de datos en un ordenador y su precio es relativamente alto. Por ejemplo, los sistemas más comunes utilizados en microorganismos son: API (bioMérieux), Enterotube (BBL) y MicroScan (Almuzara et al., 2006; Bolaños et al., 2004; Han et al., 2018).

Las enzimas extracelulares microbianas son las responsables de la mineralización de nutrientes y la asimilación de materia orgánica presente en el ambiente (Jackson et al., 2013).

También se sabe que algunas enzimas responden positivamente a los cambios efectuados en su medio (Y. Li et al., 2019). Estos métodos requieren fuentes de carbono diferentes para cada actividad enzimática y microorganismo (figura 1). Los procesos enzimáticos se desarrollan en placas con cultivos selectivos donde requieren de factores específicos que revelen determinadas características en la superficie del medio (Sandri et al., 2011).

La actividad enzimática extracelular microbiana permite comprender la reacción de hidrólisis producida en el sustrato por la asimilación de nutrientes (Tokiwa et al., 2009). Además, las enzimas comprenden la sensibilidad de un microorganismo al medio que va a metabolizar (Bou et al., 2011). Es importante recalcar que la reacción de los sistemas enzimáticos libera una señal al medio de cultivo (figura 1). Las enzimas se asocian al citoplasma rompiendo la pared celular y luego se produce la reacción por acción de un indicador (rojo Congo, azul de metileno, etc.) en la placa (Y. Li et al., 2019).

Un procedimiento para evaluar la actividad enzimática extracelular microbiana es el p-nitrofenilo (pNP), introducido en el sustrato (Jackson et al., 2013). Es importante mencionar que el método se cuantifica midiendo la actividad hidrolítica por espectrofotometría (Romero et al., 2017). Los microorganismos son dependientes de los reactivos para generar la reacción pero no es factible para toda la comunidad microbiana por lo que encontrar sus nutrientes necesarios es imprescindible (C. Castañeda et al., 2018; Garza et al., 2011; J. González et al., 2010; Tokiwa et al., 2009).

2.4.2.1 Actividad enzimática en lipasas

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas) son enzimas que presentan características muy interesantes que permiten su uso en campos de estudio bajo condiciones pueden catalizar reacciones múltiples a la hidrólisis (J. González et al., 2010). Se pueden encontrar en

microorganismos que catalizan la formación de enlaces éster (Macedo y Pio, 2005). Es conveniente que las enzimas posean un sustrato óptimo para producir una alta actividad porque en su ausencia la actividad enzimática no se desarrolla (Bornscheuer, 2002).

2.4.2.2. Actividad enzimática en esterasas

Las estereasas (carboxil éster hidrolasas) manifiestan una tolerancia al sustrato, concediendo el acceso a diversas fuentes de carbono y se presentan como biocatalizadores (Bornscheuer, 2002). Generalmente, se suplementa las placas con Tributirina. Incluso, los organismos productores de esterasas se caracterizan por el desarrollo de halos, la concentración de sustratos son determinantes para establecer si existe la actividad pero requiere de indicadores dispersos en el medio que forman un área que cubra la mayor parte de la colonia en la placa (Bornscheuer, 2002; J. González et al., 2010; Rodríguez et al., 2001).

2.4.2.3. Actividad enzimática en celulasas

Los microorganismos que degradan biomasa vegetal son identificados como productores de celulasas (Ramírez y Cocha, 2003). La mayoría de estos individuos son hongos y para catalizar la hidrólisis de celulosa intervienen enzimas como la celobiohidrolasa (CBH) y la β -glucosidasa debido a la necesidad de desarrollar el hongo en los nutrientes del sustrato (Jackson et al., 2013). Su progreso se ve afectado por elementos físico-químicos y los hongos termófilos producen estas enzimas como reacción a los factores ambientales donde se encuentran (Ramírez y Cocha, 2003).

2.4.2.4. Actividad enzimática amilasas

La actividad amilasa se ve influenciada por la presencia de sustancias inductoras (Diorio et al., 2003). La producción de la enzima se debe principalmente a las materias primas que contienen almidón (Mahapatra y Banerjee, 2012). Cabe recalcar que estas enzimas hidrolizan el

almidón y se reportan en especies de los géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Saccharomycopsis* (Garza et al., 2011; van der Kaaij et al., 2007).

2.4.2.5. Actividad enzimática pectinasas

Esta enzima desempeña un papel muy importante en la industria alimenticia, porque facilita su obtención y producción en diferentes productos como la fibra (C. Silva et al., 2004). La mayoría de los hongos poseen cantidades considerables de pectina pero para su activación requieren de un sustrato perteneciente a un grupo carboxilo que catalice su hidrolisis y permita su extracción (Sandri et al., 2011).

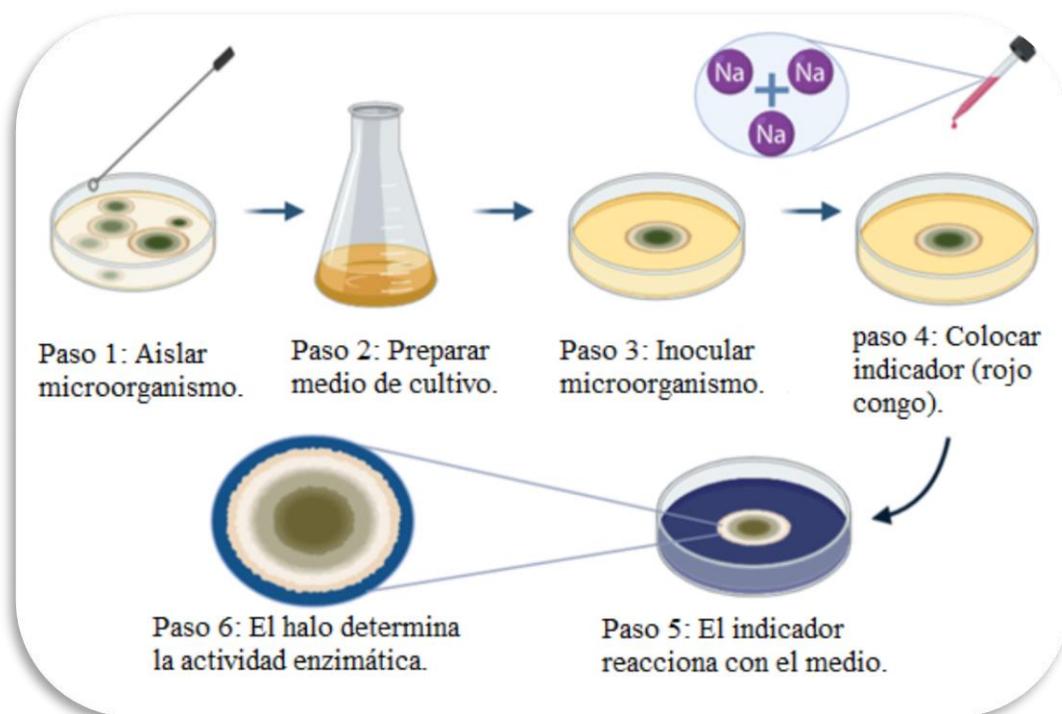
2.4.2.6. Actividad enzimática en ureasas

Bacterias y hongos sintetizan y forman enzimas extracelulares catalizando la reacción en el ecosistema (Y. M. Zhang et al., 2005). Utilizan materia orgánica para desarrollar actividad enzimática porque están involucradas en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno principalmente en la hidrolisis de la urea en amonio (Pascual et al., 2002; Rivas et al., 2009). La modificación de las condiciones donde la diversidad microbiana prolifera, conlleva a un estrés y posteriormente la producción de metabolitos secundarios (Mario Comerio y Mac Cormack, 2004).

A pesar de la cantidad de estudios enfocados en la determinación de actividad enzimática extracelular, la metodología en microorganismos eucariotas aún no es especificado a profundidad (Bou et al., 2011; Jackson et al., 2013; Y. Li et al., 2019). A diferencia de pruebas para procariontes que existen en abundancia. Por este motivo se desarrollan análisis moleculares para organismos eucariontes.

Figura 1

Metodología general para observar actividad enzimática extracelular



Nota: Pasos involucrados para desarrollar pruebas enzimáticas extracelulares. Adaptado de Vaughan et al. (2008). Tomada y modificada de www.biorender.com

2.4.3. Identificación fúngica mediante métodos moleculares

La identificación molecular inicia con la extracción de ADN a través de métodos moleculares con una muestra de la cepa (Nilsson et al., 2014). Intervienen los genes que codifican el ARN ribosomal que contienen espaciadores intergénicos transcritos (ITS) y secuencias espaciadores externas (ETS) (Korabecna, 2007; Krüger et al., 2012). También, la amplificación del ADN microbiano se efectúa mediante PCR y regiones ITS universales que permiten reconocer comunidades microbianas (Flores, 2010). Estas regiones luego de amplificar el ADN del hongo a través de PCR, se analiza en la electroforesis las bandas en el gel y su peso molecular (M. Zapata et al., 2004).

El método de identificación genotípica es más verídico y eficaz que el morfológico porque establece la taxonomía del microorganismo (Bou et al., 2011). Comparado con métodos anteriores, estudios confirman que esta técnica facilita la extracción de datos genéticos de comunidades microbianas en menor tiempo (Takamatsu y Kano, 2001; Yuko y Morimoto, 2010). Luego de amplificar una porción del ADN se clasifica acorde a su capacidad de resolución taxonómica (familia, género, especie) (Vásquez C et al., 2016). A su vez, estos fragmentos que amplifican un determinada región se definen como marcadores en los análisis genotípicos (Liu et al., 2015).

2.4.3.1 Cebadores ITS

Los datos moleculares presentan información detallada para establecer la taxonomía de organismos (Nilsson et al., 2014). Por ejemplo, los cebadores ITS (tabla 3) eliminan ADN contaminante de la PCR y determinan un fragmento específico en las secuencias de nucleótidos del microorganismo estudiado (Takamatsu y Kano, 2001). En realidad, la región ITS es más precisa para los datos moleculares de hongos y toman un rango de acuerdo a la longitud de sus regiones en la secuencia (Liu et al., 2015).

Como mencionan Doaré Lebrun et al. (2006) aunque sirven como marcador molecular, se estudió que ITS no siempre establece una identificación exacta debido a su lejanía con otros taxones. Krüger et al. (2012) detallan una alta fidelidad a los resultados filogenéticos. Al igual que los datos presentados por Kittelmann et al. (2012) quienes ratifican que la secuenciación ITS desarrollada fue adecuada para la identificación del hongo.

Tabla 3

Secuencias de los cebadores ITS universales

Cebadores	Secuencia	Referencia
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(Pereira et al., 2010)

ITS1 5'-CTT GGT CAT TTA GA GGA AGT AA-3' (Anderson et al.,
2003)

Nota: Tomado de Liu et al. (2015)

Los métodos moleculares permiten identificar microorganismos con potencial degradador (tabla 2) (Shah et al., 2008). De igual forma, las técnicas bioquímicas permiten conocer las enzimas involucradas en la fermentación (Vásquez C et al., 2016). En consecuencia, se puede desarrollar reactores que produzcan una enzima de interés identificada con las estrategias mencionadas.

2.5. Proceso de fermentación sumergida

2.5.1. Ventajas de la fermentación sumergida

La fermentación sumergida permite un mejor monitoreo y facilita el manejo de este debido a que su proceso se realiza en presencia de agua (Singhania et al., 2010). Aparte del costo mínimo (a escala laboratorio) su bajo consumo de energía es muy significativo en comparación con la fermentación sólida porque el control de parámetros es muy importante en cuanto al tipo de fermentación a utilizar (Friedl, 2016).

2.5.2. Condiciones de la fermentación sumergida

Requiere una adecuada comprensión del crecimiento del microorganismo en el reactor (Singhania et al., 2010). Porque aquellas variables permite conocer el estado del microorganismo durante la fermentación (Macias Camacho, 2017). Del mismo modo pasa con el sistema de aireación, es crucial mantener un sistema homogéneo porque este permite el transporte de oxígeno y nutrientes del medio al microorganismo (Dary et al., 2012).

Los microorganismos difieren mucho con respecto al escenario implementado. Porque al proporcionarle condiciones específicas, produce metabolitos como resultado de los parámetros inducidos durante la fermentación (Singhania et al., 2010). La producción de enzimas por acción

de los microorganismos son influenciadas mediante parámetros como el sustrato, pH, aireación, acceso a los nutrientes, temperatura, etc., (Singhania et al., 2010).

El estudio de escenarios perfectos para la fermentación sumergida es complicado por las condiciones que amerita. Como mencionan Shah et al. (2008) existen experimentos a escala laboratorio donde usan la fermentación sumergida y otros métodos para degradar polímeros.

2.5.3. Limitantes en la fermentación sumergida

Existen variables que son motivo de preocupación debido a que en escala laboratorio son difíciles de controlar y pueden afectar su productividad. Los medios de cultivo son muy importantes porque estos poseen la fuente de carbono para el microorganismo (Singhania et al., 2010). Por lo que encontrar los minerales adecuados es crucial para su desarrollo en el reactor, tan relevante como las condiciones en la fermentación (Sandhya et al., 2005).

A diferencia de la fermentación sólida, la cantidad de nutrientes debe ser específica para el crecimiento del microorganismo debido a que una fuente de nutrientes baja produce rendimientos deficientes (Y. Zhang et al., 2016). El sustrato disminuye en función del tiempo de la fermentación y al suministrar medio provoca una contaminación al reactor durante su alimentación.

2.6. Métodos para analizar el polímero residual

2.6.1. Envejecimiento térmico

Este método mecánico es fundamental porque proporciona cambios en las propiedades superficiales del material (Sáenz et al., 2007). La mayor ventaja de esta técnica es su descomposición porque las estructuras complejas son fracturadas permitiendo la observación microscópica, su análisis en dispositivos como el HPLC y ser asimilado por microorganismos (Mejias et al., 2010; Espinoza, 2018).

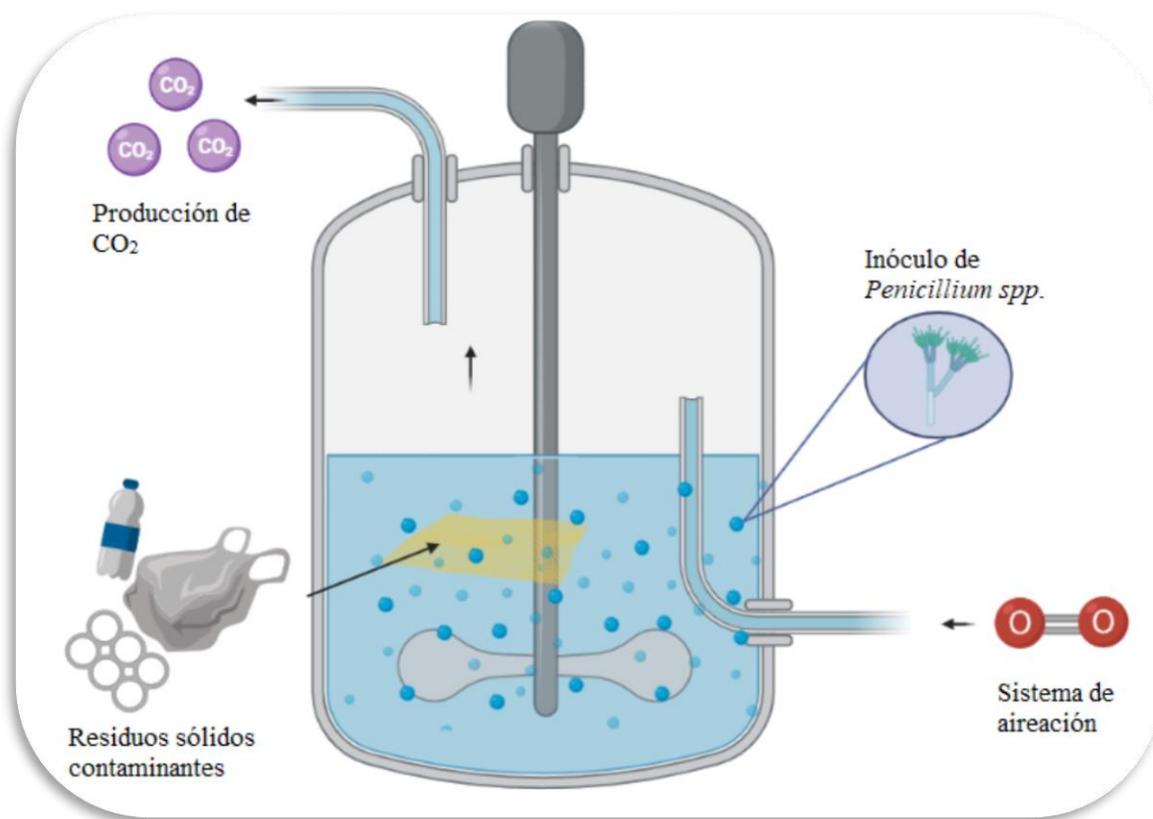
2.6.2. Respirometría

Un método eficaz para evaluar la degradación efectuada por microorganismos es la respirometría (Keener et al., 2001). A diferencia del anterior procedimiento, este proceso mide la tasa de producción de CO₂, pérdida de agua por evaporación, consumo de oxígeno en el microorganismo al proporcionarle ciertas condiciones de modo que mide parámetros biológicos derivados del organismo eucarionte influenciados por la materia prima y el crecimiento fúngico (figura 2) (Withers, 2001).

Estos parámetros resultantes de procesos biológicos y fisicoquímicos, determinan la actividad degradadora de un microorganismo y los sistemas de respirometría analizan si la materia prima que usan como fuente de carbono fue consumida mediante los datos obtenidos (Pratt et al., 2004; Reid et al., 2001).

Figura 2

Variables en degradación de residuos mediante fermentación



Nota: Descripción general del proceso fermentativo para la degradación de residuos sólidos.

Adquirido de Shah et al., (2008). Tomada y modificada de www.biorender.com

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Representación del sitio de estudio

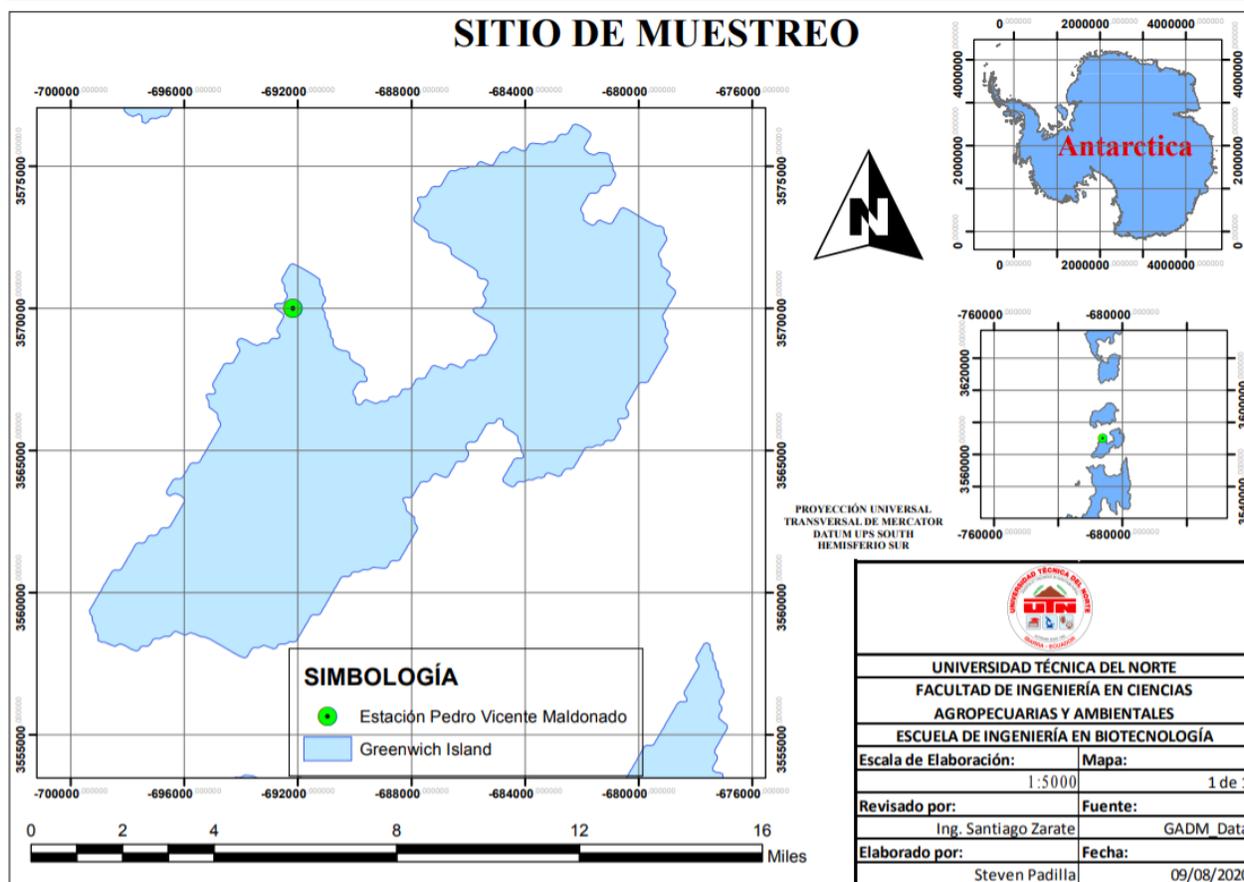
La presente investigación se formalizó en el laboratorio de Investigaciones Ambientales (LABINAM) y en el laboratorio de biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en el campus San Vicente de Paúl (UTM 17N 821358.21 38400.30) en Ibarra en la calle Juan Montalvo y Cristóbal Colón, provincia Imbabura, Ecuador.

3.1.1 Obtención de muestra biológica

El muestreo se ejecutó en la estación Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (figura 3) ubicada en la isla Greenwich, en la península Antártica (UTM, 21E 358573.85 3072791.82) y en las islas Dee (UTM, 21E 3075610 356252 y Barrientos (UTM 3077442 357803). Se sitúa a 10 metros de altitud sobre el nivel del mar, además, se conservó los microorganismos aislados en Agar Papa Dextrosa a 4°C.

Figura 3

Ubicación general de la investigación en la Antártida



3.1.2. Aislamiento y conservación del ascomiceto antártico

El ascomiceto fue seleccionado por manifestar bioactividad y un potencial desarrollo biotecnológico. Adicionalmente, el ascomiceto mostró capacidad para proliferar en un material sintético. Por tal motivo se conservó en la colección de cepas del laboratorio de investigaciones ambientales de la UTN, se mantuvo a -4°C en completa oscuridad. Posteriormente, fue aislado por triplicado en cajas Petri, sembrando en cultivo de agar papa dextrosa (PDA), debido a la afinidad de hongos por este medio (Bandh et al., 2011). De igual forma, este proceso fue repetido hasta

obtener una muestra sin contaminación. Luego, fueron incubados a temperatura ambiente (21°C) durante 7 días con el fin de lograr un cultivo puro (Molar et al., 2013).

3.2. Identificación de microorganismos eucariontes

Estas pruebas permiten identificar ciertas características de un microorganismo con el uso de herramientas o equipos que establecen propiedades y las diferencian de otras especies (Tapia et al., 2008). Adicionalmente, se detalla pruebas específicas para hongos.

3.2.1. Identificación microbianas mediante características morfológicas

El ascomiceto fue caracterizado a través de la observación macroscópica en el medio de cultivo. Es oportuno mencionar que este proceso se realizó usando la metodología descrita por Molar et al., (2013) con ligeras modificaciones, este procedimiento consiste en sembrar al hongo en medio de cultivo de Agar Czapek estandarizado con los siguientes reactivos: NaNO_3 3 g, extracto de levadura 5 g, sacarosa 3 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCL 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, agar 15 g, agua 1000 mL, ajustando un pH de 6.3 y se esterilizó a 103kPa, 121°C por 15 minutos. Posteriormente, mediante observaciones simples se establecieron las características macroscópicas más relevantes como su textura, color y forma (Yanes, 2013).

También se efectuó una observación microscópica a través de técnicas de tinción (Bandh et al., 2011). Primero, se extrajo una cantidad de muestra con un capilar, luego, se colocó sobre el portaobjetos con una gota de azul de metileno. Después, se examinó en el microscopio óptico MCX50 sus características, forma y tamaño. Por otro lado, para una observación profunda se adicionó el aceite de inmersión y se analizó sus rasgos con el lente de 100 X (Kuhar y Sequeira, 2018).

3.2.2. Identificación microbiana mediante pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron con el fin de establecer la actividad metabólica del microorganismo. En consecuencia, los ensayos efectuados fueron: ureasa, lipasa, celulasa, pectinasa, amilasa y estereasa. Para todas las pruebas se tomó como referencia los experimentos de Vaughan et al., (2008) donde se extrajo una alícuota de 200 uL y se colocó en un pozo con 5 mm de diámetro fabricado con una punta estéril de micropipeta en la placa. Posteriormente, fue conservado a temperatura ambiente (21 °C) por 72 horas. Después, se agregó 10 gotas del indicador correspondiente (rojo Congo, azul de metileno, Lugol, hexadecil trimetilamonio). Por último, se agitó hasta quedar completamente homogenizado, identificando la actividad enzimática con la presencia del halo.

3.2.3.1. Ensayo enzimático extracelular ureasas

Se preparó 60 mL de medio selectivo para detectar actividad ureasa el cual contenía 5 g/L de Triptona, 2.5 g/L de levadura, 1 g/L de glucosa y a la urea con 10 mg/L. También se ajustó a un pH de 6. Cabe recalcar que si la urea es comercial puede a filtrar en papel Whatman # 1. Posteriormente, se efectuó el proceso general descrito por Vaughan et al., (2008) y se determinó la actividad de la enzima ureasa.

3.2.2.2. Ensayo enzimático extracelular lipasas

Se elaboró el medio Tributirina agar con 10 g/L de agar, 10 g/L de Peptona, 3 g/L de Levadura, azul de metileno 1 mL, 10 ml/L de Tributirina, con pH de 6.5. Además, se adicionó el reactivo Tributirina posterior a la esterilización en la autoclave. Finalmente, se replicó el método de Vaughan et al., (2008) estableciendo la actividad enzimática lipasa.

3.2.2.3. Ensayo enzimático extracelular estereasas

Se preparó un medio selectivo de 100 mL con 100 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L de NaCl, 10 g/L Peptona y 10 mL/L de Tween 80. Aparte de eso, el Tween 80 se introdujo en el medio posterior a la esterilización en la autoclave donde se procedió a agitar hasta su asimilación completa. Después se repitió la metodología de Vaughan et al., (2008). Posteriormente, las cajas que presentaron el halo tuvieron actividad de la enzima estereasa.

3.2.2.4. Ensayo enzimático extracelular celulasas

Se realizó un agar estandarizado de 100 mL, con R2A Agar 20 g/L, carboximetilcelulosa (CMC) 1 g/L, NaCl 10 mL/L, Lugo 10 mL/L. De igual forma, se siguió el protocolo mencionado por Shivani y Kumar (2015) el medio de cultivo fue enriquecido con CMC. También se agregó 2% p/v de Rojo Congo por 15 minutos. Después se generó el proceso de Vaughan et al., (2008) y las cajas que presentaron halo tuvieron actividad de las celulasas.

3.2.2.5. Ensayo enzimático extracelular pectinasas

Se estableció el agar con 100 mL de nitrógeno de levadura agar, levadura nitrógeno base 6.7 g/L, pectina 10 g/L, agar 10 g/L, se ajustó a un pH de 7. Se desarrolló el método de Vaughan et al., (2008). Finalmente, con el reactivo hexadecil trimetilamonio se comprobó la actividad pectinasa.

3.2.2.6. Ensayo enzimático extracelular amilasas

Se preparó el medio con almidón agar 20 g/L. Con base en lo mencionado, se efectuó el protocolo de Vaughan et al., (2008). Asimismo, con el indicador Lugol se determinó la actividad de la enzima amilasa debido a la formación de un halo en la placa.

3.2.3. Identificación microbiana mediante prueba molecular

La identificación molecular se realizó en los laboratorios ID gen-Identificación Molecular, las muestras fueron aislados puros en caja Petri, el procedimiento para la extracción de ADN se realizó por métodos convencionales (M. Zapata et al., 2004) utilizando aproximadamente 100 mg de micelio. Luego se realizó electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad y calidad del ADN. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se utilizaron los primers universales ITS1/ITS4 para la amplificación de hongos (IDGEN, 2019). Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos. Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

3.3. Preparación de residuo sólido

El material elegido para el experimento fue el polietileno de baja densidad (bolsa plástica). Debido a su estructura que permite disminuir su composición química mediante la degradación biológica. Las muestras de polímero sintético utilizadas fueron bolsas plásticas que se fabrican y comercializan por empresas ecuatorianas. También, en la preparación del material se realizaron cortes cuadrados de 5 cm² en las bolsas plásticas, con un peso aproximado de 20 miligramos. Se registró los valores obtenidos en la balanza analítica Modelo VE-303.

3.3.1. Tratamiento de envejecimiento térmico estandarizado

Se efectuó el envejecimiento térmico a las muestras plásticas. Por esta razón, se introdujo en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 15

minutos. Luego, se colocó en la estufa de secado a 50 °C por 96 horas. Finalmente, se pesaron en la balanza analítica VE-303 y se registró la variación con respecto al primer pesaje (Nguyen, 2013).

3.3.2. Medio y condiciones para la fermentación sumergida

En la fermentación sumergida se controla parámetros (temperatura, pH, agitación) que influyen directamente sobre el hongo. Además, los reactores fueron incorporados en un sistema donde se pudo inspeccionar sus variables. Cabe recalcar que se efectuó este proceso en un recipiente de cristal el cual se encontraba conectado a diferentes instrumentos a través de conductos para evaluar sus condiciones.

3.3.3. Estandarización de medios para fermentación sumergida

A partir de una búsqueda literaria de la composición de medios y su afinidad para los ascomicetos. Se propuso trabajar con los componentes establecidos por Prasanna et al., (2016). Se utilizaron 0.5 g nitrato de sodio, 0.01 g amonio sulfato, 0.25 g cloruro potásico, 0.25 g sulfato magnesio, 0.25 g fosfato di hidrógeno potasio, estos nutrientes fueron calculados para 250 mL de medio líquido. No obstante, se efectuaron cambios en sus elementos en consecuencia de los reactivos disponibles en el laboratorio de biotecnología aplicada, así como también en la concentración de carbono la cual fue modificada con la finalidad de que el ascomiceto asimile el plástico como nutriente, en consecuencia ello se varió la concentración de carbono en el medio para identificar si existe crecimiento pese a las condiciones proporcionadas al microorganismo antártico.

3.3.4. Producción del inóculo para la fermentación

La preparación del inóculo se realizó como mencionan Chávez et al., (2009) retirando un disco de agar con micelio (5 mm de diámetro) e introduciéndolo en un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 150 mL de caldo papa dextrosa con un pH de 5.8 esterilizado a 121 °C por 15 minutos en

el autoclave. Después, se incubó en completa oscuridad a 21 °C durante 7 días en la incubadora agitadora (SCI FINETECH). Finalmente, para la inoculación se procedió a extraer la cantidad de 1.5 mL del inóculo que representa el 4 % del volumen de trabajo total.

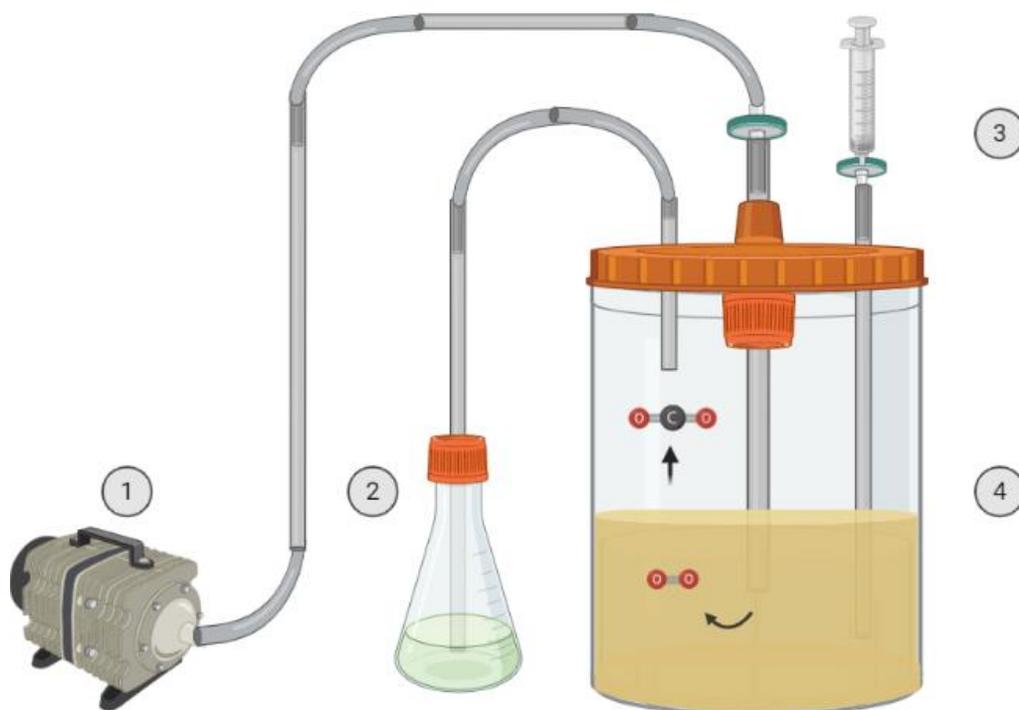
3.3.5. Dimensiones y parámetros de operación en la fermentación

Con el desarrollo del medio estandarizado, se estableció las condiciones adecuadas para el control del reactor. El fermentador constó de 3 entradas (figura 4), una entrada para el aire, otra para la salida de dióxido de carbono y una última para extraer muestra. Por otra parte, estuvieron conectados mediante mangueras plásticas con filtros de jeringa (0.22 micras) para evitar la contaminación.

Las dimensiones del reactor corresponden a un volumen de 500 mL. Su altura es de 12 cm, y un diámetro de 8 cm. Sus orificios están diseñados para introducir oxígeno al hongo, de esta manera proporciona un intercambio gaseoso con el ascomiceto liberando CO₂. De igual forma, se puede obtener un extracto líquido con la jeringa adherida. Adicionalmente, el dióxido de carbono sustraído fue depositado en un Erlenmeyer de 100 mL que contenía 10 mL de hidróxido de sodio.

Figura 4

Diseño de biorreactor e instrumentos utilizados para la fermentación sumergida



Nota: Instrumentos para la medición de parámetros: (1) bomba de pecera, (2) Erlenmeyer de 100 mL, (3) jeringa con filtro de 0.22 micras, (4) reactor de 500 mL. Tomada y modificada de www.biorender.com

3.3.5.1. Temperatura

El reactor se operó con base en las condiciones del laboratorio medido con un termómetro con valores que oscilan a una temperatura ambiente de 21 a 25 °C, aproximadamente. Uno de los principales factores que influyen en el desarrollo de hongos es la temperatura (Mannaa y Kim, 2017). Por esta razón, este parámetro en el reactor se mantuvo constante en 25 °C. Además, para conservar este valor se diseñó un sistema (60 x 30 x 40 cm) que impide alterar la temperatura.

Asimismo, se privó de luz debido a que muchos hongos se desarrollan mejor en estas condiciones (Bacon Charles, 2018).

3.3.5.2. El pH

La medición de este factor es crucial debido a que un pH alto complica el desarrollo del hongo (Puerta, 2012). De igual forma, el pH inicial fue determinado a través de un potenciómetro. Sin embargo para el reactor se utilizó el método de (Pereira et al., 2007) con leves modificaciones, se extrajo una muestra de 10 mL con una jeringa acoplada al sistema (figura 4). Posteriormente se la depositó en un tubo de ensayo para medir su pH, se utilizaron cintas de pH (Macherey Nagel) para comprobar su resultado. Los datos fueron extraídos en los primeros días en la fermentación.

3.3.5.3. Agitación continúa

La agitación en el reactor fue proporcionada por una bomba de pecera con una capacidad máxima de flujo volumétrico de 2 L /min incorporada en un extremo del reactor (figura 4). Este facto es importante debido a que homogeniza el medio (Ciro et al., 2011). Igualmente, se incorporó mangueras plásticas para introducir el aire y mantener un burbujeo constante en la fermentación. Cabe recalcar que se usaron filtros de jeringa (0.22 μ m) para inhibir agentes contaminantes en el medio.

3.3.6. Medición de la producción de CO₂

Se realizó la medición de CO₂ utilizando el método de titulación. Utilizando la metodología de (Morales et al., 2019) con leves modificaciones se determinó el intercambio gaseoso en el medio. Además, la toma de muestras se efectuó diariamente. En primer lugar, se colocó en un Erlenmeyer de 100 mL, 10 mL de NaOH a 2.5 M (figura 4), conectados por un tubo plástico al fermentador. Después, cada 24 horas se adicionó en este matraz de 10 mL con la sustancia de cloruro de bario a 1 N. Posteriormente, se centrifugó a 3 500 rpm a 21 °C por 15 minutos.

Finalmente, al sobrenadante se le añadió dos gotas del indicador fenolftaleína y por titulación el HCl a 1 N hasta que se torne transparente el medio. Posteriormente, se tomó en cuenta algunos datos para establecer la cantidad de CO₂ (ecuación 1) como el volumen de sobrenadante, volumen de HCl y la concentración del ácido (Keener et al., 2001).

$$l * m * Pm = Mco$$

Ecuación 1. *Obtención de la masa de CO₂.*

l=Volumen del titulante

m=Molaridad del ácido

Pm=Peso molecular del CO₂

Mco=Masa de CO₂

Con los resultados obtenidos en la medición de CO₂ y de las pruebas bioquímicas realizadas se identifica la importancia enzimática de este microorganismo y las implicaciones registradas para su obtención.

3.4. Análisis del escenario para el aprovechamiento del microorganismo

De los 6 ensayos enzimáticos extracelulares se escogerá uno cuya actividad presente resultados positivos y cuyas características sean de importancia en la industria. Se indagará en busca de información sobre la enzima específica y posterior a ello se investigará su forma de obtención, sus aplicaciones industriales, equipos involucrados y aspectos económicos para un emprendedor, los bioprocesos comprendidos, las implicaciones legales en el Ecuador, las cuales pueden potenciar o limitar el desarrollo del escenario.

Todos los puntos mencionados anteriormente son necesarios para efectuar una producción enzimática a nivel industrial factible. Para ello es importante efectuar un escalado a nivel laboratorio donde se identifique las condiciones necesarias para su correcto funcionamiento.

Cabe recalcar que estos aspectos pueden variar al momento de escalar cada uno de los bioprocesos, por ejemplo, el tiempo de fermentación, los ensayos necesarios para efectuar el escalado, los rendimientos en comparación con otras cepas comerciales que producen lipasas, los aditivos aplicados dependiendo el producto a obtener. El apartado financiero conlleva las entidades, mercado, infraestructura y costos necesarios para ejecutar el proyecto. Finalmente se detallan las normativas medioambientales establecidas en la constitución nacional a cumplir.

3.4.1. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico en la herramienta SPSS Statistics 22 con valores de p inferiores al nivel de significancia no se consideraron estadísticamente significativos. Conjuntamente, se determinó los supuestos de normalidad mediante una prueba de Levene y adicional se aplicó una prueba de Greenhouse Geisser.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

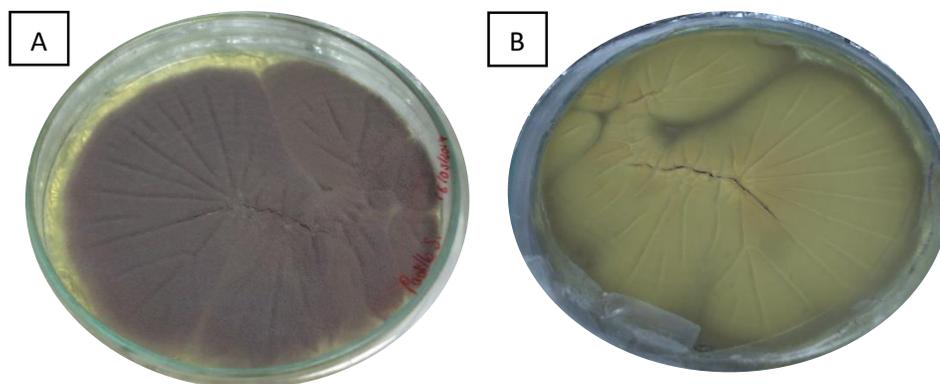
4. Caracterización de ascomiceto antártico

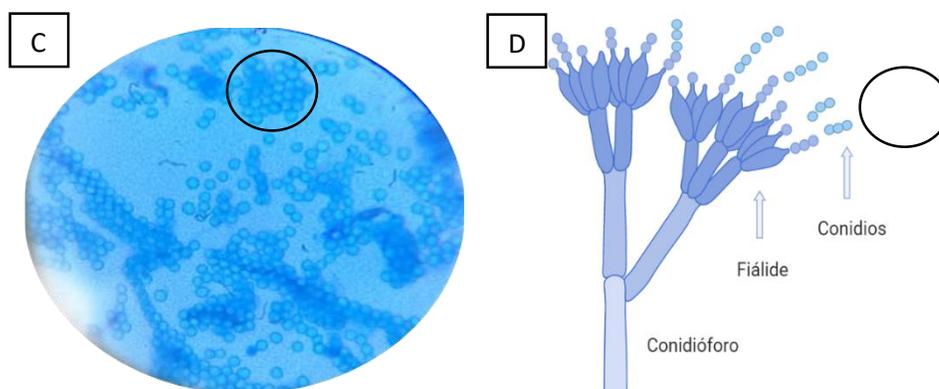
4.1.1. Identificación morfológica del hongo antártico

La principal dificultad en este proceso fue la contaminación presentada durante la réplica en el medio. Asimismo, las placas fueron contaminadas con bacterias motivo por el cual se introdujo gentamicina en el medio del hongo. Posteriormente, se observó un crecimiento exitoso. Finalmente, se identificó el ascomiceto antártico a través de procedimientos *in vitro* y se clasificó en base a su morfología (Figura 5).

Figura 5

Caracterización morfológica del microorganismo antártico





Nota: Caracterización morfológica de *Penicillium* sp. (A) Estructura macroscópica del microorganismo (B) Parte trasera de la placa (C) Observación microscópica de conidios (D) Dibujo esquemático modificado de Álvarez y Estévez (2009) y obtenido de www.biorender.com.

Las características morfológicas son determinantes para obtener la taxonomía en hongos. Se pudo observar la morfología del hongo determinando que corresponde a *Penicillium* sp. En A y B se identifica la parte superior y la vista inferior del hongo en la placa, su cuerpo fructífero con un aspecto esponjoso, color verde oscuro y con estructura algodonosa (Pereira et al. 2010). Se apreció colonias aterciopeladas con un reverso de color amarillo coincidiendo con lo planteado por Hemath et al. (2009) en su investigación. La coloración del medio de *Penicillium* sp., se tornó amarilla lo cual se diferencia de las cepas tal como plantea Tuthill et al. (2001) donde la tonalidad del medio se mantuvo.

En el apartado C se aprecia un conjunto de conidios y conidióforos que coincide con lo reportado por Noman et al. (2018). A pesar de la gran cantidad presente, no se observa fiálide al microscopio. Por ende, en la opinión de Molar et al. (2013) la presencia de estas características depende del medio donde se desarrolle el hongo. Ramachandran et al. (2008) deduce que la presencia de conidios revela un micelio en estado adulto. Por otra parte, el indicador usado fue azul de metileno para la observación microscópica. A diferencia de Macias Camacho (2017), quien

aplicó la tinción con azul de lacto fenol. Finalmente, en el apartado D, se presenta un esquema de las partes más importantes en microscopía de *Penicillium* sp.

Las limitaciones más comunes en la caracterización morfológica es la amplia gama de ascomicetos que poseen estructuras superficiales idénticas (Tapia et al. 2008). Identificar sus estructuras asexuales, ramificaciones e irregularidades puede ser una tarea difícil (Álvarez y Estévez, 2009). Esto provoca una confusión al momento de determinar la taxonomía del hongo. Molar et al. (2013) expresa en su trabajo dificultades para clasificar al hongo, debido a una serie de contaminaciones en la placa por ello recomiendan pruebas moleculares para establecer la especie del microorganismo.

4.1.2. Identificación molecular del hongo antártico

Se amplificó la secuencia con cebadores ITS1/ITS4 (Tabla 3) determinando al microorganismo antártico con un 99.06% de identidad (Anexo 2). Dado que el porcentaje de identidad es bajo no se define la especie, pero pertenece al género *Penicillium* sp. (Tabla 4).

Tabla 4

Resumen de la caracterización molecular analizada por IDGEN

Organismo	Longitud (pb)	Fragmento	Identidad (%)	Acceso NCBI
<i>Penicillium</i> sp.	735	ITS1/ITS4	99.06	KU042998.1

Nota: Fuente IDGEN (2019)

La caracterización molecular permite encontrar la especie del microorganismo en estudio, de esta forma, se puede conocer sus propiedades y las condiciones para su desarrollo (Nilsson et al., 2014). En el caso de las investigaciones efectuadas por Flores (2010) para amplificar un hongo utilizó ITS 1 e ITS 2, siendo determinantes para establecer su especie. Por otra parte, en el estudio de Badotti et al. (2017), se aplicó cebadores ITS para regiones específicas como la 5.8s del ADNr, donde se clasificó al hongo. Esto lo ratifica Zapata et al, (2004) en su investigación, donde muchos eucariontes utilizan ITS para identificar especies.

En la presente investigación se utilizaron los cebadores ITS 1 e ITS 4, amplificando un fragmento de 735 pb en la electroforesis (IDGEN, 2019). Este resultado se aproxima ejecutando los datos obtenidos por Molar et al., (2013) quien en su análisis del ADN amplificado obtuvo una longitud de 545 pb. No obstante, a pesar de que su secuencia se inclina a la división *Ascomycota*. Como postula A. Silva (2018), el porcentaje encontrado es menor al límite de identidad (100%) por tal motivo, el análisis bioinformático de especies no es convincente. En igual forma, esta evaluación fue realizada en un laboratorio privado por esta razón no se utilizó otro marcador molecular.

Es importante mencionar que el enfoque principal de este estudio no es determinar su taxonomía a nivel molecular, motivo por el cual se descartó profundizar en la especie. Finalmente, se estableció que el microorganismo antártico corresponde a un *Penicillium* sp, y una vez identificado el hongo, se procedió a investigar las condiciones para efectuar las pruebas bioquímicas.

4.1.3. Identificación bioquímica de hongo antártico

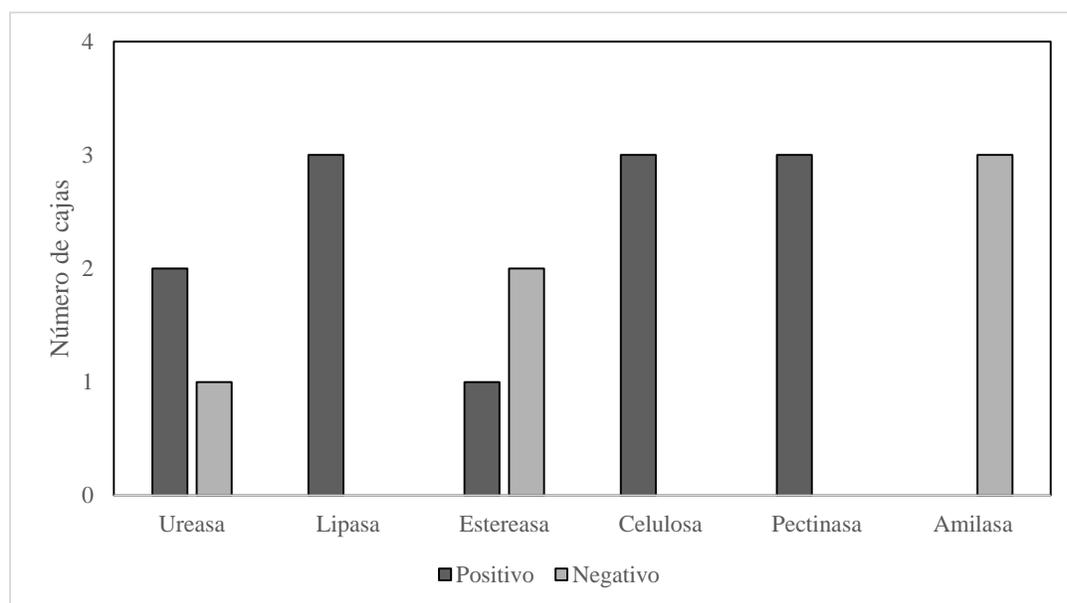
Se procedió a realizar seis pruebas enzimáticas extracelulares donde se determinó la presencia de una enzima específica. En base, se encontró contingencia entre las pruebas realizadas y la cepa seleccionada (Anexo 3); esto quiere decir que el hongo produce únicamente ciertas enzimas ($\chi^2=12.00$; $gl=5$; $p=0.035$). Las enzimas producidas fueron lipasas, celulasas y proteasas, por otra parte, no se encontró producción de amilasas (Figura 6).

Se desplegaron ensayos en medios selectivos para las enzimas del género *Penicillium* sp (Anexo 4). En investigaciones llevadas a cabo por Shivani y Kumar (2015), para efectuar ensayos enzimáticos es necesario un medio específico para que se produzca la reacción de los hongos sobre la placa. Esto lo corrobora Vaughan et al. (2008) en su libro, donde declara que estos ensayos

efectúan un cambio metabólico gracias a las enzimas secretadas por el microorganismo degradando el sustrato, dando como resultado un cambio en el medio de cultivo. Algunos ensayos presentaron un resultado negativo (Figura 6). Esto se debe a varios elementos. Vale la pena mencionar que el más significativo es que el microorganismo no excreta aquellas enzimas (Cujilema Quitio et al., 2018). Desde la perspectiva de Hasan et al. (2013) en su estudio recalcan que se debe a factores ambientales como temperatura 21°C y pH de 6,5.

Figura 6

Resultados correspondientes al microorganismo antártico, en medios de cultivo selectivos.



La ureasa manifestó 2 efectos positivos para *Penicillium* sp., el resultado negativo no presentó cambios en su estructura. Esto se asemeja a la investigación de Crippa et al. (2019) donde la mayoría de microorganismos eucariontes estudiados producen ureasa, sin embargo, cuando las condiciones no son adecuadas la enzima no es secretada. Rivas et al. (2009), para identificar ureasa utilizaron medios selectivos con urea comercial, de esta forma se presenta la enzima en la placa. La información coincide con lo reportado por Vaughan et al. (2008) quienes utilizaron la urea,

logrando secretar la enzima requerida. Loredó y Treviño et al. (2017) comprueban que la enzima con ciertas modificaciones en su medio, es la responsable de la hidrólisis de polímeros, como una herramienta eficaz para degradar materiales sintéticos. Sin embargo, son datos cualitativos, y se necesita profundizar para establecer el periodo donde el hongo alcanza su máxima actividad enzimática.

Diversas investigaciones han demostrado que la mayoría de hongos son productores de lipasas Romero et al. (2017); Bornscheuer (2002); Cujilema et al. (2018). Según los resultados de Rivas et al. (2009) las especies que elaboran la enzima son *Penicillium citrinum* y *Penicillium chrysogenum*. La mayor concentración de lipasas se obtiene con una velocidad de metabolismo y una temperatura específica (Martínez et al., 2019). Se determinó que las lipasas se desarrollan a una temperatura de 25 °C. Esto lo corroboran Macedo y Pio (2005) donde afirman que la máxima producción de la enzima se efectuó a 25 °C..

Las enzimas esterasas tuvieron más resultados negativos en las placas (Figura 6). Esto puede deberse a la falta de nutrientes presentes en el medio. Aguilar (2000) argumenta que cuando no se presenta la actividad extracelular se debe a la falencia de nutrientes en el medio empleado y que en valores cuantitativos su concentración es mínima. Ruiz (2002) en su investigación, utiliza fuentes de carbono con abundante glucosa como la pulpa de remolacha donde obtuvo un rango mínimo de producción. Morell Nápoles et al. (2014) sugieren que para obtener una producción considerable de esterasas se debe realizar en fermentación sólida con un sustrato específico como el bagazo de caña.

La enzima celulosa presenta todos sus resultados positivos (Figura 6). Varios estudios demuestran la actividad de celulosa en hongos (Crippa et al., 2019; Morell Nápoles et al., 2014;

Ramírez y Cocha, 2003). De igual forma que las lipasas, la especie que elabora la enzima es *Penicillium chrysogenum*. Se puede identificar la especie de *Penicillium* sp.

Vázquez Montoya et al. (2020) sugieren se desarrolle la actividad enzimática en fermentación sumergida utilizando carboximetilcelulosa a temperatura ambiente para obtener mejores resultados. No obstante, otros autores como Dary et al., (2012) han estudiado el efecto de añadir otro tipo de sustratos como residuos agroindustriales obteniendo buenos resultados. Bae y Shoda, (2005) quienes estudiaron el efecto de incrementar los polisacáridos dentro del medio mineral, afirman que se reduce el riesgo de producir otro compuesto pues los polisacáridos solubles inducen la producción de celulosa.

Existe actividad pectinasa en todas las pruebas (Figura 6). En estudios elaborados por Crippa et al. (2019) establecen que el ensayo enzimático puede ser efectuado tanto en bacterias como en hongos. Este resultado permite evidenciar que la enzima reacciona eficiente frente al medio (Vaughan et al., 2008). Barragán et al. (2014) afirman que se obtienen mejores resultados de extracto crudo de la enzima a una temperatura de 6,5 a 35 °C y un pH de 6,5 y 8,5. Silva et al. (2004) sugieren realizar la ultrafijación en la fermentación sumergida tomando en cuenta las limitantes mencionadas, adicionando el tiempo de exposición en el reactor como un restrictivo en la producción de pectinasa.

Se evaluó que no existen amilasas por parte de *Penicillium* sp., (Figura 6). Esto se debe a que la producción de amilasa se desarrolla bajo ciertas condiciones específicas de temperatura y pH (Garza et al., 2011). Crippa et al. (2019) afirma que para obtener amilasas, disminuyeron el pH con HCl porque un elevado pH limita la producción enzimática. Los resultados de la investigación se efectuaron a una temperatura de 25 °C. Esto coincide con lo logrado por Mahapatra y Banerjee (2012) quienes sugieren mantener el ensayo a una temperatura ambiente.

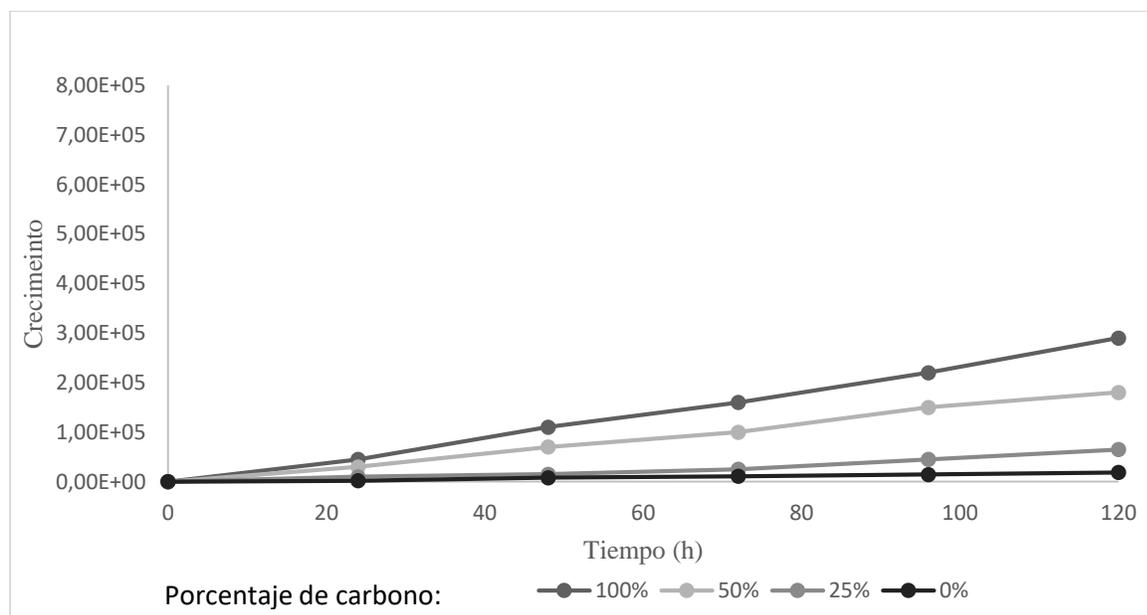
4.2. Análisis de parámetros involucrados en la degradación de residuo sintético

4.2.1. Evaluación del crecimiento fúngico en medios estandarizados

Se evaluó el crecimiento del hongo a distintas concentraciones de carbono (figura 7). Se apreció los principales resultados a las 120 horas, como era de esperarse el mejor rendimiento es con el porcentaje de carbono al 100%. Sin embargo, a pesar de las limitaciones nutricionales en el medio se observó que existe un leve desarrollo del microorganismo. Finalmente, se efectuó un ANOVA con una significancia de 5%. Se hallaron diferencias significativas en el crecimiento del ascomiceto con respecto al medio ($\varepsilon = 5,77E + 11$; $gl=1$; $p= 0,02$).

Figura 7

Cinética de crecimiento del microorganismo con diferentes porcentajes de carbono



Se encontró que el porcentaje menor se ve influenciado por retirar el carbono del medio (Figura 7). Se valoró los resultados de Koul y Singh (2017) donde presentan que estadísticamente el crecimiento del hongo con bajas proporciones de carbono disminuye el periodo de crecimiento (Anexo 5) y como era de esperar, se manifiesta un comportamiento similar en los reportes de Leal

et al. (2010) donde argumentan que el efecto de la fuente de carbono del medio es relacionado con el nivel de nitrógeno presente, por esta razón, la producción de conidios es proporcional a la relación carbono-nitrógeno utilizado en fermentación. En definitiva se determina que el hongo se desarrolla sin fuente de carbono pero lentamente.

4.2.2. Tratamiento de envejecimiento térmico estandarizado

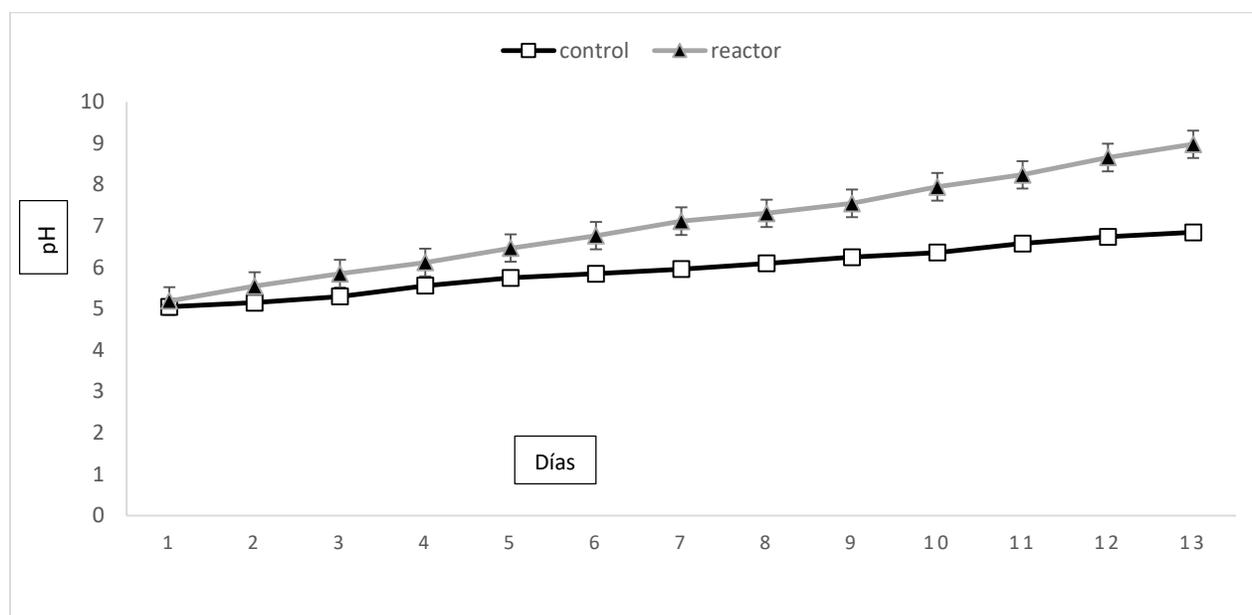
Mejias et al. (2010) mencionan que la estructura de los polímeros se modifica dependiendo de las condiciones aplicadas al residuo durante el tratamiento. Al incrementar la temperatura este puede descomponerse y permitir que el microorganismo lo asimile como fuente de carbono en menor tiempo (Gu, 2003). El procedimiento fue estandarizado de Espinoza, (2018) debido al periodo de calor, maquinaria y el lapso de tiempo que necesita. Los recortes de plástico se contrajeron, otorgando un aspecto inconsistente y arrugado.

4.2.3. Análisis de factores físicos durante la fermentación

Se encontró contingencia en los datos de pH obtenidos de *Penicillium* sp., en la fermentación ($\chi^2 = 3.0$; gl = 1; p = 0,025). Por otro lado, se evaluó los valores determinando que se aproximan entre el control y el reactor en los primeros días (Figura 8). La información coincide con Pereira et al. (2007) donde enfatiza que el pH inicial se encuentra en su punto menor debido a que el microorganismo aún no asimila los nutrientes proporcionados.

Figura 8

Variación de pH del medio durante la fermentación



Por otro lado, a partir del día 6 se aprecia una tendencia en el reactor como lo reportado por Yuzbashev et al. (2010) que en condiciones aerobias se producen metabolitos secundarios que intensifican el pH. Otro factor a tomar en cuenta es la dependencia del pH con respecto al sustrato (Figura 8) como describe Puerta (2012) quien sugiere que se establezca un medio de cultivo eficiente para el desarrollo del microorganismo o la producción de un metabolito específico

Por otra parte, el medio de cultivo es una variable importante en la fermentación. Como se examinó en la figura 8, los minerales del medio son importantes para el crecimiento del hongo (Bornscheuer, 2002; D'Annibale et al., 2006). Los microorganismos necesitan desarrollarse y producir metabolitos secundarios mediante la asimilación de un sustrato específico (Tabla 2). Se observó una turbidez en el medio del reactor, pero aunque presente esta característica no significa que el hongo acepta al residuo como su fuente de nutriente (Espinoza, 2018; Leal et al., 2010; Urbanek et al., 2018).

Cuando se extrajo el material sintético, se pudo examinar una cantidad de biomasa en el medio y las muestras. Al detener la agitación, se acumulan los sedimentos en el fondo del medio (Rietl et al., 2016). Aquellas observaciones concuerdan con Espinoza, (2018) donde se apreció un cambio en la estructura del polímero y también en el medio. Todas estas variables se observaron en los reactores de degradación, sin embargo, las del control no presentaron una turbidez significativa.

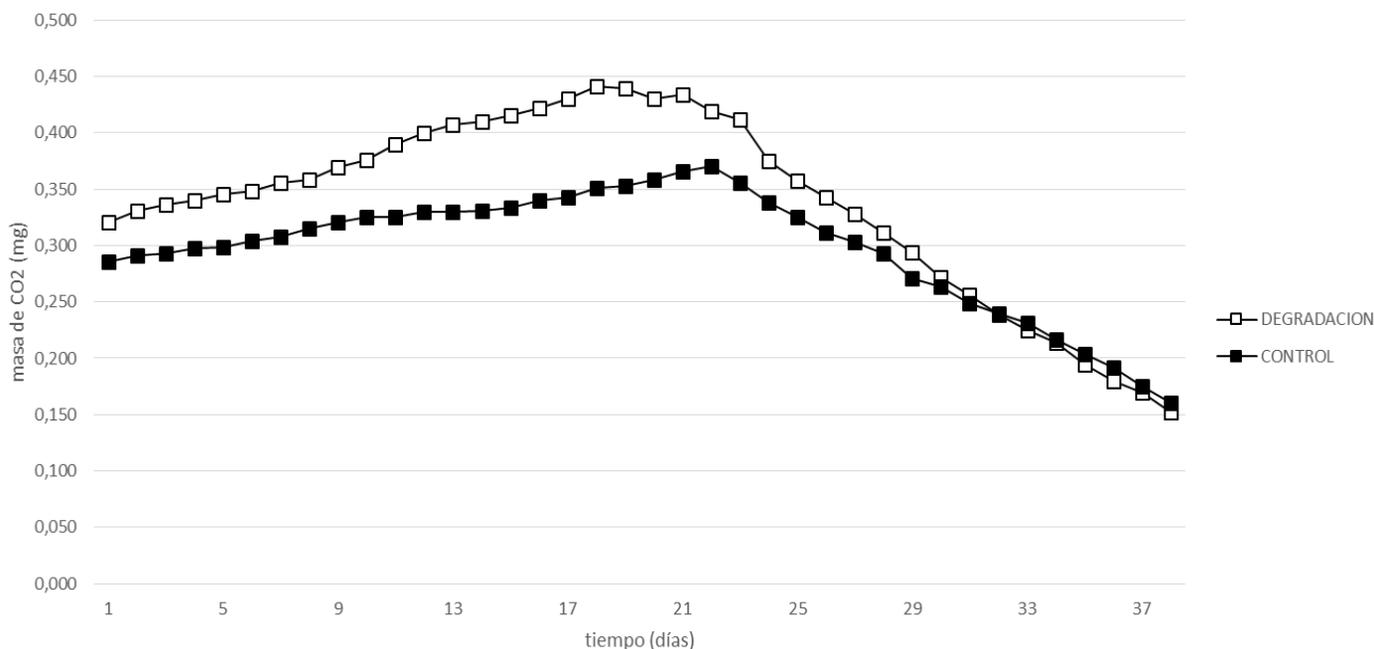
Se controló la temperatura ambiente con un compartimiento donde se mantuvo los reactores a 25 °C. Parra et al. (2019); Romero et al. (2017) argumentan que una temperatura ideal permite el crecimiento óptimo de los microorganismos. Para producir ciertos tipos de metabolitos y generar actividad enzimática el rango de este parámetro oscile entre 25 a 40 °C (Puerta, 2012). Los valores no pueden disminuir de los límites debido a que el hongo se manifiesta en ambientes con cierto grado de humedad.

4.2.4. Cuantificación de CO₂ mediante titulación

La medición de CO₂ demostró que no existieron diferencias entre la degradación y el control (figura 9), incluso a pesar de que los cambios observados en el CO₂ tuvieron un crecimiento estándar.

Figura 9

*Análisis de CO₂ entre el control y la degradación con *Penicillium* sp.*



A pesar de que los resultados estadísticos con respecto al potencial degradador del hongo no fueron los esperados (Anexo 4), debido a que la oscilación ente el ensayo y el control fue mínima, no hubo diferencias significativas. Sin embargo, la importancia del microorganismo radica en su rápido crecimiento y en su producción de enzimas de las cuales destacan principalmente las lipasas cuya exhibición tanto en placas Petri como en el medio fue evidente. En la bibliografía revisada se establece que poseen una gran importancia industrial (Aceves y Castañeda, 2012).

Aquellos microorganismos con un alto potencial para sintetizar enzimas son imprescindibles porque son aprovechados por las industrias y a su vez pueden ser extraídos en las mismas zonas donde fueron ubicados. De hecho, la principal ventaja de ellas es que contribuye al proceso de economía circular (Valencia, 2021). Esto lo efectúa aprovechando los residuos generados por las agroindustrias introduciéndolos como nutriente para el desarrollo de un microorganismo específico, dando como resultado una disminución significativa en los desechos. Esto lo corrobora Castañeda (2012), extrajo microorganismos con actividad enzimática y los

utilizó para degradar residuos agroindustriales como el bagazo de caña generando una alternativa más eficaz y sostenible a las químicas comúnmente usados para erradicar el residuo.

4.3. Análisis del escenario para el aprovechamiento del microorganismo

En el estado ecuatoriano existen empresas que se dedican mayoritariamente a la importación de productos para implementarlos en alimentos, tratamientos de aguas, síntesis de ésteres, hidrólisis de grasas para fabricar detergentes, etc., (Castañeda y Aceves, 2012). Además, las enzimas que produce el hongo antártico estudiado, son pocas las aplicaciones que presentan ventajas en la industria dentro del territorio ecuatoriano. Por ello, se realizó un enfoque teórico sobre los mecanismos de operación, mercado, entidades financieras, aspectos jurídicos y la sostenibilidad de la empresa en el Ecuador.

Con los resultados obtenidos en el apartado 4.1.3 se concretaba que la enzima cuya actividad extracelular es significativa y se encuentran presentes en el microorganismo antártico son las Lipasas. A continuación, se detalla los pasos para la obtención de enzima lipasa por medio del hongo *Penicillium* sp. A partir de una evaluación a escala laboratorio se identificaron los equipos, bioprocesos y procedimientos legales involucrados en su producción. Las lipasas (EC 3.1.1.3: triacilglicerol acil hidrolasas) son moléculas que pertenecen al grupo de enzimas cuya importancia radica en su potencial como biocatalizador el cual permite su uso en diferentes campos industriales (Moreno Perez, 2015; Paz y Garcia, 2017). De hecho, gracias a sus condiciones controlables y gran demanda en la elaboración de productos por medio de sistemas naturales, son considerados relevantes en el mercado mundial como aditivos alimentarios, saborizantes, medicamentos, fabricación de compuestos tenso activos, entre otros (Burkert et al., 2004; Diez y Sandoval, 2012; Raveendran et al., 2018; Sharma et al., 2009).

4.3.1. Comercio de lipasas

Hoy en día se comercializa 200 clases de 4000 enzimas conocidas (Lascano, 2018). No obstante, el costo de los bioprocesos involucrados en purificación e inmovilización se acercan al 80% del valor total obtenido (Eby y Peretti, 2015). Dado que los valores limitan su ejecución comercial, solo el 5% se logra producir a escala industrial. Esto se puede notar en la producción de enzimas a nivel mundial la cual es inducida por compañías donde se manipula genéticamente las moléculas como por ejemplo en USA, Holanda, Dinamarca, Suiza, etc. (Tabla 5) (S. Li et al., 2012; Paz y Garcia, 2017).

Tabla 5

Aplicaciones industriales de lipasas

Industria	Aplicación	Producto	Compañía	Referencia
Farmacéutica	Hidrólisis	Ayudantes digestivos	Novozymes	(Brown et al., 2013)
Alimentos	Optimizar la calidad y utilidad del producto	Inductor de sabores en alimentos tanto sólidos y líquidos.	Amano	(Amano Enzyme, 2021; Houde et al., 2004)
Detergentes	Hidrolisis de grasas	Erradicación de manchas en tejidos y síntesis de compuestos orgánicos.	Mannheim	(Monteiro et al., 2021; Paz y Garcia, 2017)
Química	Síntesis de compuestos	Oleo químicos e hidratantes.	Biocatalysts	(Kartal y Kilinc, 2012)

Modificado de (Divakar, 2013).

4.3.2. Perspectiva del emprendedor

Toda microempresa necesita de un capital circulante, en el Ecuador la creación de una empresa con fines de producción de enzimas para uso industrial debe cubrir las necesidades primordiales y recuperar lo invertido al final del proceso (Pérez y Pérez, 2006). Se indagó entidades financieras que faciliten préstamos a crédito con una tasa de interés muy baja. Aquellas

instituciones bancarias que ofertan créditos en el Ecuador requieren cierto tipo de documentos para realizar los trámites correspondientes (Mora, 2018).

Para obtener el capital, el solicitante debe cumplir ciertos términos legales. Como por ejemplo, encontrarse adjunto a algún sector económico, de bienes o servicios. También debe ser una persona natural o jurídica cuyas actividades sean públicas y comprobadas mediante el Servicio de Rentas Internas. Al respecto conviene decir que ser calificado y etiquetado como un emprendedor legible es un paso muy importante debido a que aumentará el rango de crédito a solicitar. Finalmente, para obtener el préstamo es necesario efectuar la documentación correspondiente en algún establecimiento financiero nacional (Arcos, 2016).

4.3.3. Inoculación previa a la producción de lipasas

El estudio a escala laboratorio con la inoculación de *Penicillium* sp., a volúmenes iniciales de 100, 250 y 1000 ml, es esencial para comprender los parámetros iniciales en la obtención de enzimas a nivel industrial (Leal et al., 2010; Y. Li et al., 2019). En primer lugar un escalado empieza con 0.1 a 1m³, a continuación 1 a 10 m³ y finalmente 10 a 100 m³ con un inóculo de 2-20% (v/v). Posterior, se identifican los métodos necesarios para la producción de lipasas los cuales se dividen en: pretratamientos, fermentación y obtención de enzimas (Alcivar et al., 2020).

4.3.4. Microorganismos productores de lipasas

Mediante una extensa revisión bibliográfica se comparó el resultado de lipasas obtenidas por varios microorganismos en diferentes sustratos, incorporando otros nutrientes al medio (Tabla 6). Se identificó los aditivos y factores que inducen la producción de enzimas. No obstante, el uso de los agregados en la industria corresponde a una pérdida económica. Como asegura Alcivar et al. (2020), al añadir otros componentes como el aceite de oliva al sustrato puede perjudicar la operación contaminando el sustrato tratado, aunque en la investigación efectuada por Aceves y

Castañeda (2012), ratifican que los elementos extras son conocidos como inductores que permiten el desarrollo del microorganismo en residuos agroindustriales.

Tabla 6

Microorganismos involucrados en la producción de lipasas

Microorganismos	Sustratos	Máximo rendimiento enzimático	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Aceite de coco	1934 U/g	(Kunamneni et al., 2015)
	Residuos de frijol		(Brooks y Asamudo, 2011)
<i>Cándida cylindracea</i>	Aceite de oliva	14,4 U /ml	
	Residuos caña	9,23 U/ml	(D'Annibale et al., 2006)
<i>Penicillium sp</i>	Aceite de oliva	22,82 U /ml	
	4-Nitrofenilo		(Pandey et al., 2016)
<i>Pseudomonas</i>	n-alcano	25 U/ml	(Kanwar et al., 2002)
<i>Botryosphaeria ribis</i>	Aceite de soja	105,6 U/mg	(Messias et al., 2009)

4.3.5. Residuos agroindustriales en Imbabura

A pesar de que en Imbabura se producen diferentes tipos de sustratos agroindustriales, es sustancial conocer que los cultivos con mayor producción en la provincia son el tomate de árbol y la caña de azúcar. Sin embargo el tomate de árbol no genera tantos desechos como la caña (ESPAC, 2014). De hecho, aquellos productos derivados de la caña conocidos como bagazo no son aprovechados, provocando daños al ambiente con su acumulación.

Es importante mencionar que la ubicación para la industria fabricante de lipasas se situaría en el cantón Urcuquí, debido a que en aquel sector existen amplios terrenos con cultivos de tomate, frejol y caña de azúcar que conciernen a la familia del autor. Adicional a ello, la organización se encuentra cercano al depósito de bagazo de caña presente en el ingenio azucarero IANCEM donde

analizan la biomasa residual para diferentes actividades como combustión, bioetanol y energía (Quinteros, 2020). Se establece al bagazo como sustrato agroindustrial para la obtención de lipasas (Pineda et al., 2015). Lo anterior no quiere decir que se requiera de un simple sustrato para fabricar lipasas, al contrario, necesitan de otras materias primas y vitaminas, como el fosfato di potásico, sulfato de magnesio y nitratos en diferentes bioprocesos.

4.3.6. Fermentación

El microorganismo *Penicillium* sp., fue seleccionado por su facilidad de proliferar en diversos sustratos y adicional es un buen productor de lipasas (Crippa et al., 2019). Al contrario de lo redactado por Paz y Garcia (2017), quienes refutan con sus resultados que *Aspergillus niger*, es mejor productor de lipasas pero en operaciones a escalada laboratorio. A pesar de ello, se aplica la fermentación sumergida en un reactor fed-batch de 10 L con escenarios específicos (Tabla 7). De hecho, este proceso es más recomendado para bacterias que hongos, sin embargo Cueto et al. (2014), arguye que se elige el método para obtener un mejor producto mediante filtración de biomasa. Incluso puede añadirse lo citado en varias investigaciones que utilizan la fermentación para aumentar el rendimiento y producto final de la enzima sin la influencia de inductores (Dary et al., 2012; R. González, 2018).

Tabla 7

Variables operativas presentes en la producción de lipasas a escala laboratorio

Variables	Influencia	Nivel límite	Nivel óptimo	Nivel límite
pH	Desnaturalización	8	9 ± 0.5	10
Temperatura (°C)	de la enzima si no	10	25±5	35
Tiempo de incubación (h)	es examinada adecuadamente	12	24	36

Adaptado de Sharma et al. (2009).

En estudios llevados a cabo por Brooks y Asamudo (2011); Kunamneni et al. (2015); Pandey et al. (2016), argumentan que los factores señalados anteriormente son críticos y comprometen el escenario porque cualquier modificación en ellos perjudica el desarrollo del microorganismo y por ende la obtención del producto (Romero et al., 2017). En consecuencia, es necesario seguir una serie de operaciones para su correcta obtención (figura 10).

Figura 10

Bioprocesos para la obtención de enzimas

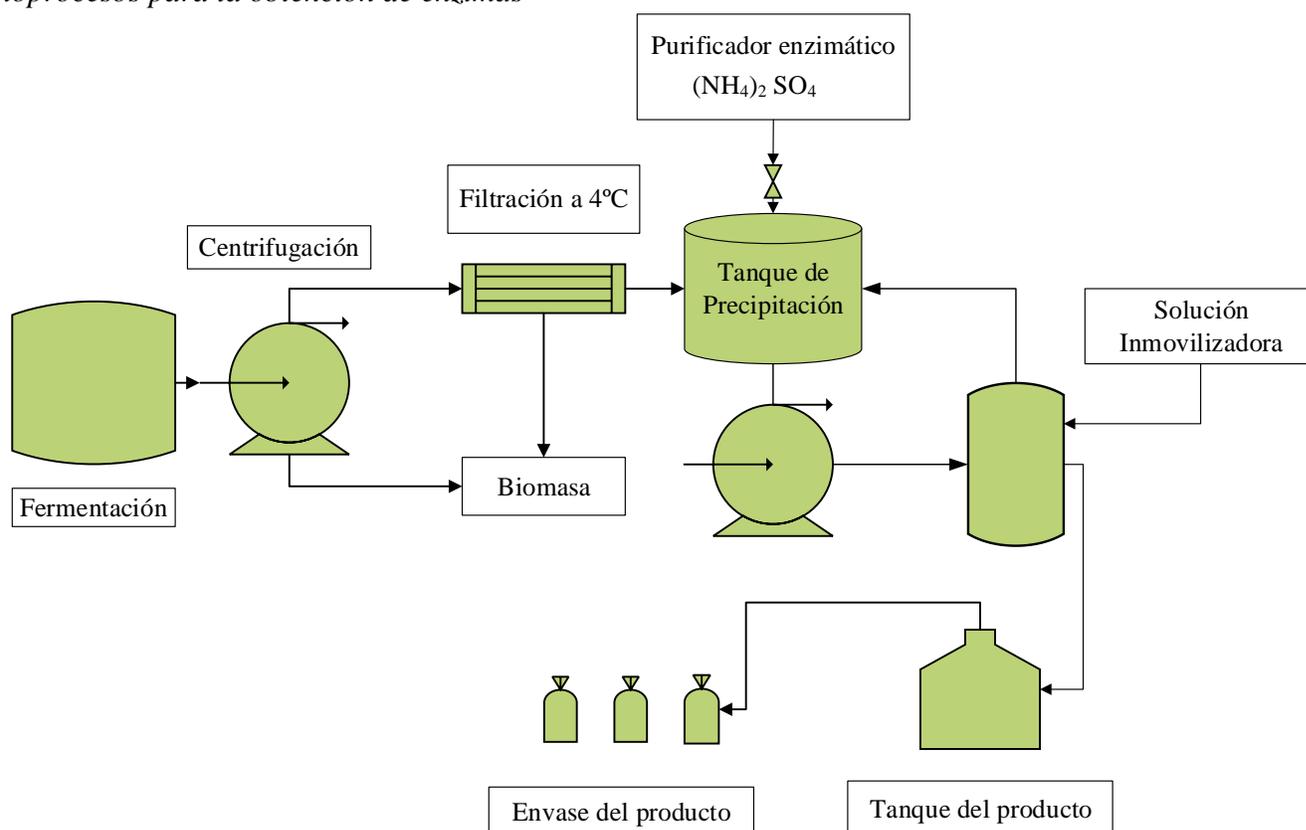


Figura 10. Proceso general para la creación de lipasas a partir de la fermentación.

La operación fed-batch tuvo mayor duración por las transformaciones que emplea. Para el correcto funcionamiento se mantiene en constante adición el aditivo mencionado anteriormente ($q=0.1$ g ácido oleico/(tiempo de fermentación)) con una biomasa final de 8g/L y una concentración de proteína correspondiente a rangos de 60 -100 $\mu\text{g/mL}$ (Moreno Perez, 2015). El

nutriente es clave ya que como afirman Paz y Garcia (2017), en la dosificación de fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio con 2% (p/v) el contenido total de lipasa obtenga un 10% excediendo al de otras investigaciones como Loredo y Treviño et al. (2017), donde aseguran tiene un incremento de 6-8 % de enzima con respecto a la proteína total.

Es importante mencionar que en el proceso se eliminan un 90% de la biomasa del medio, se ejecuta una centrifugación donde a 3500 rpm por 10 min y la filtración a 2° C permiten la obtención de un producto puro (Diorio et al., 2003). Paz y Garcia (2017), afirman que el cambio en la temperatura influye no solo en la inhibición, también puede provocar una desnaturalización parcial de lipasas.

Antes de obtener el producto final es necesario inmovilizar la enzima con alginato para poder reutilizarla (Figura 10). Asimismo, un lavado con hipoclorito de sodio al 5% permite que la enzima inmovilizada pueda pasar a distribuirse sin la necesidad de una filtración, al contrario de lo que consideran Silva et al. (2004), debe aplicarse un lavado y secado para eliminar sustancias comprometedoras con el rendimiento del producto.

Se necesita que el producto se encuentre libre de otras sustancias para la verificación de lipasas. El proceso puede ser efectuado por espectrofotometría donde se aplica la titulación en el medio con soluciones de NaOH a 0.05 N y HCl N.

El análisis de varianza de una vía (ANOVA) de diseño completamente al azar con un nivel de significancia de 5% ($p = 0.05$) determina el mejor rendimiento de lipasas. Lo cual coincide con los estudios de Sharma et al. (2009), presentando una producción máxima de las enzimas en un rango pH de 9 ± 0.5 y a una temperatura ambiente, en la región Sierra del Ecuador. Finalmente se etiqueta y almacena el producto en depósitos con completa oscuridad entre los 10-20° C en ambientes secos y frescos (Paz y Garcia, 2017).

4.3.7. Implicaciones legales y ambientales sobre productos biotecnológicos en el Ecuador

El desarrollo de productos biotecnológicos en el país ha arribado como una estrategia en la matriz productiva. Se afirma que, con el fin de promover la investigación en diferentes campos se definieron las condiciones y límites para el manejo de recursos de acuerdo a lo redactado en la constitución (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

Como lo menciona la constitución en el Art.15. Uso de Tecnologías limpias y no contaminantes. “El Estado inducirá, al sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho” (Constitución de la República del Ecuador, 2008). En efecto, se establecen las limitantes ambientales para que el paradero de desechos en las industrias no perjudique los recursos naturales.

Igualmente con respecto al área de trabajo se observa lo decretado en el Art. 319.- “Se reconocen diversas formas de organización de la producción en la economía, entre otras las comunitarias, cooperativas, empresariales públicas o privadas, asociativas, familiares, domésticas, autónomas y mixtas” (Constitución de la República del Ecuador, 2008). De esta manera, se define el bien de la población y su entorno, no obstante las personas naturales pueden ser parte del personal en la industria generando y garantizando el empleo.

4.3.8. Manejo del impacto ambiental en el Ecuador

En los últimos años, la biotecnología ha intentado surgir como un método para el desarrollo de la investigación en nuestro país. Sin embargo, los lineamientos presentes en la legislación ecuatoriana así como también los tratados internacionales dan prioridad al ambiente y su biodiversidad (Tabla 8). Se enfatiza en la correcta manipulación de recursos biológicos y

genéticos teniendo en cuenta las normas manifestadas en la ley sobre prohibiciones en el campo industrial.

El Ecuador mediante sus entidades como el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) junto con otras organizaciones adscritas como el Instituto nacional de Biodiversidad y el Ministerio de Ambiente, definen las bases para empresas públicas o privadas con normas creadas a través del Decreto Ejecutivo No. 245 en el cual se transmite lo siguiente:

Tabla 8

Resumen de los lineamientos emitidos por organizaciones ecuatorianas

Entidad	Artículos	Decretos	Referencia
COA	Art. 4 Art. 5 Art. 64 Art. 259 Art. 285 Art. 290	Aunque se promueve el establecimiento de entidades óptimas para el desarrollo de productos y también que se ampare la integridad del Ecuador, aun así, en lo estipulado en el artículo 73 se restringe actividades o establecimientos que perjudiquen la biodiversidad y al ecosistema a través de maquinarias o subproductos.	(Código Orgánico del Ambiente, 2017)
COES	Art. 8 Art. 19 Art. 68 Art. 70	El ente principal otorga los permisos con respecto al desarrollo de productos en conjunto con la autoridad ambiental nacional. No obstante, es aplicado un impuesto económico equivalente al porcentaje de ingresos obtenidos para garantizar los derechos de la naturaleza en investigaciones.	(Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos Creatividad e Innovación, 2016)

CRE	Art. 15 Art. 264 Art. 387 Art. 396 Art. 397	Se prohíbe todo tipo de producto o servicio que atente contra la soberanía del ecosistema. Además, se implementará las sanciones judiciales correspondientes por perjuicios. De hecho, los costos atribuidos a los daños ambientales son extravagantes. Por este motivo, se busca fomentar programas de investigación bioéticos que cumplan con los estatutos estipulados anteriormente.	(Constitución de la República del Ecuador, 2008).
-----	---	--	---

Debido a las exigentes reglas ejecutivas la biotecnología cuyo fin es fomentar la investigación en el ámbito económico, social, salud y ambiental es detenida por la población y el estado con el fin de conservar la biodiversidad (MAE, 2015). Como si fuera poco, un factor clave de los reglamentos es el desconocimiento que obstaculiza el desarrollo de la biotecnología en el país y nos diferencia de otros países en los campos mencionados.

4.3.9. Control de desechos y riesgos en el ambiente de trabajo

Comprender los riesgos de manipular microorganismos o elementos cuyo contacto es propenso a transmitir enfermedades es importante cuando no se implementa las normas y herramientas de seguridad adecuadas (Bejarano, 2015). Como se menciona en el Art. 66. “Los riesgos biológicos, dicta que todo trabajador expuesto a virus, hongos, bacterias, insectos, ofidios, microorganismos, etc., nocivos para la salud, deberán ser protegidos en la forma indicada por la ciencia médica y la técnica en general. Con respecto a la provisión de suero antiofídico, se lo aplicará con lo dispuesto en el Art. 424 (435) del Código del Trabajo” (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

Al usar maquinaria u otras herramientas complejas, todo el personal debe ser capacitado únicamente por profesionales en el área para un adecuado manejo de equipos y la correcta gestión de sus subproductos debido a que también poseen cierto grado de peligro. La gestión de desechos peligrosos es evaluada por la normativa ambiental No.061 (2015) donde priorizan la sustancia por su magnitud y con base en ello, determinan el paradero final de éste.

4.3.10. Gestión de productos en el sistema ecuatoriano de calidad

La gestión de la calidad en Ecuador avala la inocuidad de los servicios y productos mediante el acatamiento de tareas garantizando que los requisitos de calidad del producto trabajado por auditores, normas ISO, ARCSA y buenas prácticas de manufactura (BPM) sea aprobado a través de un certificado (Muñoz, 2017). De hecho, es importante mencionar que en el sector pueden ejercer su perfil profesional técnicos en biotecnología y gestión ambiental que valúen la calidad del bien y servicio, impulsando su productividad, así como también el bienestar de los consumidores (ARCSA, 2018).

El MIPRO como organismo que dirige el sistema de la calidad nacional, podrá ejecutar e implementar políticas, donde con obligatoriedad se ejecuten las destrezas emanadas del Comité Interministerial de la Calidad y velar por la gestión del Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE), Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), del Organismo Oficial de Notificación y de las entidades e instituciones públicas que, en función de sus competencias, tienen la capacidad de expedir normas, reglamentos técnicos y procedimientos de evaluación de la conformidad (Ministerio de Industrias y Productividad, 2014).

El análisis de documentos normativos que involucran temas de comercialización en el Ecuador es sumamente importante debido a la elaboración de escritos reglamentarios se garantiza el adecuado control, calidad y seguridad desde su producción hasta su comercialización. A pesar

de la demanda mundial de enzimas que buscan mejorar la calidad de vida, países latinoamericanos como Ecuador sufren del robo de conocimiento y recursos que perjudican al ecosistema (Espinoza, 2018; Lascano, 2018). La incorporación de normativas en la constitución del Ecuador respalda la conservación de la biodiversidad y contribuyen a ejercer la bioética en el área industrial. No obstante, el peyorativo manejo de lineamientos regulares, limita los diferentes campos de investigación biotecnológica en el país.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El microorganismo antártico fue identificado mediante técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares como *Penicillium* sp con un porcentaje de identidad del 99,06%.

La caracterización bioquímica encontró contingencia entre las pruebas cualitativas realizadas con un p valor menor al de significancia ($p=0.035$), dando como resultado la presencia de ciertas enzimas al identificar el hongo antártico.

La estructura del polímero sintético no tuvo deformaciones luego de efectuar el envejecimiento térmico a 50°C por 96 horas.

Luego de la fase de experimentación no se pudo demostrar cuantitativamente que el hongo antártico tiene potencial degradador de residuos sólidos debido a que no son significativamente diferentes ($F=6,393$), no obstante, se encontró evidencia en el medio de cultivo sobre la actividad metabólica del hongo, formación de hifas, turbidez y aroma, los cuales pueden servir para futuras investigaciones.

La fermentación a los 37 días permitió observar metabolitos secundarios en el medio los cuales pueden ser punto de partida para otros trabajos que efectúen metodologías con base en reactores, metabolismo y obtención de biomasa.

A pesar de las limitaciones legales, los datos recolectados en el escenario teórico enfocan la implementación de una industria productora de lipasas y sus derivados en la provincia de Imbabura en varios años, debido a que el Ecuador se encuentra en vías de desarrollo y no posee

la misma vanguardia tecnológica que países como Estados Unidos donde tienen acceso a maquinarias y productos que no se fabrican actualmente en nuestro país.

5.2 Recomendaciones

En el caso de caracterizar bioquímicamente un microorganismo de preferencia elegir un procarionte, por la facilidad de obtención y la cantidad de ensayos existentes.

En caso de efectuar un envejecimiento térmico, se recomienda incrementar la temperatura (200 °C) y el periodo de prórroga (20 días).

Es importante realizar un análisis enzimático cuantitativo para evaluar la productividad de lipasas con respecto a otras cepas comerciales.

Se sugiere investigar las rutas metabólicas del microorganismo y de los genes que participan para detectarlos molecularmente.

Prolongar el tiempo de fermentación en el reactor con el propósito de identificar cambios en el medio, biomasa, sustrato y también para que el microorganismo en estudio asimile los nutrientes.

La técnica de respirometría no es la única para evaluar la masa de CO₂, se sugiere realizar más estudios para evaluar la degradación como la observación de la superficie del polímero con microscopia de barrido y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier que evalúa grupos funcionales presentes en la muestra.

Profundizar en la clasificación de taxonomía hasta especies, con primers ITS 1 e ITS2 para identificar a *Penicillium* sp.

Se recomienda realizar muestreos en otros ecosistemas para comparar rendimientos de CO₂, biomasa y fuentes de carbono con la cepa investigada.

Para futuras investigaciones se sugiere implementar un micro ensayo de los bioprocesos para la obtención de lipasas, ajustando los datos del purificador, filtrador, centrifuga y fermentación a escala laboratorio.

En el apartado teórico identificar factores ambientales que beneficien los bioprocesos involucrados en la producción de lipasas.

Establecer un análisis de mercado para el correcto funcionamiento de la empresa tomando en cuenta otros aspectos importantes como la matriz productiva, proveedores, competencia, talento humano y maquinaria.

REFERENCIAS

- Aceves, A. E., y Castañeda, L. M. (2012). Biotechnological production of microbial lipases, a sustainable alternative to the use of agro-industrial wastes. *Vitae*, 19(3), 244–247.
<https://www.redalyc.org/pdf/1698/169825291001.pdf>
- Aguilar, A. (2000). *Estudio de expresión de la actividad xilanolítica de Penicillium sp. CGECCR en bagazo de caña de azúcar y pulpa de café.*
- Akhtar, S., Siddiqui, M. H., y Sayeed, U. (2016). Role of microbes in degradation of synthetic plastics and manufacture of bioplastics. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, August.
- Alcivar, A., Menendes, F., Rodrigue, J., Gómez, Y., y Rosero, A. (2020). *EVALUACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS DE RESIDUALES SÓLIDOS DEL BENEFICIO DE CAFÉ PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS*. 5(3), 55–72. <https://doi.org/10.33936/rev>
- Almuzara, M. N., Mier, C. D. E., Rodríguez, C. R., Famiglietti, A. M. R., y Vay, C. A. (2006). Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*, 197–201.
<https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016794003.pdf>
- Álvarez, B. P., y Estévez, C. V. (2009). Técnicas básicas de microbiología. Observación de hongos filamentosos. *REDUCA (Biología)*, 2(4), 1–15.
<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/800/816>
- Amano Enzyme. (2021). *Aplicaciones de enzimas*. https://www.amano-enzyme.com/es/?s=lipaseypost_type%5B0%5D=postypost_type%5B1%5D=pageyfs=1

- Anderson, I. C., Campbell, C. D., y Prosser, J. I. (2003). Potential bias of fungal 18s rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, 5(1), 36–47.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00383.x>
- Arandes, J., Bilbao, J., y López, D. (2004). Reciclado de residuos plásticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 3.
- Arcos, E. M. (2016). *FINANCIAMIENTO PARA EMPRENDEDORES Y EMPRESARIOS TERRITORIALES*. www.congope.gob.ec
- ARCSA. (2018). *NORMATIVA DE BUENAS PRACTICAS PARA LABORATORIOS FARMACEUTICOS*. 1–20.
- Bacon Charles. (2018). *Biología de hongos endofíticos de gramíneas - Charles W. Bacon - Google Libros*. Prensa CRC.
https://books.google.com.ec/books?id=fJxGDwAAQBAJydq=obscurity+for+fungiylr=yhl=esysource=gbs_navlinks_s
- Badotti, F., De Oliveira, F. S., Garcia, C. F., Vaz, A. B. M., Fonseca, P. L. C., Nahum, L. A., Oliveira, G., y Góes-Neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*, 17(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>
- Bae, S. O., y Shoda, M. (2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 45–51. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1723-2>
- Bandh, S., Kamili, A., y Ganai, B. (2011). Identification of some *Penicillium* species by traditional approach of morphological observation and culture. *African Journal of*

- Microbiology Research*, 5(21), 3493–3496. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.677>
- Barragán, J. C. A., Zerpa, S. A. I., Castillo, M. L. S., Haro, M. R., Alarcón, W. N., y Gasco, F. O. (2014). Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp. *Revista Rebiol*, 34(1), 33–41.
- Bejarano, M. (2015). “*La Biotecnología Y La Biodiversidad En La Legislación Ambiental Ecuatoriana.*” <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4956/1/T-UCE-0013-Ab-298.pdf>
- Bolaños, H. M., Acuña, M. T., Serrano, A. M., Obando, X., Mairena, H., Cháves, L., Sandí, F., Rodríguez, G., Tamplin, M. L., y Pérez, E. (2004). Desempeño de los sistemas Cholera-SMART® y Pathogen-Detection-Kit® en el diagnóstico rápido del cólera. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 16(4), 233–241.
<https://www.scielosp.org/article/rpsp/2004.v16n4/233-241/>
- Bordese, F. G. (2008). *Develando el Continente Antártico. Introducción a su conocimiento.* (E. P. de A. Ediciones (ed.)).
<https://books.google.com.ec/books?id=mf1YDwAAQBAJyPg=PA67ydq=antártida+microorganismosyhl=esysa=Xyved=2ahUKEwjnmDz4lPnqAhWEm-AKHSz1B28Q6AEwAXoECAYQA#v=onepageyq=antártida+microorganismosyf=false>
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 73–81.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00075-4)
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

- Brooks, A. A., y Asamudo, N. U. (2011). *Lipase production by strains of Aspergillus species isolated from contaminated body creams*. 3(11), 311–316.
- Brown, S. H., Bashkirova, L., Berka, R., Chandler, T., Doty, T., McCall, K., McCulloch, M., McFarland, S., Thompson, S., Yaver, D., y Berry, A. (2013). Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of l-malic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8903–8912. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5132-2>
- Burkert, J. F. M., Maugeri, F., y Rodrigues, M. I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 91(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00152-4)
- Camacho, A., y Fernández, E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología microbiana de los lagos antárticos. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 14(2), 66–78.
<https://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/155>
- Cartaya, O., Reynaldo, I., y Peniche, C. (2009). Polímeros naturales recolectores de iones metálicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(2), 81–94.
- Castañeda, C., Arana-Cuenca, A., Favela-Torres, E., Anducho-Reyes, M. A., González, A. E., y Téllez-Jurado, A. (2018). Xylanase enzymes production by *aspergillus fumigatus* in solid state fermentation and submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 47–61. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Castaneda>
- Castañeda, L., y Aceves, A. (2012). Producción Biotecnológica De Lipasas Microbianas, Una Alternativa Sostenible Para La Utilización De Residuos Agroindustriales. *Vitae*, 19(3).
- Chaves, M. (2001). Sistema de manejo de desechos sólidos en el cantón de san ramón.

InterSedes: Revista de Las Sedes Regionales, 2(2215–2458), 173–187.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=666/66620314>

Chávez, D., Pereira, G., y Machuca, Á. (2009). *Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de Pinus radiata*. 30(1), 4–9.

<https://scielo.conicyt.cl/pdf/bosque/v30n1/art02.pdf>

Chong, C. W., Dunn, M. J., Convey, P., Tan, G. Y. A., Wong, R. C. S., y Tan, I. K. P. (2009).

Environmental influences on bacterial Diversity of soils on Signy Island, maritime antarctic.

Polar Biology, 32(11), 1571–1582. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0656-8>

Ciro, H. J., Rodríguez, M. C., y Castaño, J. L. L. (2011). Secado de Café en Lecho Fijo con

Intermitencia Térmica y Flujo de Aire Pulsado. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 64(2), 6247–6255.

[http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/29417%5Cnfiles/116/37168.](http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/29417%5Cnfiles/116/37168.html%5Cnfiles/115/29417.html)

[html%5Cnfiles/115/29417.html](http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/29417%5Cnfiles/115/29417.html)

Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos Creatividad e Innovación. (2016).

COES.

Código Orgánico del Ambiente. (2017). *COA*. [https://www.ambiente.gob.ec/wp-](https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf)

[content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf](https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf)

Constitución de la República del Ecuador. (2008). *Constitución de la República del Ecuador*. 1–222.

Corsolini, S. (2009). Industrial contaminants in Antarctic biota. *Journal of Chromatography A*,

1216(3), 598–612. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.012>

Coutinho, F. M., Mello, I., y de Santa Maria, L. C. (2003). Polietileno: Principais Tipos,

Propriedades e Aplicações. *Environmental Science and Technology*, 13.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0104-14282003000100005> A

Crippa, A., Bruno, E., Mangiarotti, A. M., y Caretta, G. (2019). Extracellular enzymatic activities of 32 fungal species. *Boletín Micológico*, 3(2).

<https://doi.org/10.22370/bolmicol.1987.3.2.1531>

Cueto et al. (2014). Biocatalizadores : Desarrollo tecnológico de enzimas con beneficios a gran escala. In *Fronteras en Microbiología Aplicada* (Issue December 2016).

Cujilema-quitio, M. C., León-revelo, G., y Porro, M. R. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del pH. *Revista Centro Azúcar*, 45, 1–9.

Cujilema Quitio, M. C., León Revelo, G., Porro, M. R., Taramona Ruiz, L., y Ramos Sanchez, L. B. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del pH. *Revista Centro Azúcar*, 45, 1–9.

[http://centrozucar.uclv.edu.cu/media/articulos/PDF/2018/4/1 Vol. 45 No.4 2018.pdf](http://centrozucar.uclv.edu.cu/media/articulos/PDF/2018/4/1_Vol.45_No.4_2018.pdf)

D'Annibale, A., Sermanni, G. G., Federici, F., y Petruccioli, M. (2006). Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, 97(15), 1828–1833. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.001>

da Silva, T. H., Silva, D. A. S., de Oliveira, F. S., Schaefer, C. E. G. R., Rosa, C. A., y Rosa, L. H. (2020). Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. *Extremophiles*, 24(4), 565–576. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01176-y>

Dary, L., Pineda, C., Alfonso, L., Mesa, C., Arturo, C., y Riascos, M. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307–335. <http://www.eafit.edu.co/ingciencia>

- Demir, N., Acar, J., Sarioglu, K., y Mutlu, M. (2001). Use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 275–280. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00127-8)
- Diorio, L. A., Forchiassin, F., Papinutti, V. L., y Sueldo, D. V. (2003). Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (fungi, ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(1), 11–15.
- Divakar, S. (2013). Enzymatic transformation. In *Springer* (Vol. 44, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0873-0>
- Doaré Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guérin, L., Pernelle, J. J., Ogier, J. C., y Bouix, M. (2006). Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - Potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1340–1350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03030.x>
- Eby, J. M., y Peretti, S. W. (2015). Performance in synthetic applications of a yeast surface display-based biocatalyst. *RSC Advances*, 5(39), 30425–30432. <https://doi.org/10.1039/c5ra04039f>
- Emadian, S. M., Onay, T. T., y Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- ESPAC. (2014). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*, 23.
- Espinoza, L. (2018). *Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos*. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7410/1/139174.pdf>

European Commission DG ENV. (2011). Plastic Waste in the Environment - Final Report. *BIO Intelligence Service*, April, 171.

Flores, E. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *Revista Electrónica y Tecnológica E-Gnosis*, 8(January), 1–12.

Friedl, A. (2016). Downstream process options for the ABE fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(9), 1–5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw073>

García, V., Acuña, J., Vargas, J. A., y García, J. (2006). Calidad bacteriológica y desechos sólidos en cinco ambientes costeros de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 54(1), 35–48. <https://doi.org/10.15517/rbt.v54i1.26828>

Garza, P. M., Konigsberg, M., Saucedo, G., y Loera, O. (2011). Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en repuesta al co 2: Producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*, 45(7), 761–770.

Giselle Morell-Nápoles, M., María, C., Julián-Ricardo, C., Luis, C., y Ramos-Sánchez, B. (2014). *Actualidades de la producción de feruloil esterasa por fermentación en estado sólido Present Times of the Production of Feruloil Esterasa for Solid state Fermentation*. 202–214.

GOMIS, A. M. (2012). *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*. (Universidad de Alicante (ed.)). https://books.google.com.ec/books?id=jxilUUn4_QACydq=polimeros+propiedadesylr=yhl=esysource=gbs_navlinks_s

González, J., Moreno, V., y del Monte Martínez, A. (2010). Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. *Revista*

Colombiana de Biotecnología, 12(1), 113–140.

González, R. (2018). Módulo IV: Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. *Introducción a Los Bioprocesos, Actualizada*.

Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(2), 69–91. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00177-4)

GUEVARA, J. L., QUIJADA, R., SAAVEDRA, P., PALZA, H., y GALLAND, G. B. (2002). ESTUDIO DE LA POLIMERIZACION DE PROPENO UTILIZANDO DIFERENTES CATALIZADORES METALOCENOS. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 47(2), 81–90. <https://doi.org/10.4067/S0366-16442002000200003>

Han, X., Zhou, Z., Mei, X., Ma, Y., y Xie, Z. (2018). Influence of fermentation liquid from waste activated sludge on anoxic/oxic- membrane bioreactor performance: Nitrogen removal, membrane fouling and microbial community. *Bioresource Technology*, 250, 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.090>

Hapuarachchi, S. N. S., Kariyapper, S. R., Gunawardana, M. B. D. M. D., Egodage, S., y Ariyadasa, T. U. (2016). Biodegradation of natural rubber latex by a novel bacterial species isolated from soil. *2nd International Moratuwa Engineering Research Conference, MERCon 2016*, 293–296. <https://doi.org/10.1109/MERCon.2016.7480156>

Hasan, S., Ahmad, A., Purwar, A., Khan, N., Kundan, R., y Gupta, G. (2013). Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*, 9(5), 238–242. <https://doi.org/10.6026/97320630009238>

Hayden, W., Arnott, J., Crawford, R., y Ivanova, E. (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate).

Polymers, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym5010001>

Hazen, T. C., Dubinsky, E. A., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Piceno, Y. M., Singh, N., Jansson, J. K., Probst, A., Borglin, S. E., Fortney, J. L., Stringfellow, W. T., Bill, M., Conrad, M. E., Tom, L. M., Chavarria, K. L., Alusi, T. R., Lamendella, R., Joyner, D. C., Spier, C., ... Mason, O. U. (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, 330(6001), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1195979>

Hemath, N. K. S., Kumar, G., L., K., y Bhaskara, R. K. V. (2009). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research*, 2(6), 161–167.

<http://www.scholarsresearchlibrary.com/abstract/extracellular-biosynthesis-of-silver-nanoparticles-using-the-filamentous-fungus-penicillium-sp-11383.html>

Hernández, A. (2006). *Microbiología Industrial - Google Libros*.

https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdECyhl=esysource=gbs_navlinks_s

Houde, A., Kademi, A., y Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 118(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>

Izzaguirre, I., y Malatoni, G. (2000). Antártida, Descubriendo el Continente Blanco. In *Antártida, Descubriendo el Continente Blanco* (Ilustrada). Editorial Del Nuevo Extremo.

<https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=hxiQLqjcIQ8Cyoi=fndypg=PA13ydq=antártidayots=-xIealyc-yysig=YsWZLZZ4wOus9E0tiN8LCpaLu8Q#v=onepageyq=antártidayf=false>

Jackson, C. R., Tyler, H. L., y Millar, J. J. (2013). Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays.

- Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 80, 1–9. <https://doi.org/10.3791/50399>
- Jalil, M. A., Mian, M. N., y Rahman, M. K. (2013). Using Plastic Bags and Its Damaging Impact on Environment and Agriculture: An Alternative Proposal. *International Journal of Learning and Development*, 3(4), 1. <https://doi.org/10.5296/ijld.v3i4.4137>
- Jambeck, J. R., Ji, Q., Zhang, Y.-G., Liu, D., Grossnickle, D. M., y Luo, Z.-X. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 764–768. <https://doi.org/10.1126/science.1260879>
- Ji, M., van Dorst, J., Bissett, A., Brown, M. V., Palmer, A. S., Snape, I., Siciliano, S. D., y Ferrari, B. C. (2016). Microbial diversity at Mitchell Peninsula, Eastern Antarctica: a potential biodiversity “hotspot.” *Polar Biology*, 39(2), 237–249. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1776-y>
- Kanwar, L., Gogoi, B. K., y Goswami, P. (2002). Production of a Pseudomonas lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, 84(3), 207–211. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00061-5)
- Kartal, F., y Kilinc, A. (2012). Crosslinked aggregates of Rhizopus oryzae lipase as industrial biocatalysts: Preparation, optimization, characterization, and application for enantioselective resolution reactions. *Biotechnology Progress*, 28(4), 937–945. <https://doi.org/10.1002/btpr.1571>
- Keener, K. M., LaCrosse, J. D., y Babson, J. K. (2001). Chemical method for determination of carbon dioxide content in egg yolk and egg albumen. *Poultry Science*, 80(7), 983–987. <https://doi.org/10.1093/ps/80.7.983>
- Kittelmann, S., Naylor, G. E., Koolaard, J. P., y Janssen, P. H. (2012). A proposed taxonomy of

anaerobic fungi (class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS ONE*, 7(5), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036866>

Korabecna, M. (2007). The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1 , ITS2 , and 5 . 8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology.

Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, January 2007, 783–787.

Koul, M., y Singh, S. (2017). *Penicillium spp. Anti-Cancer Drugs*, 28(1), 11–30.

<https://doi.org/10.1097/cad.0000000000000423>

Krüger, D., Kapturska, D., Fischer, C., Daniel, R., y Wubet, T. (2012). Diversity measures in environmental sequences are highly dependent on alignment quality-data from ITS and new LSU primers targeting basidiomycetes. *PLoS ONE*, 7(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032139>

Kuhar, J., y Sequeira, A. (2018). *Los hongos al microscopio. December 2018*.

<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19025.58727>

Kunamneni, A., Raju, K. V. V. S. N. B., Zargar, M. I., Devi, R. B., Lakshmi, P. J., y Ellaiah, P.

(2015). Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(February), 65–69.

Lascano, L. D. (2018). *Producción, extracción y caracterización de lipasas provenientes de la levadura antártica Guehomyces pullulans*. 65.

Leal, R., Manzano, A., y Sanchez, M. (2010). Biodegradación de DDT por dos cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1–12.

- 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), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Li, Y., Sun, L. L., Sun, Y. Y., Cha, Q. Q., Li, C. Y., Zhao, D. L., Song, X. Y., Wang, M., McMinn, A., Chen, X. L., Zhang, Y. Z., y Qin, Q. L. (2019). Extracellular Enzyme Activity and Its Implications for Organic Matter Cycling in Northern Chinese Marginal Seas. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02137>
- Liu, J., Yu, Y., Cai, Z., Bartlam, M., y Wang, Y. (2015). Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1387–1395. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1890-6>
- Loredo-Treviño, A., Argüello, A., Rodriguez, R., Gutierrez-Sanchez, G., Escamilla, A., y Aguilar, C. (2017). Fungal biodegradation of rigid polyurethane. *Química Nova*, 40(8), 885–889. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170094>
- Luján, D., y Pajuelo, G. (2005). Método rápido para detección de bacteriuria en examen microscópico de orina no centrifugada. *REVISTA BIOMÉDICA*, 16(3), 169–174. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v16i3.414>
- Macedo, G. A., y Pio, T. F. (2005). A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 388–394. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400016>
- Macias Camacho, J. G. (Universidad N. de C. (2017). *Modelo macro cinético de la producción de conidios en fermentación sumergida por lotes a partir de Penicillium pinophilum*. *Modelo macro cinético de la producción de conidios en fermentación sumergida por lotes a partir de Penicillium pinophilum*. 1–138.

- MAE. (2015). *Ecuador impulsa nuevas iniciativas para reducir la huella ecológica – Ministerio del Ambiente y Agua*. <https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-impulsa-nuevas-iniciativas-para-reducir-la-huella-ecologica/>
- Mahapatra, S., y Banerjee, D. (2012). *Production and Characterization of Thermal Acid Amylase from Aspergillus aculeatus DBF9*. 1955, 6–9.
- Mannaa, M., y Kim, K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240–254. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.240>
- Mario Comerio, R., y Mac Cormack, W. (2004). [Some micromycetes isolated from spoiled food and soil in Argentine Antarctica]. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21(3), 128–134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709786>
- Martínez Corona, R., Cortes Penagos, C., Madrigal Pérez, L. A., y González Hernández, J. C. (2019). Hongos Y Levaduras : Fábricas De Lipasas. *Interciencia Journal*, 44(7), 378–385. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/339/33960285002/html/index.html>
- Mejias, A., Arruti, R., Cepeda, I., y Sáenz, P. (2010). Influencia del tratamiento térmico de envejecimiento sobre las propiedades mecánicas y la microestructura de un acero inoxidable dúplex 2507. *Revista INGENIERÍA UC*, 17(3), 28–39.
- Messias, J. M., da Costa, B. Z., de Lima, V. M. G., Dekker, R. F. H., Rezende, M. I., Krieger, N., y Barbosa, A. M. (2009). Screening Botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by Botryosphaeria ribis EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6–7), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.013>
- Ministerio de Industrias y Productividad. (2014). Reglamento general a la ley del sistema ecuatoriano de la calidad N° 154, 2014, págs. 50-57. *Registro Oficial*, 961(Ley No. 3437),

1–29.

Molar, R. A., Alejandra, P., Muñoz, P., Zequera, I. M., Armando, J., y Its, I. T. S. (2013).

Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* Causante de Pudrición de Tallos y Frutos de Tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 13–19.

Monteiro, R. R. C., Virgen-Ortiz, J. J., Berenguer-Murcia, Á., da Rocha, T. N., dos Santos, J. C.

S., Alcántara, A. R., y Fernandez-Lafuente, R. (2021). Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. *Catalysis Today*, 362(March), 141–154.

<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>

Mora. (2018). *Créditos para emprendedores y Pymes en Ecuador | Economía | Noticias | El*

Universo. <https://www.eluniverso.com/noticias/2018/07/03/nota/6840290/creditos-emprendedores-pymes-ecuador/>

Morales, L. V., González, I. A., Abella, J. P., y Ahumada, D. A. (2019). Acid-base titration

techniques: Metrological considerations. *Revista Colombiana de Química*, 48(1), 26–34.

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.72401>

Moreno Perez, S. (2015). *Ingeniería De La Síntesis De Triglicéridos De Ácidos Omega-3 Y De*

Antioxidantes Protectores Catalizados Por Lipasas. 144.

https://repositorio.uam.es/xmlui/bitstream/handle/10486/669697/moreno_perez_sonia.pdf?sequence=1

Muñoz, D. L. (2017). *Estudio de la cadena de valor de alimentos balanceados en el Ecuador*.

Muthukumar, A., y Veerappapillai, S. (2015). Biodegradation of plastics – A brief review.

International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 31(2), 204–209.

Nguyen, T. H. (2013). *Vieillissement artificiel et vieillissement naturel en ambiance tropicale de*

composites modèles epoxy/verre : approche nanoscopique de l'étude des interphases. 229.

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00942583/document>

- Nilsson, R. H., Hyde, K. D., Pawłowska, J., Ryberg, M., Tedersoo, L., Aas, A. B., Alias, S. A., Alves, A., Anderson, C. L., Antonelli, A., Arnold, A. E., Bahnmann, B., Bahram, M., Bengtsson-Palme, J., Berlin, A., Branco, S., Chomnunti, P., Dissanayake, A., Drenkhan, R., ... Abarenkov, K. (2014). Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity*, 67(1), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0291-8>
- Noman, E., Al-Gheethi, A. A., Nik Ab. Rahman, N. N., Hideyuki, N., A Talip, B. B. H., Mohamed, R. M. S. R., y Ab. Kadir, M. O. (2018). Phenotypic identification of *Penicillium* spp. isolated from clinical wastes based on microstructure characteristics. *Malaysian Journal of Microbiology*, May. <https://doi.org/10.21161/mjm.27918>
- Núñez, K., y Barrientos, L. (2018). Advances in antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance. In *Antibiotics* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>
- Odusanya, S. A., Nkwogu, J. ., Alu, N., Etuk Udo, G. A., Ajao, J. A., Osinkolu, G. A., y Uzomah, A. C. (2013). Preliminary Studies on Microbial Degradation of Plastics Used in Packaging Potable Water in Nigeria. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 63–72. [https://doi.org/10.1016/s0189-7241\(15\)30078-3](https://doi.org/10.1016/s0189-7241(15)30078-3)
- Ordóñez, N., Yii, H., Cárdenas, W., Aisyah, S., Moreano, H., Riofrío, M., Hussin, A., y Burbano, L. (2008). Estudio Preliminar De La Cobertura Superficial En La Isla Greenwich , Antártida Estudio Preliminar de la Cobertura Superficial en la Isla Greenwich , Antártida Resumen. *Revista Tecnológica ESPOL*, 21(Octubre).

https://www.researchgate.net/profile/Washington_Cardenas/publication/28796612_Estudio_Preliminar_De_La_Cobertura_Superficial_En_La_Isla_Greenwich_Antartida/links/02e7e51ae13ffbb099000000/Estudio-Preliminar-De-La-Cobertura-Superficial-En-La-Isla-Greenwich-

Ortega, Sania. (2018). *Hongos acuáticos. Isla Dee en la Antártida un paraíso para los microorganismos*. 1–5. www.utn.edu.ec/ficayaemprende/

Ortega, Sergio, Álvarez, R., Allan Green, T. G., y de los Ríos, A. (2012). Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 429–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01422.x>

Osswald, T. (2016). Determination of Polymers Thermal Degradation by Color Change Analysis. *Ingeniería*, 21(1), 19–30. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.reving.2016.1.a02>

Otero, T. (2003). Polímeros conductores: Síntesis, propiedades y aplicaciones electroquímicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(4), 1–50.

Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., y Pandey, A. (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, 7(10), 1533–1545. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/5>

Parra, P., Castillo, O., y Maldonado, P. (2019). Alternative method for the fermentation of cocoa beans. *IEEE ICA-ACCA 2018 - IEEE International Conference on Automation/23rd Congress of the Chilean Association of Automatic Control: Towards an Industry 4.0 - Proceedings*. <https://doi.org/10.1109/ICA-ACCA.2018.8609760>

Pascual, J. A., Moreno, J. L., Hernández, T., y García, C. (2002). Persistence of immobilised and

- total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Bioresource Technology*, 82(1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00127-4)
- Paz, P., y Garcia, E. (2017). *OBTENCIÓN DE ENZIMAS LIPASAS FÚNGICAS, PARA COMPLEMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE JABONES Y DETERGENTES USADOS EN LA HIDRÓLISIS DE LÍPIDOS.*
- Peraza, M. A. (2017). *Estudio preliminar de la biodegradación de plásticos por bacterias marinas.*
- Pereira, Fernandes, D., Carvalho, G., Benoliel, M. J., San Romão, M. V., y Barreto Crespo, M. T. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research*, 44(17), 4850–4859. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.018>
- Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A., Sánchez, M., y De, A. (2007). Efecto del pH sobre hongos ectomicorrícicos. *Bosque*, 28(3), 215–219.
- Pérez, D., y Pérez, I. (2006). El Conocimiento del Mercado: Análisis de Clientes, Intermediarios y Competidores. *MARKETING. El Conocimiento Del Mercado*, 86. http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:45089/componente45087.pdf
- Pineda, J., Ramos, L., Soto, C., y Fragata, A. (2015). *Crecimiento de Pleurotus ostreatus en residuos agroindustriales no suplementados.* http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702015000100006
- Pita, M. S., y Díaz, R. J. (2012). Plan institucional de manejo de los desechos sólidos, una herramienta para la gestión hospitalaria Institutional plan for solid waste management, a tool for hospital management. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 50(3), 415–419. <http://scielo.sld.cu>

Plastics Europe. (2015). *An analysis of European plastics production, demand and waste data*.

Pointing, S. B., Chan, Y., Lacap, D. C., Lau, M. C. Y., Jurgens, J. A., y Farrell, R. L. (2009).

Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2009) 106, 47, (19964-19969) DOI:10.1073/pnas.0908274106). In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 107, Issue 3, p. 1254).

<https://doi.org/10.1073/pnas.0913882107>

Prasanna, H. N., Ramanjaneyulu, G., y Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of cellulase

production by *Penicillium* sp. *3 Biotech*, 6(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0483-x>

Pratt, S., Yuan, Z., y Keller, J. (2004). Modeling aerobic carbon oxidation and storage by

integrating respirometric, titrimetric, and off-gas CO₂ measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(2), 135–147. <https://doi.org/10.1002/bit.20199>

Puerta, G. I. (2012). Factores, procesos y controles en la fermentación del café. *Cenicafé - Centro Nacional de Investigaciones de Café*, 1–12.

<https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0422.pdf>

Quinteros, O. (2020). *CARACTERIZACIÓN DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR DE*

VARIETADES DEL INGENIO AZUCARERO TABABUELA PARA BIOENERGÍA.

[http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/10478/2/03 IER 006 TRABAJO](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/10478/2/03%20IER%20006%20TRABAJO%20GRADO.pdf)

[GRADO.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/10478/2/03%20IER%20006%20TRABAJO%20GRADO.pdf)

Ramachandran, S., Larroche, C., y Pandey, A. (2008). Production of spores. *Current*

Developments in Solid-State Fermentation, 230–252. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6_11)

[75213-6_11](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6_11)

- Ramaswamy, V., y Sharma, H. R. (2011). *THREAT TO ENVIRONMENT AND CATTLE HEALTH: A RETROSPECTIVE STUDY FROM GONDAR CITY OF ETHIOPIA*. 2(2011), 7–12. [http://www.iioab.org/SPI-1\(EBT\)/Ramaswamy-IIOABJ-2 \(1\)-\(SP1\)-7-12p.pdf](http://www.iioab.org/SPI-1(EBT)/Ramaswamy-IIOABJ-2 (1)-(SP1)-7-12p.pdf)
- Ramírez, P., y Cocha, J. M. (2003). Degradación Enzimática de Celulosa por Actinomicetos Termófilos. *Revista Biologica Peru*, 10(1), 67–77.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., y Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Reid, B. J., MacLeod, C. J. A., Lee, P. H., Morriss, A. W. J., Stokes, J. D., y Semple, K. T. (2001). A simple ¹⁴C-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability. *FEMS Microbiology Letters*, 196(2), 141–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00062-3)
- Reyes, A., García, I., y Muñoz, J. B. (2020). Administración de empresas y buenas prácticas ambientales en Azogues, Ecuador. *Revista Killkana Sociales*, 4(1), 1–6. https://doi.org/https://doi.org/10.26871/killkana_social.v4i1.613
- Rietl, A. J., Overlander, M. E., Nyman, A. J., y Jackson, C. R. (2016). Microbial Community Composition and Extracellular Enzyme Activities Associated with *Juncus roemerianus* and *Spartina alterniflora* Vegetated Sediments in Louisiana Saltmarshes. *Microbial Ecology*, 71(2), 290–303. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0651-2>
- Rivas, Y., Oyarzún, C., Godoy, R., y Valenzuela, E. (2009). Mineralización del nitrógeno, carbono y actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst y una plantación de *pinus radiata* d. Don. Del centro-sur de Chile. *Revista Chilena de*

- Historia Natural*, 82(1), 119–134. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2009000100008>
- Rochman, C. M., Browne, M. A., Halpern, B. S., Hentschel, B. T., Hoh, E., Karapanagioti, H. K., Rios-Mendoza, L. M., Takada, H., Teh, S., y Thompson, R. C. (2013). Classify plastic waste as hazardous. *Environmental Science and Technology*, 51(8), 6–8. <https://doi.org/10.1002/etc.3608>
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., Molina, D., Díaz, C., y Soca, L. A. (2001). Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterasas y glutation-s-transferasa en *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(1), 32–36.
- Romero, M., Orduz, S., y Padilla, C. J. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 36–44. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)36-44](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)36-44)
- Ruiz, P. (2002). *Producción de cafeoil, feruoil y p-cumaroil esterasas por Aspergillus awamori NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono*. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers16-06/010067451.pdf
- Sáenz, L. A. P., Hilders, O. A., Hergueta, R. D., y Zabala, R. A. (2007). Estudio de un acero inoxidable dúplex SAF 2507 sometido a un tratamiento térmico de envejecimiento a una temperatura de 850 °c por tiempos entre 1 hora y 48 horas. *Revista de La Facultad de Ingeniería*, 22(3).
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., y Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689–2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>
- Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., y da Silveira, M. M. (2011). Clarification of

fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2217–2222.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.02.008>

Santis Navarro, M. A. (2013). Estudio De Producción De Lipasas Por Fermentación En Estado Sólido a Partir De Residuos Ricos En Grasas. Impacto Ambiental Y Posibles Usos. *Tesis*, 203. <https://www.mendeley.com/research-papers/estudio-la-producción-lipasas-por-fermentación-en-estado-sólido-partir-residuos-ricos-en-grasas-imp/>?utm_source=desktopyutm_medium=1.18yutm_campaign=open_catalogyuserDocumentId=%7B3acae564-3cb7-305b-8f64-7e02f325e

Sanyal, A., Antony, R., Samui, G., y Thamban, M. (2018). Microbial communities and their potential for degradation of dissolved organic carbon in cryoconite hole environments of Himalaya and Antarctica. *Microbiological Research*, 208(January), 32–42.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.004>

Saraswat, Y., Patel, M., Sagar, T., y Shil, S. (2014). Bioplastics from Starch. *International Journal of Research and Scientific Innovation (IJRSI)*, 1(Viii), 385–387.

<http://www.rsisinternational.org/virtual-library/papers/bioplastics-from-starch/>

Selbmann, L., Grube, M., Onofri, S., Isola, D., y Zucconi, L. (2013). Antarctic epilithic lichens as niches for black meristematic fungi. *Biology*, 2(2), 784–797.

<https://doi.org/10.3390/biology2020784>

Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., y Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

Sharma, A., Bardhan, D., y Patel, R. (2009). Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. *Indian Journal of Biochemistry and*

Biophysics, 46(2), 178–183.

Shivani, D., y Kumar, J. S. (2015). Extracellular Enzymatic Profile of Fungal Deteriogens of Historical Palace of Ujjain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(5), 122–132. <http://www.ijcmas.com>

Silva, A. (2018). *Acción in vitro de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos conjuntos contra Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador.*
[http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertación Final - Alexander Silva segunda corrección.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertación%20Final%20-%20Alexander%20Silva%20segunda%20corrección.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Silva, A. B., Costa, M. F., y Duarte, A. C. (2018). Biotechnology advances for dealing with environmental pollution by micro(nano)plastics: Lessons on theory and practices. In *Current Opinion in Environmental Science and Health* (Vol. 1, pp. 30–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.005>

Silva, C., Silveira, M., Riveros, R., y Zeni, M. (2004). Concentración de pectinasas por ultrafiltración con membranas de polisulfonas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(3), 3.

Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., y Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>

Takamatsu, S., y Kano, Y. (2001). PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience*, 42(1), 135–139. <https://doi.org/10.1007/BF02463987>

Tapia, J., Ferrera, R., Varela, L., Carlos, J., Ortiz, R., Mireles, J. L., Carmen, J., Colunga, S.,

- Torres, H. C., Angel, M., Iracheta, T., Almazán, R. C., y Potosí, L. (2008). Caracterización e Identificación Morfológica de Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular en Cinco Suelos Salinos del Estado de San Luis Potosí, México. □ *Revista Mexicana de Micología*.
- Teixeira, L. C. R. S., Peixoto, R. S., Cury, J. C., Sul, W. J., Pellizari, V. H., Tiedje, J., y Rosado, A. S. (2010). Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *ISME Journal*, 4(8), 989–1001.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.35>
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., y Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742.
<https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Troya, C., y Vaca, L. (2014). *Proyecto De Innovación Tecnológica Participativa Y Productividad Agrícola PITPPA Elaboración: Componente 1 PITPPA*.
<https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2016/01/MANUAL-labos-para-web.pdf>
- Tuthill, D. E., Frisvad, J. C., y Christensen, M. (2001). Systematics of *Penicillium simplicissimum* based on rDNA sequences, morphology and secondary metabolites . *Mycologia*, 93(2), 298–308. <https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063161>
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., y Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
- Valencia, M. (2021). Libro blanco de economía circular de Ecuador. *Centro de Innovación y Economía Circular CIEC*, 6(11), 212. https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/Libro-Blanco-final-web_mayo102021.pdf
- van der Kaaij, R. M., Janeček, Š., van der Maarel, M. J. E. C., y Dijkhuizen, L. (2007).

Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal α -amylase enzymes. *Microbiology*, 153(12), 4003–4015.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008607-0>

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

Vásquez C, J. A., Ramirez Castrillón, M., y Monsalve F, Z. I. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 129. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>

Vaughan, A., Buzzini, P., y Clementi, F. (2008). *Laboratorio didattico di microbiologia*. CEA. https://books.google.com.ec/books?id=8E09PQAACAAJydq=laboratorio+didattico+di+microbiologia&hl=es&as_sXyved=0ahUKEwi9u5TR7a3oAhVEheAKHVluA5cQ6wEILDAA

Vázquez-Montoya, E. L., Castro-Ochoa, L. D., Maldonado-Mendoza, I. E., Luna-Suárez, S., y Castro-Martínez, C. (2020). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 4–12.

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.005>

Vidya, T. V, y Growther, L. (2017). Biodegradation of rubber using actinobacteria isolated from rubber contaminated soil. *International Journal of Development Research*, 07(11), 17217–17220.

Wei, R., y Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1308–1322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>

Wierckx, N., Narancic, T., Eberlein, C., Wei, R., Drzyzga, O., Magnin, A., Ballerstedt, H., Kenny, S. T., Pollet, E., Avérous, L., O'Connor, K. E., Zimmermann, W., Heipieper, H. J.,

- Prieto, A., Jiménez, J., y Blank, L. M. (2018). Plastic Biodegradation: Challenges and Opportunities. In *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation* (pp. 1–29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44535-9_23-1
- Withers, P. C. (2001). Design, calibration and calculation for flow-through respirometry systems. *Australian Journal of Zoology*, 49(4), 445–461. <https://doi.org/10.1071/ZO00057>
- Yan, M., Cai, E., Zhou, J., Chang, C., Xi, P., Shen, W., Li, L., Jiang, Z., Deng, Y. Z., y Zhang, L. H. (2016). A dual-color imaging system for sugarcane smut fungus sporisorium scitamineum. *Plant Disease*, 100(12), 2357–2362. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0257-SR>
- Yanes, P. I. H. (2013). Caracterización Bioquímica y Molecular de la Biosíntesis del Antitumoral Andrastina y de la Toxina PR en *Penicillium roqueforti*. *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 246. <https://doi.org/10.1002/0471701343.sdp19833>
- Yergeau, E., Newsham, K. K., Pearce, D. A., y Kowalchuk, G. A. (2007). Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology*, 9(11), 2670–2682. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01379.x>
- Yuko, T. H., y Morimoto, S. (2010). Soil clone library analyses to evaluate specificity and selectivity of PCR primers targeting fungal 18s rDNA for denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE). *Microbes and Environments*, 25(4), 281–287. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10136>
- Yuzbashev, T. V., Yuzbasheva, E. Y., Sobolevskaya, T. I., Laptev, I. A., Vybornaya, T. V., Larina, A. S., Matsui, K., Fukui, K., y Sineoky, S. P. (2010). Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and*

Bioengineering, 107(4), 673–682. <https://doi.org/10.1002/bit.22859>

Zapata, D., Pujol, R., y Coda, F. (2012). Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente. *Técnica Industrial*, 297, 76–80.

<http://www.tecnicaindustrial.es/TIAdmin/Numeros/82/889/a889.pdf>

Zapata, M., Agudelo, O., y Tu, J. (2004). PCR-RFLP de secuencias ITS como método de identificación de especies de anopheles del subgénero nyssorhynchus. *Iatreia*, 17(2-S), 181–182.

Zhang, Y. M., Wu, N., Zhou, G. Y., y Bao, W. K. (2005). Changes in enzyme activities of spruce (*Picea balfouriana*) forest soil as related to burning in the eastern Qinghai-Tibetan Plateau.

Applied Soil Ecology, 30(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.01.005>

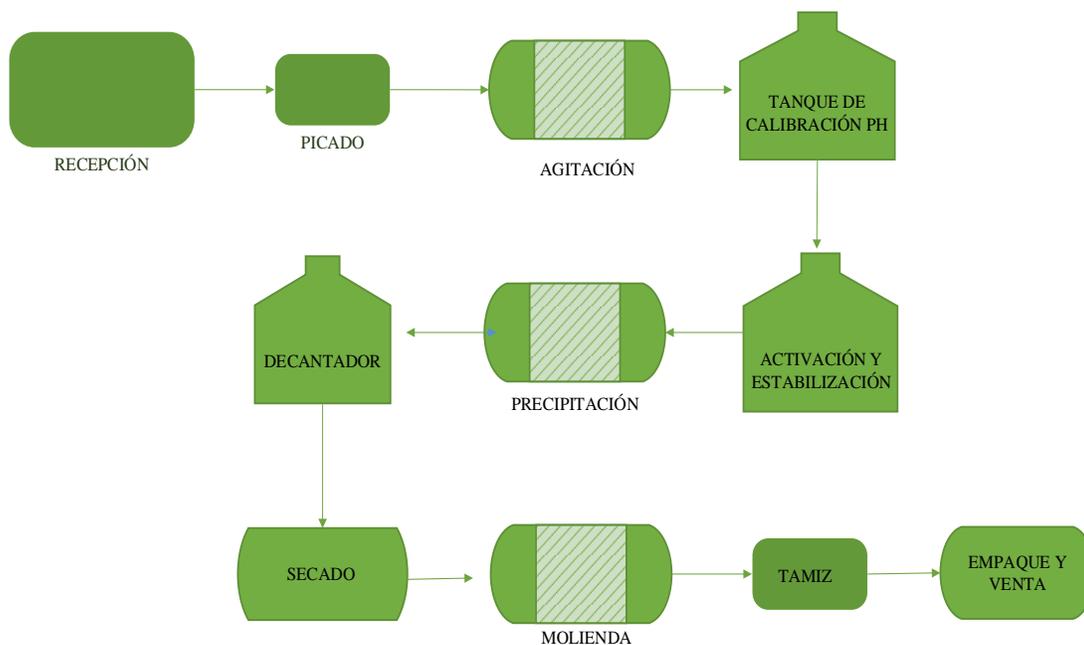
Zhang, Y., Wang, X. C., Cheng, Z., Li, Y., y Tang, J. (2016). Effect of fermentation liquid from food waste as a carbon source for enhancing denitrification in wastewater treatment.

Chemosphere, 144, 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.036>

ANEXOS

Anexo 1

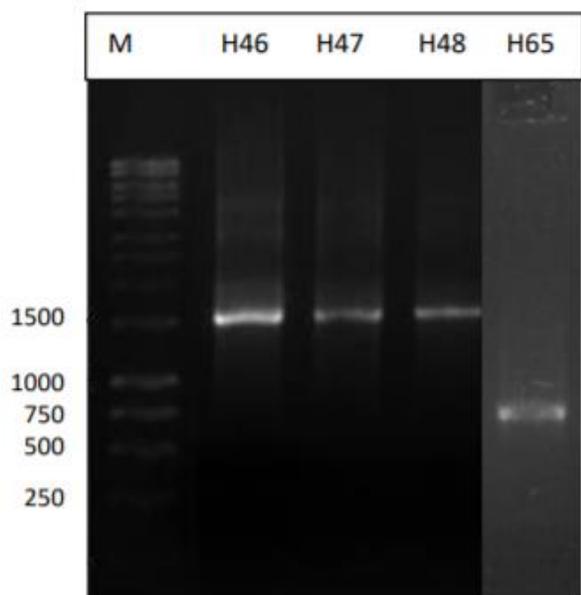
Diagrama de procesos en la producción enzimática



Nota: Obtenido y modificado de (Hernández, 2006)

Anexo 2

Observación del gel de electroforesis donde se identifica los amplicones obtenidos de la PCR con marcadores moleculares ITS



Nota: El *Penicillium sp.*, corresponde a la muestra H65 obtenida por IDGEN, 2019.

Anexo 3

Prueba estadística de chi cuadrado empleado en las pruebas bioquímicas

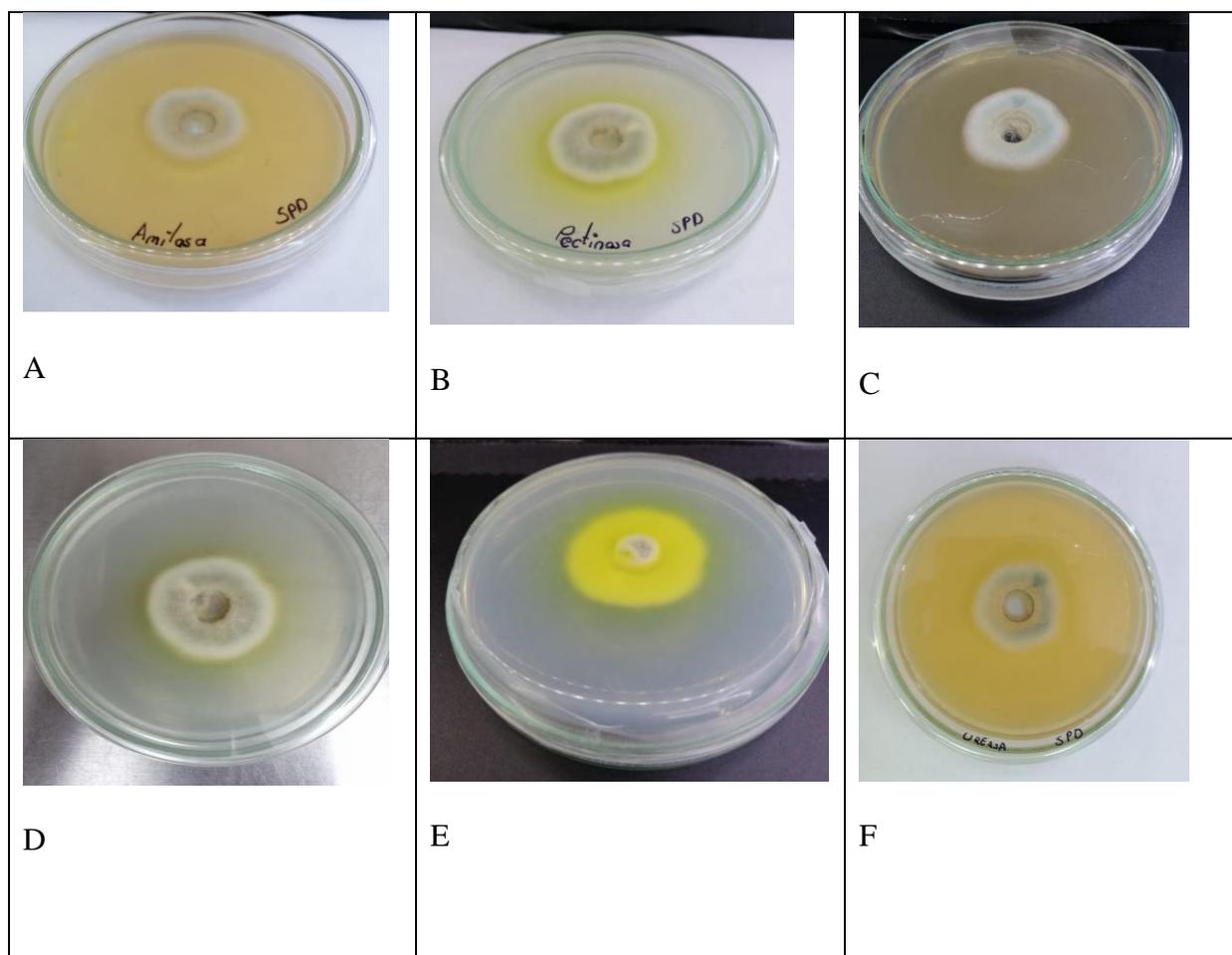
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	12,000 ^a	5	,035
Razón de verosimilitud	15,276	5	,009
Asociación lineal por lineal	1,295	1	,255
N de casos válidos	18		

a. 12 casillas (100,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,00.

Anexo 4

Pruebas de actividad enzimática extracelular



Resultados de pruebas bioquímicas aplicadas. A) Test de amilasa B) Pectinasa C) Estereasa D)

Celulosa E) Lipasas F) Ureasa, con sus nutrientes y medios de cultivo modificados.

Anexo 5

Prueba estadística de esfericidad aplicada en los datos de medios de cultivo con ausencia de carbono

Medida:

		gl	Épsilon ^b
--	--	----	----------------------

Efecto inter sujetos	Aprox. Chi- cuadrado		Greenhouse- Geisser	Huynh- Feldt	Límite inferior
tratamiento	45,252	5	,334	,335	,333

Anexo 6

Prueba de efectos dentro de sujetos aplicado a los datos de crecimiento

Pruebas de efectos dentro de sujetos

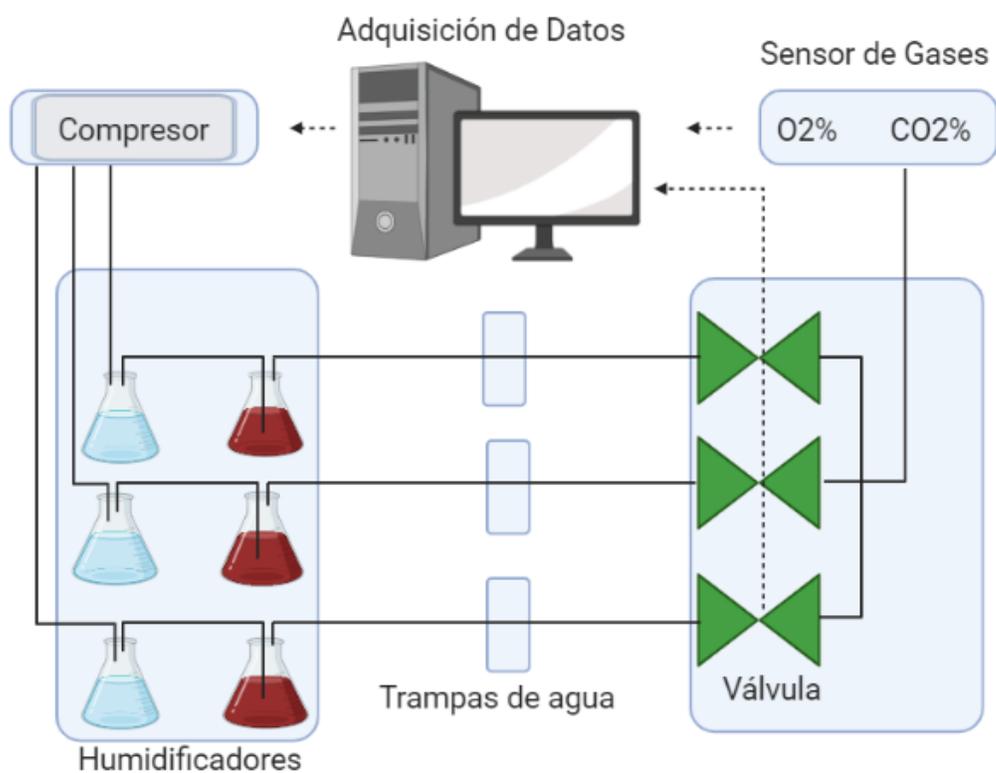
Medida: crecimiento

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
tratamiento	Esfericidad asumida	5,77E+11	3	1,92E+11	10,601	,001
	Greenhouse- Geisser	5,77E+11	1,003	5,76E+11	10,601	,022
	Huynh-Feldt	5,77E+11	1,005	5,75E+11	10,601	,022
	Límite inferior	5,77E+11	1,000	5,77E+11	10,601	,023
Error(tratamiento)	Esfericidad asumida	2,72E+11	15	1,82E+10		
	Greenhouse- Geisser	2,72E+11	5,014	5,43E+10		

Huynh-Feldt	2,72E+11	5,025	5,42E+10		
Límite inferior	2,72E+11	5,000	5,45E+10		

Anexo 7

Evaluación de factores internos de un reactor industrial



Nota: Adaptado de Santis Navarro, (2013) y obtenido de www.biorender.com

Anexo 8*Análisis de la varianza para la medición de CO2*

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,031433892	1	0,031433892	6,39351462	0,01358525	3,97022958
Dentro de los grupos	0,363823055	74	0,004916528			
Total	0,395256947	75				