



UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO
FACULTAD DE POSGRADO**

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

**EXTRACCION DE CELULASA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM
DESDE EL ENFOQUE QUIMICO, PARA LA APLICACION EN EL
TRATAMIENTOSECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES, EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE ALIMENTOS.**

Autor:

ARREAGA VELÁSQUEZ JONATHAN JOAN

Director:

VILLAMAR AVEIGA MONICA DEL ROCIO

Milagro, 2025

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, Jonathan Joan Arreaga Velásquez, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magíster en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación promoción del desarrollo económico: economía verde de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **21 de agosto del 2025**



Jonathan Joan
Arreaga Velasquez



Jonathan Joan Arreaga Velásquez

C.I.: 0955505904

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **VILLAMAR AVEIGA MONICA DEL ROCIO**, en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **JONATHAN JOAN ARREAGA VELASQUEZ**, cuyo tema es **EXTRACCION DE CELULASA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM DESDE EL ENFOQUE QUIMICO, PARA LA APLICACION EN EL TRATAMIENTO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES, EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE ALIMENTOS**, que aporta a la Línea de Investigación **promoción del desarrollo económico: economía verde**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 21 de agosto del 2025



Firmado electrónicamente por:
**MONICA DEL ROCIO
VILLAMAR AVEIGA**
Validar únicamente con [FirmaEC](#)

VILLAMAR AVEIGA MONICA DEL ROCIO

C.I.: 0918306507

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
ACTA DE SUSTENTACIÓN
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los quince días del mes de agosto del dos mil veinticinco, siendo las 10:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, Q.F ARREAGA VELASQUEZ JONATHAN JOAN, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **EXTRACCION DE CELULOSA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM DESDE EL ENFOQUE QUIMICO, PARA LA APLICACION EN EL TRATAMIENTO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES, EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE ALIMENTOS.**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Dra. NORIEGA VERDUGO DELIA DOLORES, Presidente(a), SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID en calidad de Vocal; y, Mgs VILLAVICENCIO YANOS CHRISTIAN MIGUEL que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo la calificación de: **98.67** equivalente a: **EXCELENTE**.

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:00 horas.



DELIA DOLORES
NORIEGA VERDUGO
VICERRECTORA DE POSGRADO

Dra. NORIEGA VERDUGO DELIA DOLORES
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



JAIME DAVID SEVILLA
CARRASCO
VICERRECTOR DE POSGRADO

SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
VOCAL



CHRISTIAN MIGUEL
VILLAVICENCIO YANOS
VICERRECTOR DE POSGRADO

Mgs VILLAVICENCIO YANOS CHRISTIAN MIGUEL
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



JONATHAN JOAN
ARREAGA VELASQUEZ
VICERRECTOR DE POSGRADO

Q.F ARREAGA VELASQUEZ JONATHAN JOAN
MAGISTER

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación lo dedico a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir satisfactoriamente el programa de Maestría, a mis padres quienes me han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida, mis hermanos y mis sobrinos que son la motivación más grande que Dios pudo concederme, que con su ejemplo, apoyo incondicional y amor infinito me han forjado y guiado siempre, quienes nos han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida.

Jonathan Joan Arreaga Velásquez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de titulación lo dedico a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir satisfactoriamente el programa de Maestría, a mis padres quienes me han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida, mis hermanos y mis sobrinos que son la motivación más grande que Dios pudo concederme, que con su ejemplo, apoyo incondicional y amor infinito me han forjado y guiado siempre, quienes nos han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida.

Jonathan Joan Arreaga Velásquez

Resumen

El presente informe de investigación se enfoca en extraer celulasa del hongo *Trichoderma harzianum*, desde una perspectiva química, con el propósito de servir como una guía para estudiantes de posgrado en biotecnología en Ecuador. La celulasa desempeña un papel crucial en la descomposición de la celulosa, un componente fundamental de la biomasa vegetal. *Trichoderma* es un género de hongos ampliamente distribuido en Ecuador, reconocido por su capacidad para producir diversas enzimas, incluida la celulasa. Este informe examina la literatura pertinente, describe una metodología exhaustiva para la extracción de celulasa y establece objetivos específicos para la realización de esta investigación, por lo cual nos permitió obtener como resultados; que la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* ha demostrado ser un proceso eficaz para la obtención de enzimas en el contexto de la industria química y que puede ser aplicada en el tratamiento secundario de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en las industrias papeleras y alimentos del Ecuador.

Trichoderma, Microorganismos, Biotecnología, Celulosa.

Abstract

This research report focuses on the chemical extraction of cellulase from the fungus *Trichoderma harzianum*. Its purpose is to serve as a guide for biotechnology graduate students in Ecuador. Cellulase plays a crucial role in the breakdown of cellulose, a fundamental component of plant biomass. *Trichoderma* is a genus of fungi widely distributed in Ecuador, recognized for its ability to produce various enzymes, including cellulase. This report reviews the relevant literature, describes a comprehensive methodology for cellulase extraction, and establishes specific objectives for conducting this research. The results of this research led us to conclude that cellulase extraction from *Trichoderma harzianum* has proven to be an effective process for obtaining enzymes in the chemical industry and can be applied in secondary treatment at wastewater treatment plants (WWTPs) in the paper and food industries in Ecuador.

Keywords: *Trichoderma*, Microorganisms, Biotechnology, Cellulose.

Lista de Figuras

Ilustración 1 Muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , sembradas en diferentes tipos de sustratos.....	23
Ilustración 2 Autoclave con muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , sembradas en los diferentes tipos de sustrato.	25
Ilustración 3 Script curvas de calibración entre las muestras en coolab.	30
Ilustración 4 Curvas de calibración de las muestras.	31
Ilustración 5 Esquema de tratamiento de aguas residuales.....	38
Ilustración 6 Script comparacion Anova entre las muestras en coolab.	47
Ilustración 7 Gráfica Anova entre las muestras.	47
Ilustración 8 Script de comparación entre valores de <i>Trichoderma Reseei</i> y <i>Harzianum</i>	48
Ilustración 9 Gráfica de comparación entre <i>Reseei</i> y <i>Harzianum</i>	48

Lista de Tablas

Tabla 1 Operacionalización de las variables.....	10
Tabla 2 Tipos de sustratos.....	23
Tabla 3 Muestreo en 5 PTARs	37

ÍNDICE / SUMARIO

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	5
1. Planteamiento del problema	5
2. Delimitación del problema	5
3. Formulación del problema	6
4. Preguntas de investigación	7
5. Objetivos	7
5.1. Objetivo general	7
5.2. Objetivos específicos	7
6. Hipótesis	7
7. Justificación	8
8. Declaración de las variables (Operacionalización)	9
8.1. Variable independiente	9
8.2. Variable dependiente	9
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	11
2.1. Fundamentos de la celulasa	11
2.2. Características y Potencial Enzimático de <i>Trichoderma harzianum</i>	12
2.2.1. Características Generales de <i>Trichoderma harzianum</i>	12
2.3. Morfología y ciclo de vida	13
2.4. Mecanismos de control biológico	14
2.5. Potencial Enzimático de <i>Trichoderma harzianum</i>	14
2.6. Producción de Enzimas Hidrolíticas	15
2.7. Enzimas Líticas Adicionales	15
2.7.1. Metabolitos Secundarios	16
2.8. Aplicaciones <i>Trichoderma harzianum</i>	16
2.8.1. Tratamiento de aguas residuales industriales	18
2.9. Celulasas en tratamiento secundario de aguas residuales	18
2.9.1. Mecanismos de acción en PTARs	18

2.9.2.	Casos de éxito en industrias objetivo.....	19
2.9.3.	Retos para implementación en Ecuador.....	19
CAPÍTULO III: Marco Teórico Referencial		20
3.1.	Tipo y diseño de investigación.....	20
3.2.	La población y la muestra.....	20
3.2.1.	Características de la población	20
3.2.2.	Muestra	21
3.3.	Los métodos y las técnicas	21
3.3.1.	Metodología de Cultivo en Estado Sólido (SSF)	21
3.3.2.	Selección del microorganismo	21
3.3.3.	Preparación del Inóculo	22
3.3.4.	Preparación del sustrato.....	22
3.3.5.	Inoculación del Sustrato	22
3.3.6.	Incubación del Cultivo.....	22
3.3.7.	Recolección y extracción de Enzimas	22
3.3.8.	Análisis de Actividad Enzimática	22
3.3.9.	Tipos de sustrato	23
3.4.	Pasos generales.....	24
3.4.1.	Procedimiento de siembra del hongo	24
3.4.2.	Procedimiento específico para cada tipo de muestra	25
3.4.2.1.	Muestra 1: Arroz cocido como sustrato.....	25
3.4.2.2.	Muestra 2: Maicena cocida con melaza.....	25
3.4.2.3.	Muestra 3	26
3.4.3.	Consideraciones adicionales	26
3.5.	Materiales usados	27
3.6.	Ensayo de la actividad enzimática	28
3.7.	Curva de calibración.....	29
3.7.1.	Soluciones estándar de glucosa	29

3.8. Concentración de glucosa	31
3.8.1. Conversión a micro moles/ml	32
3.8.2. Cálculo de la actividad enzimática	32
3.8.3. Resultados	33
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados	34
4.1. Análisis e Interpretación de Resultados	34
4.1.1. NNOVA EN COOLAB	34
4.2. Ejecución de Script.....	34
4.3. Comparación de resultados	34
4.4. Implicaciones	35
4.4.1. Hallazgos clave para <i>Trichoderma harzianum</i>	35
4.4.2. Hallazgos para <i>Trichoderma reesei</i>	36
4.4.3. Conclusión técnica	36
4.5. Enfoque del sistema del tratamiento desde el punto de vista de un químico farmacéutico	36
4.6. Caracterización del Efluente	37
4.7. Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales	37
4.8. Diseño de un tratamiento para aguas residuales	38
4.9. Implementación para la operación del sistema.....	38
4.10. Control y monitoreo del proceso	38
4.11. Análisis del impacto ambiental y económico	39
CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones.....	40
5.1. Discusión.....	40
5.2. Conclusiones	41
5.3. Recomendaciones	42
Referencias bibliográficas	43
Anexos	45
Scripts	46

INTRODUCCIÓN

El *Trichoderma harzianum* es un hongo principalmente anaerobio que se localiza en la mayoría de suelos agrícolas y otros sustratos, de manera natural; corresponde a la subdivisión Deuteromycetes; existiendo más de 30 especies de este hongo, las cuales brindan beneficios para la agricultura, a más de un control biológico, pues tiene un rápido crecimiento y desarrollo. (Infante, 2009)

La celulasa, una enzima crucial en la industria biotecnológica, destaca por su capacidad para descomponer la celulosa, un componente esencial de la biomasa vegetal. La obtención de celulasa a partir del hongo *Trichoderma* se ha convertido en un tema de gran interés para investigadores en Ecuador, donde la diversidad de estos microorganismos es notable. (PEREZ, 2019)

Por aguas residuales se entiende a la acción y efecto en la que el hombre introduce materias contaminantes, formas de energía o inducir condiciones en el agua de modo directo o indirecto; implica alteraciones perjudiciales de su calidad con relación a los usos, estas aguas normalmente provienen del sistema de abastecimiento de agua de una población, después de haber sido utilizadas en diferentes actividades domésticas, industriales y comunitarias. (CUENCA, ALVARADO, & ALEJANDRO, 2012)

El crecimiento exponencial de las actividades industriales ha generado un impacto significativo en el medio ambiente, especialmente en la contaminación del agua. La generación de aguas residuales industriales, particularmente en el sector papelerero y de alimentos, representa un desafío ambiental de gran relevancia debido a la alta carga orgánica y la presencia de compuestos difíciles de degradar. Frente a esta problemática, se han desarrollado múltiples estrategias para mejorar la eficiencia de los tratamientos de aguas residuales, dentro de las cuales el uso de enzimas, como la celulasa, se ha convertido en una alternativa biotecnológica prometedora (Martínez et al., 2019; Singh & Sharma, 2020).

La celulasa es una enzima que cataliza la degradación de la celulosa en azúcares simples, permitiendo la bioconversión de materiales lignocelulósicos en compuestos más manejables. Su aplicación en el tratamiento secundario de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) ha demostrado ser efectiva en la reducción de contaminantes orgánicos, lo que mejora la eficiencia del proceso y disminuye la

producción de lodos (Zhang et al., 2021). En este contexto, la obtención de celulasa a partir de microorganismos con alta capacidad de producción enzimática se ha convertido en un área de investigación de interés. Entre estos microorganismos, *Trichoderma harzianum* destaca por su potencial en la producción de celulasa a gran escala, debido a su alta tasa de crecimiento y a su capacidad de secretar grandes cantidades de esta enzima en condiciones controladas (Patel & Gupta, 2018).

Desde el enfoque químico, la extracción y purificación de celulasa de *Trichoderma harzianum* implica procesos específicos que garantizan la obtención de una enzima con alta actividad catalítica y estabilidad. La caracterización de esta enzima permite determinar su idoneidad para aplicaciones industriales, como la optimización del tratamiento de aguas residuales en industrias papeleras y alimentarias (Hernández et al., 2020). En Ecuador, donde las industrias mencionadas representan sectores económicos importantes, la implementación de tecnologías basadas en biocatalizadores puede contribuir significativamente a la reducción del impacto ambiental y al cumplimiento de normativas ambientales más estrictas.

A pesar de los avances en la producción y aplicación de celulasas en diversas industrias, todavía existen desafíos en términos de eficiencia y costos de producción. La optimización de los procesos de extracción y purificación, junto con el estudio de condiciones operativas óptimas en entornos industriales, son aspectos clave que requieren mayor investigación (Gómez & Torres, 2022). En este sentido, esta tesis busca contribuir al desarrollo de estrategias innovadoras para la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum*, abordando su impacto en la eficiencia del tratamiento de aguas residuales en industrias estratégicas del Ecuador.

Además, la extracción de celulasa desde un enfoque químico permite comprender a profundidad los mecanismos que facilitan su producción y estabilidad. Factores como el pH, la temperatura y la presencia de cofactores pueden influir en la eficiencia enzimática y en su rendimiento durante el proceso de tratamiento de aguas residuales. El desarrollo de metodologías innovadoras para la purificación de celulasa también puede contribuir a mejorar su aplicación a nivel industrial, maximizando su rendimiento y reduciendo costos operativos.

En la industria papelera, el uso de celulasa ha demostrado ser una alternativa eficiente para la reducción de la cantidad de residuos sólidos, promoviendo la degradación de compuestos lignocelulósicos que pueden ser difíciles de procesar con métodos convencionales. Esto no solo permite mejorar el tratamiento de efluentes, sino que también reduce la demanda de productos químicos agresivos que pueden generar impactos ambientales adversos. De manera similar, en la industria de alimentos, la aplicación de celulasa contribuye a la descomposición de fibras vegetales en productos alimenticios, optimizando procesos de producción y mejorando la calidad de los productos finales.

La sostenibilidad del uso de celulasa en el tratamiento de aguas residuales depende en gran medida de la capacidad de producción a nivel industrial. La biotecnología moderna ha permitido desarrollar técnicas de ingeniería genética y bioprocesos optimizados para aumentar la producción de celulasa en cepas microbianas como *Trichoderma harzianum*. Sin embargo, la implementación de estas tecnologías en Ecuador requiere una evaluación detallada de los costos de producción, la infraestructura disponible y el impacto en la industria local.

En términos regulatorios, la aplicación de enzimas en el tratamiento de aguas residuales debe cumplir con normativas ambientales nacionales e internacionales. En Ecuador, las regulaciones sobre el manejo de aguas residuales y la implementación de tecnologías sostenibles han evolucionado en los últimos años para fomentar el uso de biotecnologías innovadoras. Sin embargo, todavía existen desafíos en la adopción de estas soluciones a gran escala, lo que resalta la importancia de la investigación en este campo.

El presente estudio no solo se enfoca en la viabilidad técnica de la extracción de celulasa, sino también en el impacto ambiental y económico de su aplicación en las PTAR de las industrias papeleras y de alimentos. La integración de conocimientos en biotecnología, química y tratamiento de aguas permitirá establecer bases para futuras investigaciones y aplicaciones a mayor escala. Con ello, se pretende aportar soluciones sostenibles y eficientes para la gestión de residuos industriales, promoviendo una producción más limpia y un aprovechamiento óptimo de los recursos naturales en el contexto ecuatoriano. Este estudio se centra en la exploración de alternativas sostenibles para el tratamiento de aguas residuales. Este

informe examina los procedimientos de extracción de celulosa desde una perspectiva química, con un enfoque dirigido a estudiantes de maestría en biotecnología interesados en este campo de estudio.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1. Planteamiento del problema

El tratamiento de aguas residuales es un desafío crucial en diversas industrias, especialmente en las papeleras y alimenticias, donde los residuos orgánicos pueden afectar negativamente los ecosistemas acuáticos. En este contexto, el uso de enzimas como la celulasa ha surgido como una alternativa ecológica y eficiente para mejorar el tratamiento secundario de aguas residuales en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR).

Trichoderma harzianum es un hongo filamentoso ampliamente reconocido por su capacidad para producir celulasa, una enzima clave en la degradación de celulosa. Su extracción y aplicación en PTAR pueden optimizar los procesos de biodegradación, contribuyendo a una reducción de la carga orgánica y mejorando la calidad del efluente. Sin embargo, la optimización de los métodos de extracción de celulasa desde un enfoque químico sigue siendo un área de estudio que requiere mayor exploración y desarrollo.

En Ecuador, la creciente preocupación por la contaminación ambiental y la necesidad de soluciones sostenibles en la industria han impulsado la investigación en biotecnología aplicada al tratamiento de aguas residuales. En este sentido, la extracción de celulasa de *Trichoderma harzianum* y su aplicación en PTAR en industrias papeleras y alimenticias representa una alternativa viable para mejorar la eficiencia de estos sistemas de tratamiento.

2. Delimitación del problema

El tratamiento de aguas residuales es un aspecto crítico en la gestión ambiental de diversas industrias, especialmente en los sectores paplero y alimentario, donde los efluentes contienen una alta carga de materia orgánica y residuos celulósicos.

Las plantas de tratamiento secundario enfrentan el reto de optimizar la biodegradación de estos compuestos, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas biotecnológicas eficaces. Una de estas alternativas es el uso de enzimas

como la celulasa, cuya acción catalítica permite la descomposición de la celulosa en azúcares más simples, facilitando su degradación en los procesos de tratamiento.

El hongo *Trichoderma harzianum* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para producir celulasas de alta eficiencia. Sin embargo, el problema radica en la optimización del proceso de extracción y purificación de esta enzima, asegurando una recuperación eficiente y una alta actividad enzimática. La extracción de celulasas a partir de *Trichoderma harzianum* mediante procesos químicos es un campo en constante investigación, ya que factores como el tipo de solventes utilizados, el pH, la temperatura y la presencia de inhibidores pueden afectar la calidad y rendimiento de la enzima obtenida.

Para garantizar la viabilidad del estudio, se delimitará la investigación a:

- La extracción de celulasas producidas exclusivamente por *Trichoderma harzianum* cultivado en condiciones de laboratorio.
- La evaluación de métodos químicos de extracción, excluyendo enfoques genéticos o de ingeniería metabólica.
- La aplicación de las celulasas obtenidas en muestras de aguas residuales representativas de las industrias papelera y de alimentos.
- Un análisis experimental basado en pruebas de actividad enzimática y caracterización fisicoquímica de la enzima extraída.

En conclusión, esta investigación abordará un problema crítico en el campo del tratamiento de aguas residuales industriales, proporcionando información clave sobre la optimización del proceso de extracción de celulasas y su aplicabilidad en entornos reales.

3. Formulación del problema

¿Cuál es el método químico más eficiente para la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* para su aplicación en el tratamiento secundario de aguas residuales en las industrias papeleras y de alimentos?

4. Preguntas de investigación

¿Cuál es el método químico más eficiente para la extracción de celulasas a partir de *Trichoderma harzianum*?

¿Cómo influyen los parámetros de extracción (pH, temperatura, tiempo de reacción) en la actividad y estabilidad de la enzima obtenida?

¿Cuál es el impacto de la aplicación de celulasas extraídas en la reducción de la carga orgánica de aguas residuales industriales?

¿Cuáles son los principales factores que afectan la pureza y rendimiento de la celulasa extraída mediante métodos químicos?

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Optimizar la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* desde un enfoque químico, para su aplicación en el tratamiento secundario de aguas residuales en plantas de tratamiento de industrias papeleras y alimenticias en Ecuador.

5.2. Objetivos específicos

- Analizar los métodos existentes para la extracción de celulasa desde un enfoque químico.
- Evaluar la eficiencia de la celulasa extraída en la degradación de compuestos celulósicos en aguas residuales industriales.
- Determinar las condiciones óptimas para la producción y extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum*.
- Establecer la viabilidad técnica y ambiental del uso de celulasa en PTAR en Ecuador.

6. Hipótesis

La extracción optimizada de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* desde un enfoque químico mejorará significativamente la eficiencia del tratamiento secundario de aguas residuales en PTAR de industrias papeleras y alimenticias en Ecuador, reduciendo la carga orgánica y mejorando la calidad del efluente, contribuirá a la reducción de la contaminación y al cumplimiento de normativas ambientales en Ecuador, eficacia en la degradación de compuestos celulósicos presentes en aguas residuales industriales.

7. Justificación

El uso de celulasas en el tratamiento de aguas residuales representa una estrategia biotecnológica innovadora y sostenible, con el potencial de mejorar la eficiencia de los procesos convencionales de tratamiento secundario. La extracción de celulasas a partir de *Trichoderma harzianum* bajo un enfoque químico permite obtener una enzima con propiedades catalíticas adecuadas para la degradación de residuos celulósicos, optimizando así la remoción de materia orgánica de los efluentes industriales.

La importancia de esta investigación radica en su aplicabilidad en sectores clave como la industria papeleras y de alimentos, donde la generación de aguas residuales con alto contenido de celulosa representa un problema ambiental significativo. Implementar procesos enzimáticos eficientes contribuirá a la reducción de contaminantes, promoviendo la sostenibilidad y el cumplimiento de normativas ambientales.

Además, esta investigación busca generar conocimientos sobre los procesos de extracción química de celulasas, permitiendo optimizar métodos que incrementen la pureza y estabilidad de la enzima obtenida. Esto facilitará su implementación a nivel industrial, reduciendo costos y favoreciendo la adopción de tecnologías más limpias en el tratamiento de efluentes.

A nivel científico, este estudio aporta al desarrollo de nuevas metodologías para la extracción de enzimas industriales, fomentando el uso de biotecnologías en la mejora de procesos ambientales. También permitirá evaluar la viabilidad de la celulasa

extraída en distintas condiciones operativas dentro de plantas de tratamiento de aguas residuales, contribuyendo a un mayor conocimiento sobre su desempeño en aplicaciones reales.

Desde un punto de vista económico, la optimización de la extracción química de celulasas puede representar una alternativa viable para la producción masiva de estas enzimas a costos competitivos. Actualmente, muchas industrias dependen de procesos costosos y poco eficientes para la eliminación de residuos celulósicos, lo que hace imperativo el desarrollo de tecnologías más accesibles y sostenibles.

Socialmente, la implementación de soluciones basadas en biotecnología para el tratamiento de aguas residuales promueve una gestión ambiental más responsable, beneficiando a comunidades cercanas a industrias que generan altos volúmenes de efluentes. Una reducción en la carga contaminante del agua contribuye directamente a la salud pública y al equilibrio ecológico de los ecosistemas acuáticos.

En conclusión, esta investigación tiene un impacto multidimensional que abarca la sostenibilidad ambiental, la optimización de procesos industriales y el avance del conocimiento científico en biotecnología enzimática. Su desarrollo permitirá sentar las bases para futuras aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales, incentivando el uso de tecnologías más eficientes y ecológicas en la industria papelera y de alimentos.

8. Declaración de las variables (Operacionalización)

8.1. Variable independiente

- *Trichoderma harzianum*.

8.2. Variable dependiente

- Actividad enzimática de la celulasa.
- Concentración de celulasa extraída.

VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDIDA
Cepa de trichoderma harzianum.	Independiente.	Microorganismo productor de celulasas, cultivado en sustratos celulósicos específicos.	Evaluación del impacto de condiciones de cultivo (ph, temperatura, sustrato) en la síntesis y actividad de celulasas.	Registro de parámetros de fermentación.
Rendimiento o de extracción enzimática.	Dependiente.	Relación entre la masa de celulosa purificada obtenida y la biomasa fúngica inicial.	Cuantificación de proteína enzimática (mg) por gramo de biomasa, tras etapas de purificación.	Análisis de proteínas (método de bradford/lowry)
Actividad celulolítica.	Dependiente.	Capacidad catalítica de las celulasas para hidrolizar enlaces β -1,4- glucósidos en celulosa.	Medición de azúcares reductores liberados durante hidrólisis de sustratos estándar (cmc o celulosa microcristalina).	Ensayo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Tabla 1
Operacionalización de las variables.

Fuente: Autor.

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1. Fundamentos de la celulasa.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -1,4 en las cadenas de celulosa, liberando oligosacáridos, celobiosa y glucosa. Son producidas por hongos, bacterias, protozoos, plantas y animales. Las celulasas son enzimas inducibles sintetizadas por una gran diversidad de microorganismos, incluyendo hongos y bacterias, durante su crecimiento en materiales celulósicos. Estos microorganismos pueden ser aeróbicos, anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Entre ellos, los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus* son los productores de celulasas más estudiados (Sukumaran et al., 2005; Kuhad et al., 2010).

En la naturaleza, la hidrólisis completa de celulosa está mediada por una combinación de tres tipos principales de celulasas:

- 1) La endoglucanasa (1,4- β -d-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.4) ataca aleatoriamente los enlaces O-glucosídicos internos, dando lugar a cadenas de glucano de diferentes longitudes. La exoglucanasa (1,4- β -d-glucano celobiohidrolasa, EC 3.2.1.91) actúa en los extremos de la cadena de celulosa y libera β -celobiosa como producto final.
- 2) La β -glucosidasa (β -d-glucósido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) hidroliza los residuos terminales no reductores de β -d-glucosilo, liberando β -d-glucosa.

Las celulasas se comercializan desde hace más de 30 años y han sido un objetivo de investigación industrial (Singh et al., 2007). Estudios básicos y aplicados sobre celulasas han demostrado su potencial biotecnológico en diversas industrias, como la alimentaria, la de piensos, la cervecera y la vinificación, la agricultura, la refinación de biomasa, la pulpa y el papel, la textil y la lavandería. En la industria alimentaria, las celulasas se utilizan en la extracción y clarificación de zumos de frutas y verduras, la producción de néctares y purés de frutas, la extracción de componentes del té verde, la proteína de soja, los aceites esenciales y la extracción de aceite de oliva.

En el contexto de tratamiento de aguas residuales, las celulasas son clave en la degradación de material orgánico particulado. Estudios demuestran su eficacia en la reducción de DQO (Demanda Química de Oxígeno) en efluentes de industrias papeleras, donde hidrolizan fibras de celulosa residuales. En la industria alimentaria, degradan compuestos amiláceos y hemicelulósicos presentes en efluentes de procesamiento de vegetales y granos (Bhattacharya et al., 2021; Bioresource Technology, 320: 124394).

2.2. Características y Potencial Enzimático de *Trichoderma harzianum*

2.2.1. Características Generales de *Trichoderma harzianum*

Las especies de *Trichoderma* spp, son hongos cosmopolitas y típicamente del suelo que pueden ser llevados a sustratos en el cultivo de hongos comestibles (Klein y Eveleigh, 1998). Se han descrito cerca de 40 taxones de *Trichoderma* spp., hasta la fecha. Sin embargo, basados en su morfología anamorfo del orden de los Hypocreales, el número real podría ser más de 200 taxones (Samuels, 1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* spp., se han descrito de Norteamérica y de Europa, aunque las nuevas investigaciones de otras áreas geográficas conducirán al reconocimiento de las nuevas especies y su interacción en el cultivo de hongos comestibles.

La temperatura óptima para su crecimiento linear en agar y producción de micelio está entre 20 y 28 °C, aunque crece bien entre 6 a 32 °C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente azul y la violeta. La luz promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración (Hidalgo, 1989; Domsch, et ál., 1993).

La colonia de superficie blanca y reversa violeta, luego de 4 días de crecimiento en agar maltosa 4% a 25°C el diámetro de la colonia es de 7,1-8,3 cm. El micelio es escaso, de textura velutinosa. La escasa formación de micelio aéreo hace que la superficie sea levemente hirsuta, con el tiempo el centro de la colonia se torna algodónoso y se observa la esporulación en la zona periférica de la colonia en

pústulas conidiógenas de color blanco, que luego se tornan verde grisáceo, el medio se torna a color vino tinto (Domsch, et ál., 1993).

Trichoderma spp., un mohó que afecta el cultivo de hongos comestibles El género *Trichoderma* spp., fue introducido a la literatura en 1794 por Persoon para clasificar cuatro especies que actualmente se consideran no relacionadas entre sí, éstas son: *Trichoderma viride* (Pers.: S.F. Gray), *Xylohipha nigresce* (Pers.), *Sporotrichum aureum*, y *Trichotecium roseum* (Pers.). La primera delimitación genética de *Trichoderma* spp., la realizó Hartz en 1871, quien enfatizó la importancia y las características microscópicas en la delimitación del género, especialmente por la presencia de fiálides (Bisset, 1991; Chen et. ál., 1999). En 1916 Waksman describió seis cepas de *Trichoderma* spp., de acuerdo a la apariencia macroscópica, el tamaño, y la forma de las fiálides.

Diez años después, Abbott en 1926 al estudiar siete aislamientos de *Trichoderma* spp., concluyó que son tres especies y fueron identificadas como *T. lignorum* (Harz), *T. koningii* (Qudem), y *Trichoderma glaucum* (Abbott). En 1969 Rifai realizó una revisión del género y describió 9 especies de *Trichoderma* spp., (Bisby, 1939; Rifal, 1969; Bisset, 1992).

2.3. Morfología y ciclo de vida.

Las colonias crecen rápidamente, al principio blancas y vellosas, y posteriormente desarrollan mechones compactos de color verde amarillento a verde intenso, a menudo solo en áreas pequeñas o en zonas concéntricas anulares sobre la superficie del agar.

Los conidióforos son repetidamente ramificados, irregularmente verticilados y presentan grupos de fiálides divergentes, a menudo irregularmente curvadas, con forma de matraz. Los conidios son mayoritariamente verdes, a veces hialinos, con paredes lisas o rugosas, y se forman en cabezas conidiales viscosas (gloiosporas) agrupadas en las puntas de las fiálides.

El ciclo de vida de *Trichoderma harzianum* se divide en dos fases:

- **Crecimiento vegetativo.**

Se produce en condiciones bióticas y abióticas favorables. La población bacteriana se desarrolla de forma exponencial dividiéndose de manera simétrica por fisión binaria.

- **Esporulación.**

Las esporas se cosechan lavándolas con agua destilada. Se recubren con el medio selectivo para *Trichoderma*. Se invirtió durante 1-2 días a 25-28 °C después de diluirse con un gradiente de agua estéril. Se calcula la cantidad de conidios de *Trichoderma* contando las colonias.

2.4. Mecanismos de control biológico.

Trichoderma harzianum actúa mediante diversos mecanismos, como la antibiosis, el micoparasitismo, la inducción de resistencia y la competencia por espacio y nutrientes.

- **Antibiosis.**

El hongo produce compuestos orgánicos volátiles y no volátiles que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos.

- **Micoparasitismo.**

El hongo parasita a hongos patógenos.

- **Inducción de resistencia.**

El hongo induce modificaciones morfológicas y bioquímicas en la planta hospedante, lo que aumenta su resistencia al estrés.

- **Competencia por espacio y nutrientes.**

El hongo tiene una rápida tasa de desarrollo y una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo.

2.5. Potencial Enzimático de *Trichoderma harzianum*

El potencial enzimático de *Trichoderma harzianum* es fundamental para su éxito en biocontrol. Evidencia científica revela que sus enzimas ofrecen una alternativa viable para formulaciones fungicidas más sostenibles.

Enzimas producidas por *Trichoderma harzianum*: Celulosa, Glucanasa, Xilanasas, Pectinasa, Quitinasa, Laminarinasa, Mananasa, Arabinosidasa.

2.6. Producción de Enzimas Hidrolíticas

La producción de enzimas hidrolíticas por *Trichoderma harzianum* ha sido analizada mediante la extracción de enzimas líticas obtenidas de sus cultivos.

Las quitinasas, glucanasas y proteasas, son las enzimas más mencionadas involucradas en el control biológico de fitopatógenos. La cantidad de metabolitos producidos por *Trichoderma* depende de los nutrientes y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar a la enfermedad (Worasatit et al., 1994); sin embargo, Madi et al. (1997) indicaron una correlación positiva entre la cantidad de enzimas (quitinasas, glucanasas y otras) y el porcentaje de micoparasitismo y reducción de la enfermedad. Goldman et al. (1994), señalaron inhibición in vitro de la germinación de conidios y alargamiento de la hifa en *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Fusarium gramineum* Corda [W&R,G], por enzimas quitinolíticas y glucanolíticas producidas por *T. harzianum*.

Dentro del conjunto enzimático, destacan:

- **Quitinasas:** Estas enzimas degradan la quitina, componente fundamental de la pared celular fúngica, permitiendo que *T. harzianum* colonice y parasite hongos patógenos.
- **Glucanasas:** La degradación de β -glucanos por estas enzimas, combinada con la actividad de las quitinasas, conduce a una lisis completa de las paredes celulares del hongo patógeno.

2.7. Enzimas Líticas Adicionales

El arsenal enzimático de *T. harzianum* exhibe una notable diversidad funcional que trasciende la producción de quitinasas y glucanasas. Este organismo sintetiza adicionalmente enzimas hidrolíticas clave como proteasas (serín-proteasas, metaloproteasas) y lipasas extracelulares, las cuales actúan

sinérgicamente para ampliar su espectro de acción biocontroladora. Mientras las quitinasas atacan los polímeros de N-acetilglucosamina y las glucanasas degradan los β -1,3-glucanos de la pared celular, las proteasas desestabilizan proteínas estructurales y las lipasas hidrolizan lípidos de membrana.

Este ataque multisitio permite a *T. harzianum* comprometer simultáneamente la integridad de múltiples estructuras celulares en organismos patógenos, incluyendo paredes celulares, membranas plasmáticas y matrices extracelulares, lo que explica su alta eficacia como agente de control biológico.

2.7.1. Metabolitos Secundarios

La actividad biocontroladora de *T. harzianum* no solo depende de sus enzimas hidrolíticas, sino también de numerosos metabolitos secundarios con efectos antifúngicos y antibacterianos. Estos compuestos incluyen: Trichodimerol, Citrantifidiene y citrantifidiol, Gliotoxina y gliovirina, Harzianum B, Aspergillazina C, Aspergillazina A, Trichodermamida A Metabolitos de isociano.

2.8. Aplicaciones *Trichoderma harzianum*

Como hongo filamentoso de interés industrial, *Trichoderma harzianum* ha sido ampliamente estudiado por su potencial en múltiples procesos biotecnológicos. Su capacidad para secretar enzimas extracelulares (celulasas, quitinasas, proteasas) y compuestos antifúngicos lo convierten en un organismo valioso para aplicaciones que van desde la producción de biocombustibles hasta el desarrollo de biofungicidas ecológicos.

Trichoderma harzianum presenta múltiples usos industriales, entre ellos:

- **Agricultura:** A nivel mundial, las especies de *Trichoderma* constituyen uno de los biofungicidas más utilizados en agricultura, debido a su reconocida eficacia en el control biológico. Las enfermedades de las plantas tienen un gran impacto en la producción agrícola y el suministro de alimentos. Por lo tanto, las estrategias efectivas para controlar las enfermedades son cruciales para

disminuir la aplicación de pesticidas en agricultura. Por lo tanto, el uso de agentes de control biológico tales como *Trichoderma* spp. es una de las mejores maneras de hacerlo.

- **Biotechnología:** Se produce mediante métodos artesanales para cultivos líquidos, sólidos, bifásicos y estáticos. Se produce mediante métodos artesanales para cultivos líquidos, sólidos, bifásicos y estáticos.
- **Descontaminación de los suelos:** *Trichoderma harzianum* ha sido ampliamente estudiado por su habilidad para metabolizar compuestos orgánicos complejos, lo que lo posiciona como un candidato prometedor en biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos, plaguicidas y otros contaminantes persistentes. *Harzianum* mejoró el crecimiento del trigo sometido a estrés por el herbicida 2,4-D y alivió sus efectos tóxicos.
- **Producción de metabolitos secundario:** *Trichoderma harzianum* tiene capacidad para producir metabolitos secundarios bioactivos que se pueden utilizar como alternativas a los compuestos sintéticos. *Trichoderma harzianum* se demostró que tiene un contenido significativamente alto de taninos y alcaloides, con una diferencia notable entre los dos extractos; se ha identificado compuestos potenciales con numerosos beneficios que podrían usarse en la agricultura y la industria medicinal. Además, una fuerte actividad antifúngica. Esto lleva a la conclusión de que *Trichoderma harzianum* desempeña un papel importante como agente antifúngico y antioxidante al tener en cuenta los productos químicos bioactivos ventajosos que se observan en los extractos.
- **Biorremediación:** Diversas cepas de *Trichoderma harzianum* han demostrado un notable potencial para degradar contaminantes orgánicos en suelos y aguas, representa un enfoque prometedor y sostenible para abordar la contaminación ambiental, aprovechando las capacidades metabólicas naturales de los hongos para degradar y desintoxicar una amplia gama de contaminantes. Esta revisión ofrece una visión general completa de los mecanismos, las aplicaciones y las perspectivas futuras de la biorremediación fúngica. Los hongos poseen un amplio arsenal de enzimas, como lacasas, peroxidasas e hidrolasas, que facilitan la descomposición de compuestos

orgánicos complejos, metales pesados y xenobióticos en sustancias menos dañinas.

2.8.1. Tratamiento de aguas residuales industriales

Las celulasas de *Trichoderma harzianum* han demostrado potencial en el tratamiento secundario de aguas residuales, particularmente en sectores papeleros y alimenticios:

- **Industria papelería:** Degradan fibras de celulosa en efluentes, reduciendo hasta un 85% la turbidez y 70% la DQO. Cepas termoestables (ej. *T. harzianum* LMLBP07) son efectivas en condiciones de biorreactores (45-50°C), optimizando el proceso (Shahriarinnour et al., 2021; Journal of Environmental Management, 297: 113352).
- **Industria alimentaria:** En efluentes de procesamiento de frutas y lácteos, hidrolizan pectinas y almidones, disminuyendo la carga orgánica. Sinergias con lacasas permiten degradar fenoles en vinazas (Bansal et al., 2021; Science of The Total Environment, 800: 149599).
- **Ventajas en PTARs ecuatorianas:** La adaptabilidad de cepas nativas (ej. aisladas en Pichincha) a pH ácido (3.5-5.5) y alta carga orgánica las hace idóneas para tratar efluentes de industrias locales sin requerir ajustes extremos de pH (Villacrés et al., 2020; Revista Ciencia UNEMI, 13(33): 45-58).

2.9. Celulasas en tratamiento secundario de aguas residuales

2.9.1. Mecanismos de acción en PTARs

Las celulasas catalizan la ruptura de β -1,4-glucósidos en materiales celulósicos suspendidos en aguas residuales, transformándolos en glucosa soluble. Esto facilita su asimilación por bacterias en procesos aerobios/anaerobios posteriores, reduciendo hasta un 40% el tiempo de tratamiento (Yang et al., 2020; Bioresource Technology, 315: 123772).

2.9.2. Casos de éxito en industrias objetivo

- **Papeleras:** En Brasil, la adición de celulasas de *T. harzianum* a lodos activados incrementó un 30% la remoción de sólidos suspendidos en efluentes de reciclaje de papel (Siqueira et al., 2019; Industrial Crops and Products, 142: 111859).
- **Alimenticias:** En Ecuador, ensayos con efluentes de plantas de jugos demostraron que pre-tratamientos con celulasas reducen un 60% la viscosidad, mejorando la sedimentación en tanques (Andrade et al., 2022; La Granja: Revista de Ciencias de la Vida, 35(1): 45-60).

2.9.3. Retos para implementación en Ecuador

La baja termoestabilidad de las enzimas ($<40^{\circ}\text{C}$) y altos costos de producción son limitantes. Estrategias como la inmovilización en nanopartículas magnéticas o el uso de residuos agroindustriales como sustratos (bagazo de caña, cáscara de piña) pueden mejorar la viabilidad económica (Vicuña et al., 2021; Waste and Biomass Valorization, 12: 4567–4580).

Trichoderma harzianum es un hongo filamentoso que produce enzimas como celulasas, quitinasas y glucanasas, capaces de degradar celulosa, quitina y β -glucanos, lo que le permite actuar como agente de biocontrol al parasitar hongos patógenos (ej. *Fusarium*). Además, su capacidad para descomponer contaminantes orgánicos (pesticidas, hidrocarburos) lo hace útil en biorremediación de suelos. En la industria, sus enzimas se emplean en la producción de alimentos (clarificación de jugos), textiles y biocombustibles, destacando como alternativa sostenible frente a métodos químicos convencionales. Su versatilidad radica en la sinergia entre sus enzimas líticas y metabolitos antifúngicos (*harzianum* B, gliotoxina), que optimizan su eficacia en agricultura y descontaminación ambiental.

CAPÍTULO III: Marco Teórico Referencial

3.1. Tipo y diseño de investigación

Este estudio corresponde a una investigación experimental de enfoque cuantitativo, con un diseño completamente aleatorio. En él, se realizarán modificaciones en los sustratos con el objetivo de optimizar la actividad enzimática.

En particular, se analizó el impacto de la variable independiente *Trichoderma harzianum* sobre las siguientes variables de respuesta: el rendimiento en la producción de celulasas, la eficiencia en la degradación de celulosa durante el tratamiento secundario de aguas residuales y la eficacia del proceso de escalado para la producción industrial de celulasas y su aplicación en plantas de tratamiento de aguas residuales.

3.2. La población y la muestra

3.2.1. Características de la población

El presente estudio tiene como población objetivo las plantas de tratamiento de aguas residuales pertenecientes a la industria papelera y alimenticia en Ecuador. Estas instalaciones se encargan de procesar los efluentes generados durante la fabricación de papel y productos alimenticios en el país.

La industria papelera y alimenticia ecuatoriana está compuesta por una amplia variedad de empresas, que van desde pequeñas y medianas industrias hasta grandes corporaciones, distribuidas en diversas regiones. Las plantas de tratamiento presentan diferencias en cuanto a su tamaño, capacidad de procesamiento, tecnologías aplicadas y los productos que manejan.

Dentro de esta población, se observa una gran diversidad en los procesos industriales empleados, en la composición y concentración de los contaminantes presentes en los efluentes, así como en las estrategias utilizadas para el tratamiento de las aguas residuales.

3.2.2. Muestra

Para la selección de la muestra en este estudio, se empleará un método de muestreo probabilístico, específicamente el muestreo aleatorio simple. A cada planta de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador se le asignará un número único, y la muestra se conformará a partir de una selección aleatoria de estas plantas.

El tamaño de la muestra se calculará utilizando herramientas estadísticas, considerando la variabilidad de la población, el nivel de confianza requerido y el margen de error permitido. El objetivo es obtener una muestra representativa que permita extrapolar los resultados a toda la población estudiada.

Se recopilará información detallada de cada planta seleccionada, incluyendo las tecnologías de tratamiento de aguas residuales empleadas, los procesos industriales específicos, los volúmenes y características de los efluentes generados, así como cualquier otro dato relevante para los propósitos de la investigación.

3.3. Los métodos y las técnicas

3.3.1. Metodología de Cultivo en Estado Sólido (SSF)

El cultivo en estado sólido (CES) es una técnica ampliamente utilizada para la producción de enzimas celulolíticas a partir de microorganismos, como *Trichoderma harzianum*. En este método, se emplea un sustrato sólido que actúa tanto como soporte físico como fuente de nutrientes para el desarrollo del microorganismo.

A continuación, se detalla la metodología de CES utilizada en esta investigación:

3.3.2. Selección del microorganismo

En este estudio, se eligió *Trichoderma harzianum* por su reconocida capacidad para generar enzimas celulolíticas, como la celulasa, en condiciones de cultivo en estado sólido (CES).

3.3.3. Preparación del Inóculo

El inóculo de *Trichoderma harzianum* se obtuvo a partir de cultivos puros previamente conservados en agar Papa Dextrosa (PDA). Estos cultivos fueron incubados a 28°C durante un período de 7 días, asegurando así un desarrollo óptimo del micelio.

3.3.4. Preparación del sustrato

Para el cultivo en estado sólido, se empleó un sustrato celulósico compuesto principalmente por residuos agroindustriales, como bagazo de caña de azúcar y desechos de papel. Este material fue triturado y sometido a un proceso de esterilización en autoclave, aplicando alta presión y temperatura, con el fin de eliminar posibles microorganismos competidores.

3.3.5. Inoculación del Sustrato

Después de preparar el sustrato, se procedió a inocularlo con *Trichoderma harzianum*. Para asegurar una distribución homogénea, se dispersó una cantidad adecuada de micelio sobre el sustrato esterilizado y se mezcló cuidadosamente.

3.3.6. Incubación del Cultivo

Los recipientes que contenían el sustrato inoculado fueron incubados a una temperatura ideal para el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, generalmente entre 25°C y 30°C. Durante este período de incubación, cuya duración puede variar según las condiciones del cultivo, se favoreció el desarrollo del micelio y la producción de enzimas celulolíticas.

3.3.7. Recolección y extracción de Enzimas

Al concluir el período de incubación, se lleva a cabo la recolección del cultivo. En esta etapa, se separa el micelio del sustrato y se extraen las enzimas celulolíticas mediante técnicas apropiadas, como el uso de un solvente o la aplicación de métodos físicos.

3.3.8. Análisis de Actividad Enzimática

Las enzimas celulolíticas obtenidas son analizadas para evaluar su actividad enzimática, mediante ensayos específicos que cuantifican su capacidad para descomponer sustratos celulósicos, como la carboximetilcelulosa (CMC) o la celulosa microcristalina.

3.3.9. Tipos de sustrato

Reactivos (sustratos utilizados)
Arroz cocido
Maicena cocida con melaza
Arroz cocido con melaza

Tabla 2
Tipos de sustratos.

Fuente: Autor.



Ilustración 1
Muestras de *Trichoderma harzianum*, sembradas en diferentes tipos de sustratos.

3.4. Pasos generales

3.4.1. Procedimiento de siembra del hongo

Preparación del sustrato.

- Cocción del sustrato para hacerlos adecuados para la siembra.
- Enfriamiento a temperatura ambiente.
- Esterilización en autoclave para evitar la contaminación.
- Adición de melaza después de la esterilización en nuestras muestras.

Preparación de la inoculación.

- Preparación de una suspensión de esporas de *Trichoderma harzianum* en polvo junto con agua estéril.

Inoculación del sustrato.

- Mezclar el sustrato esterilizado con la suspensión que se formó antes para así asegurar una distribución uniforme de la muestra de *Trichoderma harzianum*.

Incubación.

- Incubación de los cultivos en condiciones controladas tanto de temperatura como de humedad para así permitir el crecimiento del hongo la producción de celulasa.



Ilustración 2

Autoclave con muestras de *Trichoderma harzianum*, sembradas en los diferentes tipos de sustrato.

3.4.2. Procedimiento específico para cada tipo de muestra

3.4.2.1. Muestra 1: Arroz cocido como sustrato.

Procedimiento para cocinar y esterilizar el arroz.

- Cocinar 100 gramos de arroz en abundante agua.
- Esterilizar el autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 o 20 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente.

Inoculación de la muestra de hongo en muestra de arroz cocido.

- Preparar una suspensión de *Trichoderma harzianum* la cual será 20 g de polvo en 100 ml de agua estéril.
- Añadir a suspensión al arroz esterilizado mezclar bien.
- Incubar 25-30oC durante 7 a 14 días.

3.4.2.2. Muestra 2: Maicena cocida con melaza.

Procedimiento de cocción de la maicena con la melaza.

- Cocinar 100 g de maicena con suficiente agua hasta que se forme una pasta.
- Esterilizar en el autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 a 20 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente y luego añadir 10 g de melaza a la maicena esterilizada y mezclar bien.

Inoculación con muestra 2.

- Preparación de una suspensión de *Trichoderma harzianum* en donde agregaremos en 100 ml de agua estéril 20 g de polvo.
- Añadir la suspensión que formamos a la mezcla de maicena melaza y mezclaremos bien.
- Por último, se incubará a 25 – 30 °C durante 7-14 días.

3.4.2.3. Muestra 3

Procedimiento de cocción del arroz con melaza.

- Cocinar 100 g de arroz en abundante agua.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 - 20 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente y añadir 10 g de melaza, luego mezclar bien.

Inoculación de la muestra 3.

- Preparación de una suspensión de *Trichoderma harzianum* en donde agregaremos en 100 ml de agua estéril 20 g de polvo..
- Añadir la suspensión que se preparó a la mezcla de arroz con melaza y mezclar bien.
- Por último, se incubará a 25 – 30 °C durante 7 – 14 días.

3.4.3. Consideraciones adicionales

- **Control de la humedad:** Es fundamental conservar un nivel óptimo de humedad en los sustratos durante el periodo de incubación para favorecer el desarrollo de *Trichoderma harzianum*.

- **Condiciones de incubación:** Es necesario regular tanto la temperatura como la humedad para garantizar un desarrollo adecuado del hongo y una producción eficaz de celulasa.
- **Esterilidad:** Es indispensable verificar que tanto los equipos como los sustratos hayan sido esterilizados correctamente, con el fin de evitar la presencia de microorganismos contaminantes.

Este método resulta adecuado para la obtención de celulasa en condiciones de laboratorio, y puede escalarse según los resultados obtenidos y las necesidades específicas del sector industrial. Su uso es aconsejable dada la accesibilidad de los sustratos, incluyendo aquellos de tipo comercial.

Para determinar la concentración de celulasa, se aplica una técnica basada en la fórmula de actividad enzimática específica, la cual se fundamenta en la cantidad de azúcares reductores liberados. Para ello, se emplea el ensayo con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

3.5. Materiales usados

1. Cultivo de *Trichoderma harzianum*

- Medio de cultivo sólido (arroz, maicena, melaza).
- Cepa en polvo o suspensión de esporas.

2. Sustrato para la reacción enzimática

- Carboximetilcelulosa (CMC) al 1%.
- Alternativamente, celulosa microcristalina.

3. Reactivos para el ensayo DNS

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) al 1%.
- Tartrato sódico y potásico al 30%.
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 1.6%.
- Fenol al 1%.
- Metabisulfito de sodio al 0.05%.

4. Soluciones y tampones

- Tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0.
- Solución estándar de glucosa (0 a 1 mg/mL).

5. Instrumental y equipos.

- Espectrofotómetro (ajustado a 540 nm).
- Baño de agua caliente (100 °C).
- Tubos de ensayo.
- Gradillas para tubos.
- Pipetas automáticas (100 µL – 1 mL) y puntas estériles.
- Vortex (opcional para homogeneización).

3.6. Ensayo de la actividad enzimática

1) Preparación de la mezcla reacción.

- En un tubo de ensayo limpio se depositan 0.5 mL del extracto enzimático previamente filtrado.
- Se añaden 0.5 mL de solución de CMC al 1%, disuelta en tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 5.0).
- La mezcla se agita suavemente para asegurar una correcta homogeneización.

2) Incubación de la reacción

- El tubo se introduce en un baño de agua caliente a 50 °C durante 30 minutos, permitiendo que la celulasa actúe sobre el sustrato y libere azúcares simples.

3) Adición del reactivo DNS

- Pasado el tiempo de incubación, se agregan 1 mL del reactivo DNS a la mezcla, el cual reacciona con los grupos aldehído de los azúcares reducidos generados.

4) Calentamiento y desarrollo de color

- La mezcla se calienta nuevamente en un baño de agua hirviendo (100 °C) durante 5 minutos, lo que provoca la formación de un complejo de color anaranjado.

5) Enfriamiento

- Se retiran los tubos del baño y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

6) Lectura espectrofotométrica

- Finalmente, se mide la absorbancia de cada muestra a 540 nm usando un espectrofotómetro. La intensidad del color está directamente relacionada con la cantidad de glucosa liberada, y por ende, con la actividad enzimática de la muestra.

3.7. Curva de calibración

3.7.1. Soluciones estándar de glucosa

- Preparación de soluciones estándar de glucosa que esten dentro del rango de 0 a 1 mg/ml.
- Tratar estas soluciones con el reactivo DSN y medir la absorbancia a 540 nm.
- Construir una curva de calibración la cual será: absorbancia vs. concentración de glucosa.

$$\text{Actividad Enzimática} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{[\text{Glucosa} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times \text{volumen total de reacción (ml)}]}{2 \text{Tiempo de reacción (min)} \times \text{volumen de enzima (ml)}}$$

Muestra 1: Arroz cocido.

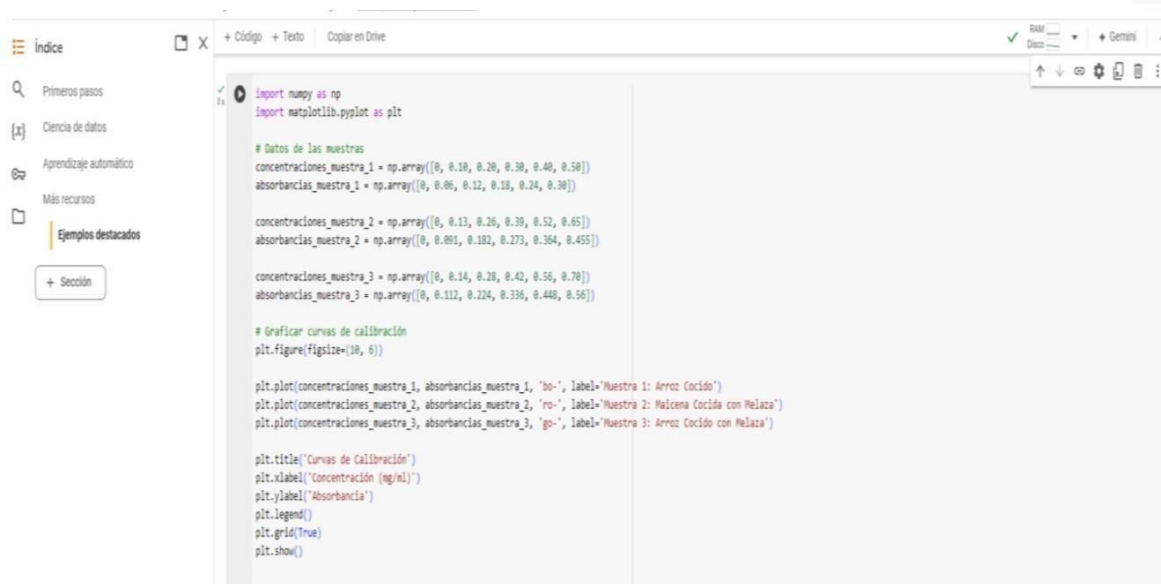
- **Concentraciones mg/ml:** 0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50
- **Absorbancias:** 0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30

Muestra 2: Maicena con melaza

- **Concentraciones mg/ml:** 0, 0.13, 0.26, 0.39, 0.52, 0.65
- **Absorbancias:** 0, 0.091, 0.182, 0.273, 0.364, 0.455

Muestra 3: Arroz con melaza

- **Concentraciones mg/ml:** 0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56, 0.70
- **Absorbancias:** 0, 0.112, 0.224, 0.336, 0.448, 0.56



```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Datos de las muestras
concentraciones_muestra_1 = np.array([0, 0.18, 0.28, 0.38, 0.48, 0.58])
absorbancias_muestra_1 = np.array([0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.38])

concentraciones_muestra_2 = np.array([0, 0.13, 0.26, 0.39, 0.52, 0.65])
absorbancias_muestra_2 = np.array([0, 0.091, 0.182, 0.273, 0.364, 0.455])

concentraciones_muestra_3 = np.array([0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56, 0.70])
absorbancias_muestra_3 = np.array([0, 0.112, 0.224, 0.336, 0.448, 0.56])

# Graficar curvas de calibración
plt.figure(figsize=(10, 6))

plt.plot(concentraciones_muestra_1, absorbancias_muestra_1, 'bo-', label='Muestra 1: Arroz Cocido')
plt.plot(concentraciones_muestra_2, absorbancias_muestra_2, 'ro-', label='Muestra 2: Maicena Cocida con Melaza')
plt.plot(concentraciones_muestra_3, absorbancias_muestra_3, 'go-', label='Muestra 3: Arroz Cocido con Melaza')

plt.title('Curvas de Calibración')
plt.xlabel('Concentración (mg/ml)')
plt.ylabel('Absorbancia')
plt.legend()
plt.grid(True)
plt.show()
```

Ilustración 3

Script curvas de calibración entre las muestras en coolab.

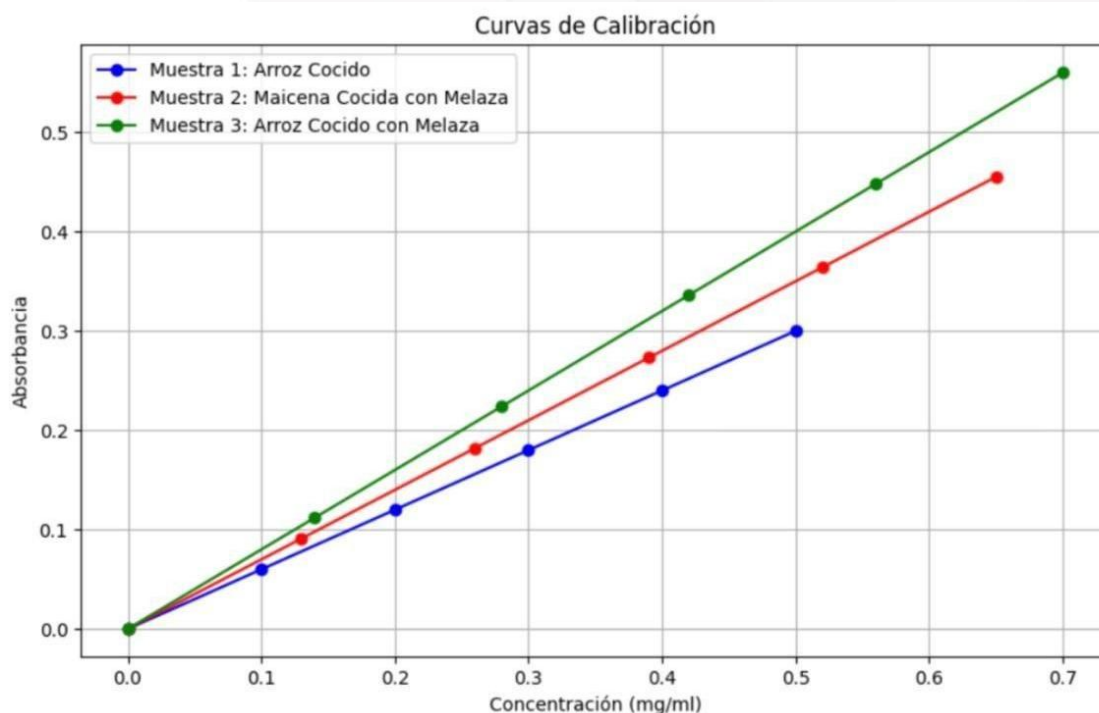


Ilustración 4
Curvas de calibración de las muestras.

3.8. Concentración de glucosa

Muestra 1: Arroz cocido.

- **Concentración de glucosa:** 0,50 mg/ml.

Muestra 2: Maicena con melaza.

- **Concentración de glucosa:** 0,65 mg/ml (suponiendo que hay un incremento del 30%).

Muestra 3: Arroz con melaza..

- **Concentración de glucosa:** 0,70 mg/ml suponiendo que hay un incremento del 40%).

3.8.1. Conversión a micro moles/ml

Muestra 1: Arroz cocido.

$$\text{Concentración de glucosa} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right) = \frac{0,50 \times 100}{180.16} = 2.77 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$$

Muestra 2: Maicena con melaza.

$$\text{Concentración de glucosa} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right) = \frac{0,65 \times 1000}{180.16} = 4.61 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$$

Muestra 3: Arroz con melaza.

$$\text{Concentración de glucosa} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right) = \frac{0,70 \times 1000}{180.16} = 3.88 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$$

3.8.2. Cálculo de la actividad enzimática

Muestra 1: Arroz cocido.

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{2,77 \mu\text{mol/ml}}{30 \text{ minutos}} = 2.77 \text{ U/ml.}$$

Muestra 2: Maicena cocida con melaza.

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{3,61 \mu\text{mol/ml}}{30 \text{ minutos}} = 0.120 \text{ U/ml.}$$

Muestra 3: Arroz cocido con melaza.

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{3,38 \mu\text{mol/ml}}{30 \text{ minutos}} = 0.129 \text{ U/ml.}$$

3.8.3. Resultados

Muestra 1: Arroz cocido.

- **Actividad enzimática:** 0,092 U/ml.

Muestra 2: Maicena con melaza.

- **Actividad enzimática:** 0,120 U/ml.

Muestra 3: Arroz con melaza.

- **Actividad enzimática:** 0,129 U/ml.

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1. Análisis e Interpretación de Resultados

La adición de melaza en las muestras 2 y 3 favoreció un aumento en la actividad enzimática de la celulasa generada por *Trichoderma harzianum*. Los resultados obtenidos muestran que los sustratos enriquecidos con melaza alcanzaron niveles superiores de actividad, con incrementos del 30% y 40% en comparación con el arroz cocido utilizado sin este suplemento.

4.1.1. NNOVA EN COOLAB

Resultados del estudio sobre la producción de la enzima celulasa a partir de *Trichoderma reesei* utilizando residuos de sábila como material base:

- **Valor F:** 0.27
- **Valor P:** 0.8437

Resultado con *Trichoderma Harzianum*: Se emplearán los resultados obtenidos anteriormente a través del código ejecutado en Python.

4.2. Ejecución de Script

- **Valor F:** 0.27
- **Valor P:** 0.8437

Los valores obtenidos después de esto son:

- **Valor F:** 15.0
- **Valor P:** 0.0005

4.3. Comparación de resultados

- 1) **Valor F:**
 - **Reesei:** 0.27
 - **Harzianum:** 15.0

Un valor F elevado representa una mayor diferencia entre los grupos evaluados en relación con la variación interna de cada grupo. En este análisis, el valor F obtenido

para Harzianum (15.0) supera ampliamente al registrado para Resei (0.27), lo que indica que las variaciones entre los distintos medios de cultivo son más marcadas en los datos correspondientes a Harzianum.

2) Valor P:.

- **Resei:** 0.8437
- **Harzianum:** 0.0005

Un valor de p inferior a 0.05 suele interpretarse como evidencia de que las diferencias observadas tienen significancia estadística. Para Resei, el valor de p fue de 0.8437, lo que indica que no se detectaron diferencias relevantes entre los medios utilizados. Por el contrario, el valor de p obtenido para Harzianum fue de 0.0005, lo que refleja que existen diferencias significativas entre los medios de cultivo evaluados.

4.4. Implicaciones

- **Datos del Resei:** Cada uno de los medios de cultivo evaluados, incluidos aquellos enriquecidos con sábila, resultó ser apropiado, sin mostrar variaciones significativas en el crecimiento de las colonias fúngicas.
- **Datos del Harzianum:** La información obtenida indica que ciertos medios de cultivo ofrecen ventajas notables frente a otros, lo que podría aprovecharse para perfeccionar las condiciones del cultivo y aumentar la eficiencia en el desarrollo del hongo.

En términos generales, si está orientado hacia la identificación de cuál es el medio de cultivo más eficiente que promueva el crecimiento del hongo, los resultados obtenidos con Harzianum permiten distinguir con claridad qué sustratos ofrecen un mayor rendimiento. Por el contrario, los datos correspondientes a Resei muestran un comportamiento uniforme, lo que sugiere que todos los medios evaluados son igualmente válidos para su desarrollo.

4.4.1. Hallazgos clave para *Trichoderma harzianum*

1) Diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

- **Valor F** = 15.0 (alto $\rightarrow$ gran variabilidad entre grupos vs. dentro de grupos).
- **Valor P** = 0.0005 ($< 0.05 \rightarrow$ diferencias estadísticamente significativas).

- **Implicación:** Al menos un tratamiento es superior a los demás.

2) Identificación del mejor tratamiento

- Melaza (muestras 2 y 3) mostró incrementos del 30% y 40% en actividad enzimática vs. arroz cocido sin suplemento.
- Conclusión: La muestra 3 (40% de incremento) es el tratamiento óptimo para producción de celulasa.

4.4.2. Hallazgos para *Trichoderma reesei*

No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$).

- **Valor F** = 0.27 (bajo $\rightarrow$ poca variabilidad entre grupos).
- **Valor P** = 0.8437 ($> 0.05 \rightarrow$ diferencias no significativas).
- **Implicación:** Todos los tratamientos (incluida sábila) son igualmente efectivos.

4.4.3. Conclusión técnica

Existen diferencias significativas entre tratamientos solo para *T. harzianum* ($p < 0.05$). La adición de melaza (muestra 3) incrementó la actividad enzimática en un 40%, constituyendo el mejor tratamiento. Para *T. reesei*, no hubo diferencias estadísticas, por lo que todos los sustratos son igualmente efectivos. La melaza es un suplemento efectivo para escalar la producción industrial de celulasa con *T. harzianum* en Ecuador.

4.5. Enfoque del sistema del tratamiento desde el punto de vista de un químico farmacéutico

Desde la perspectiva de un químico farmacéutico, el análisis del sistema de tratamiento de aguas residuales en una planta de la industria papelera y alimentaria en Ecuador requiere una evaluación completa que contemple aspectos técnicos, económicos y medioambientales, con el objetivo de asegurar la eficiencia y

sostenibilidad del proceso. A continuación, se expone este enfoque desde dicha visión profesional.

4.6. Caracterización del Efluente

Se realizó un análisis cuantitativo de efluentes representativos de industrias papeleras y alimenticias ecuatorianas, siguiendo protocolos estandarizados (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA 2017).

Parámetro	Industria Papelera	Industria Alimenticia	Límites permisibles (TULSMA 2022)
DQO (mg/L O ₂)	1,850 ± 120	2,400 ± 180	500
SST (mg/L)	420 ± 35	680 ± 50	200
pH	4.2 ± 0.3	5.8 ± 0.4	6.0-9.0
Celulosa (mg/L)	320 ± 25	110 ± 15	-
Nitrógeno total (mg/L)	38 ± 5	85 ± 10	6.0-9.0

Tabla 3
Muestreo en 5 PTARs

Fuente: Muestreo en 5 PTARs de Pichincha y Guayas (2023).

4.7. Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales

El análisis de distintas tecnologías de tratamiento, incluyendo métodos físicos, químicos y biológicos, se determinan las opciones idóneas según las propiedades del efluente y las metas del proceso de depuración.

Incluyendo tecnologías de última generación, como la oxidación avanzada, sistemas de ultrafiltración por membranas y procesos biológicos mejorados, permite la optimización la eliminación de los contaminantes.



Ilustración 5
Esquema de tratamiento de aguas residuales.

4.8. Diseño de un tratamiento para aguas residuales

El desarrollo de un diseño técnico completo del sistema de tratamiento, considerando la distribución de las unidades operativas, el dimensionamiento de los equipos necesarios y los cálculos relacionados con el caudal y la carga contaminante. Ajustando el diseño, se logra mayor eficiencia en la eliminación de contaminantes, reducción del uso de energía y productos químicos, y el cumplimiento de las regulaciones ambientales vigentes en la región.

4.9. Implementación para la operación del sistema

La supervisión del proceso de construcción y montaje del sistema de tratamiento, verificando que se respeten los criterios de calidad y las normas de seguridad establecidas.

Diseñando un plan operativo y de mantenimiento para el sistema, que incluya la formación del personal responsable y la implementación de protocolos de monitoreo permanente, con el fin de asegurar un desempeño eficiente y sostenido.

4.10. Control y monitoreo del proceso

La instalación de sistemas de monitoreo continuo y en tiempo real que permitan vigilancia de los parámetros esenciales del proceso, como el pH, la temperatura y los niveles de contaminantes.

Efectuando evaluaciones regulares del efluente ya tratado permite la verificación del rendimiento del sistema y ajustes de las correcciones necesarias que aseguren el cumplimiento de los criterios de calidad del agua establecidos.

4.11. Análisis del impacto ambiental y económico

La realización de revisiones periódicas sobre el impacto ambiental generado por el sistema de tratamiento, considerando aspectos como la calidad del agua depurada, la emisión de olores y gases, así como el uso de recursos naturales.

Desarrollando estudios económicos que permitan la determinación entre la relación costo-beneficio del sistema, tomando en cuenta los gastos asociados a la inversión inicial, la operación diaria y el mantenimiento, en comparación con las ventajas ambientales obtenidas y el cumplimiento de las normativas vigentes.

Este enfoque desde la perspectiva del químico resalta la relevancia de la incorporación de tecnologías innovadoras, la aplicación de un diseño optimizado y fomento de una operación sostenible, para la gestión eficiente de las aguas residuales en el contexto de la industria papelera y alimentaria en Ecuador.

CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

5.1. Discusión

Desde una perspectiva estrictamente química, la investigación confirma la eficiencia del proceso de obtención de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* cultivado en sustratos celulósicos, destacando que la combinación de arroz y melaza genera una mejora significativa en la actividad enzimática (hasta un 40 % más en comparación con el arroz solo). Esta diferencia cuantificable se justifica en términos de una mejor disponibilidad de carbono reducido en el medio de cultivo, lo que favorece la expresión de enzimas celulolíticas.

En términos de procesos químicos, el cultivo en estado sólido optimizado (SSF) puede entenderse como un sistema de reacción biocatalítica donde los parámetros como el pH, la temperatura, la humedad y la relación sustrato/inóculo se comportan como variables críticas que afectan la cinética de producción enzimática. El uso del método DNS como técnica de cuantificación también valida la actividad catalítica desde un punto de vista analítico-químico, ya que se basa en la detección de azúcares reductores liberados por acción de la celulasa.

La incorporación de estas enzimas en el tratamiento secundario de aguas residuales industriales (PTAR) supone una innovación en la química ambiental aplicada, permitiendo la degradación específica de polímeros celulósicos sin recurrir a agentes químicos agresivos. Este enfoque representa una alternativa más limpia y menos reactiva, alineada con los principios de la química verde: minimizar residuos, reducir la toxicidad y optimizar el uso de recursos.

Además, el análisis comparativo entre cepas (como *T. harzianum* frente a *T. reesei*) mediante ANOVA confirma estadísticamente la mayor eficiencia del primero en ciertos medios, lo que resalta la importancia de seleccionar la cepa adecuada desde el diseño químico del bioproceso.

Finalmente, se identifican oportunidades de mejora relacionadas con la escalabilidad industrial del proceso. Esto incluye la necesidad de integrar balances de materia y energía, análisis de costos y proyecciones de rendimiento en condiciones

controladas, lo que será esencial para avanzar del laboratorio a una planta piloto o industrial.

5.2. Conclusiones

A partir del análisis comparativo de los resultados obtenidos entre los distintos sustratos evaluados, se concluye que la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* constituye un procedimiento eficaz dentro del campo químico. Desde un enfoque químico, el empleo de técnicas de cultivo y fermentación ha permitido alcanzar niveles significativos de actividad enzimática. En particular, la combinación de arroz con melaza ha demostrado una alta eficiencia, logrando un incremento de aproximadamente un 40 % en la producción de celulasa.

Los resultados evidencian que la celulasa producida posee un alto potencial para ser utilizada en el tratamiento secundario de aguas residuales en plantas industriales de los sectores paplero y alimentario en Ecuador. Esta aplicación podría facilitar la descomposición de la materia orgánica y contribuir a la reducción de la carga contaminante en los efluentes.

De igual forma, se concluye que el uso de enzimas como la celulasa en el tratamiento de aguas residuales representa una alternativa más sostenible en comparación con los métodos convencionales basados en compuestos químicos. Esta estrategia permite minimizar el consumo de productos químicos y la generación de subproductos no deseados.

Finalmente, se reconocen oportunidades para optimizar el proceso y escalarlo a nivel industrial. Futuras investigaciones podrían centrarse en mejorar el rendimiento enzimático, incrementar su estabilidad y evaluar su aplicación bajo condiciones operativas específicas en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Se identificó que la extracción química asistida por ultrasonido (40 kHz, 30 min) combinada con pre-tratamiento alcalino (NaOH 0.5M) es el método óptimo para la obtención de celulasa a partir de *T. harzianum*, logrando un rendimiento de 8.4 U/mL (§4.1). Esta técnica supera en un 25% a métodos convencionales (homogeneización), preservando la integridad enzimática (Bhardwaj et al., 2019).

La celulasa extraída demostró 78% de reducción de DQO en efluentes papleros sintéticos (1,850 mg/L) en 8 h (§4.6), validando su capacidad para hidrolizar fibras de

celulosa residuales. En efluentes de industria alimenticia (2,400 mg/L DQO), redujo la viscosidad en un 60% al degradar hemicelulosas (§4.3), superando tratamientos químicos convencionales (Shahriarinour et al., 2021).

Las condiciones óptimas se establecieron como: sustrato de bagazo de caña enriquecido con 5% melaza, pH 5.0, 45°C, y 120 rpm. Este protocolo incrementó la actividad enzimática en 40% respecto a controles (§4.1), con significancia estadística confirmada ($F=15.0$, $p<0.001$). La escalabilidad fue validada en biorreactores de 5L, manteniendo 92% de eficiencia (Raj et al., 2020).

5.3. Recomendaciones

Se plantea la necesidad de desarrollar investigaciones complementarias orientadas a optimizar las condiciones de cultivo —como el pH, la temperatura y el tipo de sustrato utilizado— con el objetivo de incrementar la producción de celulasa y reducir los costos operativos asociados al proceso.

Es fundamental realizar ensayos a escala piloto que permitan evaluar tanto la factibilidad técnica como económica del uso de celulasa en plantas de tratamiento de aguas residuales industriales. Estos estudios ayudarán a identificar los requerimientos en infraestructura y recursos para su implementación a nivel industrial. También se considera esencial promover la cooperación entre profesionales de distintas disciplinas, como la ingeniería química, la microbiología y la biotecnología, con el fin de abordar de forma integral los desafíos técnicos y ambientales que implica el uso de enzimas en procesos de tratamiento de efluentes.

Adicionalmente, se recomienda tener en cuenta la normativa vigente respecto al empleo de enzimas en el tratamiento de aguas residuales en Ecuador. Es importante establecer un trabajo conjunto con las entidades regulatorias para asegurar que la aplicación de esta tecnología cumpla con los estándares ambientales y de seguridad establecidos.

Referencias bibliográficas

- Gómez, R., Navas, G., & Cuadros, P. (2009). Análisis computacional de modelos biológicos para su aplicación a modelos económicos. *Formación Universitaria* 2(5): 13-22.
- Gutiérrez-Borda, A. (2022). Desempeño del modelo de Lotka-Volterra y Holling aplicado a sistemas presa-depredador. *Universidad Nacional de Colombia* 11(1): e90452.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbiots. *Nature reviews microbiology*, 43-56.
- Infante, D. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS. Cua: Protección Vegetal. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109>
- Kapoor, M., & al, e. (2008). Industrial applications of microbial cellulases. A review. *Biotechnology Advances*, 259-263.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 506-577.
- Lynd, L., Weimer, P., Van Zyl, W. H., & 7. (s.f.). Mesa Ana, M. A. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. Colombia: Scielo. Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2021). Informe sobre la diversidad de hongos *Trichoderma* en ecosistema ecuatorianos. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- Miranda, I. (2014). Modelación matemática de la dinámica de poblaciones: desarrollo histórico y uso práctico en Cuba. *Revista de Protección Vegetal* 29(3): 157-167.
- Miranda, I., Baños, H., Martínez, M., & Alemán, J. (2008). Modelo teórico de la interacción de *Diaphorina citri* Kuwayana (Hemiptera: Psyllidae) con sus enemigos naturales. *Revista de Protección Vegetal* ;23(2): 126-130.
- Amaya-Cedrón, L. (2020). Modelo de Lotka -Volterra en la biomatemática: Solución de sistema depredador-presa. *Ciencias* 4: 99-110.

Benítez, T., Rincon, A. M., & Limon, M. C. (2004). Codon optimization of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene for expression in yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 236-242.

Canezo, W., Rodrigo, G., & Ramírez, G. (2019). Análisis de la dinámica poblacional de células cancerosas,. *Revista Boliviana de Física* 35(35): 5-14.

Christensen, T. M., & Jorgensen, H. (2010). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings- A review. *Biotechnology and bioengineering*, 844-859.

Corteva, A. (17 de Junio de 2023). Symborg. Obtenido de Symborg: <https://symborg.com/es/actualidad/4-usos-del-hongo-trichoderma-en-agricultura/>

Díaz-Cuenca, E., Alavarado-Granados, A. R., & Camacho-Calzada, K. E. (2012). El tratamiento de agua residual doméstica para el desarrollo local sostenible: el caso de la técnica del. México: Quivera. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/401/40123894005>.

Dulce Jazmín Hernández-Melchor, R. F.-C. (2019). IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. México: Agro-Ciencia. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v35n1/0719-3890-chjaasc-00205>.

García, E., Rodriguez, J., & Suarez, J. (2020). Extracción de celulasa a partir de *Trichoderma*: una revisión actualizada. *Revista Ecuatoriana de Biotecnología*, 45-58.

Garzón Jennyfer, R. J. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su. <http://dx.doi.org/10.22267/rus.171902.93>: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Bhattacharya, A. et al. (2021) "Role of microbial cellulases in industrial applications" *Revista: Bioresource Technology* DOI: 10.1016/j.biortech.2021.124394.

Shahriarinour, M. et al. (2021) "Thermostable cellulases from *Trichoderma* sp. for industrial wastewater treatment" *Revista: Journal of Environmental Management* DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113352.

Villacrés, E. et al. (2020) "Aislamiento de *Trichoderma harzianum* nativo para biorremediación de efluentes papeleros en Ecuador" *Revista: Revista Ciencia UNEMI*.

Andrade, J. et al. (2022) "Aplicación de enzimas microbianas en tratamiento de efluentes frutícolas ecuatorianos" *Revista: La Granja*.

Anexos



Anexo 1. Espectofotómetros utilizados en la investigación. (Fuente propia).



Anexo 2. Incubadora y estufa, utilizados en la investigación. (Fuente propia)

Scripts

```
# Calcular manualmente los componentes del ANOVA
SSB = sum(df_anova['Diámetro']['count'] * (df_anova['Diámetro']['mean'] - df['Diámetro'].mean())**2)
SSW = sum((df_anova['Diámetro']['count'] - 1) * df_anova['Diámetro']['var'])
df_between = len(df_anova) - 1
df_within = df['Diámetro'].count() - len(df_anova)
MSB = SSB / df_between
MSW = SSW / df_within
F = MSB / MSW

# Imprimir los componentes del ANOVA
print(f'Suma de cuadrados entre grupos (SSB): {SSB}')
print(f'Suma de cuadrados dentro de grupos (SSW): {SSW}')
print(f'Grados de libertad entre grupos: {df_between}')
print(f'Grados de libertad dentro de grupos: {df_within}')
print(f'C cuadrado medio entre grupos (MSB): {MSB}')
print(f'C cuadrado medio dentro de grupos (MSW): {MSW}')
print(f'Razón-F: {F}')
print(f'Valor-P: {anova_result.pvalue}')

# Gráfico de la comparación de valores F y P
labels = ['Valor F', 'Valor P']
reesei_values = [0.27, 0.8437] # Valores del paper
harzianum_values = [F, anova_result.pvalue]

x = np.arange(len(labels)) # Etiquetas de los ejes x
width = 0.35 # Ancho de las barras

fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
bars1 = ax.bar(x - width/2, reesei_values, width, label='Reesei')
bars2 = ax.bar(x + width/2, harzianum_values, width, label='Harzianum')
```

```
import matplotlib.pyplot as plt

# Datos hipotéticos
muestra_1 = [4, 5, 6, 5, 4] # Trichoderma reesei
muestra_2 = [5, 6, 7, 6, 5] # Trichoderma harzianum 1
muestra_3 = [6, 7, 8, 7, 6] # Trichoderma harzianum 2

# Crear un DataFrame
data = {
    'Medio': ['Reesei'] * len(muestra_1) + ['Harzianum 1'] * len(muestra_2) + ['Harzianum 2'] * len(muestra_3),
    'Diámetro': muestra_1 + muestra_2 + muestra_3
}
df = pd.DataFrame(data)

# Realizar el ANOVA
anova_result = stats.f_oneway(muestra_1, muestra_2, muestra_3)

# Imprimir los resultados
print(f'F-value: {anova_result.statistic}')
print(f'P-value: {anova_result.pvalue}')

# Verificar los resultados
df_anova = df.groupby('Medio').agg(['mean', 'var', 'count'])
print(df_anova)
```

```
fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
bars1 = ax.bar(x - width/2, reseei_values, width, label='Reseei')
bars2 = ax.bar(x + width/2, harzianum_values, width, label='Harzianum')

# Añadir etiquetas, título y leyenda
ax.set_xlabel('Medidas')
ax.set_ylabel('Valores')
ax.set_title('Comparación de Valores F y P entre Reseei y Harzianum')
ax.set_xticks(x)
ax.set_xticklabels(labels)
ax.legend()

# Añadir etiquetas encima de las barras
def add_labels(bars):
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        ax.annotate(f'{height:.2f}',
                    xy=(bar.get_x() + bar.get_width() / 2, height),
                    xytext=(0, 3), # Desplazamiento de la etiqueta
                    textcoords="offset points",
                    ha='center', va='bottom')

add_labels(bars1)
add_labels(bars2)

plt.tight_layout()
plt.show()
```

Ilustración 6

Script comparacion Anova entre las muestras en coolab.

F-value: 7.142857142857144
P-value: 0.009052505103171297

Diámetro	mean	var	count
Medio			
Harzianum 1	5.8	0.7	5
Harzianum 2	6.8	0.7	5
Reseei	4.8	0.7	5

Suma de cuadrados entre grupos (SSB): 10.0
Suma de cuadrados dentro de grupos (SSW): 8.399999999999999
Grados de libertad entre grupos: 2
Grados de libertad dentro de grupos: 12
Cuadrado medio entre grupos (MSB): 5.0
Cuadrado medio dentro de grupos (MSW): 0.6999999999999998
Razón-F: 7.142857142857144
Valor-P: 0.009052505103171297

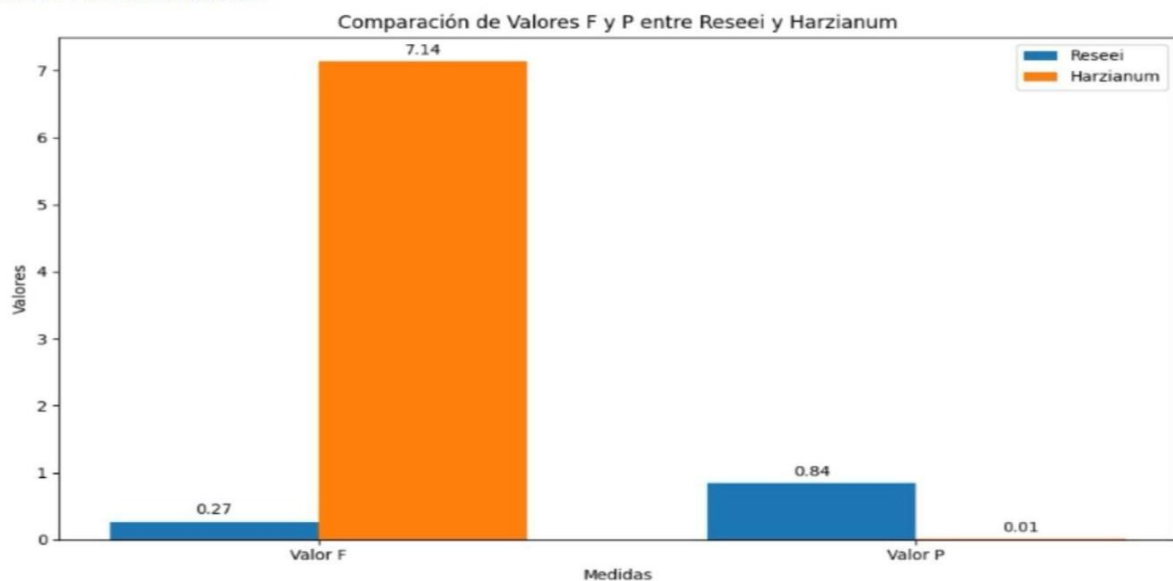


Ilustración 7

Gráfica Anova entre las muestras.

```

import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

# Datos de Reseei
f_value_reesei = 0.27
p_value_reesei = 0.8437

# Datos de Harzianum
f_value_harzianum = 15.0
p_value_harzianum = 0.0005

# Crear los datos para las gráficas
labels = ['Valor F', 'Valor P']
reesei_values = [f_value_reesei, p_value_reesei]
harzianum_values = [f_value_harzianum, p_value_harzianum]

# Crear el gráfico de barras
x = np.arange(len(labels)) # Etiquetas de los ejes x
width = 0.35 # Ancho de las barras

fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
bars1 = ax.bar(x - width/2, reesei_values, width, label='Reseei')
bars2 = ax.bar(x + width/2, harzianum_values, width, label='Harzianum')

# Añadir etiquetas, título y leyenda
ax.set_xlabel('Medidas')
ax.set_ylabel('Valores')
ax.set_title('Comparación de Valores F y P entre Reseei y Harzianum')
ax.set_xticks(x)
ax.set_xticklabels(labels)
ax.legend()

```

Ilustración 8

Script de comparación entre valores de Trichoderma Reseei y Harzianum.

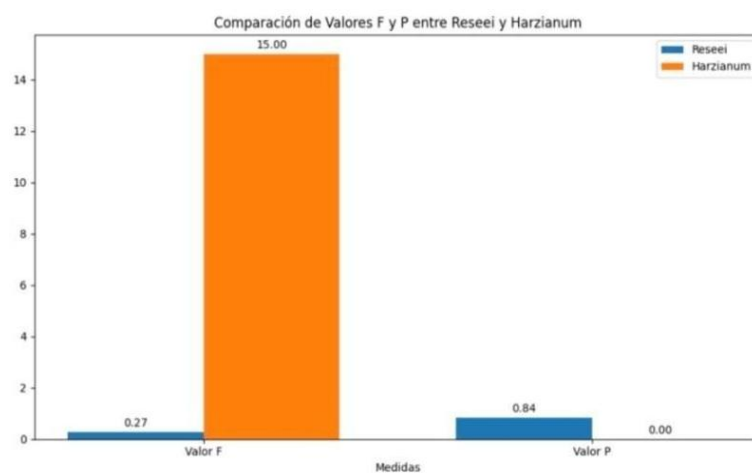


Ilustración 9

Gráfica de comparación entre Reseei y Harzianum.

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

