

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



BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS SINTETIZADORES DE
AMINOÁCIDOS, NATIVOS DE LA ZONA NORTE

PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGIA

AUTOR/A:

JAVIER FRANCISCO RUBIO ROCHA

DIRECTOR:

SANTIAGO ZARATE BACA

IBARRA – ECUADOR

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

“BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS SINTETIZADORES DE
AMINOÁCIDOS, NATIVOS DE LA ZONA NORTE”

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor; por lo cual, se autoriza su presentación
como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADA:



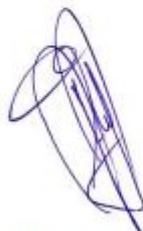
Ing. Santiago Zarate MSc.

DIRECTOR



Ing. Carla Sandoval MSc.

ASESOR



Ing. Juan Carlos Garcia PhD

ASESOR



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: | 1004521512 | | |
| APELLIDOS Y NOMBRES: | Rubio Rocha | | |
| DIRECCIÓN: | Javier Francisco | | |
| EMAIL: | jfrubior@utn.edu.ec | | |
| TELÉFONO FIJO: | 644 090 | TELÉFONO MÓVIL: | 0984173399 |

| DATOS DE LA OBRA | | | |
|--------------------------------|---|--|--|
| TÍTULO: | "BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS SINTETIZADORES DE AMINOÁCIDOS, NATIVOS DE LA ZONA NORTE" | | |
| AUTOR (ES): | RUBIO ROCHA JAVIER FRANCISCO | | |
| FECHA: DD/MM/AAAA | 10/11/2020 | | |
| SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO | | | |
| PROGRAMA: | <input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO | <input type="checkbox"/> POSGRADO | |
| TÍTULO POR EL QUE OPTA: | INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA | | |
| ASESOR /DIRECTOR: | Ing. SANTIAGO ZARATE, MSc. | | |

2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de esta y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 10 días del mes de noviembre del 2020

EL AUTOR:

Javier Francisco Rubio Rocha

AGRADECIMIENTO

Agradezco de forma especial a la Universidad Técnica del Norte y sobre todo a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, al cuerpo docente por todo el conocimiento que me ayudaron a cumplir los objetivos de la educación.

A mi director de proyecto, magister Santiago Zarate por sus sabios consejos y enseñanzas dictados en sus clases, motivarme a elegir el camino de la ciencia y tratar de mejorar al país. A mis asesores magister Carla Sandoval y doctor Juan Carlos García por tu tiempo y conocimiento que me facilitaron para la investigación.

A mi familia por todo el apoyo brindado y esfuerzos por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro. A mi madre con su protección y sabiduría me llevo por el camino de bien, por darme confianza me ayuda a creer en mí y en mis capacidades como profesional y ser humano. A mis hermanos por sus fuerzas para motivarme a seguir adelante en todo lo propuesto. A mi abuelo por todas sus enseñanzas y por impulsar mi camino hacia la investigación.

A mis compañeros de carrera por ayudarme a mejorar como persona cada día y sobre todo por su sincera amistad dentro y fuera de las clases.

Tabla de contenidos

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| CAPÍTULO I | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1.1 Problema de la investigación | 12 |
| 1.2 Justificación | 13 |
| 1.3 Marco legal | 14 |
| 1.4 Pregunta directriz de la investigación | 15 |
| 1.5 Objetivos | 15 |
| 1.5.1. Objetivo general..... | 15 |
| 1.5.2 Objetivos específicos | 16 |
| 1.6 Hipótesis..... | 16 |
| CAPÍTULO II | 17 |
| MARCO TEÓRICO | 17 |
| 2.1 Los aminoácidos | 17 |
| 2.2 Los Aminoácidos en la Industria | 17 |
| 2.3 Principales parámetros para la producción biotecnología de aminoácidos..... | 19 |
| 2.3.1 Preparación del inóculo para el bioproceso | 19 |
| 2.3.2 Fermentación – Biorreactores | 22 |
| 2.3.3 Downstream – Purificación de los aminoácidos..... | 24 |
| 2.4 Microorganismos sintetizadores de aminoácidos | 26 |
| 2.4.1 Características de las cepas utilizadas en la industria..... | 26 |
| 2.4.2 Metabolismo de síntesis de aminoácidos..... | 26 |
| CAPÍTULO III | 29 |
| METODOLOGÍA | 29 |
| 3.1 Caracterización del área de muestreo..... | 29 |
| 3.2 Descripción del área experimental | 30 |
| 3.3 Muestreo <i>in situ</i> | 30 |
| 3.4 Aislamiento de cepas bacterianas | 31 |
| 3.5 Identificación morfológica | 32 |
| 3.6 Identificación molecular de las cepas | 32 |
| 3.7 Proceso de fermentación | 32 |
| 3.7.1 Diseño del biorreactor y forma de operación | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7.2 Determinación de la cinética de crecimiento | 33 |
| 3.7.3 Medio de cultivo para la producción de aminoácidos | 33 |
| 3.7.4 Cinética de consumo de sustrato y producción de aminoácidos..... | 34 |
| 3.7 Determinación del perfil aminoacídico por Cromatografía en capa fina (TLC)..... | 36 |
| 3.8 Planteamiento del escenario teórico para la producción de aminoácidos | 37 |
| 3.9 Análisis estadístico..... | 38 |
| CAPÍTULO IV | 39 |
| RESULTADOS | 39 |
| 4.1 Caracterización de cepas bacterianas aisladas | 39 |
| 4.2 Identificación Molecular | 40 |
| 4.3 Proceso de Fermentación bacteriana..... | 40 |
| 4.3.1 Cinética de crecimiento bacteriano..... | 40 |
| 4.3.2 Cinética de consumo de sustrato y producción de aminoácidos..... | 42 |
| 4.4 Perfil aminoacídico mediante cromatografía de capa fina..... | 44 |
| 4.5 Escenario teórico para la producción de lisina..... | 45 |
| 4.5.1 Cepas productoras de aminoácidos a nivel industrial..... | 46 |
| 4.5.2 Organismos financieros para emprendimientos tecnológicos en el Ecuador . | 47 |
| 4.5.3 Manejo e importación de equipos y maquinaria para la bioproduccion..... | 48 |
| 4.5.4 Organización de los recursos humanos para la empresa | 50 |
| 4.5.5 Mercado nacional para el consumo de L- lisina HCL | 51 |
| 4.5.6 Materiales y métodos del bioproceso | 52 |
| 4.5.7 Resultados de la producción y distribución del producto L- lisina HCL | 58 |
| 4.5.8 Marco legal y normativo para productos biotecnológicos en el Ecuador..... | 60 |
| CAPÍTULO V | 68 |
| DISCUSIÓN | 68 |
| 5.1 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas | 68 |
| 5.2 Proceso Fermentativo..... | 69 |
| 5.2.1 Cinética de crecimiento bacteriano..... | 70 |
| 5.2.2 Cinética de producción de aminoácidos | 71 |
| 5.2.3 Cinética de consumo de la fuente de carbono | 74 |
| 5.2.4 Perfil aminoacídico de las cepas aisladas | 75 |
| 5.3 Escenario teórico del bioproceso para la producción L-lisina HCL | 77 |
| CAPÍTULO VI | 81 |
| CONCLUSIONES | 81 |
| CAPÍTULO VII | 82 |

| | |
|------------------------------|-----|
| RECOMENDACIONES | 82 |
| BIBLIOGRAFÍA | 83 |
| ANEXOS | 100 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama de flujo para la purificación de aminoácidos. A Método cromatográfico, B. Método por concentración (Ikeda, 2003)..... | 25 |
| Figura 2. Vía sintética de la L-lisina en <i>C. glutamicum</i> . En la ruta sintética de la lisina, su precursor, el oxaloacetato, se convierte en aspartato mediante la adición de un grupo amino tomado de glutamato (Este et al., 2017). | 28 |
| Figura 3. Mapa de ubicación de la reserva sabia Esperanza..... | 29 |
| Figura 4. Extracción de muestras: A. zona con descomposición orgánica B. área de la rizosfera y..... | 31 |
| Figura 5. Esquema de biorreactor y sus componentes | 33 |
| Figura 6. Diagrama de flujo para el escalado desde 5 ml a 250 ml producción de aminoácidos escala laboratorio | 35 |
| Figura 7. Características morfológicas de las cepas aisladas. Cepas caracterizadas mediante microscopia, clasificadas con tinción Gram. A y B: ACT-1A, C y D: ACT-1B. Izquierda: estereoscopio 4x, derecha: microscopio 100x | 39 |
| Figura 8. Curvas de crecimiento bacteriano medidas a 600 nm en espectrofotómetro y cámara neubauer. 1) Fase de latencia 2) Fase exponencial 3) Fase estacionaria. A, ACT-1A - <i>Micromonospora</i> sp. B, ACT-1B - <i>Micromonospora</i> sp. | 41 |
| Figura 9. A. Producción de aminoácidos. B. Concentración de azúcares reductores. Los ensayos fueron evaluados utilizando dos fuentes de carbono (Melaza y Glucosa) en diferentes cepas bacterianas (ACT-1A y ACT-1B)..... | 42 |
| Figura 10. Diagrama de barra para la concentración de aminoácidos totales por cada cepa y fuente de carbono | 43 |
| Figura 11. Cromatografía TCL de aminoácidos por cada cepa. A y B: número de repeticiones del ensayo..... | 45 |
| Figura 12. Diagrama de flujo para la producción de lisina (Upstream y Fermentación)..... | 56 |
| Figura 13. Esquema del proceso para la purificación de L-lisina HCL y su porcentaje de recuperación de cada etapa | 58 |
| Figura 14. Diagrama general del proceso de fermentación fed - batch y sus rendimientos | 58 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Principales aplicaciones en la industria a partir de aminoácidos..... | 18 |
| Tabla 2 Valores nutricionales de la melaza de caña de azúcar | 20 |
| Tabla 3 Fuente de carbono y micronutrientes utilizados para el bioproceso | 34 |
| Tabla 4 Tratamientos que se evaluaron para la producción de aminoácidos..... | 36 |
| Tabla 5 Análisis de la varianza para la evaluación de la producción de aminoácidos | 36 |
| Tabla 6 Valores estándar (Rf) para aminoácidos por TLC | 37 |
| Tabla 7 Principales servidores de información acerca de los procesos biotecnológicos..... | 37 |
| Tabla 8 Datos moleculares de las colonias aisladas..... | 40 |
| Tabla 9 Perfil aminoacídico mediante cromatografía TLC | 44 |
| Tabla 10 Principales tipos de cepas utilizadas en la industria de la producción..... | 46 |
| Tabla 11 Tipos de créditos y principales entidades financieras..... | 47 |
| Tabla 12 Mecanismos de financiamiento gestionado por AEI | 48 |
| Tabla 13 Principales empresas importadoras de maquinaria industrial y productos químicos para todo sector productivo..... | 49 |
| Tabla 14 Organización de la empresa por departamentos y sus respectivas funciones..... | 50 |
| Tabla 15 Mercado nacional de las principales empresas que importan lisina para sus productos | 51 |
| Tabla 16 Contenido de azúcares en diferentes fuentes de carbono | 53 |
| Tabla 17 Principales ingenios azúcares proveedores de melaza de caña del Ecuador | 54 |
| Tabla 18 Índice de consumo de nutrientes para el bioproceso (fed – batch)..... | 54 |
| Tabla 19 Equipos principales del bioproceso | 55 |

Índice de Anexos

| | |
|--|-----|
| Anexo 1. Salida de campo para extracción de muestras de suelo. A y B. Zona de la rizosfera, C. Muestras de suelo etiquetadas..... | 100 |
| Anexo 2. Datos técnicos de la zona Rizosfera – descomposición | 100 |
| Anexo 3. Datos técnicos de la zona matorral..... | 101 |
| Anexo 4. Datos técnicos de la zona raíces de arboles..... | 101 |
| Anexo 5. Visualización en gel de agarosa 2% de los tres amplicones de aproximadamente 1500 pb – 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases. | 101 |
| Anexo 6. Curva de calibración glucosa – Método DNS | 102 |

| | |
|--|-----|
| Anexo 7. Cinética de crecimiento relacionando UFC y absorbancia 600 nm. A, ACT-1A - Micromonospora sp. B, ACT-1B - Micromonospora sp | 103 |
| Anexo 8. Esquema del análisis de la varianza como variable dependiente la concentración de aminoácidos. | 104 |
| Anexo 9. Promedio de Rf de cada punto por cepa (ACT-1A y ACT-1B)..... | 104 |

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA
BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS SINTETIZADORES DE
AMINOÁCIDOS, NATIVOS DE LA ZONA NORTE

Nombre del estudiante: Javier Francisco Rubio Rocha

RESUMEN

En los últimos años la producción de la caña de azúcar ha ido en aumento. Solo en Imbabura el cultivo permanente de mayor producción es la caña de azúcar, que anualmente produce 328 671 Tm para elaborar 11 825 Tm de azúcar y otros derivados. Estos derivados de la producción en específico la melaza son utilizados mayormente en la alimentación animal, ignorando el potencial de este recurso alto en azúcares, proteínas y vitaminas como fuente de carbono alternativo. Por este motivo, se aprovechó el compuesto nutritivo de la melaza para usarlo como fuente alterna de carbono e implementarlo en el bioproceso de la fermentación biológica en la bioconversión de moléculas de gran interés en este caso aminoácidos. Para llevar esto a cabo se establecerá bioprocesos *in vitro* para una producción eficiente de aminoácidos a escala laboratorio. Además, el punto clave del proceso a destacar es el uso de cepas nativas (Actinobacterias) con gran potencial para la síntesis de aminoácidos y las cuales fueron aisladas mediante muestreo en la zona reserva sabia Esperanza que proporcionen las condiciones óptimas a microorganismo productores de Aminoácidos. En la presente investigación se obtuvieron resultados favorables demostrando que la melaza es una fuente de carbono que potencia la producción de aminoácidos significativamente al contrario que la glucosa, como lo registró ACT-1A con melaza (1.87 ± 0.05 g/l) y con glucosa (1.50 ± 0.04 g/l), ACT-1B con melaza (1.29 ± 0.01 g/l) y ACT-1B con glucosa (0.45 ± 0.01 g/l). Estas investigaciones de biotecnología aplicada son iniciativas necesarias para el reconocimiento del potencial que tiene la diversidad microbiana en los diferentes campos energéticos, farmacéuticos, nutrición, entre otras y sobre todo evitando la importación de microorganismo genéticamente modificados.

Palabras clave: Bioproceso; Fermentación Sumergida; Aminoácido; Biotecnología Industrial

ABSTRACT

In recent years, sugarcane production has been increasing. In Imbabura alone, the permanent crop with the highest production is sugarcane, which annually generates 328 671 tons to produce 11 825 tons of sugar and other derivatives. These products, in specific molasses are mainly used in animal feed, ignoring the potential of this resource high in sugars, proteins, and vitamins, as an alternative carbon source. For this reason, it was taken advantage of the nutritional compound of molasses to use it as an alternative source of carbon and implement it in the bioprocess of biological fermentation in the bioconversion of molecules of great interest in this case. To accomplish this, bioprocesses will be established *in vitro* for efficient parameter production. In addition, the key point of the process to be highlighted is the use of native strains (Actinobacteria) with great potential for amino acid synthesis, which were obtained directly by sampling in the Esperanza reserve zone, where the optimal conditions for an amino acid producing microorganism were provided. In the present investigation, favorable results were obtained demonstrating that molasses is a carbon source that enhances the production of amino acids significantly in contrast to glucose, as recorded by ACT-1A with molasses (1.87 ± 0.05 g / l) and with glucose (1.50 ± 0.04 g / l), ACT-1B with molasses (1.29 ± 0.01 g / l) and ACT-1B with glucose (0.45 ± 0.01 g / l). These applied biotechnology investigations are necessary projects for the recognition of the potential that microbial diversity has in different fields such as energy, pharmaceuticals, nutrition, among others and above all avoiding the importation of genetically modified microorganisms.

Keywords: Bioprocess; Submerged fermentation; Amino acid; Industrial Biotechnology

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Problema de la investigación

Ecuador es el país con mayor biodiversidad de la región (Peña, 2005) y uno de los que mayor proyección agrícola presenta (Espacios, Autores, Vera, Carlos y Toral, 2018). Sin embargo, su economía enfatiza en la extracción y exportación de materia prima sin alguna transformación en sus propiedades. Estos factores condicionan negativamente la economía nacional, misma que se ve afectada por los constantes cambios en los precios internacionales de las materias primas, así como su creciente diferencia frente a los precios de los productos de mayor valor agregado (Palacios y Reyes, 2016).

Una alternativa para la diversificación y mejoramiento de la economía es el cambio de la matriz productiva, que tiene como enfoque principal el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en la implementación ciencias como la Biotecnología. A pesar de ello, el país no ha considerado a las ciencias biotecnológicas como eje principal de este cambio quedando aislado de las grandes comunidades científicas. En términos absolutos, los países que más invierten en la investigación y el desarrollo son Colombia, Brasil, Argentina, México y Chile, Costa Rica y Cuba (Wendt y Izquierdo, 2002). Por lo tanto, existe un déficit en la cantidad de investigaciones y soluciones ligadas al uso de nuevos enfoques y reutilización de subproductos de la industria.

Los subproductos industriales tienen alta potencialidad para su uso biotecnológico, no obstante, estos no han sido debidamente explotados y en su gran mayoría son desechados en el medio. Por ejemplo, en Imbabura la productividad del cultivo de caña de azúcar es de 328 671 Tm/año utilizadas para producción de azúcar y otros derivados. Entre ellos la melaza que alcanza niveles de productividad de 11825 Tm/año (INEC, 2017). Este derivado presenta alta concentración de azúcar, proteínas y vitaminas, lo que lo convierte en un producto con potencial biotecnológico. Sin embargo, el único uso que se le ha dado es como suplemento en la alimentación animal (Trivedi y Shah, 2014). La alta concentración de azúcares de la melaza la vuelve ideal para ser considerada como una fuente de carbono para la obtención de biomoléculas como aminoácidos esenciales, utilizando diferentes metodológicas químicas y biotecnológicas creadas por las industrias (Dehghan Shasaltaneh, Moosavi-Nejad, Gharavi, y Fooladi, 2013).

Entre los diferentes métodos de obtención de aminoácidos esenciales, existe la síntesis química, la extracción de hidrolizado de proteínas, el método enzimático y la técnica de fusión de protoplastos. A pesar de las ventajas que estas técnicas ofrecen, la ejecución es compleja (reacciones químicas) e ineficiente en términos de rendimiento productivo, consumo de recursos, energía para las reacciones y costos de purificación de la molécula objetivo. Por otra parte, existen otras metodologías entre ellas el método fermentativo, que utiliza sistemas biológicos modificados como fábricas de producción de biomoléculas en reactores y muestra mayor eficiencia que los métodos industriales clásicos (Ikeda, 2016).

A pesar de que estas metodologías son empleadas a nivel mundial, en Ecuador es un campo incipientemente desarrollado (Engov Policy Brief, 2015; Wendt y Izquierdo, 2002). La falta de profundidad en este tema responde a cuestiones legales como el Artículo 401 de la constitución ecuatoriana que indica: Ecuador es un país libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y solo en caso de interés nacional debidamente fundamentada por el gobierno y aprobado por la Asamblea nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados (Constituyente, 2008). Con la cual la alternativa para el método fermentativo sería la bioprospección de microorganismos de gran potencial industrial (Beattie et al., 2011).

1.2 Justificación

En los últimos años, el gobierno ecuatoriano ha desarrollado objetivos a largo plazo, beneficiosos para el campo económico, educativo, científico e industrial. Este modelo económico, busca alejarse del proceso de acumulación de material e incorporar formas de producción que se basen en principios diferentes a la lógica del mercado (Senplades, 2009). El gobierno hace referencia a incentivar nuevas áreas de producción, desarrollo de tecnología y conocimiento científico evitando la explotación y exportación de materia primas sin valor agregado de innovación.

En los avances en las áreas de bioprocesos, especialmente en la fermentación biológica en reactor, se está convirtiendo en uno de los procesos más prometedores para la producción comercial de aminoácidos, debido a las nuevas herramientas como ingeniería genética aplicadas para maximizar el rendimiento, la especificidad y la productividad de los compuestos objetivo en microorganismos (Ikeda, 2003). Mediante la tecnología de bioprocesos utilizan menos energía siendo más eficientes que otros métodos de extracción y por lo general, utilizan materias primas de bajo costo; en ciertos casos producen compuestos orgánicos que no pueden

fabricarse por métodos químicos (Sindhu, Pandey, y Binod, 2016). La utilización de melaza ha sido siempre un deseo apremiante de las fábricas de azúcar (Olbrich, 1963). Además, se llegó a la conclusión de que la melaza tiene la capacidad de convertirse en alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, valina y lisina mediante fermentación bacteriana (Khan, Rasool, y Nadeem, 2006).

El consumo total anual actual de aminoácidos en todo el mundo se estima en más de 2 millones de toneladas (Kusumoto, 2001). El crecimiento anual del mercado para la mayoría de los aminoácidos es más del 10% (Hermann, 2003). Esto quiere decir la demanda de estas biomoléculas cada vez es exponencial y necesaria para la dieta, ya sea para el ser humano o para la alimentación del ganado. Hoy en día, los L- aminoácidos fermentados representan los principales productos de la biotecnología, tanto en volumen como en valor (Ikeda, 2003; Leuchtenberger, 1996). Los avances posteriores en la industria de los aminoácidos están estrechamente relacionados con el descubrimiento de los microorganismos y el posterior desarrollo de cepas de producción para varios tipos de l-aminoácidos (Ikeda, 2003).

Estas investigaciones acerca de biotecnología aplicada son iniciativas necesarias para empresas o pequeños emprendedores que identifiquen el potencial de crear bioproductos con valor agregado, consolidándose en nuevos nichos de mercado y satisfaciendo la oferta de talento humano. Por otro lado, el uso de la biodiversidad endémica es de gran importancia porque se evita la importación de organismos genéticamente modificados que están prohibidos por la constitución ecuatoriana. Los aminoácidos son necesarios en los dominios farmacéuticos y de alimentos, por lo que los aminoácidos de alto valor agregado pueden recuperarse de los subproductos y utilizarse en aplicaciones médicas, cosméticas, de alimentación animal y otras aplicaciones industriales (Varaee, Honarvar, Eikani, Omidkhah, & Moraki, 2019).

1.3 Marco legal

Los artículos que se toman para el desarrollo del marco legal del tema de tesis fueron receptados de la Constitución del Ecuador 2008 y al Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021, siendo los siguientes: Dentro de la constitución

Título II: Derechos

Capítulo Segundo: Derechos del Buen Vivir

Sección primera: Agua y alimentación

Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales.

Capítulo Segundo: Ambiente sano

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, sumak kawsay.

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias.

Capítulo séptimo: Derechos de la naturaleza

Art. 71.- 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. Se deberán aplicar medidas de precaución sobre actividades que causen deterioro en el ecosistema y alteraciones en los ciclos vitales.

Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales

Sección séptima: Biosfera, ecología urbana y energías alternativas

Art. 413.- El Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas, de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua.

De acuerdo con el Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021:

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

Promueve 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.

1.4 Pregunta directriz de la investigación

¿Es posible obtener aminoácidos a partir de cepas nativas?

1.5 Objetivos

1.5.1. Objetivo general

- Obtener microorganismos nativos potencialmente productores de aminoácidos.

1.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar microorganismos nativos potencialmente productoras de aminoácidos.
- Establecer el bioproceso *in vitro* para la producción de aminoácidos a escala laboratorio utilizando como fuente de carbono melaza.
- Plantear un escenario teórico para la obtención de aminoácidos a partir de los microorganismos caracterizados más promisorios.

1.6 Hipótesis

El rendimiento productivo de aminoácidos mediante la fermentación biológica de microorganismos nativos en reactores es igual o superior al de cepas comerciales usando como fuente de carbono alterna.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Los aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que contienen una estructura muy simple, consisten en un átomo de carbono, unido al menos por un grupo amino (NH_2), una función carboxílica (COOH), un átomo de hidrogeno y una cadena lateral (R) en su configuración molecular (Leuchtenberger, 1996). Componentes básicos de la vida, juegan un papel importante en la nutrición y el mantenimiento de la salud humana y animal (Bercovici y Fuller, 2007). Los aminoácidos estándar se dividen en 20 moléculas y que proporcionan los componentes básicos necesarios para la biosíntesis de proteínas (Belitz, Grosch, y Schieberle, 2009; Wade, 2011). Donde algunos aminoácidos no son sintetizados en el mismo sistema biológico y es necesario tomarlos en la dieta en organismos animales, los cuales se denominan aminoácidos esenciales y otros aminoácidos se sintetizan en el cuerpo y no es necesario tomarlos en la dieta, este tipo de aminoácidos se denominan aminoácidos no esenciales (Asif et al., 2011).

De acuerdo con los roles funcionales/nutricionales pueden ser diferenciados de la siguiente manera. Los 20 aminoácidos estándar de la proteína, 9 aminoácidos son esenciales L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-lisina, L-treonina, L-metionina, L-histidina, L-fenilalanina y L-triptófano ocupan un posición clave (Leuchtenberger y Huthmacher, 2009). Aminoácidos no esenciales: glicina, alanina, prolina, serina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico (Belitz et al., 2009).

2.2 Los Aminoácidos en la Industria

Uno de los mayores retos de la actualidad para desarrollar productos con valor agregado, es obtener método óptimo para sintetizar las biomoléculas esenciales. Mediante la tecnología de bioprocesos se utilizan materias primas de bajo costo; en la mayoría de los casos producen productos que no pueden fabricarse por métodos químicos (R. Sindhu et al., 2016). Para cumplir ese objetivo es la implementación de la ingeniería de bioprocesos, que consiste en el uso de dispositivos como los biorreactores en reacciones bioquímicas llevados a cabo por células microbianas, vegetales y animales. La ingeniería ha ayudado a desarrollar muchos

procesos biológicos, como la producción de antibióticos, biocombustibles, vacunas, enzimas que son moléculas de gran interés industrial (Markov, 2015).

Una de las moléculas más sintetizadas son los aminoácidos que se utilizan en muchas aplicaciones industriales como bioquímicos: aditivos para piensos, potenciadores del sabor en la nutrición humana (D'Este, Alvarado, y Angelidaki, 2018). Los aminoácidos proteinógenos restantes se requieren en las industrias farmacéuticas y cosmética, además son materias primas ideales para la síntesis de ingredientes activos quirales, que a su vez encuentran aplicación en sectores como el farmacéutico, el cosmético y la agricultura (Tabla 1) (Leuchtenberger, Huthmacher, y Drauz, 2005), los aminoácidos son utilizados en la industria en diversos campos productivo.

Tabla 1
Principales aplicaciones en la industria a partir de aminoácidos

| Aminoácido | Aplicación | Referencia |
|--|---|---|
| Lisina | Aditivo alimenticio para ganado | (Kumagai, 2000) |
| Arginina | Intermediador para tratamiento potencial de enfermedades hepáticas | (Wendisch, 2017) |
| Triptófano | Alimentos y piensos tanto como humanos y animal. | (Hermann, 2003) |
| Metionina | Propiedades antioxidantes utilizadas en la industria de alimentos, suplementación de alimentos para animales | (Sadovnikova y Belikov, 1978) (Divched, 2004) |
| Valina, leucina, isoleucina y fenilalanina | Alimenticia: Edulcorante bajo en calorías, Medica: activos en la inhibición de la formación de biopelículas por <i>B. subtilis</i> , | (Hermann, 2003) (Meletis y Barker, 2005) |
| Alanina, prolina, serina | Complejos con fármacos para tratamientos de enfermedades: daño del músculo prevención del cáncer, diabetes, tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos. | (Meletis y Barker, 2005) (Martínez, Gómez, Rodríguez, Clemente, y Las Heras, 2010) |
| Acido aspártico y glutámico | Colorantes alimentarios, antioxidantes, adsorbentes de oxígeno e inhiben la lipoxidasa | (Sadovnikova y Belikov, 1978) |
| Aspartato y glutamato monosódico | Aditivo o condimento para potenciar el sabor en la dieta humana | (Divched, 2004) |
| Cistina y Cisteína | Cosmético, reduce el daño en la piel y en cabello sintetizado como crema. | (Tonouchi y Hisao, 2017) |

En términos de volumen de mercado, ha sido tremendamente optimista en los llamados aminoácidos de alimentación L-lisina, DL-metionina, L-treonina y Triptófano que constituyen la mayor parte (56%) del mercado total de aminoácidos, estimado en 2004 en aproximadamente US \$ 4.5 mil millones (Leuchtenberger et al., 2005). Las capacidades del mercado mundial

(2005) de aminoácidos varían drásticamente, por ejemplo, $1.69 \times 10^6 \text{ t a}^{-1}$ para el ácido L-glutámico y $1.50 \times 10^6 \text{ t a}^{-1}$ para la L-alanina (Hohmann et al., 2018).

2.3 Principales parámetros para la producción biotecnológica de aminoácidos

2.3.1 Preparación del inóculo para el bioproceso

El objetivo principal del proceso upstream es crear el entorno necesario para que las células produzcan la molécula de interés, cual es el proceso de fermentación que incorpora la dispensación, la preparación de medios y el descubrimiento del cultivo celular (Genzyme, Taticek, y Pfizer, 2004). El primer paso es el aislamiento microbiano, las bacterias son los habitantes principales de la rizosfera del suelo, considerado una de las interfaces más dinámicas de la Tierra (Beattie et al., 2011). En donde la búsqueda de nuevas moléculas naturales y sostenibles proporcionen nuevas aplicaciones biotecnológicas (Kanchiswamy, Malnoy, & Maffei, 2015).

Fuente de carbono – melaza de caña de azúcar

En la fermentación biológica una variable importante para la producción de biomoléculas es el sustrato o fuente de carbono es elegida en función de costo y disponibilidad. Como fuente principal de carbono, la melaza de caña, la melaza de remolacha y los hidrolizados de almidón (glucosa) del maíz y la yuca se usan ampliamente para la producción industrial de aminoácidos (Ikeda, 2003). Sustrato principal en la fermentación en reactores se utiliza la miel final (melaza), ya que contiene de forma natural la vitamina *biotina* y otros compuestos nutritivos necesarios para que se sinteticen aminoácidos (Pérez, Rabassa, Crespo y Pérez, 2015).

Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Farjardo y Sarmiento, 2007). Las cepas productoras de aminoácidos prefieren la glucosa como fuente de carbono (Lothar Eggeling y Bott, 2005), pero también puede utilizar otros azúcares como sacarosa, fructosa, ribosa, manosa y maltosa (Zahoor, Lindner, y Wendisch, 2012) (Tabla 2).

Tabla 2

Valores nutricionales de la melaza de caña de azúcar

| Componentes | Constituyentes | Contenido (p/p) |
|---------------------------------|--|------------------------|
| Componentes mayores | Materia seca | 78% |
| | Proteínas | 3% |
| | Sacarosa | 60 - 63 % p/p |
| | Azúcares reductores (fermentables) | 3 - 5 % p/p |
| | Sustancias disueltas (diferentes azúcares) | 4 - 8 % p/p |
| | Agua | 16% |
| | Grasas | 0.40% |
| | Cenizas | 9% |
| Contenido de minerales | Calcio | 0.74% |
| | Magnesio | 0.35% |
| | Fósforo | 0.08% |
| | Potasio | 3.67% |
| Contenido de Aminoácidos | Glicina | 0.10% |
| | Leucina | 0.01% |
| | Lisina | 0.01% |
| | Treonina | 0.06% |
| | Valina | 0.02% |
| Contenido vitamínico | Colina | 600 ppm |
| | Niacina | 48.86 ppm |
| | Acido Pantoténico | 42.90 ppm |
| | Piridoxina | 44 ppm |
| | Riboflavina | 4.40 ppm |
| | Tiamina | 0.88 ppm |

Farjardo y Sarmiento, (2007)

Una forma para cuantificar como se va consumiendo el contenido de azúcar fermentable en el sustrato es por el método DNS (ácido 3, 5-dinitrosalicílico). Utilizado ampliamente para la determinación de sacáridos totales – azúcares reducidos (Deng y Tabatabai, 1994; Gusakov, Kondratyeva, y Sinitsyn, 2011). El ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) puede usarse como oxidante. Cuando el DNS reacciona con los carbohidratos en solución alcalina que tienen grupos terminales de aldehído (CHO) o cetona grupos (CO) (Miller, 1959). Dentro de un cierto rango de concentración, la profundidad del color es directamente proporcional a la concentración del reductor (Hu et al., 2008). Por lo tanto, el DNS se usa ampliamente para determinar la reducción del contenido de azúcar en los campos de alimentos, medicina, bioprocesos (Rivers, Gracheck, Woodford, y Emert, 1984).

Influencia del pH en el medio para la producción de aminoácidos

En las fermentaciones microbianas, el pH es un factor muy importante y fuertemente influyente. Compuestos básicos, como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, carbonato de calcio, amoníaco y amoníaco gaseoso y urea, compuestos de ácido inorgánico como ácido sulfúrico o fosfórico y ácidos orgánicos se utilizan para controlar el pH en cultivos que van de 5.0 a 9.0 (Razak y Viswanath, 2015). Sus condiciones óptimas de crecimiento son a una temperatura de 30°C y un pH de 7 para la síntesis de los aminoácidos. Para mantener un pH óptimo, se deben añadir reactivos como el carbonato de calcio al medio de cultivo al comienzo de la fermentación. El pH del fermentador se controla automáticamente con agua de amoníaco, una pequeña cantidad de CaCO₃ (Shah, Hameed, Ahmad, y Khan, 2002). En otras investigaciones más específicas como Tani, Lim, y Yang, (1988) reportaron medios de producción que contenían biotina a 5.5 pH para la producción de metionina utilizando levadura metilotrófica *C. biodinii*. Broer, Eggeling, y Kramer, (1993) también informó que el pH óptimo para el transporte de velocidad máxima de *C. glutamicum* era de 7.4 - 7.8 para la producción de L- lisina.

Fuente de nitrógeno

Se utilizan varias fuentes de nitrógeno individualmente o como mezclas para la producción a escala comercial y piloto de L-lisina, incluidos los compuestos inorgánicos como el gaseoso y el amoníaco acuoso, las sales de amonio de los inorgánicos u orgánicos como el sulfato de amonio, el nitrato de amonio, el fosfato de amonio, el amonio cloruro, acetato de amonio y carbonato de amonio (US4066501A, 1978). Alternativamente, materiales orgánicos que contienen nitrógeno natural como hidrolizado de soja, hidrolizado de proteína de soja (nitrógeno total de aproximadamente 7%) (Marc, 2007), harina de soja, hidrolizado de torta de soja (US4275157A, 1981), licor de maíz, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, extracto de carne (Thomas y Stevens, 2004), extracto de malta, urea, peptonas (US5133976A, 1992) y los aminoácidos también se pueden utilizar. Por ejemplo, Mondal, Das, y Chatterjee, (1996) observaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes niveles de biotina en la producción de metionina e informaron la mejor producción de metionina a 60 mM de nitrato de amonio.

Influencia de la temperatura para la producción de aminoácidos

Se ha revelado una amplia gama de temperaturas óptimas y operativas para la fermentación de aminoácidos, con el fin potenciar la producción. El documento US4275157

[43] reivindica temperaturas de producción de L-lisina entre 24 y 37 °C, preferiblemente a 30-33 °C las primeras 24 horas, después a 37°C durante 2 a 7 días (US4411997A, 1983). La patente de Bastuck et al., (2005) describe un proceso de fermentación que reivindica la producción de L- treonina por cepas mutantes de fusión de protoplastos (*E. coli*) a temperaturas entre 20 y 40 °C. Algunos estudios en la fase de la producción, la alta temperatura hasta 41°C se han utilizado para aumentar la productividad de algunos aminoácidos como el ácido L- glutámico en Actino bacterias (Delaunay, Lapujade, Engasser, y Goergen, 2002).

Influencia del oxígeno presente en el medio para la producción de aminoácidos

Se ha demostrado que según las características bioquímicas de los aminoácidos, la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) influye en la productividad de los aminoácidos (Villadsen, Nielsen, y Lidén, 2011). De hecho, se ha demostrado que el incremento en el OTR ha llevado a una productividad y rendimiento de L- fenilalanina 45% mayor (Shu y Liao, 2002), mientras que la producción de L- triptófano se vio favorecida por condiciones de transferencia de oxígeno más bajas ya que aumenta el flujo de carbono hacia la vía de aminoácidos aromáticos (Kocabaş, Çalik, y Özdamar, 2006). La producción de L- arginina está fuertemente inhibida por la falta de oxígeno, el efecto del oxígeno en las fases de crecimiento y producción (0.01 – 0.05 atm) provoca una sobreproducción de L- arginina (30 g/L) (Utagawa, 2004). Por otro lado, investigaciones como Sharma y Gomes, (2001) informaron que el 40% de oxígeno disuelto es óptimo para la producción de metionina usando *C. Liliium* NTE 99. De igual forma informaron que el mejor caudal de aire para la producción de L-lisina por células libres fue de 1.25 vvm, la concentración del producto fue de 20.54 g/l (Razak y Viswanath, 2015).

2.3.2 Fermentación – Biorreactores

El proceso de fermentación es en principio muy simple: un tanque de fermentación se carga en condiciones estériles con un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono adecuada, como el jarabe de caña de azúcar, así como las fuentes de nitrógeno, azufre y fósforo requeridas, algunos oligoelementos y se agita bajo condiciones específicas (temperatura, pH, aireación) (Leuchtenberger et al., 2005). El biorreactor es el corazón de cualquier proceso bioquímico en el que se utilizan enzimas, microbios, mamíferos o sistemas de células vegetales para la fabricación de una amplia gama de productos biológicos útiles (Metabolisms, 2007). Existen varios tipos de biorreactores utilizados en la industria de la fermentación y sus operaciones se basan principalmente en las células microbianas que realizan la fermentación y el producto que se debe lograr después de esa fermentación (Ali, Rafique, Ahmed, y Sakandar,

2018). La fermentación se lleva a cabo en un sistema parcialmente cerrado, en el que los materiales se cargan en el biorreactor, los productos, al ser intracelulares o extracelulares, se encuentran al final del proceso (R. Sindhu et al., 2016). Utilizado mayormente en Antibióticos, Cultivo masivo de tejidos, Enzimas quitinolíticas y aminoácidos (Chen et al., 2010; Martin y Vermette, 2005; Spier, Vandenberghe, Medeiros, y Soccol, 2012).

Métodos de identificación y cuantificación de aminoácidos

Los métodos más utilizados para la identificación son los colorimétricos de forma cualitativa y cuantitativa. El método con la ninhidrina que reacciona en medio ácido (pH 3-4) produciendo amoníaco, dióxido de carbono y un complejo de color púrpura-azulado (dicetohidrindilideno) y en forma cuantitativa absorbe a una longitud de onda de 570 nm (Roca, Oliver, y Rodríguez, 2003). Otro método de rápida y simple identificación es la cromatografía de capa de fina (TLC) que permite un análisis cualitativo e incluso semicuantitativo muy rápido y eficiente de aminoácidos y mezclas de aminoácidos (Sherma y Fried, 1997).

La técnica se basa en dos etapas, la fase estacionaria donde el solvente polar (mezcla acetona, butanol, ácido acético, piridina) es absorbido por placas como gel de sílice, celulosa, alúminas adsorbentes impregnados e intercambiadores de iones y la fase móvil las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas (Mohammad, Moheman, y El-Desoky, 2012). La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos. Para revelar la placa, se identifican con la ninhidrina, que se usa ampliamente por su notable alta sensibilidad produciendo el mismo color púrpura / violeta con todos los aminoácidos, excepto la prolina y la hidroxiprolina (Sen, Sarkar, Kundu, y Laskar, 2012). El comportamiento de las biomoléculas y la forma de registrar los resultados de este ensayo, generalmente se caracteriza por el valor R_f , definido como la relación de las distancias recorridas por la sustancia y el frente del solvente (Brenner y Niederwieser, 1967).

Métodos modernos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o la cromatografía de gases. Para estos procesos las muestras de aminoácidos necesitan estar derivatizadas en donde el analito se vuelve más volátil, esto produce el remplazo de los hidrógenos activos de grupos polares (OH, NH₂, SH) por un fragmento no polar (Walker y Mills, 1995). El Pico-Tag es la metodología utilizada para analizar aminoácidos reaccionando fenilisotiocianato a 46°C para producir feniltiocarbamil y registrado con una absorbancia de 254 nm (Roca et al., 2003). Esto

se produce generando gradientes de elución de dos sistemas, el disolvente “A” desplaza los aminoácidos más polares y el disolvente B a los más hidrofóbicos (Jajic, Krstovic, Glamocic, Jakšic, y Abramovic, 2013; Wittmann-Liebold, Salnikow, y Erdmann, 1986).

2.3.3 Downstream – Purificación de los aminoácidos

El proceso Downstream es la fase de biofabricación que generalmente se considera que comienza con el cultivo de biorreactores de cultivo celular que contiene el ingrediente activo y finaliza con un producto altamente purificado adecuadamente, listo para la formulación final y el envasado (Bracewell, Mumtaz, y Smales, 2009). Para los aminoácidos requiere varias fases previas para obtener el concentrado.

Aislamiento y purificación

Los procesos de recuperación industrial de aminoácidos del caldo de fermentación dependen del método cromatográfico convencional o del método de cristalización por concentración (Flickinger y Drew, 1999). La eliminación de la masa celular se realiza bien por técnicas basadas en la gravitación (ultra centrifugación, centrifugación o decantación) o por filtración (Hermann, 2003) es el paso inicial para las dos metodologías. Por el método cromatográfico se usa resinas de intercambio iónico que separan a los aminoácidos para ser filtrados, concentrados y neutralizados con HCL, finalmente cristalizados. Esto proporciona mayor calidad, pero genera mayor licor residual lo que genera mayor pérdida económica (Zapp et al., 2012). El método convencional por concentración solo se elimina la biomasa, filtra, se ajusta los pH necesarios para ser filtrado y se lo cristaliza. Este método es el más sencillo, pero no puede ser aplicado para tipo de moléculas. Estas impurezas pueden reducirse lavando los cristales con un disolvente adecuado y otras etapas de separación (Hohmann et al., 2018) (Figura 1).

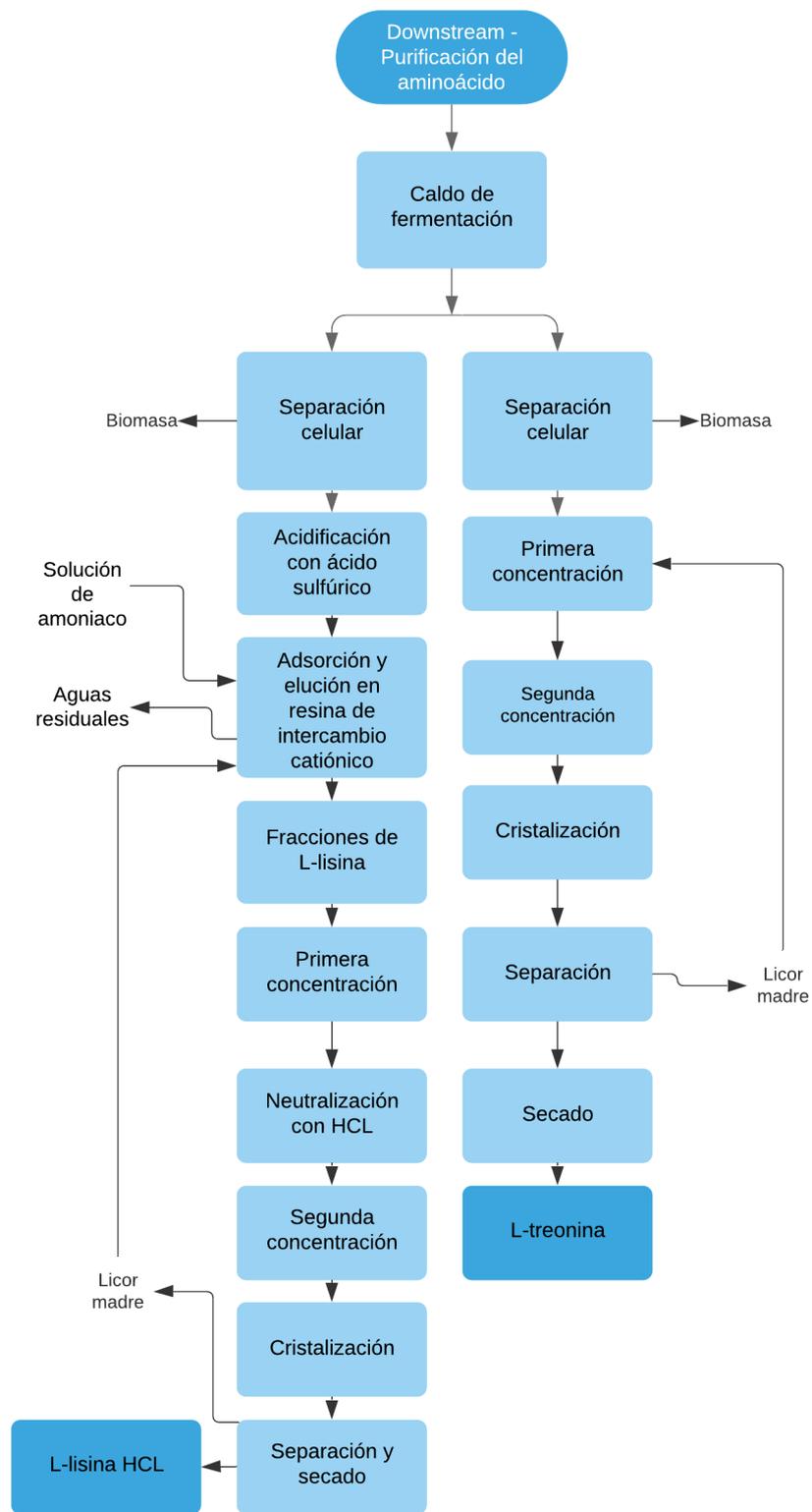


Figura 1. Diagrama de flujo para la purificación de aminoácidos. A Método cromatográfico, B. Método por concentración (Ikeda, 2003)

2.4 Microorganismos sintetizadores de aminoácidos

2.4.1 Características de las cepas utilizadas en la industria

Los microorganismos preferidos por la industria de aminoácidos son los actinomicetos, con gran potencial sintetizador, el grupo de gram positivos representan un 20 a 60 % total del suelo, aguas dulces y marinas (Parada, Marguet y Vallejo, 2017). Esta zona del suelo es donde se encuentra mayor carga de biodiversidad, donde los actinomicetos representan entre 20 y 60 % de la población total del suelo y que cumplen roles en la descomposición de la materia orgánica (Parada, Marguet y Vallejo, 2017). Los actinobacterias que tienen arsenales extensos de metabolitos secundarios, productos de metabolismos que a diferencia de los metabolitos primarios como vitaminas, aminoácidos, nucleótidos, etc., no son esenciales para el crecimiento bacteriano (Drahansky et al., 2016).

La actividad metabólica de los actinomicetos frecuentemente está acompañada por la producción de metabolitos secundarios (MS) de gran diversidad química, que desempeñan un papel primordial en el mantenimiento, señalización y colonización de su hábitat (González, Ayuso, Anderson y Genilloud, 2005). La mayoría de los compuestos bioactivos sintetizados por actinomicetos corresponden a diversas estructuras químicas, como aminoglucósidos (estreptomina y kanamicina), glicopéptidos (vancomicina), macrólidos (eritromicina), B-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nucleósidos (puromicina), péptidos de síntesis no ribosomal (gramicidina, bacitracina), policétidos (actinorrudina, anfotericina), entre otros (Nanjwade, Chandrashekhara, Goudanavar, Shamarez y Manvi, 2010).

Por ejemplo, la producción global anual de L-lisina es superior a 800 000 Tn, la mayoría de las cuales se obtiene de la biosíntesis por *Brevibacterium spp* (*Brevibacterium lactofermentum*), *Corynebacterium spp.* (*Corynebacterium glutamicum*) y *Escherichia spp.* (*Escherichia coli*) (He et al., 2015). Estos avances en la tecnología de desarrollo de cepas, combinados con los enfoques recientes a nivel de sistemas, casi han logrado la optimización de sistemas celulares completos como fábricas celulares para la producción de aminoácidos de alto rendimiento (Ikeda, 2016).

2.4.2 Metabolismo de síntesis de aminoácidos

El microorganismo *Corynebacterium glutamicum* bacteria del suelo Gram positiva aerobia no patógena y que representa la principal bacteria productora de aminoácidos (Ikeda, 2002). Se han identificado tres vías principales: la vía de Embden Meyerhof Parnas (glucólisis),

la vía de pentosa fosfato (PPP) y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Tatsumi y Inui, 2012). En la primera parte las diferentes enzimas participan en la conversión de carbono entre el ciclo de TCA y la glucólisis, como la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y el isocitrato deshidrogenasa (Tatsumi y Inui, 2012).

En la glucólisis, responsable de un catabolismo adicional de los azúcares, la glucosa se convierte en piruvato y portadores de energía tales como ATP y NADH. En el fosfoenolpiruvato (PEP), el ganglio oxaloacetato de piruvato, el PEP y el piruvato, los productos finales de la glucólisis, entran en el ciclo TCA (Tatsumi y Inui, 2012). El ciclo TCA, está compuesto por una fase catabólica y una anabólica. Durante la fase catabólica, la acetil-CoA, producida por la degradación de los azúcares, se oxida a través de varios pasos en CO₂, generando simultáneamente NADH (Bott, 2007).

Durante la fase anabólica, el ciclo de TCA produce dos precursores de la familia de aminoácidos glutamato y aspartato, 2-oxoglutarato y oxaloacetato, además de otros intermedios como la succinil-CoA. El PPP es responsable de proporcionar el poder reductor anabólico NADPH y ribosa 5-fosfato y eritrosa 4-fosfato, dos precursores de la biosíntesis de bloques de construcción (Stincone et al., 2015). Además, durante el ciclo, se producen vitaminas y constituyentes de la pared celular esencial para la producción de aminoácidos.

La lisina se produce convirtiendo su precursor oxaloacetato en aspartato con la ayuda del producto gen aspB. El aspartato luego se fosforila a L-4-aspartilfosfato por la enzima aspartato quinasa (AK), que a su vez se convierte en L-aspartato 4-semialdehído por la enzima aspartato-semi aldehído deshidrogenasa (ASADH). El L-aspartato 4-semialdehído se convierte adicionalmente en deshidrodipicolinato por reacción con piruvato, catalizado por deshidrodipicolinato sintasa (DHDPS). El 2,6-dicarboxilato de L-piperidina se produce con la ayuda del agente reductor NADPH y la enzima deshidrodipicolinato reductasa (DHDPR).

El 2,6-dicarboxilato de L-piperidina se puede convertir directamente en meso-2,6-diaminopimelato agregando un grupo amino, proceso llamado variante de deshidrogenasa y catalizado por diamino pimelato deshidrogenasa (DAPDH), o por la variante de succinilo donde están involucradas varias reacciones. Finalmente, el diaminopimelato meso-2,6 se descarboxila a lisina por medio de la enzima diaminopimelato descarboxilasa (DAPDC). La ruta biosintética de la L-lisina a partir de la glucosa (Figura 2).

Por otro lado, entre los aminoácidos comercialmente más importante se encuentra la lisina que es sintetizado por *C. glutamicum*. Estas tipos de cepas, corineformas generalmente muestran

una fuerte actividad en la asimilación del azúcar y glutamato deshidrogenasa es la enzima responsable de la biosíntesis del glutamato (Kumagai, 2000). Los azúcares de la glucosa se degrada a través de una vía glucólisis y parte de un ciclo ácido cítrico (Becker, Rohles, y Wittmann, 2018), y 2 oxo-glutarato formado en el ciclo se amina a glutamato por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa (Hirasawa y Wachi, 2016). Como por ejemplo los principales que los genes *dapF* y *dapC* que completan la vía biosintética de lisina en bacterias productoras de aminoácidos (Hartmann et al., 2003).

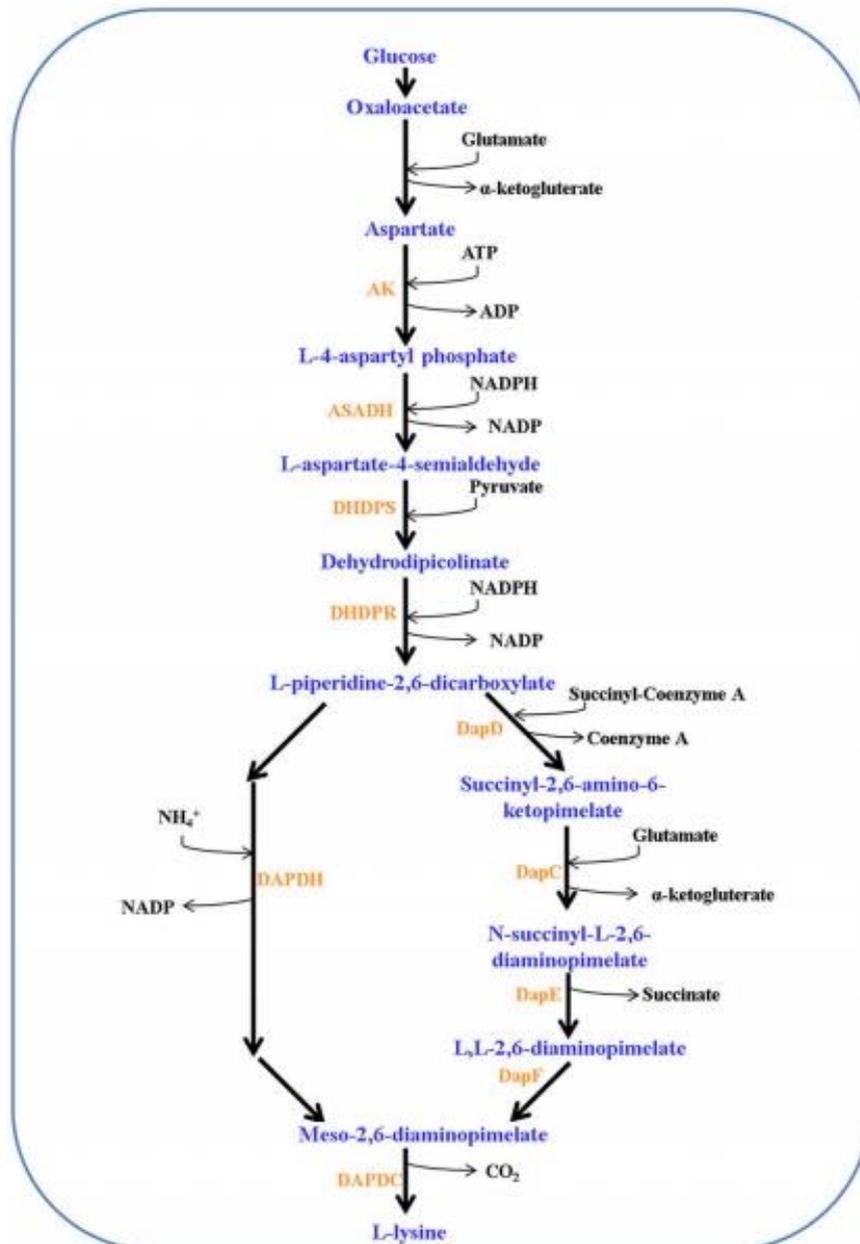


Figura 2. Vía sintética de la L-lisina en *C. glutamicum*. En la ruta sintética de la lisina, su precursor, el oxaloacetato, se convierte en aspartato mediante la adición de un grupo amino tomado de glutamato (Este et al., 2017).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

En el presente capítulo se describe los procedimientos empleados para la investigación detallando la zona donde se realizó la bioprospección y sus principales características de ubicación. Además, las técnicas de aislamiento y caracterización a nivel morfológico e identificación molecular de los microorganismos aislados. Finalmente, los protocolos para determinar la cinética de crecimiento, consumo de fuentes de carbono y la producción de aminoácidos (perfil aminoacídico) mediante fermentación líquida usando las cepas aisladas.

3.1 Caracterización del área de muestreo

La recolección de muestras de suelo para el aislamiento de bacterias sintetizadoras de aminoácidos se realizó en la reserva Sabia Esperanza, ubicada en la provincia de Imbabura, Cantón San Pedro de Pimampiro, Parroquia San Francisco de Sigsipamba en el sector del Río Verde al norte del país (18 N 0177961, 0030580 - UTM) (Figura 3). La reserva tiene alrededor 1500 ha con temperaturas que varían entre los 4 y 24 °C. Se eligió este lugar debido a las condiciones de temperatura, humedad y luminosidad adecuados para encontrar bacterias sintetizadoras de aminoácidos.

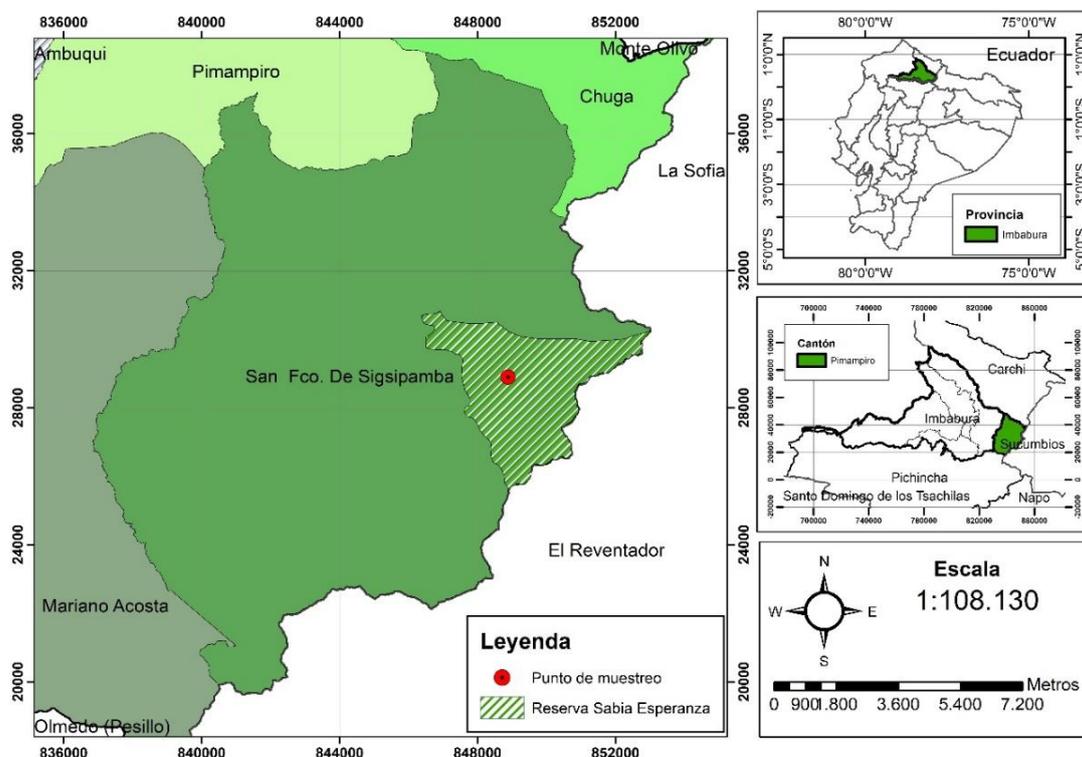


Figura 3. Mapa de ubicación de la reserva sabia Esperanza

Las cepas aisladas fueron de la zona del bosque nublado con mayor cobertura vegetal de la reserva Sabia Esperanza (Permiso ambiental No. 0017-2018-ICA-FAU-FLO-DEPAI/MAE). En esta sección de lugar se eligió en preferencia suelo donde exista mayor carga orgánica en descomposición y alta retención de humedad. Además, el sitio tenía un olor característico a “suelo húmedo” lo cual es producto de la geosmina que es un metabolito volátil, sintetizados por los actinomicetos (Nannipieri, 2014), el cual se presentaba en todas la cepas aisladas. Los microorganismos preferidos por la industria de aminoácidos son los actinomicetos, son cepas con gran potencial sintetizador.

3.2 Descripción del área experimental

La fase experimental de la presente investigación fue realizada en los laboratorios de Biotecnología Aplicada y Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte - Campus San Vicente de Paúl, ubicado en el cantón Ibarra, parroquia San Francisco (0°20'48.9" N 78°06'51.3" W).

3.3 Muestreo *in situ*

Debido a que el acceso a la reserva es muy limitado con un máximo de tres kilómetros por la espesa cobertura vegetal, se decidió realizar un muestreo por conveniencia sin un arreglo probabilístico. Al llegar al sitio seleccionado se usó materiales estériles como guantes, mascarilla y bolsas de polietileno para evitar disturbar el perfil original del suelo. Se llegó al punto de mayor interés que es la zona de la rizósfera de los árboles, por lo general se aíslan cepas de actinomicetos a una profundidad entre 2 y 15 cm, más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de estos (Carrillo, 2003; Cisneros, 2016) (Anexo 1).

Para obtener una muestra, se recolectaron 4 submuestras de aproximadamente 200g en diferentes lugares de la zona de la rizosfera (alrededor del árbol), a una profundidad de 10 cm. Se rótulo con datos técnicos como temperatura del suelo, coordenadas GPS, hora de recolección, altura y obsercaciones del lugar (10-04-2019) (Anexo 2). Se transportó y conservó a una temperatura de 4 – 5 °C en el laboratorio de biotecnología aplicada de la Universidad Técnica del Norte (Figura 4).



Figura 4. Extracción de muestras: A. zona con descomposición orgánica B. área de la rizosfera y C. área de la reserva

3.4 Aislamiento de cepas bacterianas

De cada submuestra recolectada fue filtrada para eliminar rastrojo y homogenizado en una sola muestra dependiendo de cada punto de referencia. Posteriormente, se realizaron las disoluciones seriadas a partir de 10g de muestra que fueron diluidos en 90 ml de agua destilada (1:10), hasta llegar a la dilución requerida 10^{-1} a 10^{-5} (Guevara, 2017). En las últimas diluciones (10^{-4} a 10^{-5}) se inocularon 50 μ l por duplicado en placas con agar para aislamiento de actinomicetos (TM Media) usando como control fúngico nistatina (1.5 μ g/ml) (Parada et al., 2017). Se procedió a dispersar el inóculo por toda la superficie con el asa de Drigalsky, luego fueron selladas e incubadas (Biobase Incubator) a 29°C por un periodo de siete días tomando control cada 24 horas (Li, Chen, Jiang, y Jiang, 2016). El crecimiento bacteriano se examinó en cada caja Petri para identificar colonias relacionadas con el filo actinomicetos (morfología de la colonia) y las cuales se retiraban con el asa de siembra en nuevas placas para obtener cepas puras.

3.5 Identificación morfológica

Cada colonia se aisló en nuevas placas y se incubaron a 29 °C para obtener cepas puras posteriormente, se realizó microscopia (100x). Se identificaron posibles cepas de interés mediante observaciones morfológicas incluida la germinación de esporas, la formación de micelio aéreo, el color del micelio aéreo y la producción de pigmentos, para identificar actinobacterias (Q. Li, Chen, Jiang, y Jiang, 2016; Torabi et al., 2016). Además, se realizó una prueba de tinción Gram de cada colonia aislada. Las cepas se caracterizaron por métodos morfológicos de forma macroscópica y microscópica (100x) dónde se observaron a través de la inmersión en aceite (Dhananjeyan, Selvan, y Dhanapal, 2010).

3.6 Identificación molecular de las cepas

Las muestras más prominentes fueron enviadas los laboratorios IDGen donde se realizó la identificación molecular. El aislamiento de ADN fue ejecutado por métodos convencionales de extracción y purificación de ADN mediante el kit de muestras de alta pureza para PCR (choque térmico, con ciclos repetitivos de calentamiento (100 °C) y enfriamiento (-20 °C); enzimáticos, con incubación en diferente búfer) a partir de 100 mg de pellet bacteriano, evaluado su integridad y calidad de ADN en electroforesis. El ADN obtenido fue diluido a una concentración 20 ng/μL para la amplificación mediante PCR, para esto se utilizaron los primers universales de bacterias 16S rRNA (27F/1492R). Los productos de PCR fueron secuenciados por el método de SANGER y ensamblados para ser analizados por programas bioinformáticos. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de nucleótidos de GenBank – NCBI.

3.7 Proceso de fermentación

3.7.1 Diseño del biorreactor y forma de operación

El bioproceso se realizó en reactores tipo batch de 250 ml, usando frascos de vidrio (Figura 5.A) los cuales se adaptaron mangueras de silicona (Figura 5.B) para el intercambio gaseoso (Diámetro - 7 mm). La agitación de la fermentación el cual se realizó con bomba de aire 4x3 l/min (SB-948) con una presión 0.02 MPa, ajustado con bushing pvc para evitar fugas y contaminaciones (Figura 5.C). Para evitar posibles contaminantes se filtró el aire de entrada mediante membranas de 0.22 μm (Millipore Millex GP) (Figura 5.D) y otro orificio para tomar alícuotas para realizar controles de consumo de azúcares, síntesis de aminoácidos totales y salida de gases de la fermentación (Figura 5.E) con filtro de algodón para evitar el ingreso de contaminantes externos (Figura 5.F).

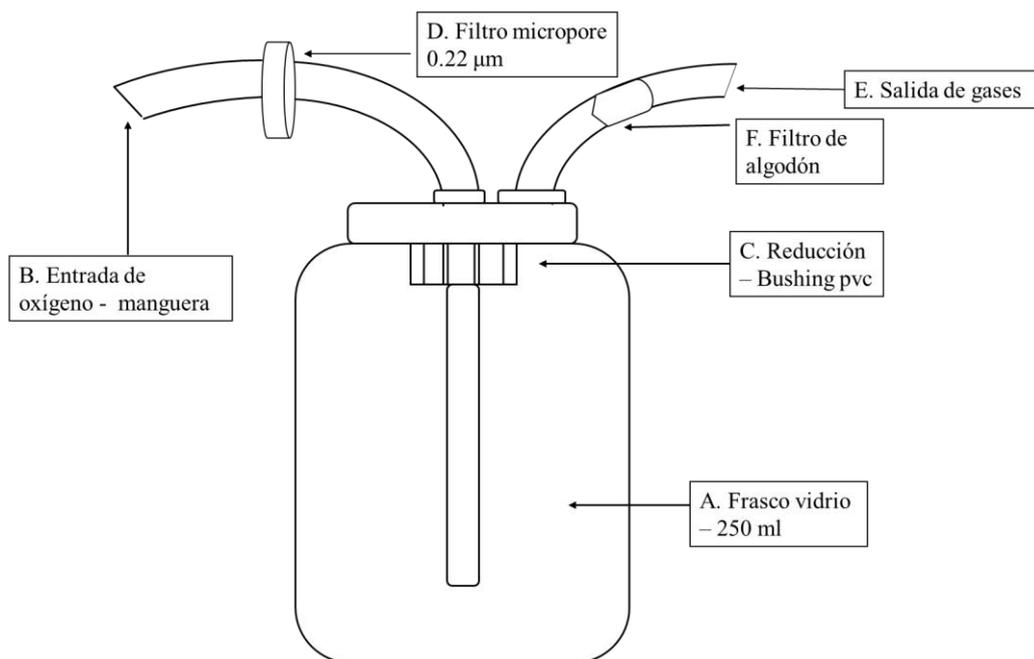


Figura 5. Esquema de biorreactor y sus componentes

3.7.2 Determinación de la cinética de crecimiento

Para observar el valor máximo de células viables que las cepas alcanzan a través del tiempo, se determinó la curva de crecimiento bacteriano identificando todas sus fases. Para desarrollar los ensayos se inocularon dos colonias ACT-1A, ACT-1B, 29 ± 1 °C durante 3 días en 5 ml de caldo nutriente (Acumedia). Posteriormente, el contenido se utilizó para escalar en medios líquidos de 100 ml de caldo nutritivo y se incubó a 29 °C en un agitador orbital a 150 rpm (Thermo Scientific MaxQ 4000) (Khan et al., 2006; Moosavi-Nasab, Ansari, y Montazer, 2007).

Para cuantificar la concentración de células se utilizó espectrofotómetro UV (Jenway 6705 UV/Vis), tomando alícuotas de 3 ml y midiendo a una longitud de onda de 600 nm registrando lecturas dos veces al día en una diferencia de 8 horas durante 96 horas (Shakoori et al., 2012). Además, se determinó el número de células mediante conteo de cámara Neubauer (dilución de la muestra 1:10). Para determinar si las muestras presentan una distribución normal se realizó la prueba de Shapiro – Wilk.

3.7.3 Medio de cultivo para la producción de aminoácidos

Las fuentes de carbono utilizadas para la fermentación fueron la melaza de caña comercial y glucosa de grado analítico (Sigma – Aldrich) en las dos cepas (ACT-1A y ACT-1B), la reacción se realizó en reactor de 250 ml con 4 repeticiones por cada cepa. Además, se utilizaron macro y micronutrientes necesarios para la biosíntesis de aminoácidos, metabolismo

y mantenimiento celular como nitrato de amonio, fosfato dipotásico, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de hierro y sales sulfato de hierro, cloruro de manganeso, sulfato de zinc (Tabla 3). El sustrato estuvo compuesto por la fuente de carbono disueltos en 100 ml medio B y 1 ml de solución de sales, aforado a 1000 ml ajustado a pH 7.0 – 7.2 (Tabla 3). La melaza de caña usada en los ensayos se encuentra de forma de nutriente limitante 25 g (por cada 15 g de melaza existe 6 g de azúcares fermentables), este valor se obtuvo realizando una relación tomando como estándar la glucosa de grado químico 10 g para obtener una fermentación optima (Hermann, 2003). Se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 atm por 15 min (tuttnauer 3870 ML).

Tabla 3

Fuente de carbono y micronutrientes utilizados para el bioproceso

| Fuente de carbono | | Cantidad (g) |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Melaza de caña de azúcar | | 25 |
| Glucosa | | 10 |
| Fuente de nitrógeno | | |
| NH ₄ NO ₃ | | 0.4 |
| Micronutrientes | | |
| Medio B | K ₂ HPO ₄ | 1.0 |
| 6,8 pH | KNO ₃ | 0.5 |
| 1000 ml | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 |
| | CaCl ₂ | 0.1 |
| | NaCl | 0.1 |
| | FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.01 |
| Solución de sales | FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.1 |
| 100 ml | MnCl ₂ .4H ₂ O | 0.1 |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0.1 |
| Agua destilada | | 900 ml |

Rózycki y Strzelczyk, (1986); Shakoori et al., (2012)

3.7.4 Cinética de consumo de sustrato y producción de aminoácidos

El sustrato se repartió en los reactores y se inocularon con 50 ml de cultivo bacteriano reactivado previamente por 72 horas para llegar a un volumen de final de 250 ml (Figura 6). Se incubó a 29±1°C durante 120 horas usando la bomba de aire como agitador e intercambiador gaseoso para distribuir homogéneamente nutrientes y células en el medio. Para determinar los dos tipos de cinética se tomaron alícuotas de 5 ml cada 24 horas de cada reactor y todas las muestras se centrifugaron a 4000 x g, 4°C por 10 min (Thermo Scientific Sorvall ST16R) (Parada et al., 2017), para separar la biomasa del sobrenadante y así evitar interferencia en la lectura de absorbancia.

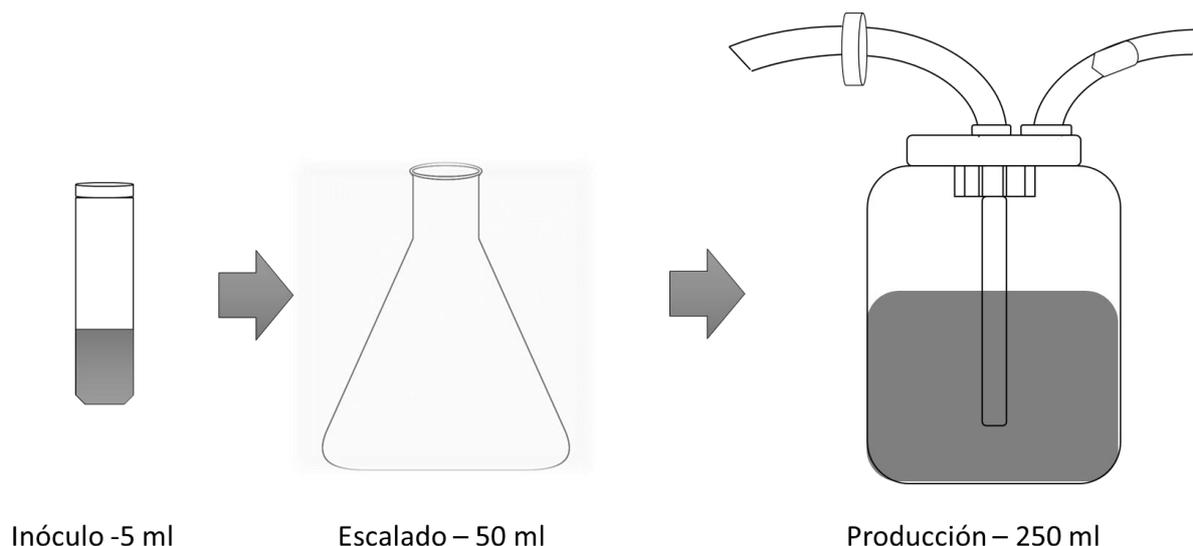


Figura 6. Diagrama de flujo para el escalado desde 5 ml a 250 ml producción de aminoácidos escala laboratorio

El consumo de la fuente de carbono se determinó mediante espectrofotómetro UV con el método DNS (Sigma – Aldrich) a una longitud de onda 540 nm relacionando con la curva estándar con glucosa (Anexo 6) (Núñez, Pérez, Motzezak, y Chirinos, 2012). La reacción se preparó en tubos de ensayo, tomando 500 μ l del fermentado y 500 μ l del reactivo DNS. Los tubos se calentaron en baño María a 100°C por 5 min, se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min y se registró la absorbancia en el espectrofotómetro.

La producción de aminoácidos totales fue cuantificada por la reacción de ninhidrina al 1% (Loba Chemie PVT. LTD). Se añadió 1 ml y se calentó durante 15 minutos en un baño de agua 100°C. Luego, los tubos se aforaron a 7 ml con agua destilada y se enfriaron a temperatura ambiente para estabilizar la reacción. Se registro cuantitativamente tomando lecturas a 570 nm usando como referencia la curva estándar de aminoácidos (Supelco) (Bishir, Alhaji, y Obansa, 2017; Roca, Oliver, y Rodríguez, 2003).

Diseño experimental para determinar la cinética de producción de aminoácidos

En estos experimentos se evaluaron dos factores en estudio: Fuente de carbono (F) y el tipo de microorganismo (m). El primer factor en estudio presentó dos niveles: f1: glucosa, f2: melaza. Mientras que el segundo factor en estudio presentó dos niveles, m1: ACT-1A, m2: ACT-1B (Tabla 4). Para evaluar la variable de la producción de aminoácidos se diseñaron ensayos que consistieron en cuatro tratamientos. Se realizaron cuatro repeticiones de cada uno de los tratamientos, de tal manera se obtuvieron 16 unidades experimentales. Así se obtuvieron los siguientes experimentos:

Tabla 4

Tratamientos que se evaluaron para la producción de aminoácidos

| Tratamiento | Código | Significado |
|-------------|--------|------------------|
| 1 | f1m1 | ACT-1A + Melaza |
| 2 | f1m2 | ACT-1A+ Glucosa |
| 3 | f2m1 | ACT-1B + Melaza |
| 4 | f2m1 | ACT-1B + Glucosa |

Con el fin de determinar diferencias entre los tratamientos de la mejor cepa y fuente de carbono para la producción de aminoácidos totales, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) ajustado a un modelo de diseño de bloques completos al azar en un arreglo de bloques A y B. Se denominó al Factor A como cepa y factor B la fuente de carbono. Además, se aplicaron pruebas de significancia estadística a posteriori en todas las fuentes de variación que resultaron significativas después de realizar el ANOVA (Tabla 5).

Tabla 5

Análisis de la varianza para la evaluación de la producción de aminoácidos

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|-----------------------|--------------------|
| Cepa | 1 |
| Fuente Carbono | 1 |
| Fuente Carbono * Cepa | 1 |
| Repetición | 3 |
| Error | 9 |
| Total | 15 |

3.7 Determinación del perfil aminoacídico por Cromatografía en capa fina (TLC)

El perfil aminoacídico permite caracterizar aminoácidos para ello se traza a 1.5 cm del borde inferior en la placa silicagel (Merck TLC 60G F254) una línea con lápiz y sobre ella se marcan 4 puntos a 1.5, 3.0, 4.5 y 6.0 cm, escribiendo debajo de cada uno de ellos los códigos asignados (ACT-1A, ACT-1B). Se aplicaron los licores fermentados de la glucosa sobre cada uno de los puntos, hasta que se forme una mancha de unos 5 – 10 mm de diámetro. La placa se introdujo en un recipiente con la solución de la fase móvil compuesta con n-butanol: acético glacial: agua (12:3:5) (Peinado y Meléndez, 2010). La placa permaneció aproximadamente 60 minutos para que se complete la fase móvil.

Se marcó el punto de alcance en la fase móvil y se secaron en corriente de aire caliente hasta que no se aprecie el olor a butanol. Finalmente, se sumergió la placa completamente con la solución de ninhidrina al 0.1% en etanol y se dejó secar por 24 horas a 100°C para identificar

el perfil aminoacídico (Roca et al., 2003). Al finalizar se midió la distancia de la línea de aplicación de las muestras hasta cada mancha mediante el calibrador - vernier digital. Se calcularon los valores del factor de resolución (Rf) para cada aminoácido y su desviación estándar por cada una de las 4 repeticiones de la fermentación con glucosa para evitar los falsos positivos. Los valores Rf calculados se relacionarán con los valores Rf estándar de los aminoácidos para el tipo de solvente utilizado por investigaciones previas (Tabla 6).

Tabla 6
Valores estándar (Rf) para aminoácidos por TLC

| Aminoácidos | Valor Rf |
|-----------------|----------|
| Alanina | 0.38 |
| Arginina | 0.20 |
| Acido aspártico | 0.24 |
| Acido glutámico | 0.31 |
| Glicina | 0.26 |
| Lisina | 0.27 |
| Metionina | 0.55 |
| Leucina | 0.68 |
| Serina | 0.27 |
| Fenilalanina | 0.68 |
| Tirosina | 0.45 |

Peinado y Meléndez, (2010); Rakesh Sindhu y Sharma, (2010)

3.8 Planteamiento del escenario teórico para la producción de aminoácidos

Los datos y la bibliografía sobre los materiales, maquinaria, bioprocesos y rendimiento de sustrato, productos se tomaron de varias bases de datos, investigaciones relacionadas con el campo de la producción de aminoácidos (Tabla 7). Además, se tomó en cuenta la normativa vigente para la utilización de organismos genéticamente modificados dentro de procesos industriales, principales consumidores del mercado nacional, entidades financieras para el emprendimiento y la factibilidad de la industria dentro del territorio ecuatoriano.

Tabla 7
Principales servidores de información acerca de los procesos biotecnológicos

| Bases bibliográficas | URL |
|----------------------|---|
| ScienceDirect | https://www.sciencedirect.com/ |
| Elsevier | https://www.elsevier.es/es |
| Ingenta | https://www.ingentaconnect.com/ |
| Pubmed | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed |
| Springer | https://link.springer.com/ |
| Scopus | https://www.scopus.com/home.uri |

De los 20 aminoácidos solo se seleccionará uno por su importancia en la industria, económico y factibilidad para la producción mediante fermentación biológica. Para llevar un hilo conductor se explicarán las etapas del bioproceso mediante diagramas de flujo, indicando la entrada del sustrato (Preparación del medio nutritivo e inóculo inicial de la cepa), fermentación (reacción bioquímica), la salida del producto objetivo (purificación de la molécula) y los subproductos de cada paso del proceso. En el siguiente cuestionario de preguntas se tomó como eje principal, para desarrollar una estructura base del escenario teórico de la producción de aminoácidos (L – lisina):

- ¿Qué técnicas o procesos biotecnológicos son necesarios para preparar el sustrato, microorganismo, reacción de fermentación y purificación del aminoácido objetivo?
- ¿Cuáles son los balances de materia involucrados en el proceso de entrada y salida de cada etapa del proceso?
- ¿Qué ensayos o pruebas de laboratorio son utilizadas para identificar y cuantificar los aminoácidos presentes en el licor fermentado del bioproceso?
- ¿Cuáles son las limitaciones de la propuesta a nivel económico, rendimiento y demanda del bioproducto en el mercado nacional?
- ¿Qué implicaciones conllevaría la propuesta con respecto a las normativas legales, bioéticas y medioambientales en el marco de la constitución nacional?
- ¿Producción de L- lisina es económicamente factible ejecutarla en el Ecuador con respecto a la inversión en maquinaria, talento humano e infraestructura?
- ¿Existe en el Ecuador entidades financieras de carácter pública o privada que fomenten económicamente el desarrollo del emprendimiento en el campo biotecnológico?

3.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en el software IBM SPSS Statistics 22. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos. Se comprobaron los supuestos de normalidad a través de la prueba de Shapiro Wilk y de igualdad de la varianza mediante prueba de Levene.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los principales resultados obtenidos en los ensayos descritos en la metodología. Se detallan las cepas aisladas de la reserva desde la identificación microscópica mediante características morfológicas hasta el reconocimiento de las especies a nivel molecular. Además, se establece la cinética de crecimiento, consumo de fuente de carbono y producción de aminoácidos totales libres de las colonias aisladas. Se registran los rendimientos y se comparan entre las cepas, finalmente se reconoce el perfil aminoacídico de las fermentaciones.

4.1 Caracterización de cepas bacterianas aisladas

Las cepas se clasificaron dependiendo de su morfología colonial observados a diferentes aumentos en el microscopio óptico como se indica en la siguiente figura.

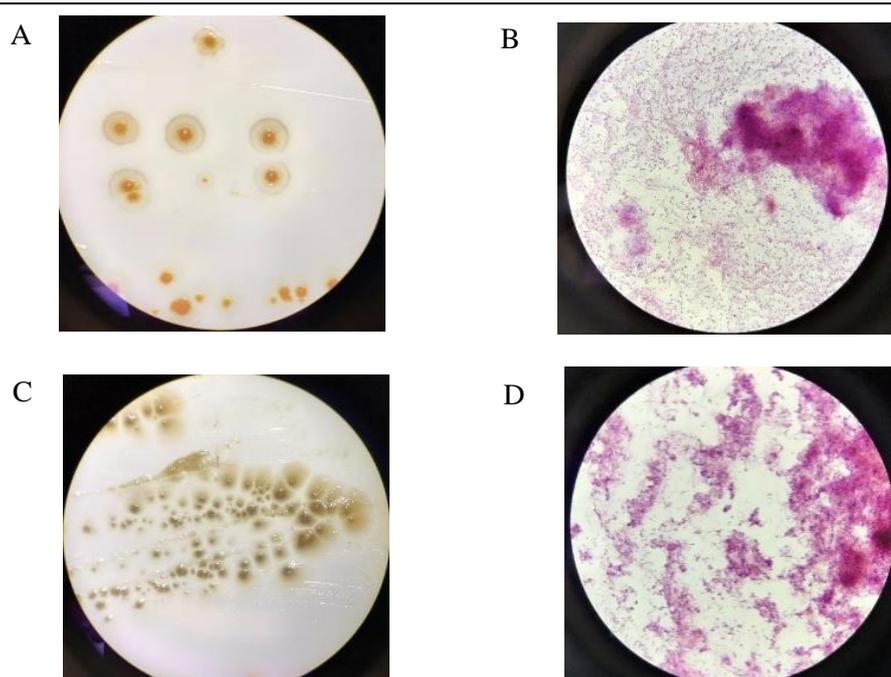


Figura 7. Características morfológicas de las cepas aisladas. Cepas caracterizadas mediante microscopia, clasificadas con tinción Gram. A y B: ACT-1A, C y D: ACT-1B. Izquierda: estereoscopio 4x, derecha: microscopio 100x

La presencia de síntesis de moléculas alrededor de las colonias es una característica importante para actinomicetos, y fue observado en todas las cepas. Para ACT-1A se registró un color rojo con halos de secreción alrededor de las colonias (Figura 7.A), para ACT -1B un color café opaco de igual forma presento secreciones (Figura 7.C).

Las bacterias que fueron aisladas e identificadas mediante tinción resultaron ser Gram positivas. La microscopia a 100x registró que ACT-1A presentó una estructura de micelios aéreos y esporas, textura polvorosa, adheridas al agar y de crecimiento lento (Figura 7.B). De igual forma para ACT-1B presentaron características en las colonias como el aspecto cremoso y estructuras micelares incrustadas en el medio sólido (Figura 7.D). Esta prueba permitió clasificar las cepas más viables para su posterior identificación molecular.

4.2 Identificación Molecular

Los primers universales (27F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') amplificaron el gen 16s ADNr para todas las cepas aisladas (Anexo 5). Los análisis bioinformáticos (BLAST) demostraron que las secuencias de ACT-1A con 97.76% y ACT-1B con 98.08% son homólogos para *Micromonospora* sp. Estos resultados proporcionaron información que las bacterias aisladas pertenecen al filo Actinobacterias, limitándose solo al género *Micromonospora* y *Paenibacillus* (87.47%) este último no pertenece a los actinomicetos. Los segmentos del genoma analizadas tienen el número de acceso en la base datos de GenBank (Tabla 8).

Tabla 8

Datos moleculares de las colonias aisladas

| Muestra | Longitud | Organismo | Fragmento | % de identidad | N° Accesoión NCBI |
|---------|----------|---------------------------|-----------|----------------|-------------------|
| CP1.A | 473 | <i>Micromonospora</i> sp. | 27F/1492R | 97.76 | KT803197.1 |
| CP1.B | 427 | <i>Micromonospora</i> sp. | 27F/1492R | 98.08 | KT803197.1 |
| CP1.C | 575 | <i>Paenibacillus</i> sp. | 27F/1492R | 87.47 | JX154321.1 |

4.3 Proceso de Fermentación bacteriana

4.3.1 Cinética de crecimiento bacteriano

Estos ensayos registraron la curva de crecimiento bacteriano de las cepas aisladas. En las cuales se identificaron tres fases de la cinética de crecimiento mediante la medición de la concentración de células y su variación en el tiempo se determinó: fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaria.

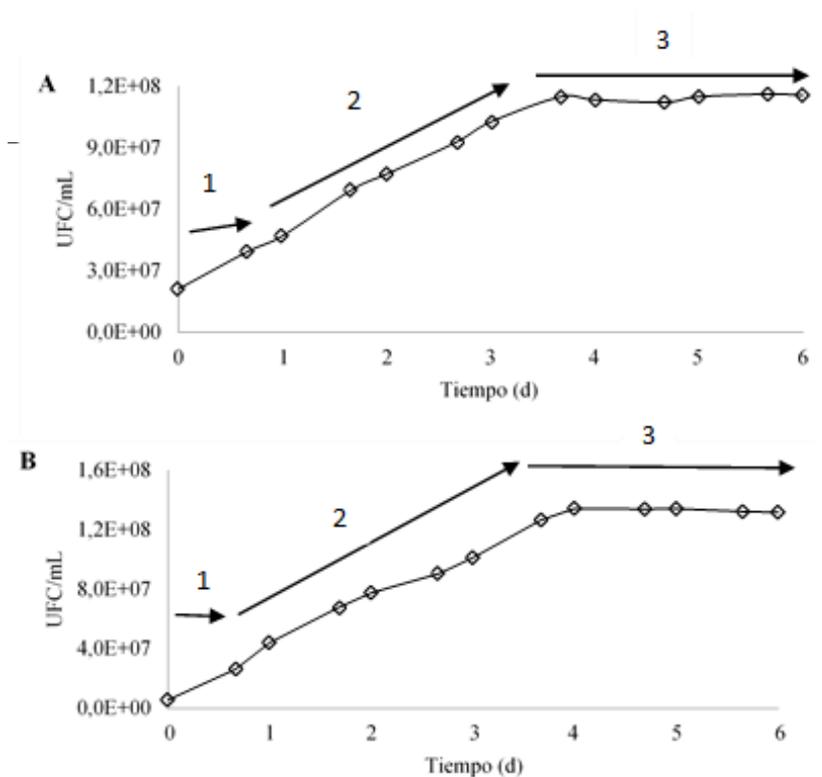


Figura 8. Curvas de crecimiento bacteriano medidas a 600 nm en espectrofotómetro y cámara neubauer. 1) Fase de latencia 2) Fase exponencial 3) Fase estacionaria. A, ACT-1A - *Micromonospora* sp. B, ACT-1B - *Micromonospora* sp.

Para la cepa ACT-1A la fase de latencia inició con 2.12×10^7 UFC/ml y terminó con 3.95×10^7 UFC/ml por otra parte la cepa ACT-1B mostró el inicio de la fase de latencia con 5.58×10^6 UFC/ml y su culminación con 2.63×10^7 UFC/ml, aproximadamente las primeras 12 horas. La fase exponencial para la cepa ACT-1A inició cuando la fase de latencia había concluido y culminó con un valor equivalente a 1.15×10^8 UFC/ml a las 72 horas con una tasa de crecimiento específico de 0.44 h^{-1} ($R^2 = 0.995$; $R = 0.000043$; $gl = 9$). Mientras que ACT-1B culminó esta etapa con una concentración de 1.34×10^8 UFC/ml a las 96 horas, tasa de crecimiento 0.65 h^{-1} ($R^2 = 0.9924$; $R = 0.01$; $gl = 9$). Cabe mencionar que el tiempo transcurrido para cada fase es diferente dependiendo de la cepa, la fase estacionaria se presentó pasadas las 72 y 96 horas para ACT-1A y ACT-1B, respectivamente, en esta etapa las bacterias mantienen la máxima concentración celular en el medio, y al finalizar entrarán en la fase de muerte (Figura 8).

Estos datos permitieron analizar el crecimiento de las cepas y determinar la etapa donde existe mayor cantidad de biomasa para la producción de aminoácidos. Visualizándose que la fase logarítmica (mayor concentración de células activas) se presentó a las 72 y 96 horas, etapa más importante del proceso de fermentación. Esto se puede verificar si se representa los resultados

correlacionado UFC/ml con absorbancia, donde se observa que a mayor absorbancia existe mayor concentración de células presentes en los licores fermentados (Anexo 7).

4.3.2 Cinética de consumo de sustrato y producción de aminoácidos

Los ensayos realizados reportan que las concentraciones máximas de aminoácidos totales fueron sintetizadas a partir de las diferentes de fuentes de carbono por cada cepa durante 96 horas, este es el tiempo necesario para alcanzar el máximo crecimiento celular y producción de aminoácidos (Brautaset y Ellingsen, 2011).

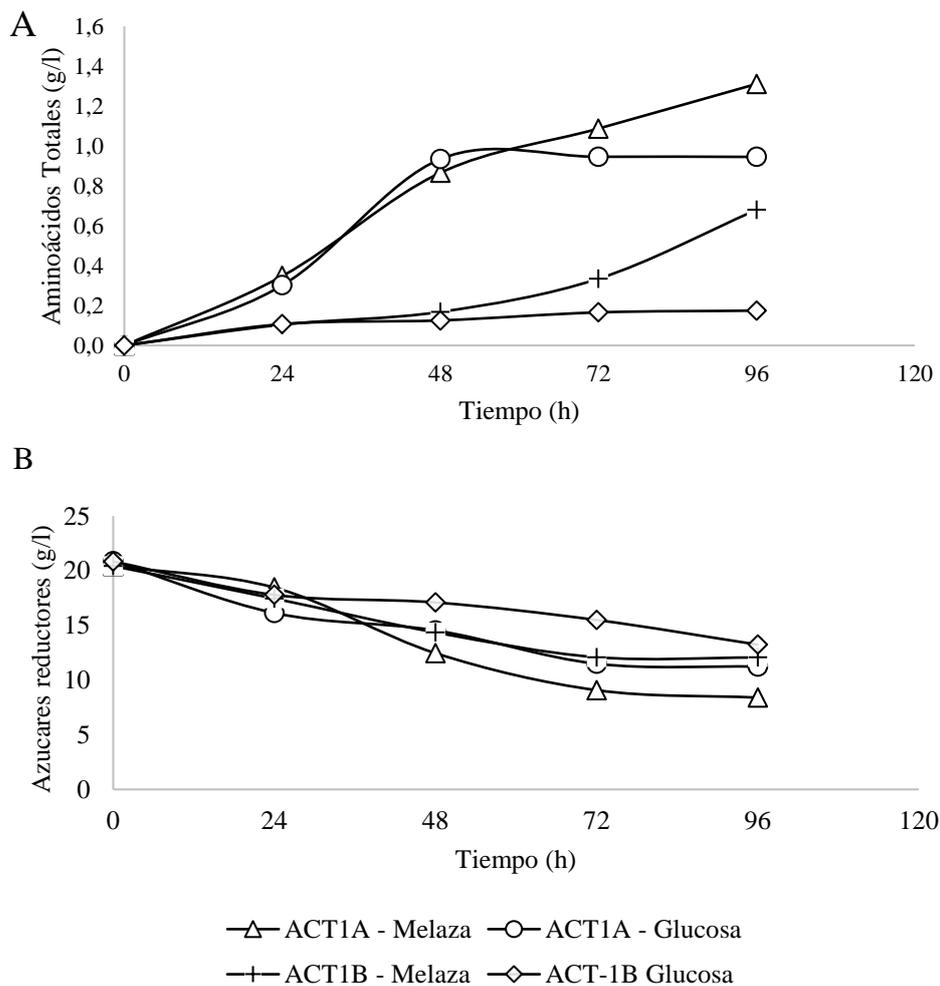


Figura 9. A. Producción de aminoácidos. B. Concentración de azúcares reductores. Los ensayos fueron evaluados utilizando dos fuentes de carbono (Melaza y Glucosa) en diferentes cepas bacterianas (ACT-1A y ACT-1B)

A medida a que aumenta la producción de aminoácidos, la concentración de azúcares en el medio se reduce. La máxima producción de aminoácidos se alcanzó a las 96 horas con ACT-1A utilizando como fuente de carbono la melaza de caña (1.31 g/l) mientras que con el control glucosa se obtuvo una menor producción (0.95 g/l). Por otra parte, la cepa ACT-1B resgistró valores menores con 0.68 y 0.17 g/l para melaza y glucosa respectivamente (figura 9.A). De igual forma, se pudo evidenciar que existe una disminución de la fuente de carbono para las dos cepas en los dos sustratos el mayor consumo de sustrato se presentó a las 96 horas. La cepa ACT-1A en el sustrato melaza registró una concentración de azúcares reductores en el medio de 8.39 g/l mientras que con glucosa el valor fue de 11.23 g/l. Se registraron para ACT-1B valores como 12.06 y 13.24 g/l para melaza y glucosa respectivamente (figura 9.B).

Para determinar la mejor cepa y fuente de carbono para la producción de aminoácidos totales, se realizó un ANOVA ($F= 184.56$; $gl= 1$; $P= 2.66 \times 10^{-7}$) y una prueba de Tuckey. Se determinó que entre los tratamientos existe una diferencia significativa y demostrando que la mejor cepa y fuente de carbono para la fermentación de aminoácidos es ACT-1A con melaza (1.87 ± 0.05 g/l) que se encuentra en el rango A. Para los demás tratamientos en orden de mayor a menor se obtuvo resultados como ACT-1A con glucosa (1.50 ± 0.04 g/l) rango B, ACT-1B con melaza (1.29 ± 0.01 g/l) rango C y ACT-1B con glucosa (0.45 ± 0.01 g/l) fue el tratamiento con menor producción ubicándose con el rango D (Figura 10).

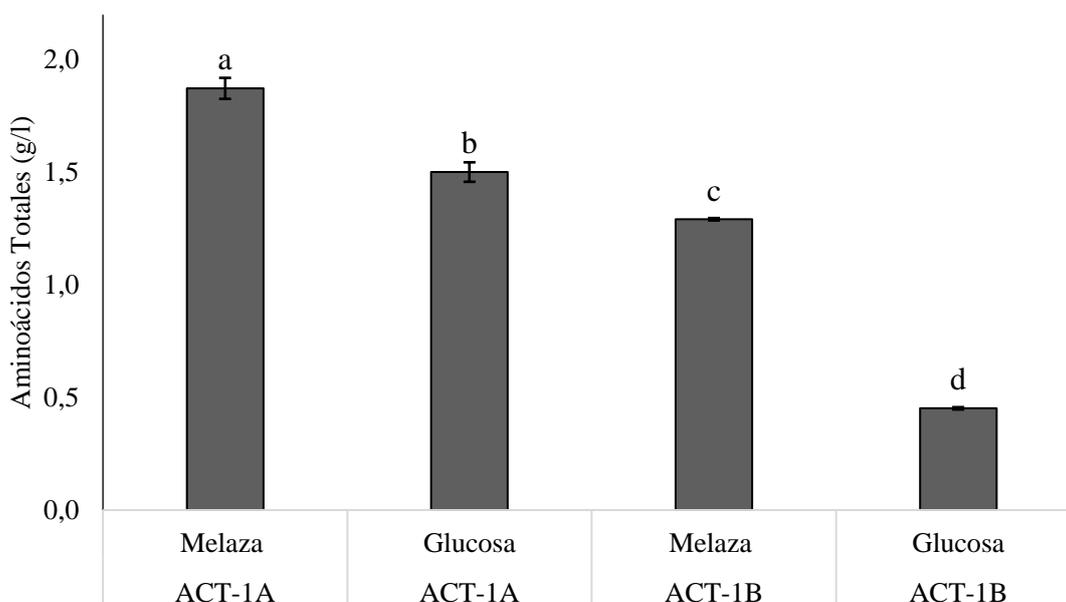


Figura 10. Diagrama de barra para la concentración de aminoácidos totales por cada cepa y fuente de carbono

4.4 Perfil aminoacídico mediante cromatografía de capa fina

En este ensayo se identificaron los aminoácidos libres que son sintetizados por las cepas calculados mediante las distancias recorridas de los aminoácidos en la fase móvil desde el punto de origen (Tabla 9).

Tabla 9
Perfil aminoacídico mediante cromatografía TLC

| Cepa / Puntos | Factor de resolución – Rf | | | |
|---------------|---------------------------|------------------|---------------|---------------|
| | Punto 1 | Punto 2 | Punto 3 | Punto 4 |
| ACT-1A | 0.32 ± 0.01 * | 0.44 ± 0.01 * | 0.55 ± 0.01 * | 0.72 ± 0.01 * |
| Aminoácido | Ácido glutámico | Prolina/tirosina | Metionina | Isoleucina |
| ACT-1B | 0.27 ± 0.01 * | 0.43 ± 0.01 * | 0.54 ± 0.01 * | 0.71 ± 0.01 * |
| Aminoácido | Serina/lisina | Prolina/tirosina | Metionina | Isoleucina |

*($\bar{X} \pm sd$) = promedio ± desviación estándar

Para determinar el perfil aminoacídico se utilizó únicamente los licores fermentados de la glucosa para evitar posibles falsos positivos provenientes de los licores fermentados de la melaza, ya que contiene un mínimo concentración de aminoácidos el cual puede interferir en la revelación de la placa. Al obtener esta información previamente, se puede evitar los falsos positivos producidos por la melaza e identificar los sintetizados en la fermentación. Los datos que tienen dos posibles aminoácidos son debido a que presenta valores (Rf) muy similares (Figura 11).

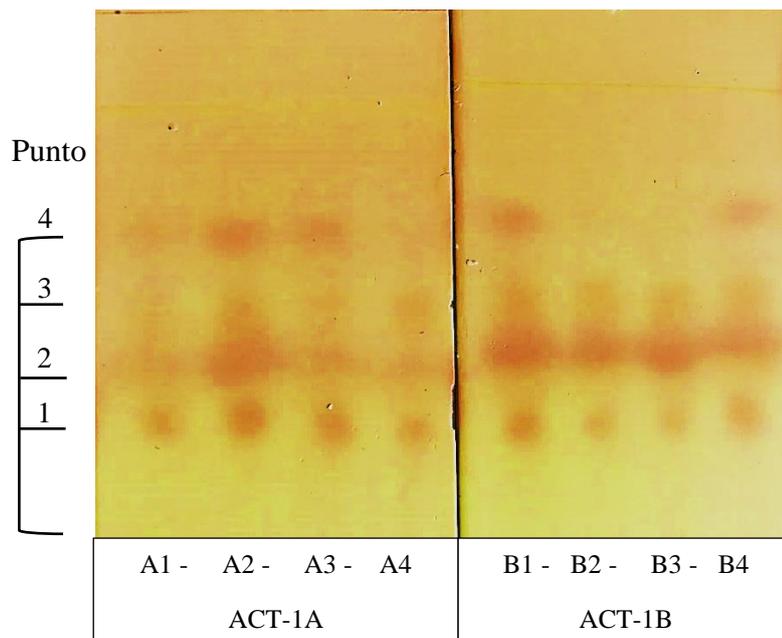


Figura 11. Cromatografía TCL de aminoácidos por cada cepa. A y B: número de repeticiones del ensayo

4.5 Escenario teórico para la producción de lisina

Esta propuesta busca establecer las pautas iniciales para la producción de aminoácidos en específico L- lisina a escala laboratorio desde su fermentación biológica y hasta purificación de la molécula objetivo. Se definirán los principales elementos como las cepas, fuentes de carbono y maquinaria necesaria para obtener un bioproceso. La biomolécula L-lisina ($C_6 H_{14} N_2 O_2$; MW 146.19) es uno de los aminoácidos esenciales, comerciales e importantes que se produce a gran escala por la industria de los aminoácidos, alrededor del 80% de la lisina en el mercado mundial se sintetiza por fermentación microbiana y el 20% restante por síntesis química. (Razak y Viswanath, 2015). De hecho, las empresas alimenticias se vieron beneficiadas en el consumo total de aminoácidos L-lisina, L-metionina, L-treonina y L-triptófano contribuyendo con la mayor parte (56%) del mercado total. Esto generó unas ganancias en el 2005 alrededor de USD 5,4 mil millones, aumentando cada año hasta alcanzar en el 2008 la cifra de USD 9,4 mil millones. (D'Este et al., 2018; Leuchtenberger et al., 2005).

La principal función de la lisina a nivel industrial es como potenciador de sabores y complementos dietéticos (Demain y Dana, 2007), utilizado mayormente por la industria ganadera como ingrediente que suministrar energía y como componentes básicos del cuerpo para el crecimiento de los animales (Sanchez y Demain, 2014). Los aminoácidos de uso alimentario pueden usarse para reemplazar la harina de soja en el alimento

convencional de maíz sin cambiar el equilibrio de aminoácidos de la alimentación. Además, son comercializados en el campo médico como fusiones que contenía aminoácidos altamente purificados (Open universiteit y Polytechnic, 1991), lociones o cremas enriquecidas con aminoácidos que mejora de manera eficiente el contenido de humedad de la piel por la parte cosmética (Yokota y Ikeda, 2017). La L-lisina es un aminoácido básico con una demanda de 2.4 millones de toneladas métricas en 2015 (J. H. Lee y Wendisch, 2017).

4.5.1 Cepas productoras de aminoácidos a nivel industrial

Para llevar esto acabo las industrias han utilizado las cepas microbianas como *Brevibacterium lactofermentum* *Brevibacterium flavum* (Ikeda, 2003) y *C. glutamicum* (Anastassiadis, 2008) durante los últimos 50 años para la producción a gran escala de L-lisina. Este aminoácido se produce mediante un proceso de fermentación aeróbica utilizando *C. glutamicum*, que es una bacteria corniforme Grampositiva y no patógena, de crecimiento rápido, no esporulante, Gram-positiva y no patógena (Kinoshita, Udaka, y Shimono, 1957; Lee, Na, Kim, Lee, y Kim, 2016). Además, la capacidad de *C. glutamicum* para producir otros aminoácidos, como L-treonina (Kase y Nakayama, 1974), L-metionina (Kumar y Gomes, 2005), L-serina (Eggeling, 2006), L-valina (Ruklisha, Paegle, y Denina, 2007), L-triptófano (Ikeda, 2006), L-fenilalanina y L-tirosina (Ikeda y Katsumata, 1992), L-leucina (Steinb, 2009) y L- isoleucina lo ha convertido en un organismo importante y las más utilizadas en biotecnología industrial (Tabla 10).

Tabla 10
Principales tipos de cepas utilizadas en la industria de la producción

| Cepa | Aminoácido | Referencia |
|--|-------------------|--|
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | | |
| MH20-22B/pJC23, AGM5, Lys-12 | L – lisina | Ikeda, 2003; Masato Ikeda, Ohnishi, Hayashi, y Mitsuhashi, 2006 |
| F172–8 | L–ácido glutámico | Aoki, Wada, Takesue, Tanaka, y Yokota, 2005 |
| KY9229 | L – triptófano | Ikeda, 2006; Ikeda y Katsumata, 1995 |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| BL21 (DE3) | L – lisina | Khamduang, Packdibamrung, Chutmanop, Chisti, y Srinophakun, 2009 |
| MG1655 derivative FUS4.11/pF81kan (W3110 derivative) | L– fenilalanina | Weiner, Albermann, Gottlieb, Sprenger, y Weuster-Botz, 2014 |
| FB-04/pSV03 (W3110 derivative) | L – triptófano | Zhao et al., 2011 |

4.5.2 Organismos financieros para emprendimientos tecnológicos en el Ecuador

La formación de una empresa no es fácil, puede existir la idea del proyecto y la predisposición pero sin financiamiento o capital inicial no es posible. Es importante encontrar entidades financieras que permitan desarrollar nuevos campos productivos, al ser nuevas industrias la necesidad de fuertes inversiones es primordial para su ejecución. La inversión de capital total estimada para la construcción de una planta que produzca 100000 toneladas métricas por año de L-lisina HCl en los EE. UU. Es de aproximadamente \$ 350 millones (Intratec, 2019). La inversión de capital incluye capital fijo total, capital de trabajo y requisitos de capital adicional. Las entidades financieras públicas y privadas del Ecuador, permiten prestamos que oscilan entre \$ 500 hasta 25 millones de dólares dirigidos par emprendedores y empresarios (Tabla 11).

Tabla 11

Tipos de créditos y principales entidades financieras

| Tipo de crédito | Entidad Financiera |
|--|---------------------------------------|
| Microcréditos \$ 500 a \$ 100 000 de dólares | Corporación Financiera Nacional (CFN) |
| | Fondo Nacional de Garantías (FNG) |
| | BanEcuador |
| | Banco del Pacifico |
| | Banco General Rumiñahui |
| | Banco Pichincha |
| PYMES \$ 50 000 a \$ 25 millones de dólares \$ 50 millones de dólares para grandes grupos económicos | Banco Procredit |
| | Corporación Financiera Nacional (CFN) |

Mora, (2018)

El gobierno ecuatoriano con la Alianza para el emprendimiento e innovación (AEI) que fomentan actividades, iniciativas, programas y proyectos que fortalecen el ecosistema de negocios en el país que facilitan el acceso a información de mercado, educación y formación, capital de riego, dialogo público y privado. AEI dispone de una red de inversionistas, conexiones internacionales, empresas públicas y privadas que enfocan en el desarrollo de siete áreas en la asesoría, marco regulatorio, talento humano, cultura y financiamiento. Para llevar acabo esto crearon un programa de fomento de capital emprendedor – capital destinado a emprendimientos innovadores (Tabla 12).

Tabla 12

Mecanismos de financiamiento gestionado por AEI

| Mecanismos de financiamiento | Entidades | Capital de inversión (\$ / Dólares) |
|---|--|---|
| Capital semilla \$ 20 000 – 250 000 | CRISFE Fundación | 20 000 (max) |
| | Ministerio de producción comercio exterior, inversiones y pesca | Idea/proyecto: 100 000 Puesto en marcha: 250 000 |
| | Secretaria de educación superior, ciencia, tecnología e innovación | Idea/proyecto: 50 000 Puesto en marcha: 125 000 |
| Inversionistas Ángel \$ 25 000 – 300 000 | Ángeles Ec – Red Ecuatoriana de inversionistas | 50 000 (promedio) |
| | Startups Ventures | 30 000 – 300 000 |
| Capital de riesgo \$ 20 000 – 2 000 000 | DRIVUM CAPITAL | 50 000 – 500 000 |
| | Humboldt – XPT Venture Fund | 250 000 – 1 500 000 |
| | Kruger Labs | 20 000 – 100 000 |

AEI, (2018)

Requisitos para el financiamiento formal

Para obtener un capital inicial el solicitante debe cumplir requisitos y es accesible para Personas naturales o jurídicas de cualquier sector de la economía, productores de bienes y/o servicios (micro o pequeño empresario). Además, las entidades requieren que la actividad empresarial este destinado a una de las áreas de la producción, comercio, servicios turismo o desarrollo tecnológico (Arcos, 2016).

- Pueden acceder las personas naturales o jurídicas que desarrollen actividades empresariales, ya sea productivas o de servicios, con la debida formalidad tributaria.
- Los clientes deberán presentar capacidad de pago suficiente para el cumplimiento de sus obligaciones y viabilidad en los negocios para los cuales requiere financiamiento.
- Calificar como microempresario, pequeño empresario, exportador u organización de pequeños empresarios y emprendedores elegibles, según el nivel de ventas netas anuales o exportaciones.
- Solicitar financiamiento en alguna de las instituciones financieras reguladas.

4.5.3 Manejo e importación de equipos y maquinaria para la bioproducción

Agencia nacional de regulación, control y vigilancia sanitaria (ARCSA) es la entidad pública en establecer el proceso para autorizarla importación de medicamentos,

productos biológicos, dispositivos médicos, reactivos bioquímicos y de diagnóstico que no hayan obtenido el correspondiente registro sanitario (Arcsa, 2016). Además, el ingreso de maquinaria y reactivos dentro de los límites del país debe cumplir las formalidades y obligaciones aduaneras dependiendo el régimen de importancia dictadas:

- Importación para el Consumo (Art. 147 COPCI)
- Admisión Temporal para Reexportación en el mismo estado (Art. 148 COPCI)
- Admisión Temporal para Perfeccionamiento Activo (Art. 149 COPCI)
- Reposición de Mercancías con Franquicia Arancelaria (Art. 150 COPCI)
- Transformación bajo control Aduanero (Art. 151 COPCI)
- Depósito Aduanero (Art. 152 COPCI)
- Reimportación en el mismo estado (Art. 153 COPCI)

Por parte de la ARCSA en el Art. 32.-Toda modificación en el proceso, equipos y/o sistemas críticos de apoyo, debe ser notificado presentando la documentación de respaldo; conforme el instructivo que la Agencia emita para el efecto. La certificación permite la una validación para todo el bioproceso, garantizarían de la calidad y buenas prácticas de manufactura que destacaría a la empresa. Esto permite adquirir maquinaria y materia prima que se usara en el proceso, en el Ecuador existe empresas que ofrecen el servicio de asesoramiento técnico, importación y comercialización (Tabla 13).

Tabla 13

Principales empresas importadoras de maquinaria industrial y productos químicos para todo sector productivo

| Tipo de prestación | Servicio | Empresa | URL |
|------------------------------|--|------------------|---|
| | Provee insumos, materia prima equipos y maquinaria industrial. | QSI ECUADOR S. A | https://www.qsi.ec |
| Maquinaria e infraestructura | Equipos para procesos de Alimentos, Farmacéutico, Productos de Consumo General, Limpieza comercial e industrial | REPRASER S.A. | http://www.repraser.com |
| | Sector de la infraestructura industrial como tanques atmosféricos y de presión de todo tamaño y capacidad, tuberías, redes de aire, vapor, gases | Indutorres | https://www.indutorres.com |

| | | | |
|--------------------|---|-------------------|---|
| Reactivos químicos | Importa y comercializa equipos, reactivos químicos y soporte técnico para tipo de industria | NOVACHE M | https://www.novachem.com.ec |
| | Comercialización de ácidos, detergentes biodegradables, insumos químicos para diversos sectores productivos | PROVEQUI MI C. A. | https://www.provequimca.com |

4.5.4 Organización de los recursos humanos para la empresa

Los perfiles profesionales que necesita una empresa biotecnológica son diversos (administrativo, producción técnica, logístico, comercial, investigación y desarrollo) para cumplir con un proceso eficiente, manejo de recursos y presupuestos, distribución del producto y los objetivos propuestos para la producción industrial (Tabla 14).

Tabla 14

Organización de la empresa por departamentos y sus respectivas funciones

| Departamento | Perfil profesional | Función |
|----------------------------|---|---|
| Administrativo | Contabilidad y auditoria | Análisis y control desviaciones, impuestos |
| | Finanzas | Gestión de costes, presupuestos |
| | Comercio | Relaciones con proveedores y consumidores |
| Producción | Biotecnología: Bioprocesos Industrial | Ejecución del proceso productivo Planificación del proceso |
| | Microbiología | Mantenimiento de los sistemas biológicos |
| | Sistemas computacionales | Automatización del proceso |
| | Gestión de la calidad | Control de calidad y objetivos |
| Almacén y logístico | Gestión de recursos y transporte del producto | Almacenamiento de la materia prima y productos |
| | Manejo empresarial | Gestión y control de inventario |
| Comercial | Marketing | Campañas publicitarias y promociones |
| | Relaciones publicas | Atención al cliente, servicios de post - venta |
| Investigación y Desarrollo | Biotecnología: Alimentos, biorremediación, fármacos | Identificas nuevas oportunidades e innovar en diversas áreas productivas. |

4.5.5 Mercado nacional para el consumo de L- lisina HCL

Todo emprendiendo necesita un mercado consumidor del producto, para el sector de la producción de aminoácidos es vital importancia que conocer al servicio o producto que va a ofrecer la empresa. Dependiendo de su grado de concentración y pureza del aminoácido (L-lisina) es adquirida y desarrollan productos a partir de eso (Tabla 15).

Tabla 15

Mercado nacional de las principales empresas que importan lisina para sus productos

| Campo de acción | Empresa | Producto o servicios | URL |
|---------------------------------|----------------------|--|---|
| Alimentación del ganado | Pronaca | El balance adecuado de energía, proteína, aminoácidos, vitaminas y minerales para lograr una producción altamente eficiente. | https://www.procampo.com.ec/ |
| | SIAP CIA. LTDA | Elaboración de premezclas vitamínico-minerales y demás aditivos para alimentación animal. | https://www.bioalimentar.com/ |
| | ALIFORTE | Comercialización de insumo para alimentos balanceados enfocada en diferentes campos: bovino, porcino, avícola. | https://www.aliforte.com.ec |
| Alimentación Acuícola, pesquera | Adilisa | Desarrollo, fabricación y comercialización de aditivos y alimentos pre-iniciadores para la industria animal. | https://www.adilisa.com/ |
| | VIMIN | Premezclas vitamínicas, sales minerales, núcleos y aditivos nutricionales | https://www.vimin.com.ec/ |
| Salud y belleza | BIOVEA | Fabricante, distribuidor productos de alta gama de salud y belleza como Colágeno, enzimas, hormonas y proteínas. | https://www.biovea.com/ec |
| Farmacéutico | Importadora Schiller | Suministrar materias primas farmacéuticas. Importan insumos de: USA, Europa, América Latina, India, China, Indonesia, etc. | https://schiller.com.ec/ |
| | Disan Ecuador, S.A. | Distribuidores y comercializadores de productos químicos y materias primas para todo tipo de industria | http://disanlatinoamerica.com |

En función a la información de la Asociación de Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales (AFABA), la demanda de alimento balanceado en el Ecuador es de 2.5 millones de toneladas métricas al año y su destino es la nutrición de los animales de la industria pecuaria y elaboración de productos procesados (Muñoz, 2017). Las ventas de

la industria sumaron un total de US \$ 1 173 857 al finalizar el 2016. Mientras por la parte de los suplementos nutritivos el Servicio Nacional de Aduanas (Senae) registro, que en enero a julio de 2017 se importaron \$ 7.2 millones de proteínas, mientras que en el mismo período de 2018 ascendió a \$ 7.8 millones (Senae, 2018).

4.5.6 Materiales y métodos del bioproceso

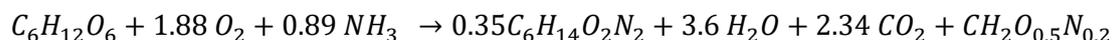
Un proceso de fermentación convencional para la producción de L-lisina HCl, se puede dividir en tres partes principales: preparación del sustrato, fermentación, recuperación del producto. Los medios de cultivo utilizados en las fases de fermentación por batch y fed-batch se preparan mezclando agua destilada, fuente de carbono (melaza de caña) y nutrientes esenciales para el metabolismo celular. En la fase de la fermentación, el inóculo de microorganismos se alimenta en los fermentadores, que se han llenado previamente con el sustrato. Después del agotamiento de la fuente de carbono, finaliza la fase y se inicia la fase de alimentación por fed-batch. Durante la fase de fed-batch, se suministran continuamente glucosa y nutrientes hasta que se alcanza la concentración de L-lisina deseada. Al final de la fermentación, el caldo se envía a un tanque intermedio para proporcionar un flujo continuo a los pasos posteriores del proceso.

El caldo de fermentación se envía a un sistema de ultrafiltración para la eliminación de restos celulares y otros sólidos en suspensión. Posteriormente, el licor de la ultrafiltración se alimenta a columnas de intercambio iónico, donde la L-lisina se adsorbe selectivamente. La L-lisina eluida de las columnas de intercambio iónico se mezcla con las aguas madres de la etapa de filtración del producto y se concentra por evaporación. La solución de lisina concentrada se acidifica con ácido clorhídrico y la L-lisina libre se convierte en L-lisina HCl. La solución de L-lisina HCl se envía luego al cristalizador y se filtra la sal de lisina. Las aguas madres se reciclan al evaporador y la torta húmeda se transporta a los secadores. Se obtiene L-lisina-HCl seco final (98,5% en peso) y se envía a una línea de envasado antes de ser almacenado en bolsas.

Reacción estequiométrica de formación de L - lisina

La reacción estequiométrica se produce a partir de la fuente de carbono que son todos los azúcares reducidos que constituyen la melaza (Ikeda, 2017; Leuchtenberger, 1996). La melaza de caña es un subproducto de la industria azucarera, que azúcares totales (sacarosa, glucosa, fructosa), coloides suspendidos, metales pesados, vitaminas y compuestos nitrogenados (Kotzamanidis, Roukas, y Skaracis, 2002). Es una materia

prima relativamente económica, disponible en el mercado y comúnmente utilizada para la producción de bioproductos por su compuesto nutricional y para minimizar los costos de producción (Ergun y Ferda, 2000). Esta reacción tiene un rendimiento del 85 – 90 % con respecto a la fuente de carbono:



Producción de L – lisina a partir de melaza de caña como fuente de carbono

Las fuentes de carbono utilizadas actualmente para la producción industrial de aminoácidos son principalmente azúcares, incluidas la melaza de caña, la melaza de remolacha y el jarabe de maíz (glucosa), debido a su costo y disponibilidad relativamente bajos. La melaza de caña de azúcar es una fuente rica en azúcares, proteínas, vitaminas y otros elementos minerales que ayuda al crecimiento celular y producción de aminoácidos. Entre uno de los compuestos más importantes de la melaza es la biotina (Paturau, 1989), que potencia la excreción de los aminoácidos que se sintetizan dentro de la bacteria, mejorando así la concentración de los aminoácidos libres (Reed, 2006). Además, la melaza posee una composición de diversos azúcares que le convierte un elemento fundamental para la producción de aminoácidos entre otras fuentes de carbono (Tabla 16).

Tabla 16
Contenido de azúcares en diferentes fuentes de carbono

| Contenido (% w/w) | Azúcar blanca | Jugo de remolacha espesa | Melaza de caña | Melaza de remolacha | Jarabe de maíz |
|-------------------|---------------|--------------------------|----------------|---------------------|----------------|
| Sucrosa | ≥ 99.5 | - | 35 | 48 | - |
| Dextrosa | | 22 | 6 | 0.4 | 52 |
| Fructuosa | | 20 | 8 | 0.6 | 42/55 |
| Azúcar invertido | 0.1 | 52 | 4 | 1 | - |

Poel, Schiweck, y Schwartz (2000); Takors et al., (2007)

En el país la principal fuente de materia prima de melaza de caña es suministrado por los ingenios azucareros como derivado del proceso de la elaboración del azúcar (Tabla 17). En los Ingenios azucareros se obtienen entre 29 y 41.6 Litros de melaza/Tn de caña (7.6 Gal. /Tn) dependiendo del ° Brix final de la melaza, en todo el Ecuador se produce alrededor de 31 680 000 galones (Gilces y Veloz, 2006). En el mercado actual, los precios de la melaza (50% de contenido total de azúcar) y la glucosa industrial son de aproximadamente \$ 0.1 kg⁻¹ y \$ 0.39 kg⁻¹, respectivamente (Xu et al., 2015).

Tabla 17

Principales ingenios azucares proveedores de melaza de caña del Ecuador

| Nombre del ingenio | Provincia |
|--------------------|-----------|
| San Carlos | Guayas |
| Valdez | Guayas |
| La Troncal | Cañar |
| Isabel María | Los Ríos |
| Monterrey | Loja |
| IANCEM | Imbabura |

Barrera y Pacheco, (2011); Gilces y Veloz, (2006)

Además de utilizar la fuente de carbono (melaza) en el proceso principal de la fermentación, los microorganismos necesitan otros tipos nutrientes para complementar la síntesis de L – lisina a partir de melaza de caña (Tabla 18).

Tabla 18

Índice de consumo de nutrientes para el bioproceso (fed – batch)

| Materia Prima | Consumo (Ton/año) |
|---|-------------------|
| Melaza de caña | 8.80 – 9.50 |
| Harina de soya | 0.60 - 0.65 |
| HCL – 35 % | 0.77 – 0.85 |
| NaOH | 355.33 |
| H ₂ PO ₄ – 98 % | 1.80 – 2.10 |
| Agua amoniacal – 25% | 1.00 – 1.10 |
| Antiespumante | 0.02 |
| Sales | |
| Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄ | 18.31 |
| Sulfato de magnesio MgSO ₄ | 9.16 |
| Sulfato de manganeso MnSO ₄ | 0.09 |

Ditzel y Pacheco, (2015); Pérez et al., (2015)

Equipos del bioproceso

El equipamiento principal para ejecutar todo el bioproceso desde el upstream, fermentación y purificación del aminoácido (L- lisina) esta detallado en la tabla (Tabla 19). La oferta de equipos, maquinaria y reactivos puede realizarse a través de una gran variedad de distribuidores mayoristas o mediante agentes que ofrecen soporte técnico y mantenimiento. En la parte tecnológica la industria debe contar con plantas de procesamiento equipadas y con tecnología permita el procesamiento de grandes volúmenes de materia prima, como:

Tabla 19

Equipos principales del bioproceso

| Equipo | Función |
|--------------------------------|--|
| Cultivador | Propagación de células – Inóculo inicial |
| Pre – fermentador | Propagación de células – Inóculo secundario |
| Fermentador industrial | Biosíntesis de L- lisina |
| Tanque agitador 1 | Preparación de medios de cultivo |
| Tanque agitador 2 | Pretratamiento de la melaza de caña |
| Tanque agitador 3 | Recipiente del caldo fermentativo |
| Centrifugación de discos | Separación de biomasa – licor fermentado |
| Tanque Acidificación | Acidificación del medio H ₂ SO ₄ |
| Columnas de intercambio iónico | Filtración de la lisina del licor fermentativo |
| Evaporadores | Concentración lisina |
| Tanque agitador 5 | Acidificación del medio HCL |
| Cristalizador | Formar cristales L-lisina HCL |
| Secador de lecho fluido | Secado de los cristales |

Ditzel & Pacheco, (2015); Pérez et al., (2015)

Inóculo inicial de biomasa

La primera fase de la producción se comienza a nivel de laboratorio con pre-inóculos 50, 250, 500 y 1000 ml (cultivador de células) hasta obtener volúmenes necesarios de biomasa, con una agitación (250 – 300 rpm) (Johnston y Nghiem, 2018). En la primera fase se escala 1 a 5 m³, en el segundo de 10 a 50 m³, proporcionando temperatura (30 °C), pH (7.0 – 7.2), suministro de CO₂ idóneo para el crecimiento exponencial del microorganismo hasta obtener una concentración de biomasa 0.1 g/l. En el pre-fermentador, se cultivan bajo condiciones aerobias y agitación, con una velocidad de agitación cambiante durante la fermentación entre 600 (a 0 h) y 900 rpm (a las 19 h) durante 26 – 28 horas (Anastassiadis, 2008; US5268293, 1993). Normalmente se usa un nivel de inóculo de 5-10% (v / v), cuanto más grande es el inóculo, más corta es la fase de latencia y más rápida es la fase de exponencial (Open universiteit y Polytechnic, 1991). El sustrato usado contiene todos los nutrientes para la división celular permite una sobre producción de biomasa para su posterior uso en la síntesis de aminoácidos (L – lisina) (Figura 12).

Producción de L – lisina mediante fermentación biológica

En el fermentador industrial, se realiza la reacción principal de la fermentación y que está compuesto principalmente del sustrato y biomasa activa que usualmente se procesa volúmenes de 50 a 750 m³ (Leuchtenberger, 1996; Leuchtenberger y Huthmacher, 2009). Como fuente de nitrógeno se utiliza el nitrógeno amoniacal (46 g/l)

y una concentración limitante de biotina (2.5 - 3.5 $\mu\text{g/l}$) para excreción celular del aminoácido acumulándose en el caldo fermentativo durante 72 h, 30 – 35 °C y ajustado pH 7.0 – 7.2 (control del pH con amoníaco) (Félix et al., 2019). Además exigen agitación mecánica con tasa de transferencia de oxígeno (OTR) de 200 mmol / L-h (Eggeling y Bott, 2005), operan a una velocidad de aireación de 0.85 a 0.62 volumen de aire en condiciones estándar por volumen de líquido por minuto (VVM) de aire atmosférico (Benz, 2008) (Figura 12).

Por otro lado, cuando se utiliza un gran fermentador (capacidad de 40.000 L o más), como en el caso de la fermentación de aminoácidos, cada pieza del equipo se esteriliza por separado con vapor y se enfría con aire estéril, y las materias primas que no sean azúcar son preparado en un tanque agitador 1. El azúcar se esteriliza por separado y se envía al fermentador con otros nutrientes (Ugimoto, 2010). Así, los sistemas de esterilización continua se han integrado en la configuración clásica del fermentador para garantizar una condición aséptica durante todas las etapas del proceso (Junker, Lester, Brix, Wong, y Nuechterlein, 2006).

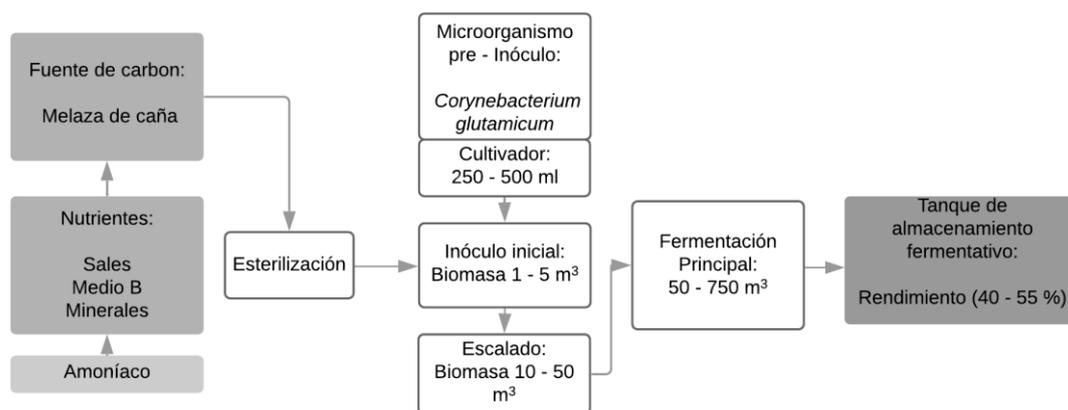


Figura 12. Diagrama de flujo para la producción de lisina (Upstream y Fermentación) (Tosaka, Enei, y Hirose, 1983)

El microorganismo (*C. glutamicum*) puede tolerar un suministro limitado de oxígeno u otras variables, pero para la producción de L-lisina es ventajoso evitar cualquier limitación de oxígeno porque el organismo reacciona con una mayor formación de subproductos, disminuyendo la pureza y la conversión del aminoácido objetivo (L – lisina) (Ensari y Lim, 2003). Además, el proceso generalmente no se ve afectado siempre que los contaminantes (Hongos, levaduras o bacterias) no excedan el 0.1% de los organismos de producción (*C. glutamicum*) (Lothar Eggeling y Bott, 2005). El proceso

fermentativo se termina cuando se alcanza el máximo volumen del tanque de almacenamiento fermentativo (50 a 750 m³), el recipiente no se vacía por completo queda un volumen apropiado (10 a 20%) en el reactor como inóculo para el siguiente ciclo.

Purificación de L - lisina

Al terminar la fase de fermentación, el siguiente paso es el aislamiento del metabolito de interés (L – lisina). En primer lugar se separa por centrifugación para separar la biomasa del licor fermentado. Este sobrenadante se cambia su pH (7 ± 1) mediante ácido sulfúrico (98%) (Hohmann et al., 2018). Este paso es requerido para la filtración mediante cromatografía de intercambio iónico, a través de columnas con resinas catiónicas que tiene como función adsorber L-lisina del licor fermentado (Hungming et al., 2003). La resina más lisina son separadas con soluciones amoniacaes y NaOH (Lee, Lee, Namgoong, y Lee, 2002). El eluato de la reacción que contiene lisina es enviado hacia un evaporador de calentamiento por placas al vacío.

La concentración de salida es de 50 – 55 % y nuevamente es acidificada con ácido clorhídrico (35 %) y así finalmente se obtiene clorhidrato de lisina, el cual se cristaliza mediante agitación y enfriamiento en cristalizadores verticales (15 – 25 °C) produciendo Lisina – HCL (Kobayashi, Itoyama, Mitani, y Usul, 2007). El licor residual obtenido de cada fase del proceso se recircula en la etapa de evaporación y cristalización para obtener el mayor rendimiento, se recupera aproximadamente un valor 1.5 % del producto. Los cristales se secan y se elimina la humedad residual obteniendo un producto purificado al 98%, con un rendimiento final del todo proceso de aislamiento del aminoácido 90 % (Figura 13).

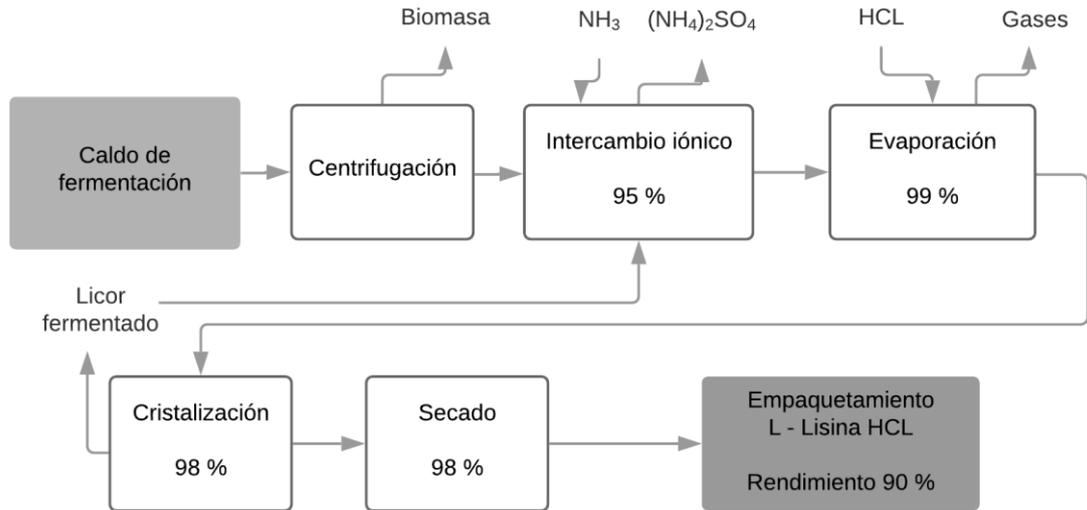


Figura 13. Esquema del proceso para la purificación de L-lisina HCL y su porcentaje de recuperación de cada etapa

4.5.7 Resultados de la producción y distribución del producto L- lisina HCL

En la producción de lisina se ha realizado en diferentes métodos de fermentación pero la más utilizadas son dos batch y fed – batch. Como lo explica Kawahara, Yoshihara, Ikeda, Yoshii, y Hirose, (1990) han demostrado una conversión del 35 - 55% con 2 g/ l h es factible en una fermentación batch que comienza con 160 g/l de glucosa, sintetizando 105 g/l L-lisina en un tiempo total de 30 h. Por otro lado, fermentaciones de tipo fed-batch, se han informado conversiones de 38 – 41 % con concentraciones de L-lisina de 650 hasta 900 mmol/ l (175.5 g/l) con una productividad máxima de 3.9 g/ l h, en un tiempo total de 20 horas (Shiratsuchi et al., 1995) (Figura 14).

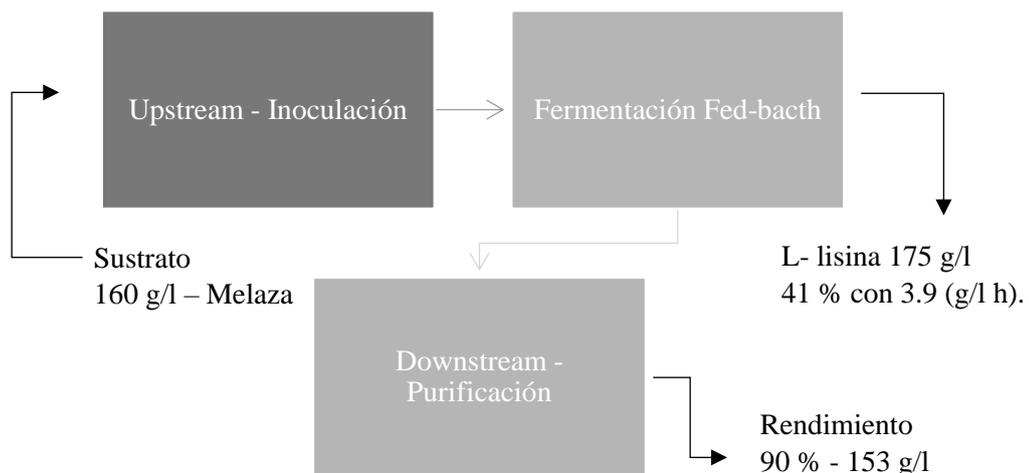


Figura 14. Diagrama general del proceso de fermentación fed - batch y sus rendimientos

La concentración de producto final obtenido de la fermentación batch es usualmente menor que la de los procesos semi-alimentados, aumentando así el costo del

procesamiento de la purificación, con un rendimiento final del todo proceso de aislamiento del aminoácido 90 % (Verbelen, De Schutter, Delvaux, Verstrepen, y Delvaux, 2006). El rendimiento general del proceso en el azúcar fermentable (que combina el rendimiento de fermentación y el rendimiento aguas abajo de los diferentes procesos) de los procesos de fabricación actuales puede variar entre 36% y 52% (Eggeling y Bott, 2005).

L-lisina tiene una serie de aplicaciones en las industrias de alimentos, farmacéutica, molienda de piensos y cosméticos, y su precio en el 2015 es de aproximadamente US \$ 3-4 kg⁻¹ (Razak y Viswanath, 2015). Además, debido a que *C. glutamium* se clasifica como GRAS (generalmente recomendado como seguro), el organismo en sí mismo es adecuado como aditivo para alimentos y agrega un valor adicional a la formulación del alimento (Lothar Eggeling y Bott, 2005). Los licores fermentados descargados no solo tienen una alta demanda biológica de oxígeno, sino también una gran cantidad de factores que promueven el crecimiento de las plantas y, por lo tanto, pueden usarse como fertilizantes. En Kyowa Hakko Kogyo Co., los fertilizantes compuestos orgánicos se fabrican utilizando eficazmente las aguas madres de la fermentación de aminoácidos para reciclar recursos y proteger el medio ambiente (Faurie y Thommel, 2002), ingresos extras para recuperar el capital invertido en todo el proceso.

La creciente demanda de L-lisina favorece el dominio de algunas empresas y también aumenta la presión para aumentar la eficiencia de la producción. Esto se relaciona tanto con la eficiencia de rendimiento (L-lisina por glucosa) como con la productividad (L-lisina por tiempo de proceso). La L-lisina se fabrica en plantas de producción donde normalmente se opera una serie de biorreactores de aproximadamente 500 m³ de tamaño. Se puede calcular fácilmente que a un precio de 3 USD kg⁻¹, una compañía que produce 300 000 toneladas por año, solo un aumento del 1% es igual a 9 millones de dólares extra de USD (Lothar Eggeling y Bott, 2015).

Presentación del producto L-lisina HCL y principales canales de distribución

El escenario más común es llegar con el producto a las empresas fabricantes de mezclas vitamínico - minerales para la alimentación del ganado como lo hace la empresa Ajinomoto Heartland, Inc. comercializa de L- lisina HCL de grado alimenticio (98.5%). Pero de igual forma hay alcance a distribuidores mayoristas y clientes finales mediante la presentación en sacos, generalmente de 25 a 1000 kg, mismos que se distribuyen en

camiones de carga pesada (Ajinomoto Heartland, 2011). Actualmente, el desarrollo para satisfacer diversos requisitos ha dado como resultado la comercialización de diferentes formas de productos a precios más bajos. Estos incluyen concentrados líquidos y sólidos granulados con diferentes concentraciones de lisina. Un ejemplo de un producto líquido es Liquid Lysine 60 (grado alimenticio) de Ajinomoto Co., Inc., que contiene lisina libre y clorhidrato de lisina a una concentración del 60% (Lothar Eggeling y Bott, 2005). Un ejemplo de un producto granulado es Soldas Biolys de Evonik Industries. Este producto se extrae directamente del caldo fermentado por evaporación y granulación sin la eliminación de la masa celular y, por lo tanto, contiene coproductos como otros aminoácidos y proteínas (más del 54,6% de pureza como una sal de sulfato) (Ikeda, 2016).

Beneficiarios directos e indirectos de la producción de L-lisina

La Lisina es el primer aminoácido limitante en dietas de maíz y pasta de soya para cerdos y el segundo aminoácido limitante después de Metionina en aves de producción. Con la comercialización L-Lisina, los nutricionistas tienen una mayor flexibilidad en el empleo de ingredientes alimenticios no tradicionales, que les permiten mejorar la rentabilidad sin la pérdida de la calidad del alimento. Como resultado, el requerimiento de lisina en los animales puede ser satisfecho de manera costo-efectiva al reducir la proporción de ingredientes costosos y de alto valor proteico. presentaría un ahorro arancelario por parte del consumidor al evitar la importación de L – lisina HCL de los principales países exportadores (USA, India, Japón). Además, indirectamente personal perteneciente a la línea de producción, administrativo y proveedores de materia prima – maquinaria, ya que se intercambiaría activos.

4.5.8 Marco legal y normativo para productos biotecnológicos en el Ecuador

La biotecnología en el país ha sido apoyada por los últimos gobiernos como herramienta substancial para el cambio de la matriz productiva. Por lo cual implementaron normativa necesaria para fortalecer y promover la investigación y desarrollo para las diferentes aéreas como la industrial, salud, agrícola y extracción de recursos naturales. Así mismo, establecieron fuertes limitantes para el manejo de Organismos genéticamente modificados (OGMs) como está escrito en la constitución (Constituyente, 2008).

Art.15. Uso de Tecnologías limpias y no contaminantes. - “El Estado promoverá, en el 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 de agua.

Art. 281.- Regular bajo normas de bioseguridad el uso y desarrollo de biotecnología, así como su experimentación, uso y comercialización.

Art. 401.- Se declara al Ecuador libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y sólo en caso de interés nacional debidamente fundamentado por la Presidencia de la República y aprobado por la Asamblea Nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados. El Estado regulará bajo estrictas normas de bioseguridad, el uso y el desarrollo de la biotecnología moderna y sus productos, así como su experimentación, uso y comercialización. Se prohíbe la aplicación de biotecnologías riesgosas o experimentales.

Según las leyes de la Constitución Política del Ecuador en el Registro Oficial N° 449 (2008), capítulo sexto sección primera nos habla acerca de fomentar nuevas áreas productivas trabajo y producción en los siguientes artículos. 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. El Estado promoverá las formas de producción que aseguren el buen vivir de la población y desincentivará aquellas que atenten contra sus derechos o los de la naturaleza; alentará la producción que satisfaga la demanda interna y garantice una activa participación del Ecuador en el contexto internacional.

Art. 320.-En las diversas formas de organización de los procesos de producción se estimulará una gestión participativa, transparente y eficiente. La producción, en cualquiera de sus formas, se sujetará a principios y normas de calidad, sostenibilidad, productividad sistémica, valoración del trabajo y eficiencia económica y social.

Manejo del impacto ambiental y gestión de los recursos microbiológicos

El Ministerio de Medio Ambiente actualmente está formulando un proyecto para la promoción de la biodiversidad que intenta vincular la conservación con el uso sostenible de los recursos genéticos, tomando como base las experiencias generadas por otros proyectos de bioprospección (Wendt y Izquierdo, 2002). Conjunto con el Instituto nacional de biodiversidad (INABIO), organismo público de investigación, entidad adscrita al Ministerio del Ambiente con personalidad jurídica de derecho público, con

independencia funcional, administrativa, financiera y presupuestaria, con jurisdicción nacional creada mediante Decreto Ejecutivo No. 245 (Presidencia de la República, 2014), delimita su accionar sobre la biodiversidad nacional conforme lo establecido en 4 normas jurídicas:

- Constitución de la República del Ecuador (CRE)
- Código Orgánico del Ambiente (COA)
- Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos y Creatividad (COES)
- Reglamento al Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos y Creatividad (RCOES).

La biotecnología en la legislación ecuatoriana y tratados internacionales, tienen una prioridad en los temas del manejo ambiental y de biodiversidad. En la normativa destaca lineamientos sobre la importancia de plantear la biotecnología y su relación con el medio ambiente, su correcto manejo de los recursos biológicos y genéticos. Con respecto a la conservación de la fauna y flora de los ecosistemas ecuatorianos se ha regulado lo concerniente a organismos genéticamente modificados, mediante normas de bioseguridad, propagación, experimentación, uso, comercialización e importación. Intentado evitar cualquier liberación de las cepas modificadas, el ejecutivo ecuatoriano se ha manifestado a base de la evaluación de riesgos y en atención al principio de precaución, la prohibición del uso industrial y así limitando de gran manera el campo de la biotecnología.

La dificultad de la implementación del campo de la biotecnología aplicada queda por sentada por el estado y la población por preservar la biodiversidad. La falta de políticas que regule y se adapte a nuevas herramientas de desarrollo económico que es la biotecnología e impulsar la inversión pública y privada saber aprovechar la riqueza de la fauna y flora del Ecuador. Además, las repercusiones sociales se destacan que los avances científicos generan una ambigüedad de pensamientos sobre que es la biotecnología y su potencial. El desconocimiento de esta área trae consigo un impacto en la economía, y, al parecer se daría una mayor brecha entre los países del tercer mundo y los desarrollados.

Código Orgánico del Ambiente (COA, 2017)

Se fomentará la investigación, la educación y la difusión de información científica sobre la biotecnología moderna, sus productos y la gestión de la bioseguridad.

Art. 5.- Derecho de la población a vivir en un ambiente sano. El derecho a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado comprende: El uso, experimentación y el desarrollo de la biotecnología y la comercialización de sus productos, bajo estrictas normas de bioseguridad, con sujeción a las prohibiciones establecidas en la Constitución y demás normativa vigente

Art. 64.- Conservación y manejo *ex situ*. La conservación *ex situ* procurará la protección, conservación, aprovechamiento sostenible y supervivencia de las especies de la vida silvestre, a fin de potenciar las oportunidades para la educación ambiental, la investigación y desarrollo científico, desarrollo biotecnología) y comercial de los componentes de la biodiversidad y sus productos sintetizados.

Art. 75.- De la bioseguridad. Las normas de bioseguridad regularán los productos de la biotecnología moderna, con el objeto de contribuir a la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad y de garantizar los derechos a la salud humana y al ambiente.

Art. 77.- Evaluación del riesgo. La evaluación del riesgo a los productos de la biotecnología moderna se realizará con base en procedimientos científicos sólidos y en principios ambientales reconocidos en la Constitución y en este Código, así como en los instrumentos internacionales aplicables

Además, los numerales 2 y 3 del artículo 397 de la Constitución de la República del Ecuador, manifiesta que es un compromiso del Estado, mediante Instructivo para el registro de sustancias químicas peligrosas establecerá los mecanismos eficaces de prevención y control de la contaminación ambiental; así como también, regular la importación, producción, uso, distribución y disposición final de materiales tóxicos y peligrosos para la salud de las personas y el ambiente (Ministerio del Ambiente, 2015).

Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos y Creatividad (COES, 2017)

Art. 19.- Se fijará obligatoriamente un porcentaje para el financiamiento no reembolsable para investigaciones en bioconocimiento que garanticen los derechos de la naturaleza, un ambiente sano y sustentable, en las áreas tales como bio energía, agroecología, bio fármacos, biosimilares, estudios de bioequivalencia, entre otros.

Art. 66.- El ente encargado de la regulación y control sanitario en coordinación con el ente rector del Sistema Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación y las entidades de investigación, establecerán un proceso específico para la concesión del registro sanitario de biofármacos y bio similares.

Reglamento al Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos y Creatividad (RCOES - Asamblea Nacional, 2016)

Art. 3.- Fomentar la protección de la biodiversidad como patrimonio del Estado, a través de las reglas que garanticen su aprovechamiento soberano, sustentable, y evitar la apropiación indebida de la biodiversidad y los conocimientos tradicionales asociados a esta

Art. 4.- La biodiversidad y el patrimonio genético son propiedad inalienable, imprescriptible e inembargable del Estado; no pueden ser privatizado y, su acceso, uso y aprovechamiento se realizará de forma estratégica procurando la generación de los conocimientos endógenos y el desarrollo tecnológico nacional

El Estado impulsará de manera prioritaria las actividades de investigación y desarrollo tecnológico en sectores económicos denominados como industrias básicas.

Art. 93.- Conocimientos generados a partir de la biodiversidad. - El Estado participará en la titularidad de las modalidades de propiedad intelectual y otros derechos que recaigan sobre procedimientos y productos derivados o sintetizados obtenidos a partir de la biodiversidad, de conformidad con lo establecido en la Constitución

Ley orgánica de la salud y su implementación para la producción biotecnológica

Toda actividad laboral, productiva, industrial, comercial deben cumplir con lo establecido en las respectivas normas y reglamentos sobre la prevención y control, para evitar así la contaminación que afecte a la salud humana, animal y vegetal (Asamblea Nacional, 2015). Esto se aplica a los alimentos genéticamente modificados son aquellos que contienen o están compuestos por organismos genéticamente modificados o han sido producidos a partir de ellos (Bejarano, 2014).

Art. 149.- “El desarrollo, tratamiento, elaboración, producción, aplicación, manipulación, uso, alimentación, transporte, distribución, importación, comercialización, y expendio de

alimentos para consumo humano que sean o contengan productos genéticamente modificados, se realizara cuando se demuestre ante la autoridad competente, mediante estudios técnicos y científicamente avanzados, su inocuidad y seguridad para los consumidores y el medio ambiente”

Art. 151.- Los envases de los productos que contengan alimentos genéticamente modificados, sean nacionales o importados, deben incluir obligatoriamente, en forma visible y comprensible en sus etiquetas, el señalamiento de esta condición, además de los otros requisitos que establezca la autoridad sanitaria nacional, de conformidad con la ley y las normas reglamentarias que dicten para el efecto.

Reglamento de seguridad y salud de los trabajadores y mejoramiento del medio ambiente de trabajo (Comité interinstitucional de seguridad e higiene del trabajo, 2013)

Los riesgos existentes en la industria están vinculados a los accidentes internos propios de la actividad del trabajador en lo manual u operativo, por esta razón se requiere otorgar vestimenta, calzado, casco de seguridad, mascarillas, guantes, arnés y otros elementos, a de más de las herramientas apropiadas y certificadas mismas que brinden la protección necesaria para el trabajo diario. Adicionalmente este tipo de riesgos requieren de una constante capacitación para concientizar a los colaboradores del peligro existente.

En aquellos trabajos en que se manipulen microorganismos o sustancias de origen animal o vegetal susceptibles de transmitir enfermedades infectocontagiosas, se aplicarán medidas de higiene personal y desinfección de los puestos de trabajo, dotándose al personal de los medios de protección necesarios

En el Art. 66.- Los riegos 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. Respecto a la provisión de suero antiofídico, se aplicará lo dispuesto en el Art. 424 (435) del Código del Trabajo.

Art. 67.- La eliminación de desechos sólidos, líquidos o gaseosos se efectuará con estricto cumplimiento de lo dispuesto en la legislación sobre contaminación del medio ambiente.

Reglamento general a la ley del sistema ecuatoriano de la calidad

Esta actividad es parte de la gestión de la calidad, es encargada de cumplir un conjunto de tareas planificadas y sistemáticas garantizando que los requisitos de calidad del producto sean satisfechos. Las herramientas más conocidas y aplicadas son: Buenas Prácticas de Manufactura BPM, Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control HACCP, Normas ISO 22000 y ARCSA auditora para obtener la Certificación. (Muñoz, 2017).

Art. 19.- Eventualmente, cuando el caso así lo amerite, podrán participar expertos técnicos externos, profesionales especializados en áreas afines como: microbiología, biotecnología, biología, oncología/citostáticos, gestión ambiental, sistemas de aire, ingeniería nuclear, entre otros

Artículo 1.- El presente Reglamento General contiene la normativa para una adecuada aplicación de la Ley del Sistema Ecuatoriano de la Calidad, con el objeto de viabilizar y facilitar la investigación y aplicación de las normas y reglamentos técnicos, metrología, acreditación y evaluación de la conformidad 15 que promueven y protegen la calidad de bienes y servicios, en busca de la eficiencia, el mejoramiento de la competitividad; el incremento de la productividad; y, el bienestar de los consumidores y usuarios.

Artículo 19.- El Ministerio de Industrias y Productividad (MIPRO), como organismo rector del Sistema Ecuatoriano de la Calidad, es competente para implementar el control, la investigación ejecutar políticas y disposiciones relacionadas con las actividades vinculadas con la evaluación de la conformidad, la seguridad, la protección de la vida, la preservación del medio ambiente, la salud humana, animal y vegetal en favor de los consumidores y usuarios, en el mercado nacional. (Reglamento general a la Ley del Sistema Ecuatoriano de la Calidad N° 154, 2014, págs. 50-57).

Para el cumplimiento de los objetivos establecidos en la Ley del Sistema Ecuatoriano de la Calidad, el MIPRO, a través de su Subsecretaría de la Calidad, ejecutará las políticas, cumplir y hacer cumplir las disposiciones 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, 2016, págs. 22-25)

Planifica, organiza, dirige, controla y evalúa los parámetros de la calidad, inocuidad y seguridad de los productos y servicios que se comercializan en el país, a través del desarrollo de documentos normativos necesarios acorde con el avance tecnológico, de tal forma que estos documentos se constituyan en el punto de referencia técnico-legal que garantice orden en las actividades a desarrollarse.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas

La reserva Sabia Esperanza, es un bosque nublado que posee gran cobertura vegetal, temperatura del suelo (11.6°C), pH (5.30 – 6.00) y humedad idónea para el aislamiento de actinomicetos. Esto se asemeja a la investigación por Thawai et al., (2005) donde registró un pH del suelo entre 3.39 – 6.37 rango preferente para estos microorganismos. En específico el sitio en donde se encontró mayor número de biodiversidad microbiana (actinomicetos), fue en zonas de descomposición orgánica (Qiu, Ruan, y Huang, 2008) y rizosferas de los árboles. Estas afirmaciones concuerda con Merzaeva y Shirokikh (2006) que las cepas del filo *Actinobacteria* pueden crecer en comunidades microbianas en el suelo, formando complejos con la rizosfera. En donde cumplen asociaciones íntimas con plantas por la fijación de nitrógeno. Además, están ampliamente distribuidos dentro de los diferentes biomas como: sedimentos marinos (Maldonado, Fragoso-Yáñez, Pérez-García, Rosellón-Druker, y Quintana, 2009), bosques de pantanos (Thawai et al., 2005) y praderas de llanuras (Zenova y Zvyagintsev, 2002).

Los dos microorganismos, ACT-1A y ACT-1B aislados de la reserva, pertenecen al género *Micromonospora*, al filo *Actinobacteria* por presentar todas las características morfológicas. Schmidt y Swafford, (2014) menciona en su investigación que estas especies poseen micelios que se incrustan en la placa de agar, compuestos extracelulares como geosmina, presentarse en forma arenosa y en diferentes colores de pigmentos miceliales entre naranja, rojo o marrón (Parte et al., 2012; Vobis, 2006). Además, otras investigaciones afirman que las cepas de *Micromonospora* se encuentran dentro del grupo Grampositivas, aeróbicas, mesofílicas que producen esporas (Hirsch y Valdés, 2010; Thawai, Kanchanasin, Ohkuma, Kudo, y Tanasupawat, 2018). Este tipo de esporas se desarrollan de forma lateral y como lo explica Vobis (2006), presentando hifas septadas ramificadas con un diámetro 0.25 – 0.6 µm.

En la identificación molecular, la secuenciación del gen 16S rRNA y los análisis filogenéticos para las 2 cepas (ACT-1A y ACT-1B), confirmaron que pertenecen al género *Micromonospora* descritas anteriormente, pero estas secuencias genéticas no

podrían diferenciarlos entre especies. Varias investigaciones han llegado a la conclusión que el filo *Micromonospora* tiene una singularidad genética en donde las secuencias del gen 16s proporcionan valores de similitud inferiores al 99 %, esto se debe por una reasociación de al ADN – ADN inferiores al 70 %, proporcionando datos limitados para determinar a nivel de especie (Kasai, Tamura, y Harayama, 2000; Maldonado, Stach, Ward, Bull, y Goodfellow, 2008; Trujillo, Kroppenstedt, Schumann, Carro, y Martínez-Molina, 2006). Esto quiere decir que las dos cepas aisladas presentan valores de similitud menores al 99 % con respecto al gen 16sRNA, por lo cual, pueden ser nuevas especies y probablemente representan nuevos taxones que necesiten otros métodos de identificación molecular.

Las cepas de *Micromonospora* representan especies individuales cuando los valores de similitud de la secuencia del gen 16S rRNA que son inferiores al 99% (Kroppenstedt et al., 2005). Varias investigaciones han usado otros genes para poder identificarlos, ADN girasa-subunidad B(*gyrB*) es el más probable que diferencie especies de *Micromonospora* que una comparación de ADN con ARNr 16S, porque tiene una tasa de evolución molecular más alta que la de ADNr (De Menezes, Lockhart, Cox, Allison, y McCarthy, 2008; Kasai et al., 2000)

5.2 Proceso Fermentativo

Los ensayos de fermentación fueron sometidos a condiciones idóneas con respecto a la temperatura, pH y composición del sustrato para obtener un máximo rendimiento en la producción de aminoácidos. Los principales aspectos que se van a contrastar con las cepas comerciales son la formación de biomasa, consumo de sustrato y producción de aminoácidos totales e individuales.

La fermentación bacteriana de las cepas aisladas del género *Micromonospora* (ACT-1A y ACT-1B), son generalmente usadas como fuente eficaz para la síntesis de varios metabolitos bioactivos, como antibióticos e inhibidores enzimáticos (Antal et al., 2005; Gutierrez-Lugo et al., 2005; Rusnak et al., 2001), sin embargo no existe información o investigaciones previas que hayan sido utilizadas para el campo de los aminoácidos. Con respecto a la producción de aminoácidos, en la industria las especies más utilizados son *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli* (Graf et al., 2018) y en términos de rendimientos son muy superiores a cualquier otra cepa “Wild type”, ya que han sido modificadas con ingeniería metabólica y genética (Anusree y Nampoothiri, 2015).

5.2.1 Cinética de crecimiento bacteriano

En los ensayos para determinar la curva de crecimiento para ACT-1A y ACT-1B se registraron las primeras 24 horas fueron de adaptación y que su fase exponencial fue a las 72 y 96 horas respectivamente. El crecimiento para este tipo de bacterias es más lento en comparación a las cepas *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* y *Pseudomonadaceae*, utilizadas en el campo de los aminoácidos (Jillich, 1994), donde se encontró que la fase de latencia fue muy corta hasta 2 – 4 horas y la fase exponencial fue extendido hasta las 12 - 24 horas en todos los organismos (Shakoori et al., 2012). En otras investigaciones utilizando la cepa comercial *Corynebacterium glutamicum* filo *Actinomicetos*, se encontraron valores similares en cuestión de tiempo de las etapas durante la fase exponencial (14 g/L - biomasa) alcanzada a las 48 – 60 horas en medios definidos de miel de caña (Johnston y Nghiem, 2018). Esta diferencia del tiempo de crecimiento bacteriano, se debe principalmente al filo *Actinomicetos*, genero *Micromonospora* que poseen un crecimiento mediante esporulación, principal desventaja porque necesita más tiempo para tener biomasa necesaria para la síntesis de aminoácidos (Qiu et al., 2008). Esta es la principal desventaja frente a otras cepas comerciales, su lento crecimiento debido a la esporulación, como parte fundamental la fase de crecimiento exponencial que debe mantenerse en el mínimo tiempo posible, para evitar el desperdicio de tiempo y por lo tanto el dinero a nivel industrial (Yokota y Ikeda, 2017).

La cepa ACT-1A en la fase exponencial se estimó una tasa de crecimiento de 0.44 h^{-1} (1.15×10^8 UFC/ml) y ACT-1B culminó la etapa con 0.65 h^{-1} (1.34×10^8 UFC/ml). Estudios de crecimiento previos de (Grünberger et al., 2013) mostró que la cepa alcanzó tasas de crecimiento máximas de $0.42 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ cuando se cultivó en biorreactores a escala de laboratorio utilizando melaza como fuente principal de carbono. De los mismos, Unthan et al., (2014) identificaron que las diferentes azúcares y sales presentes en la melaza son compuestos aceleradores del crecimiento bacteriano, afecta el transporte de hierro, mejora el crecimiento mediante un efecto combinatorio o incluso puede apoyar el metabolismo. Por consiguiente, en otras investigaciones se utilizó medio definido con glucosa y como se esperaba, se observaron tasas de crecimiento de $0.32 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ en condiciones no suplementadas que podrían aumentarse a $0.45 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ cuando se utiliza melaza y sus complementos (Graf et al., 2018).

5.2.2 Cinética de producción de aminoácidos

Los ensayos evaluados en la presente investigación proporcionaron información acerca de cómo se comportan los microorganismos aislados con diferentes tipos de sustrato (melaza y glucosa). Los datos obtenidos de la producción de aminoácidos, se observó que la melaza de caña es un potenciador en las síntesis de aminoácidos en las cepas ACT-1A (1.87 g/L) y ACT-1B (1.29 g/L), donde existe una diferencia significativa con la glucosa 1.5 y 0.45 (g/L) respectivamente. En la investigación de Khan et al., (2006) igualmente registró una sobreproducción de aminoácidos mediante aislados de bacterias fermentados con melaza (alanina 4.9 g/l, valina 0.68 g/l, lisina 0.79 g/l) comparando con la fuente de carbono estándar (glucosa) que se diferenciaba con un 25 a 45 % (Hoskisson, Sharples, y Hobbs, 2003; Zahoor et al., 2012). Esta diferencia cerca del 50 % entre los rendimientos, se debe a varios factores entre los principales la fuente de carbono, temperatura, pH y los microorganismos utilizados genéticamente modificados u obtenidos de fuentes naturales (Aoki, Wada, Takesue, Tanaka, y Yokota, 2005; Open universiteit y Polytechnic, 1991).

La melaza de caña utilizada en los ensayos de fermentación es ampliamente usada en la industria por su económica accesibilidad y sobre todo por su contenido de azúcares, vitaminas y carbohidratos fermentables. Esto se debe porque la melaza posee un suministro variado de fuentes de carbonos alternos para su fermentación (Sucrosa 35, dextrosa 6, fructosa 8, azúcar invertido o derivados reducidos 4; %, p/p) que permite al microorganismo potenciar sus rutas metabólicas relacionadas con los aminoácidos (Poel et al., 2000). Diversas investigaciones han probado el efecto de las diferentes fuentes de carbono como fructuosa, glucosa, maltosa, sucrosa y galactosa, llegando a la conclusión que la fructuosa es un factor potenciador del 32 % para la producción de ácido glutámico, (3.7 g/l) (Niaz, Nadeem, Muzammil, Khan, y Zahoor, 2009). Este sustrato no solo proporciona una alta concentración de azúcares C6, también una alta concentración de vitaminas "B", especialmente biotina, que aumenta las tasas de fermentación (Paturau, 1989).

La biotina es compuesto nutricional importante para la sobreproducción de aminoácidos que se encuentra de forma natural en la melaza, la composición de las vitaminas (biotina) en la miel de caña, es aproximadamente de 0.1-1.0 % (Barrera y Pacheco, 2011). Kumagai, (2000) menciona que es requerimiento nutricional y debe estar presente en el sustrato de forma limitante para la acumulación extracelular (Demain y Birnbaum, 1968;

Reed, 2006). Por otro lado, Neubeck et al., (1993) en su investigación determinó la concentración idónea de biotina, para la secreción óptima de aminoácidos utilizando concentraciones de biotina de 2.5 - 3.5 µg /l. Varias investigaciones observaron el efecto de la biotina en las células, demostrando que permite la permeabilidad de la membrana citoplasmática disminuyendo los fosfolípidos, la proporción de ácidos grasos saturados / insaturados y su contenido en lípidos de la membrana en menor en las células “productoras” que las “no productoras” (Hoischen y Kramer, 1990). Esto permite un cambio estructural en la membrana, diferencia en la anisotropía (capacidad alterar propiedades físicas), aumentando la excreción de aminoácidos de las células (Kikuchi y Nakao, 1973; Krämer, Lambert, Hoischen, y Ebbighausen, 1990).

Este es el caso del ácido L-glutámico en bacterias, por ejemplo las industrias utilizan cepas como *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium spp.* *Microbacterium spp.* y *Arthrobacterium spp.* Estos organismos no liberan cantidades significativas de aminoácidos en el medio, por lo que se utilizan diversos métodos para aumentar la permeabilidad de la membrana celular. En estos organismos, la vitamina biotina y los ácidos grasos saturados C₁₆₋₁₈ están involucrados en la síntesis de fosfolípidos de membrana (Open universiteit y Polytechnic, 1991). Si la síntesis de fosfolípidos es limitada, las membranas de las células se vuelven "permeables" y se liberan los aminoácidos en el medio.

Los factores para tomar en cuenta para el suministro de melaza – biotina es el tipo de cepa a utilizarse temperatura y pH del sustrato influyen en la productividad de los aminoácidos (Villadsen, Nielsen, y Lidén, 2011). Los ensayos se realizaron en condiciones idóneas, las cepas ACT-1A y ACT-1B fueron sometidas a temperatura de 30 °C, se registró buen comportamiento de las cepas, al momento de la fermentación. En varias investigaciones han probado varios rangos de temperatura demostrando que la temperatura es parámetro clave para la biosíntesis de aminoácidos, las cepas por preferencia crecen en rangos de 25 – 40 °C, pero otras investigaciones obtuvieron excelentes rendimientos en la fermentación de aminoácidos a 30 – 35 °C (Flickinger y Drew, 1999). También han determinado temperaturas exactas para sintetizar un tipo de aminoácido como por ejemplo 41 °C se han utilizado para aumentar la productividad de algunos aminoácidos como el ácido L-glutámico (Delaunay, Lapujade, Engasser, y Goergen, 2002), en producción de L-lisina entre 24 y 37 °C (US4411997A, 1983), L- treonina a 40 °C (Bastuck et al., 2005) en *Actinobacteria*.

El pH del medio tiene una importante función para la biosíntesis de aminoácidos. El sustrato utilizado en los ensayos fue ajustado y mantenido a pH 7.0 para obtener una producción de aminoácidos idónea. En estudios realizados que afirman que el mejor rango de pH para la producción es el 6.0 – 7.2 para sintetizar la mayor cantidad de aminoácidos en general (Cooney y Moo-Young, 1985). En otras investigaciones, registraron que en el caso de las células libres los valores óptimos fueron para tiempo de fermentación de 72 h, pH 7.5, temperatura 30 °C, fuentes de carbono 80 g / l, tasa de flujo de aire 1.25 vvm y tasa de aireación 300 rpm (Razak y Viswanath, 2015). El pH al ser un parámetro que varía dependiendo del objetivo del bioproceso, como Tani, Lim, y Yang, (1988) verifico que pH 5.5 para la producción de metionina, un pH de 7.4 - 7.8 para la producción de L-lisina (Broer, Eggeling, y Kramer, 1993) en *Actinobacteria*. Como en la temperatura, estas variaciones de pH son detectados por la célula y potencia la síntesis del aminoácido objetivo.

Las cepas utilizadas en todos los ensayos fueron aisladas de fuentes naturales, identificados como *Actinobacteria*, filo *Micromonospora* (ACT-1A y ACT-1B) presentan una gran desventaja, al obtener rendimientos inferiores de aminoácidos frente a las cepas comerciales. A nivel industrial es una pérdida económica al no producir en grandes cantidades, las cepas GM alcanzan un alto nivel de producción de aminoácidos y un crecimiento mucho mejor que la cepa de producción desarrollada tradicionalmente, lo que permite acortar los tiempos de fermentación en aproximadamente un 40 - 50% (Ohnishi et al., 2002). Como por ejemplo, la cepa *C. glutamicum* GM se utiliza para producir lisina o ácido glutámico (Becker, Zelder, Häfner, Schröder, y Wittmann, 2011) con altos rendimientos hasta 50% p p⁻¹, frente a bacterias *C. glutamicum* sin modificar (Aoki, Wada, Takesue, Tanaka, y Yokota, 2005). La cepa de *E. coli* se ha modificado para permitir producción de aminoácidos aromáticos extremadamente codiciados como L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina (Rodriguez et al., 2014).

Los actinomicetos, como *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* y *Actinoplanes* tienen gran capacidad de producir metabolitos secundarios entre los principales la producción de los macrólidos policétidos (antibióticos) (Martens y Demain, 2017). En la industria se han utilizado para obtener antibióticos y no existe alguna información previa que se enfocará al campo de los aminoácidos, pero sintetiza una gran variedad de aminoácidos y se puede mejorar esos rendimientos.

5.2.3 Cinética de consumo de la fuente de carbono

La concentración óptima de melaza de caña para el crecimiento de actinomicetos (*Micromonospora*) es de 25 g/L, que corresponde a 10 g/L de concentración de azúcar (glucosa) en medio de cultivo. Como indican los datos obtenidos por Dehghan Shasaltaneh et al., (2013), la biomasa comienza a disminuir cuando las concentraciones de melaza se incrementaron y sobrepasaron el valor óptimo de la fuente de carbono. Esta observación probablemente esté relacionada con el efecto inhibitorio del crecimiento del componente azucarero de la melaza, una disminución en la tasa de hidrólisis de azúcar u efecto osmótico de las altas concentraciones de azúcar (Atiyeh y Duvnjak, 2003). La alta concentración inicial de la fuente de carbono conducirá a una alta osmolaridad que puede prolongar la fase de retraso de la cepa de producción y, por lo tanto, reducir la productividad. Bashir (2000) recomienda una concentración de melaza del 7-10 % p/p adecuada para la producción de aminoácidos y no saturar el sustrato.

Los ensayos determinaron que a las 72 y 96 horas de fermentación, el máximo consumo de la melaza que de la glucosa en la fermentación, así disminuyendo el contenido de azúcar del medio, durante el crecimiento bacteriano, demuestran el metabolismo activo de las bacterias. Este indicativo del consumo de azúcar y la producción de aminoácidos de las bacterias por la melaza (la única fuente de carbono en medio), apoya la noción de que las bacterias producen metabolitos (aminoácidos) de manera óptima durante la fase de latencia y exponencial (Hassan et al., 2003). En las dos primeras etapas (latencia y exponencial) son críticas porque los actinomicetos, como *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* y *Actinoplanes* tienen gran capacidad de producir metabolitos secundarios (Martens y Demain, 2017).

Aunque la glucosa es una fuente adecuada de carbono y energía para el crecimiento celular, no es suficiente para la producción de aminoácidos. Esto se pudo observar que en los valores registrados al terminar la fase exponencial (72 y 96 horas) existe un consumo mayor de las fuentes de carbono usando la melaza, esto se debe por el principal componente los azúcares C₆ potenciadores de la fermentación (Paturau, 1989; Poel et al., 2000). Al pasar la etapa exponencial del crecimiento, se observa una ligera disminución de la concentración de aminoácidos en las fermentaciones de las cepas. Esto se debe principalmente por las mismas células productoras, al sintetizar enzimas tales como desaminasas y descarboxilasas que convierten el aminoácido en otros compuestos. Al pasar la etapa del crecimiento exponencial en la mayoría de los actinomicetos,

minimizando así el consumo y la producción (Open universiteit y Polytechnic, 1991). Es vital importancia terminar el proceso de fermentación y cosechar los aminoácidos del sustrato.

5.2.4 Perfil aminoacídico de las cepas aisladas

Las cepas del género *Micromonospora sp.* que fueron aisladas de la zona de la rizosfera presentaron un perfil aminoacídico similar en prolina, tirosina, metionina e isoleucina pero existe una variación en el punto 1 (Rf) de ácido glutámico por parte ACT-1A y lisina – serina por ACT-1B. La investigación realizada por Rózycki y Strzelczyk (1986) igualmente afirma que los actinomicetos de la rizosfera de los bosques, producen con mayor frecuencia y en mayor cantidad los siguientes aminoácidos: ácido glutámico, alanina, valina, lisina. Perlman y O'Brien, (1958), Chatterjee y Chatterjee, (1982), descubrieron que los estreptomicetos del suelo pueden sintetizar grandes cantidades de ácido glutámico y lisina en fermentaciones. Becker y Schmidt, (1960) y Aseeva, Vinogradova, y Orlova, (1965) produjeron alanina, y en cantidades más pequeñas leucina, isoleucina, valina, metionina e isoleucina, producidas por estos organismos (actinomicetos) en mismas condiciones. Presumiblemente en ambientes naturales, estos compuestos pueden servir no solo como factores de crecimiento, sino también como fuentes de carbono y nitrógeno para los hongos micorrícicos y otros organismos auxotróficos.

El perfil de aminoácidos mediante la técnica de cromatografía de capa fina es una técnica de rápida detección pero tiene una limitación, al ser un método semicuantitativo no se puede determinar la concentración de cada uno de los aminoácidos (Roca et al., 2003). Esa es la principal limitante para emplear este método pero permite la detección de aminoácidos de forma fácil. Para llevar a cabo estos ensayos se usan mezclas de disolventes de dos o tres componentes. La acetona, el metanol, el agua, el ácido acético y el ácido fórmico, a veces con la adición de amoníaco o piridina, se usan comúnmente como uno de los componentes dependiendo del aminoácido objetivo (Mohammad et al., 2012).

Por las limitaciones que tiene el método de la cromatografía de capa fina, acerca de usar compuesto que ya contienen aminoácidos como es la melaza principal sustrato para la reacción bioquímica y perfilar la producción aminoácidos después de la fermentación, proporcionaría un falso positivo acerca de la capacidad de síntesis de las cepas (Irshad et

al., 2015; Mohammad et al., 2012). Investigaciones recomiendan caracterizar la melaza de caña a utilizarse en la fermentación mediante HPLC, y evitar discrepancias con la alta concentración de diferentes sustancias en las muestras (Dehghan Shasaltaneh et al., 2013; Faghfuri, Fooladi, Sepehr, y Moosavi-Nejad, 2013). Otras investigaciones relacionadas han obtenido resultados similares al observar acumulaciones de aminoácidos en forma de manchas, y que recomiendan caracterizar la melaza mediante HPLC y TLC con cada uno de los aminoácidos objetivos (Dehghan Shasaltaneh et al., 2013). Los resultados obtenidos sobre la presencia y ausencia de aminoácidos, se utiliza el método de TLC para seguir la producción de las fermentaciones. Por limitaciones de adquisición del equipo de HPLC no se caracterizó la melaza a utilizarse y se usó el licor fermentado de la glucosa.

La mezcla utilizada en fase móvil compuesta con n-butanol: acético glacial: agua (12:3:5) permitió una caracterización de los compuestos presentes pero se observó lugares en la placa silica-gel donde existe aglomeraciones de aminoácidos. Este comportamiento se asemeja a las investigaciones, que demostraron que utilizando metanol-agua-acetonitrilo (1:1:4) se definen de mejor manera aminoácidos (metionina, valina, leucina, serina e isoleucina) pero los aminoácidos restantes se acumulan en zonas de la placa provocando manchas (Sherma, 1996; Sherma y Fried, 1997). En estas zonas se asume que existe más aminoácidos que tiene una polaridad similar o necesita otras combinaciones de solventes y placas cromatográficas que pueda separar dependiendo del aminoácido objetivo (Mohammad et al., 2012).

Varias investigaciones utilizan diferentes combinaciones de solventes y placas que separen aminoácidos por su polaridad como las capas de gel de sílice impregnadas con eritromicina, diferentes combinaciones de NaCl-MeCN-MeOH, revelaron aminoácidos como fenilalanina, valina, leucina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, norleucina, ácido α -amino-n-butírico, metionina y triptófano (Bhushan y Parshad, 1996). Hay sistemas de placas y disolventes como n-propanol-agua-cloroformo (5:2:1) permite una buena separación de DL-metionina de las sustancias que lo acompañan (Buhl y Gałkowska, 2006). Otros métodos más generales adaptados a la mayoría de aminoácidos, sistemas de solventes como piridina-benceno (2.5:20), tetracloruro de metanol-carbono (1:20) y acetona-diclorometano (0.3:8), proporcionaron una mejor resolución e identificación en general de 18 aminoácidos en comparación con los sistemas reportados previamente (Bhushan, Mahesh, y Varma, 1994). La distancia de separación de zonas y la resolución están fuertemente influenciadas por la posición de entrada del solvente.

5.3 Escenario teórico del bioproceso para la producción L-lisina HCL

L-lisina es un aditivo alimenticio muy importante, ya que es esencial en las dietas para animales. La producción química de D, L-lisina se conoce desde hace mucho tiempo; sin embargo, la producción de L-lisina se realiza únicamente por fermentaciones microbianas (Johnston y Nghiem, 2018). La producción de aminoácidos en específico L-lisina mediante fermentación, ha sido un campo inexplorado en el Ecuador, todo emprendimiento relacionado tiene mucho potencial comercial porque no hay competencia a nivel industrial. Las materias primas utilizadas en el proceso de fermentación para la producción de L-lisina están disponibles biológica y naturalmente, y los subproductos sintetizados durante la fermentación de L-lisina no son tóxicos y tienen un alto valor comercial como complementos nutritivos y fertilizantes. La fermentación y la realidad socio - económico del Ecuador presenta ventajas y desventajas al tratar de plantear un escenario teórico.

El microorganismo generalmente utilizado por la industria *Corynebacterium glutamicum*, produce los 20 tipos de aminoácidos solo en las cantidades que necesitan para su metabolismo, al modificar estos mecanismos de regulación pueden alcanzar altos rendimientos de aminoácidos (Stoimenova, Ivanov, Obreshkova, y Saso, 2013). Las vías en el metabolismo del carbono más alteradas para el beneficio industrial es el ciclo de TCA y la derivación de glioxilato, glucólisis, sistema de fosfotransferasa (PTS), gluconeogénesis, vía de pentosa fosfato (PPP) (Anusree y Nampoothiri, 2015). La ingeniería de las enzimas en estos puntos de ramificación de las rutas biosintéticas dirigirá el flujo de carbono hacia el producto de interés que conduce al rendimiento máximo del producto.

La ruta biotecnológica es la más adecuada para la producción de lisina, ya que solo se produce el isómero biológicamente activo (L- lisina) y alcanza rendimiento mucho más altos de este aminoácido (Powell, Chowdhury, y Bureau, 2015). Además de las ventajas mencionadas anteriormente, la biosíntesis puede utilizar materias primas renovables y no generar residuos con una alta carga contaminante (Leuchtenberger y Huthmacher, 2009). En consecuencia, otros métodos como la síntesis química generalmente implica pasos costosos que resultan en una mezcla racémica (además de los residuos de alto impacto biológico) (Dalibard et al., 2014; Leuchtenberger y Huthmacher, 2009).

La L-lisina se ha incorporado al mercado principalmente como un aditivo alimentario porque inhibe una opción más económica, se utiliza principalmente en piensos (50.1%), pollos de engorde (37.4%) y pavos (9.4%) (Félix et al., 2019). Además, la suplementación alimenticia con un perfil de aminoácidos que cumpla con los requisitos nutricionales óptimos de los animales, contribuye positivamente al rendimiento del crecimiento y al depósito de proteínas en los tejidos de cerdos, aves y peces (Lothar Eggeling y Bott, 2015; Nguyen y Davis, 2016). Este tipo de bioprocesos son considerados de sistema cerrado porque los subproductos como la biomasa y licor fermentado son utilizados en otras industrias, la biomasa separada del caldo contiene más del 50% de proteínas, usada como complemento alimenticio animal. El licor fermentado son compuestos de nitrógeno orgánicos e inorgánicos, los compuestos de fósforo y las sales de potasio, que podrían usarse como fertilizantes (Anastassiadis, 2008).

Estos productos son fabricados y consumidos por todo el mundo y tan solo en el Ecuador la importación de productos de industrias químicas o de las industrias conexas, registrado como compuestos aminados con funciones oxigenadas. La principal entidad AFABA que demanda aminoácidos en piensos, consume alimento balanceado en el Ecuador alrededor de 2.5 millones de toneladas métricas al año, producto compuesto principalmente de aminoácidos (L – lisina HCL) (Muñoz, 2017). Actualmente, la producción de L-lisina supera los 2 mil millones de toneladas métricas por año y se espera que alcance casi 3 mil millones en 2020, a nivel mundial (Johnston y Nghiem, 2018; Pérez-García, Peters-Wendisch, y Wendisch, 2016).

Limitaciones de escenario teórico y del bioproceso

El Ecuador al ser un país en vías de desarrollo que en la última década, el poder ejecutivo ha incentivado a la producción e investigación biotecnológica. Esto provocó crear y modificar nuevos lineamientos en la normativa constitucional del país, que respalde el manejo de la biodiversidad OGMs y la bioética al usarlos en la explotación industrial. Pero en la actualidad aún existe vacíos legales e incipientes artículos que no abarca la magnitud y una falta de normativas exclusiva para el campo de la biotecnología que se diversifica en varias líneas productivas ya sea dirigido para humanos, animales y remediación ambiental.

La biotecnología industrial al ser un campo relativamente nuevo en el país no existe empresas que se enfocan a la bioproducción en específico en los aminoácidos básicos (L-lisina) sino solo a su importación. Esto es un impedimento para establecer valores reales y técnicos para futuras propuestas que reflejen la realidad social-económica del Ecuador, conocer si es factible los emprendimientos relacionados con la bioproducción. Al no conocer estos parámetros, complica el diseño de escenarios teóricos que se adapten y puedan optimizar con modelamientos en el manejo de materia prima, reactivos, costes de operación y rendimientos productivos. Al momento de simular un escenario teórico en el campo de la bioproducción en específico en los aminoácidos, existe grandes obstáculos en la accesibilidad de información del mercado nacional, vacíos en las normativas relacionadas con la producción biotecnológica, valores teóricos y reales en los rendimientos del proceso. Esto no permiten estructurar adecuadamente el proyecto más a la realidad del país.

La demanda de L-lisina en alimentos, piensos y productos farmacéuticos sigue aumentando. Para satisfacer esta demanda, la industria de los aminoácidos está tratando de mejorar la tecnología de producción reduciendo costos y utilizando recursos inusuales (fuentes de carbono alternas) (Tosaka, Enei, y Hirose, 1983). La fermentación al ser el principal proceso que satisface las demandas productivas y que trae grandes ventajas sobre otros métodos de síntesis, existen aspectos negativos o limitantes que cabe resaltar para el diseño del escenario teórico.

Las desventajas a tomarse en cuenta acerca de todos los procesos de fermentación pueden resumirse como: los procesos continuos aumentan los riesgos de contaminación de todo el sistema; el mantenimiento de la estabilidad del sistema de fermentación y biológico durante un largo período de tiempo de proceso necesario para alcanzar las concentraciones máximas del producto deseado suele ser comparativamente largo (Li, Chen, Chen, Wu, y Chen, 2014); los procesos de fermentación continua también carecen de la necesidad de equipos específicos de alta gama y diseño del diagrama de flujo del proceso optimizados para evitar pérdidas (Ding y Tan, 2006). Los costos de exportación de los residuos azucareros (melaza) de la empresa azucarera a la planta de fermentación generan es un costo adicional. Además, la disponibilidad estacional de la melaza provoca efectos de pérdida en su calidad durante el almacenamiento (Ratledge y Kristiansen, 2001).

Este tipo de investigaciones son necesarias para evaluar la realidad socioeconómica, potencial industrial y normativo que tiene el Ecuador, que sirve para establecer las pautas iniciales para el diseño del bioproceso, materiales y maquinaria a utilizarse, la organización de la compañía y su mercado objetivo. Además, en los parámetros más técnicos identificar cepas nativas que puedan igualar o superar el rendimiento en la producción de aminoácidos a cepas comerciales utilizadas ampliamente por las industrias. Existe el mercado nacional e internacional que demanda aminoácidos como materia prima para su fabricación de productos con valor agregado. Se puede crear un fabrica que aproveche este sector de la biotecnología que no está siendo explotado actualmente en el país. Este llevaría a generar nuevos ingresos, desarrollo científico - tecnológico y sobre todo nuevas plazas de empleo en el sector.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Fue posible el aislamiento de bacterias productoras de aminoácidos de la zona de la rizosfera de los árboles en la Reserva Sabia Esperanza.

Las características morfológicas presentes en las cepas aisladas de la reserva Sabia esperanza permitió clasificarlas en el filo *Actinobacteria*.

La caracterización molecular permitió identificar a nivel el género a *Micromonospora* utilizando como cebadores 16S rRNA.

Las cepas aisladas de la reserva que pertenecen al filo actinomicetos pueden sintetizar aminoácidos a escala laboratorio, sin embargo no alcanza el rendimiento productivo de las cepas comerciales.

Las cepas aisladas presentaron diferencias significativas en la producción de aminoácidos totales, registrando que ACT-1A es superior en rendimientos a ACT1-B.

La mejor fuente de carbono para la sobreproducción de aminoácidos totales es la melaza de caña con respecto al estándar de la glucosa.

El perfil aminoacídico sintetizado por las ACT-1A es ácido glutámico, prolina/tirosina, metionina, isoleucina y ACT-1B presentó similar perfil pero con una variación de serina y lisina.

La reacción de ninhidrina es una molécula muy sensible con los aminoácidos que permitió cuantificarlos e identificarlos en los licores fermentados de una forma sencilla y rápida.

Los datos obtenidos del escenario teórico proyectan al Ecuador como un potencial productor local de L-lisina mediante fermentación a través de la industria biotecnológica.

En términos teóricos de rendimientos al producir L – lisina HCL, el Ecuador no podría alcanzar la productividad de las industrias internacionales como Brasil, EE. UU. o Japón, pero cambiándole el enfoque de cantidad a calidad con valor agregado tendrá oportunidad al mercado de exportaciones.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

Un punto de partida para próximas investigaciones que desarrollen metodologías en términos de sustrato, diseño de biorreactor, ingeniería metabólica y genética que mejoren rendimientos del producto.

Realizar muestreos en nuevos ecosistemas y aislar nuevos microorganismos nativos potencialmente productores de aminoácidos y analizar su potencial industrial.

Se recomienda someter a los mismos ensayos cepas comerciales utilizadas por las industrias y analizar los rendimientos en la biosíntesis de aminoácidos.

Para futuras investigaciones evaluar la fermentación en diferentes fuentes de carbono como melaza de caña, melaza de remolacha, hidrolizados de almidón u otros hidrolizados de biomasa utilizando cepas aisladas y comerciales.

Además, se recomienda utilizar la metodología del HPLC/TLC para definir la concentración del perfil aminoacídico de cada biomolécula utilizando las dos fuentes de carbono.

Establecer protocolos de purificación de aminoácidos hasta obtener la cristalización a escala laboratorio.

Registrar los rendimientos utilizando otras metodologías de fermentaciones fed-batch y continuo o en el diseño de un biorreactor eficiente para la producción de aminoácidos.

Diseñar metodologías a base de la ingeniería genética y metabólica del microorganismo para la sobreproducción de aminoácidos como modificación de las enzimas en las vías terminales, eficiencia energética o metabolismo central del carbono.

De acuerdo con el escenario teórico, ejecutar bioprocesos pilotos a pequeña escala desde el medio definido, fermentación y purificación hasta obtener el concentrado cristalizado.

Efectuar estudios de rentabilidad financiera y factibilidad del proyecto que garanticen su adecuada implementación e indicar a inversionistas los indicadores económicos.

BIBLIOGRAFÍA

- AEI. (2018). La Industria de Capital Emprendedor En Ecuador 2019. Retrieved May 15, 2020, from https://issuu.com/martinalmirati/docs/brochure_mapeo_de_fondos_2018-19__1
- Ajinomoto Heartland, I. (2011). Monohidrocloruro de L-Lisina - Grado Nutrición Animal 78.8%. Retrieved from <https://www.lysine.com/es/products/l-lysine.aspx>
- Ali, S., Rafique, A., Ahmed, M., & Sakandar, S. (2018). Different Types of Industrial Fermentors and Their Associated Operations for the Mass Production of Metabolites. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* *Www.Ejpmr.Com*, 109(5), 109–119. Retrieved from www.ejpmr.com
- Anastassiadis, S. (2008). L-Lysine Fermentation. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 11–24. <https://doi.org/10.2174/187220807779813947>
- Antal, N., Fiedler, H. P., Stackebrandt, E., Beil, W., Ströch, K., & Zeeck, A. (2005). Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tü 6368 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *Journal of Antibiotics*, 58(2), 95–102. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.12>
- Anusree, M., & Nampoothiri, K. M. (2015). *White Biotechnology for Amino Acids. Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00014-8>
- Aoki, R., Wada, M., Takesue, N., Tanaka, K., & Yokota, A. (2005a). Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(8), 1466–1472. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1466>
- Aoki, R., Wada, M., Takesue, N., Tanaka, K., & Yokota, A. (2005b). Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(8), 1466–1472. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1466>
- Arcos, E. (2016). *Financiamiento Para Emprendedores Y Empresarios Territoriales*. (C. de G. P. del Ecuador, Ed.) (Primera). Quito. Retrieved from <http://www.congope.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/Financiamiento-para-emprendedores-y-empresarios-territoriales.pdf>
- Arcsa. (2016). Norma tecnica importacion medicamentos, tratamientos especializados, 1–8.
- Asamblea Nacional. (2015). Ley organica de salud - Ecuador. *Plataforma Profesional de Investigacion Jurídica*, (593), 13. Retrieved from <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2017/03/LEY-ORGÁNICA-DE-SALUD4.pdf>
- Aseeva, I., Vinogradova, K., & Orlova, G. (1965). Amino acid biosynthesis by actinomycetes isolated from the soil of Pamir. *Mikrobiologiya*, 34(1), 24–31.
- Asif, M., Akram, M., Asif, H. M., Uzair, M., Barberfi, R., Madni, A., & Shah, S. M. A. (2011). Amino acids : A review article Amino acids : A review article. *Journal of*

Medicinal Plants Research, 5(17), 3997–4000.

- Atiyeh, H., & Duvnjak, Z. (2003). Production of fructose and ethanol from cane molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Acta Biotechnologica*, 23(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/abio.200390005>
- Barrera, R., & Pacheco, M. (2011). Producción de ácido láctico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* a partir de melaza. *Universidad Técnica de Ambato*, 118. Retrieved from <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>
- Bastuck, C., De, B., Hermann, T., De, B., Thierbach, G., & De, B. (2005). Fermentation process for the preparation of L-amino Acids using strains of the family Enterobacteriaceae.
- Beattie, A. J., Hay, M., Magnusson, B., de Nys, R., Smeathers, J., & Vincent, J. F. V. (2011). Ecology and bioprospecting. *Austral Ecology*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02170.x>
- Becker, G., & Schmidt, E. (1960). Excretion of amino acids by soil and rhizosphere isolates. In *Bact. Proc.*
- Becker, J., Rohles, C. M., & Wittmann, C. (2018). Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metabolic Engineering*, 50(July), 122–141. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.008>
- Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., & Wittmann, C. (2011). From zero to hero-Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metabolic Engineering*, 13(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.003>
- Bejarano, M. (2014). La Biotecnología Y La Biodiversidad En La Legislación Ambiental Ecuatoriana.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Amino Acids, Peptides, Proteins. *Food Chemistry*, (May), 1–1070. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Benz, G. (2008). Piloting bioreactors for agitation scale-up. *Chemical Engineering Progress*, 104(2), 32–34.
- Bercovici, D., & Fuller, M. F. (2007). Industrial amino acids in nonruminant animal nutrition. *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, (Table 2), 93–113. <https://doi.org/10.1002/9783527615353.ch6>
- Bhushan, R., Mahesh, V. K., & Varma, A. (1994). Improved thin layer chromatographic resolution of PTH amino acids with some new solvent systems. *Biomedical Chromatography*, 8(2), 69–72. <https://doi.org/10.1002/bmc.1130080205>
- Bhushan, Ravi, & Parshad, V. (1996). Thin-layer chromatographic separation of enantiomeric dansylamino acids using a macrocyclic antibiotic as a chiral selector. *Journal of Chromatography A*, 736(1–2), 235–238. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01330-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01330-X)
- Bishir, M., Alhaji, A. S., & Obansa, A. I. (2017). Glutamic Acid Production from Rice

- Husk Using *Corynebacterium glutamicum* Isolated from Soil 3 . Preliminary Screening of the Isolates for Glutamic Acid Production, 4(6), 70–76. <https://doi.org/10.11648/j.bio.20160406.13>
- Bott, M. (2007). Offering surprises : TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*, 15(9). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.08.004>
- Bracewell, D. G., Mumtaz, M. A. S., & Smales, C. M. (2009). Downstream processing. *Section Title: Pharmaceuticals*, 492–512. <https://doi.org/10.1039/9781849730211-00492>
- Brautaset, T., & Ellingsen, T. E. (2011). *Lysine: Industrial Uses and Production. Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 3). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00220-8>
- Brenner, M., & Niederwieser, A. (1967). Thin-Layer Chromatography (TLC) of Amino Acids. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(67\)11007-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(67)11007-0)
- Broer, S., Eggeling, L., & Kramer, R. (1993). Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 316–321. <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.316-321.1993>
- Buhl, F., & Galkowska, M. (2006). Determination of methionine in pharmaceuticals after chromatographic separation. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 19(111), 401–404. <https://doi.org/10.1556/JPC.19.2006.5.12>
- Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. *Microbiologia Agrícola*, (2), 1–453. Retrieved from <http://www.unsa.edu.ar/matbib>
- Chatterjee, S., & Chatterjee, S. P. (1982). A glutamic acid producing *Streptomyces* sp. *Folia Microbiologica*, 27(2), 116–120. <https://doi.org/10.1007/BF02879769>
- Chen, H. B., Kao, P. M., Huang, H. C., Shieh, C. J., Chen, C. I., & Liu, Y. C. (2010). Effects of using various bioreactors on chitinolytic enzymes production by *Paenibacillus taichungensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.008>
- Cisneros, J. (2016). Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Solanum tuberosum* sp . andigena (Papa), 80.
- COA. (2017). Código Organico Del Ambiente. *Registro Oficial Suplemento 983*, 1–92.
- COES. (2017). Reglamento Código Organico Economía Social De Los Conocimientos, 1–17. Retrieved from <https://www.correosdelecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/08/REGLAMENTO-CODIGO-CONOCIMIENTOS.pdf>
- Comité interinstitucional de seguridad e higiene del trabajo. (2013). Reglamento de Seguridad y Salud de los trabajadores y Mejoramiento del Medio Ambiente de trabajo. *Braz J Allergy Immunol*, 1(3), 138–142.
- Constituyente, A. (2008). Constitución De La Republica Del Ecuador 2008. *Constitucion de La Republica Del Ecuador*, 136.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Cooney, C. L., & Moo-Young, M. (1985). *Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Elsevier Science & Technology Books. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=YNhTAAAAMAAJ>
- D'Este, M., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2018). Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. *Biotechnology Advances*, *36*(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.001>
- Dalibard, P., Hess, V., Le Tutour, L., Peisker, M., Peris, S., Gutierrez, A. P., & Redshaw, M. (2014). *Amino acids in animal nutrition*.
- De Menezes, A. B., Lockhart, R. J., Cox, M. J., Allison, H. E., & McCarthy, A. J. (2008). Cellulose degradation by micromonosporas recovered from freshwater lakes and classification of these actinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(22), 7080–7084. <https://doi.org/10.1128/AEM.01092-08>
- Dehghan Shasaltaneh, M., Moosavi-Nejad, Z., Gharavi, S., & Fooladi, J. (2013). Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. *Iranian Journal of Microbiology*, *5*(3), 285–292.
- Delaunay, S., Lapujade, P., Engasser, J. M., & Goergen, J. L. (2002). Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *28*(6), 333–337. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000251>
- Demain, A., & Dana, C. (2007). The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*, *3*(3), 269–283. Retrieved from http://www.sbmicrobiologia.org.br/PDF/The_business_of_biotechnology.pdf
- Demain, A. L., & Birnbaum, J. (1968). Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46121-7_1
- Deng, S. P., & Tabatabai, M. A. (1994). Colorimetric determination of reducing sugars in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, *26*(4), 473–477.
- Dhananjeyan, V., Selvan, N., & Dhanapal, K. (2010). Isolation, Characterization, Screening and Antibiotic Sensitivity of Actinomycetes from Locally (Near MCAS) Collected Soil Samples. *Journal of Biological Sciences*, *10*: 514-51. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.514.519>
- Ding, S., & Tan, T. (2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, *41*(6), 1451–1454. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.014>
- Ditzel, F., & Pacheco, F. (2015). Diseño y evaluación técnico-económica de la producción de glutamato monosódico por fermentación.
- Divched, W. J. (2004). The Monosodium Glutamate Story: The Commercial Production of MSG and Other Amino Acids. *Journal of Chemical Education*, *81*(347).
- Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab

- taiwo, Asniza, M., & Abdul Khalid, S. H. . (2016). Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Eggeling, L., & Bott, M. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=vlfMBQAAQBAJ>
- Eggeling, Lothar. (2006). L-Serine and Glycine. *Microbiol. Monogr.*, (January). <https://doi.org/10.1007/7171>
- Eggeling, Lothar, & Bott, M. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum. PhD Proposal* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Eggeling, Lothar, & Bott, M. (2015). A giant market and a powerful metabolism: l-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3387–3394. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6508-2>
- Engov Policy Brief. (2015). *El reenfoque de la biotecnología en el Ecuador: influencia y visión de un nuevo grupo de poder*. Retrieved from http://www.engov.eu/documentos/policy_brief/2015_PolicyBrief5_ES.pdf
- Ensari, S., & Lim, H. C. (2003). Kinetics of L-lysine fermentation: A continuous culture model incorporating oxygen uptake rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1266-y>
- Ergun, M., & Ferda Mutlu, S. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 73(3), 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00140-6)
- Espacios, H. R., Autores, L. O. S., Vera, P. V., Carlos, M., & Toral, T. (2018). Economía ecuatoriana : de la producción agrícola al servicio. *Espacios*.
- Faghfuri, E., Fooladi, J., Sepehr, S., & Moosavi-Nejad, S. Z. (2013). L- tryptophan production by whole cells of *Escherichia coli* based on Iranian sugar beet molasses. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(4), 1–6. <https://doi.org/10.5812/jjm.5370>
- Farjardo, E., & Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, 120.
- Faurie, R., & Thommel, J. (2002). *Advances in biochemical engineering biotechnology : microbial production of L-amino acid. Microbial production of L-amino acids*.
- Félix, F. K. do C., Letti, L. A. J., Vinícius de Melo Pereira, G., Bonfim, P. G. B., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2019). L-lysine production improvement: a review of the state of the art and patent landscape focusing on strain development and fermentation technologies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(8), 1031–1055. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1663149>
- Flickinger, M., & Drew, S. (1999). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, Bioseparation. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. New York, NY. <https://doi.org/10.1002/0471250589>
- Genzyme, S., Taticek, R., & Pfizer, J. M. (2004). Upstream Processing. *BioProcess International*, 1–41.
- Gilces, P., & Veloz, P. (2006). *Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en*

fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico.
Universidad de Guayaquil.

- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.05.004>
- Graf, M., Zieringer, J., Haas, T., Nieß, A., Blombach, B., & Takors, R. (2018). Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to increasingly nutrient-rich growth conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02058>
- Grünberger, A., van Ooyen, J., Paczia, N., Rohe, P., Schiendzielorz, G., Eggeling, L., ... Noack, S. (2013). Beyond growth rate 0.6: *Corynebacterium glutamicum* cultivated in highly diluted environments. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 220–228. <https://doi.org/10.1002/bit.24616>
- Guevara, B. L. L. (2017). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagonica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. *Escuela Agrícola Panamericana*, 30.
- Guillen Peña, C. (2005). Legislación ecuatoriana y biotecnología. *Revista de Derecho*, No. 4, (4), 205–230.
- Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G., & Sinitsyn, A. P. (2011). Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2011/283658>
- Gutierrez-Lugo, M. T., Woldemichael, G. M., Singh, M. P., Suarez, P. A., Maiese, W. M., Montenegro, G., & Timmermann, B. N. (2005). Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068. *Natural Product Research*, 19(7), 645–652. <https://doi.org/10.1080/14786410412331272040>
- Hartmann, M., Tauch, A., Eggeling, L., Bathe, B., Möckel, B., Pühler, A., & Kalinowski, J. (2003). Identification and characterization of the last two unknown genes, *dapC* and *dapF*, in the succinylase branch of the L-lysine biosynthesis of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), 199–211. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00156-1)
- Hassan, B., Asghar, M., Nadeem, S., Zubair, H., Muzammil, H. M., & Shahid, M. (2003). Isolation and Screening of Amino Acids Producing Bacteria from Milk. *Biotechnology(Faisalabad)*, 2(1), 18–29. <https://doi.org/10.3923/biotech.2003.18.29>
- He, X., Chen, K., Li, Y., Wang, Z., Zhang, H., Qian, J., & Ouyang, P. (2015). Enhanced L-lysine production from pretreated beet molasses by engineered *Escherichia coli* in fed-batch fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(8), 1615–1622. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1403-x>
- Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), 155–172. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00149-4)

- Hirasawa, T., & Wachi, M. (2016). Glutamate Fermentation-2: Mechanism of L-Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123(July 2015), 127–141. <https://doi.org/10.1007/10>
- Hirsch, A. M., & Valdés, M. (2010). Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.023>
- Hohmann, L., Löbnitz, L., Menke, C., Santhirakumaran, B., Stier, P., Stenger, F., ... Kockmann, N. (2018). Continuous Downstream Processing of Amino Acids in a Modular Miniplant. *Chemical Engineering and Technology*, 41(6), 1152–1164. <https://doi.org/10.1002/ceat.201700657>
- Hoischen, C., & Kramer, R. (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 172(6), 3409–3416. <https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3409-3416.1990>
- Hoskisson, P. A., Sharples, G. P., & Hobbs, G. (2003). The importance of amino acids as carbon sources for *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Letters in Applied Microbiology*, 36(5), 268–271. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01306.x>
- Hu, R., Lin, L., Liu, T., Ouyang, P., He, B., & Liu, S. (2008). Reducing sugar content in hemicellulose hydrolysate by DNS method: A revisit. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2(2), 156–161. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2008.306>
- Hungming, L., Eddington, J., Yang, Y., Dancey, R., Swisher, S., & Mao, W. (2003). NOVEL BACTERIAL STRAINS, METHODS OF PREPARING THE SAME AND USE THEREOF IN FERMENTATION PROCESSES FOR L-LYSINE PRODUCTION. *Patent Application Publication*.
- Ikeda, M., & Katsumata, R. (1992). Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 781–785. <https://doi.org/10.1128/aem.58.3.781-785.1992>
- Ikeda, Masato. (2003a). Amino Acid Production Processes, 79, 3–6.
- Ikeda, Masato. (2003b). The *Corynebacterium glutamicum* genome : features and impacts on biotechnological processes, 99–109. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1328-1>
- Ikeda, Masato. (2006). Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 615–626. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0252-y>
- Ikeda, Masato. (2016). Lysine Fermentation: History and Genome Breeding (pp. 73–102). Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/10_2016_27
- Ikeda, Masato. (2017). Lysine Fermentation: History and Genome Breeding. In *Educational Technology and Society* (Vol. 20, pp. 237–247). <https://doi.org/10.1007/10>
- Ikeda, Masato, & Katsumata, R. (1995). Tryptophan Production by Transport Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(8), 1600–1602. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1600>

- Ikeda, Masato, Ohnishi, J., Hayashi, M., & Mitsuhashi, S. (2006). A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient l-lysine production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 610–615. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0104-5>
- INEC. (2017). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2017. *Dirección De Estadísticas Agropecuarias Y Ambientales*, 23. <https://doi.org/10.4206/agrosur.1974.v2n2-09>
- Intratec. (2019). *L-Lysine-HCl Production from Glucose - Cost Analysis - Lysine E12A*. Intratec. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=HcGcCwAAQBAJ>
- Irshad, S., Faisal, M., Hashmi, A. S., Javed, M. M., Baber, M. E., Awan, A. R., & Anjum, A. A. (2015). Mass production and recovery of l-lysine by microbial fermentation using *brevibacterium flavum*. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25(1), 290–294.
- Jajic, I., Krstovic, S., Glamocic, D., Jakšić, S., & Abramovic, B. (2013). Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(6), 839–850. <https://doi.org/10.2298/JSC120712144J>
- Jillich, F. (1994). Secretion of amino acids by bacteria : Physiology and mechanism, 13, 75–93.
- Johnston, D. B., & Nghiem, N. (2018). Evaluation of sweet sorghum juice for the production of lysine using *Corynebacterium glutamicum*. *Fermentation*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020029>
- Junker, B., Lester, M., Brix, T., Wong, D., & Nuechterlein, J. (2006). A next generation, pilot-scale continuous sterilization system for fermentation media. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(6), 351–378. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0041-0>
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, 20(4), 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.004>
- Kasai, H., Tamura, T., & Harayama, S. (2000). Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 127–134. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-127>
- Kase, H., & Nakayama, K. (1974). Mechanism of l-threonine and l-lysine production by analog-resistant mutants of *corynebacterium glutamicum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(5), 993–1000. <https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861280>
- Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Ikeda, S., Yoshii, H., & Hirose, Y. (1990). Stimulatory effect of glycine betaine on l-lysine fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 87–90. <https://doi.org/10.1007/BF00170929>
- Keishi, S., Nakamura, Y., & Yamada, Y. (1983). *US4411997A*.
- Khamduang, M., Packdibamrung, K., Chutmanop, J., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2009). Production of l-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(10), 1267–1274.

<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0606-z>

- Khan, S. H., Rasool, G., & Nadeem, S. (2006). Bioconversion of cane molasses into amino acids, *43*, 157–161.
- Kikuchi, M., & Nakao, Y. (1973). Relation between Cellular Phospholipids and the Excretion of L-Glutamic Acid by a Glycerol Auxotroph of *Corynebacterium alkanolyticum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *37*(3), 515–519. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.37.515>
- Kinoshita, S., Udaka, S., & Shimono, M. (1957). Studies On the Amino Acid Fermentation Part I. Production of L-Glutamic Acid by Various Microorganisms*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *3*(3), 193–205. <https://doi.org/10.2323/jgam.3.193>
- Kobayashi, M., Itoyama, T., Mitani, Y., & Usul, N. (2007). Method for producing basic amino acid. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Designated+Extension+States+:#0>
- Kocabaş, P., Çalik, P., & Özdamar, T. H. (2006). Fermentation characteristics of l-tryptophan production by thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* in a defined medium. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(5), 1077–1088. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.012>
- Kotzamanidis, C., Roukas, T., & Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*(5), 441–448. <https://doi.org/10.1023/A:1015523126741>
- Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C., & Ebbighausen, H. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *European Journal of Biochemistry*, *194*, 929–935.
- Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C., & Stackebrandt, E. (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* s. *Systematic and Applied Microbiology*, *28*(4), 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.011>
- Kumagai, H. (2000). Microbial production of amino acids in Japan. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *69*, 71–85. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_3
- Kumar, D., & Gomes, J. (2005). Methionine production by fermentation. *Biotechnology Advances*, *23*(1), 41–61. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.08.005>
- Kusumoto, I. (2001). Glutamine Metabolism: Nutritional and Clinical Significance Industrial Production of L -Glutamine 1, 2552–2555.
- Lee, I., Lee, K., Namgoong, K., & Lee, Y. S. (2002). The use of ion exclusion chromatography as approved to the normal ion exchange chromatography to achieve a more efficient lysine recovery from fermentation broth. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(6), 798–803. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00060-1)

- Lee, J. H., & Wendisch, V. F. (2017). Production of amino acids – Genetic and metabolic engineering approaches. *Bioresource Technology*, 245, 1575–1587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.065>
- Lee, J. Y., Na, Y. A., Kim, E., Lee, H. S., & Kim, P. (2016). The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 807–822. <https://doi.org/10.4014/jmb.1601.01053>
- Leuchtenberger, W. (1996). Amino Acids - Technical Production and Use. *Biotechnology Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9783527620883.ch14a>
- Leuchtenberger, W., & Huthmacher, K. (2009). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects, (2005), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0155-y>
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., & Drauz, K. (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0155-y>
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016a). Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. <https://doi.org/10.5772/61462>
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016b). Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, (i). <https://doi.org/10.5772/61461>
- Li, T., Chen, X. Bin, Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2014). Open and continuous fermentation: Products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal*, 9(12), 1503–1511. <https://doi.org/10.1002/biot.201400084>
- Maldonado, L. A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., & Quintana, E. T. (2009). Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9294-3>
- Maldonado, L. A., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Bull, A. T., & Goodfellow, M. (2008). Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 94(2), 289–298. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9244-0>
- Marc, J.-. (2007). L-lysine producing coryneform bacteria and methods for the production of L-lysine, 1(19), 1–9.
- Markov, S. (2015). *Bioprocess & Engineering*, (September).
- Martens, E., & Demain, A. L. (2017). *An Overview of the Industrial Aspects of Antibiotic Discovery. Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804765-1.00007-2>
- Martin, Y., & Vermette, P. (2005). Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, 26(35), 7481–7503. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.057>

- Martínez-Rodríguez, S., Martínez-Gómez, A. I., Rodríguez-Vico, F., Clemente-Jiménez, J. M., & Las Heras-Vázquez, F. J. (2010). Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: An overview. *Chemistry and Biodiversity*, 7(6), 1531–1548. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900245>
- Meletis, C. D., & Barker, J. E. (2005). Therapeutic uses of amino acids. *Alternative and Complementary Therapies*, 11(1), 24–28. <https://doi.org/10.1089/act.2005.11.24>
- Merzaeva, O. V., & Shirokikh, I. G. (2006). Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. *Microbiology*, 75(2), 226–230. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020184>
- Metabolisms, A. (2007). Bioreactor Design 6.1. *Biomass*, 142–169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52845-2.50006-9>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ministerio del Ambiente. (2015). Instructivo para el registro de sustancias químicas peligrosas y las obligaciones ambientales, (099), 7–9. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/04/AM-099-Instructivo-para-el-Registro-de-Sustancias-Químicas-Peligrosas.pdf>
- Mohammad, A., Moheman, A., & El-Desoky, G. E. (2012). Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: Review of the current state. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 731–750. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0019-0>
- Mondal, S., Das, Y. B., & Chatterjee, S. P. (1996). Methionine Production by Microorganisms. *Folia Microbiologica*, 41(6), 465–472. <https://doi.org/10.1007/BF02814659>
- Moosavi-Nasab, M., Ansari, S., & Montazer, Z. (2007). Fermentative Production of Lysine by *Corynebacterium glutamicum* from Different Carbon Sources. *Iran Agricultural Research*, 25(2), 99–106.
- Mora, B. (2018). Créditos para emprendedores y Pymes en Ecuador | Economía | Noticias | El Universo. Retrieved May 15, 2020, from <https://www.eluniverso.com/noticias/2018/07/03/nota/6840290/creditos-emprendedores-pymes-ecuador>
- Muñoz, D. (2017). *Estudio de la cadena de valor de alimentos balanceados en el Ecuador*. Universidad Andina Simón Bolívar.
- Nanjwade, B. K., Chandrashekhara, S., Goudanavar, P. S., Shamarez, A. M., & Manvi, F. V. (2010). Production of antibiotics from soil-isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), 373–377. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i4.58933>
- Nannipieri, G. P. P. (2014). *Omics in Soil Science*. Caister Academic Press.
- Neubeck, M., Prenner, E., Horvat, P., Bona, R., Hermetter, A., & Moser, A. (1993). Membrane fluidity in glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium* sp. ATCC 13869. *Archives of Microbiology*, 160, 101–107.
- Nguyen, L., & Davis, D. A. (2016). Comparison of crystalline lysine and intact lysine used as a supplement in practical diets of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 464, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.005>
- Niaz, B., Nadeem, S., Muzammil, H. M., Khan, J. A., & Zahoor, T. (2009). Optimization of fermentation conditions for enhanced glutamic acid production by a strain of *Corynebacterium glutamicum* NIAB BNS-14. *Pakistan Journal of Zoology*, 41(4), 261–267.
- Núñez, R. Á., Pérez, B. R., Motzezak, R. H., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135.
- Oh, J., Kim, S., Cho, Y., Park, N., & Lee, J. (1993). US5268293. *United States Patent*.
- Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K., & Ikeda, M. (2002). A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2), 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0883-6>
- Olbrich, H. (1963). The molasses. *Biotechnologie Kempe GmbH*, 131. Retrieved from http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses_OLBRICH.pdf
- Open universiteit, & Polytechnic, T. (1991). Amino acids: their production and uses in the food industry. In *Biotechnological Innovations in Food Processing* (pp. 211–251). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-1513-6.50015-9>
- Osamu, T., Masaru, I., & Koichi, T. (1981). US4275157A.
- Palacios, D., & Reyes, P. (2016). Cambio de la matriz productiva del Ecuador y su efecto en el comercio exterior. *Dominio de Las Ciencias*, 2, 418–431. <https://doi.org/dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/download/183/pdf>
- Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes Isolation and partial characterization of soils actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug-resistant bac. *Revista Colombiana Biotecnología*, XIX(2), 15–23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- Parte, A., Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., ... Suzuki, K. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer New York. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=66UMS7A2KisC>
- Paturau, J. M. (1989). *By-products of the cane sugar industry. An introduction to their industrial utilization*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19900393895>
- Peinado, J., & Meléndez, F. (2010). 10. Cromatografía en papel de aminoácidos, 2–6.
- Pérez-García, F., Peters-Wendisch, P., & Wendisch, V. F. (2016). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for fast production of l-lysine and l-pipecolic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 8075–8090. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7682-6>

- Pérez, A., Rabassa, G., Crespo, L., & Pérez, A. (2015). ESTUDIO TÉCNICO-ECONÓMICO DE LA PRODUCCIÓN DE L-, 42, 75–84.
- PERLMAN, D., & O'BRIEN, E. (1958). Production of glutamic acid by streptomycetes. *Journal of Bacteriology*, 75(5), 611. <https://doi.org/10.1128/JB.75.5.611-611.1958>
- Poel, P. W. van der (Pieter W., Schiweck, H. (Hubert), & Schwartz, T. K. (2000). *Sugar technology : beet and cane sugar manufacture*. Verlag Dr Albert Bartens KG.
- Powell, C. D., Chowdhury, M. A. K., & Bureau, D. P. (2015). Assessing the bioavailability of l-lysine sulfate compared to l-lysine HCl in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 448, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.013>
- Presidencia de la República. (2014). Decretos 245. Créase el Instituto Nacional de Biodiversidad, adscrito al Ministerio del Ambiente.
- Qiu, D., Ruan, J., & Huang, Y. (2008). Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5593–5597. <https://doi.org/10.1128/AEM.00303-08>
- Ratledge, C., & Kristiansen, B. (2001). *Basic Biotechnology*. Cambridge University Press. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=x-N-DsC-7AEC>
- Razak, M. A., & Viswanath, B. (2015). Optimization of fermentation upstream parameters and immobilization of *Corynebacterium glutamicum* MH 20-22 B cells to enhance the production of l-lysine. *3 Biotech*, 5(4), 531–540. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0252-7>
- RCOES - Asamblea Nacional. (2016). Código Organico de la economía social de los conocimientos, creatividad e inovacion, 30. Retrieved from <http://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/ec/ec075es.pdf>
- Reed, G. (2006). *Prescott & Dunn's Industrial Microbiology*. CBS Publishers & Distributors. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=t5ZqngEACAAJ>
- Rivers, D. B., Gracheck, S. J., Woodford, L. C., & Emert, G. H. (1984). Limitations of the DNS assay for reducing sugars from saccharified lignocellulosics. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(7), 800–802. <https://doi.org/10.1002/bit.260260727>
- Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. (2003). *Bioquímica Técnicas y métodos*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rodríguez, A., Martínez, J. A., Flores, N., Escalante, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2014). Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0126-z>
- Rouy, N. (1992). US5133976A.
- Różycki, H., & Strzelczyk, E. (1986). Free amino acids production by actinomycetes, isolated from soil, rhizosphere, and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Zentralblatt Für Mikrobiologie*, 141(6), 423–429. [https://doi.org/10.1016/s0232-4393\(86\)80032-4](https://doi.org/10.1016/s0232-4393(86)80032-4)

- Ruklisha, M., Paegle, L., & Denina, I. (2007). l-Valine biosynthesis during batch and fed-batch cultivations of *Corynebacterium glutamicum*: Relationship between changes in bacterial growth rate and intracellular metabolism. *Process Biochemistry*, 42(4), 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.11.008>
- Rusnak, K., Troyanovich, J., Mierzwa, R., Chu, M., Patel, M., & Weinstein, M. (2001). An antibiotic with activity against gram-positive bacteria from the gentamicin-producing strain of *Micromonospora purpurea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 502–503. <https://doi.org/10.1007/s002530100671>
- Sadovnikova, M. ., & Belikov, V. . (1978). Industrial Applications of Amino-acids. *Russian Chemical Reviews*, 199.
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2014). *Fermentation (Industrial): Production of Amino Acids*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00373-6>
- Schmidt, J. M., & Swafford, J. R. (2014). *The Prokaryotes III - Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1>
- Sen, S., Sarkar, S., Kundu, P., & Laskar, S. (2012). Separation of Amino Acids Based on Thin-Layer Chromatography by a Novel Quinazoline Based Anti-Microbial Agent. *American Journal of Analytical Chemistry*, 03(09), 669–674. <https://doi.org/10.4236/ajac.2012.39088>
- Senae. (2018). El Telégrafo - Industrias innovan en suplementos para deportistas. *El Telegrafo*. Retrieved from <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/empresas-suplementos-deportivos-ecuador>
- Senplades. (2009). *Sostenibilidad, conservación, conocimiento del patrimonio natural y fomento del turismo comunitario, Garantizar los derechos de la naturaleza y promover un ambiente sano y sustentable. Plan Nacional para el Buen Vivir 2009-2013* . <https://doi.org/Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo>
- Shah, A. H., Hameed, A., Ahmad, S., & Khan, G. M. (2002). Optimization of Culture Conditions for L-Lysine Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/jbs.2002.151.156>
- Shakoori, F. R., Butt, A. M., Ali, N. M., Zahid, M. T., Rehman, A., & Shakoori, A. R. (2012). Optimization of fermentation media for enhanced amino acids production by bacteria isolated from natural sources. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(4), 1145–1157.
- Sharma, S., & Gomes, J. (2001). Effect of Dissolved Oxygen on Continuous Production of Methionine. *Engineering in Life Sciences*, 1(2), 69–73. [https://doi.org/10.1002/1618-2863\(200108\)1:2<69::aid-elsc69>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1618-2863(200108)1:2<69::aid-elsc69>3.0.co;2-2)
- Sherma, J. (1996). Planar chromatography. *Analytical Chemistry*, 68(12), 1–20. <https://doi.org/10.1021/a1960001s>
- Sherma, J., & Fried, B. (1997). *Handbook of thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A* (Vol. 89). [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(96\)00967-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(96)00967-3)
- Shiratsuchi, M., Kuronuma, H., Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Miwa, H., & Nakamori, S. (1995). Simultaneous and High Fermentative Production of L-Lysine and L-

- Glutamic Acid Using a Strain of *Brevibacterium Lactofermentum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(1), 83–86. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.83>
- Shu, C. H., & Liao, C. C. (2002). Optimization of L-phenylalanine production of *Corynebacterium glutamicum* under product feedback inhibition by elevated oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(2), 131–141. <https://doi.org/10.1002/bit.10125>
- Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2016). *Design and Types of Bioprocesses. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00002-1>
- Sindhu, Rakesh, & Sharma, S. (2010). Pharmacognostical and preliminary phytochemical investigations on *Verbesina encelioides* Benth. Roots. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 4, 113–118.
- Spier, M. R., Vandenberghe, L. P. de S., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2012). *Application of different types of bioreactor in bioprocesses* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000114141.37640.37>
- Steinb, A. (2009). *Microbiology Monographs* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-48596-4>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., ... Ralser, M. (2015). The return of metabolism : biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway, 90, 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Stoimenova, A., Ivanov, K., Obreshkova, D., & Saso, L. (2013). Biotechnology in the production of pharmaceutical industry ingredients: Amino acids. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(2), 3620–3626. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2012.0134>
- Takors, R., Bathe, B., Rieping, M., Hans, S., Kelle, R., & Huthmacher, K. (2007). Systems biology for industrial strains and fermentation processes-Example: Amino acids. *Journal of Biotechnology*, 129(2), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.031>
- Tanenholtz, P. E. E. (1978). *US4066501A*.
- Tani, Y., Lim, W. J., & Yang, H. C. (1988). Isolation of l-methionine-enriched mutant of a methylotrophic yeast, *Candida biodinii* No. 2201. *Journal of Fermentation Technology*, 66(2), 153–158. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(88\)90041-6](https://doi.org/10.1016/0385-6380(88)90041-6)
- Tatsumi, N., & Inui, M. (2012). *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=BGJlb3fzW90C>
- Thawai, C., Kanchanasin, P., Ohkuma, M., Kudo, T., & Tanasupawat, S. (2018). Identification and antimicrobial activity of *Micromonospora* strains from Thai peat swamp forest soils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(4), 119–125. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8417>
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K. I., & Kudo, T. (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 417–422. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63217-0>

- Thomas, B., & Stevens, J. (2004). Process for making granular L-lysine feed supplement, *30655(19)*, 1–19.
- Tonouchi, N., & Hisao, I. (2017). Present Global Situation of Amino Acids in Industry. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/10_2016_23
- Torabi, M., Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo, ... Abdul Khalid, S. H. . (2016). An Introduction to Actinobacteria. *Intech*, *i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Tosaka, O., Enei, H., & Hirose, Y. (1983). The production of l-lysine by fermentation. *Trends in Biotechnology*, *1(3)*, 70–74. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(83\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(83)90055-0)
- Trivedi, S., & Shah, S. (2014). The Effect of Cane molasses on Cow Milk Productivity. *International Journal of Current Engineering and Technology*, *4(6)*, 2–7.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L., & Martínez-Molina, E. (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56(10)*, 2381–2385. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64449-0>
- Ugimoto, M. (2010). Amino Acids , Production Processes. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 1–11.
- Unthan, S., Grünberger, A., van Ooyen, J., Gätgens, J., Heinrich, J., Paczia, N., ... Noack, S. (2014). Beyond growth rate 0.6: What drives *Corynebacterium glutamicum* to higher growth rates in defined medium. *Biotechnology and Bioengineering*, *111(2)*, 359–371. <https://doi.org/10.1002/bit.25103>
- Utagawa, T. (2004). and Clinical Significance Production of Arginine by Fermentation 1. *Journal of Nutritions*, *134*, 2854–2857.
- Varaee, M., Honarvar, M., Eikani, M. H., Omidkhah, M. R., & Moraki, N. (2019). Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses. *The Journal of Supercritical Fluids*, *144*, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.007>
- Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, *28(19)*, 1515–1525. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. Springer US. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=Sq2VJ3D_QOwC
- Vobis, G. (2006). The Genus *Actinoplanes* and Related Genera. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (pp. 623–653). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_24
- Wade, L. (2011). Amino-acids, Peptides, and Proteins. In *Química orgànica - Vol. II* (p. 577). <https://doi.org/10.1039/9781847557261>

- Walker, V., & Mills, G. A. (1995). Quantitative methods for amino acid analysis in biological fluids. *Annals of Clinical Biochemistry*, 32(1), 28–57. <https://doi.org/10.1177/000456329503200103>
- Weiner, M., Albermann, C., Gottlieb, K., Sprenger, G. A., & Weuster-Botz, D. (2014). Fed-batch production of l-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 83, 62–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.12.001>
- Wendisch, V. (2017). Microbial Production of Amino Acid-Related Compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123, 127–141. <https://doi.org/10.1007/10>
- Wendt, J., & Izquierdo, J. (2002). *Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador*. Fundación REDBIO Internacional.
- Wittmann-Liebold, B., Salnikow, J., & Erdmann, V. (1986). *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). Berlin: Springer, Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-71534-1>
- Xu, S., Hao, N., Xu, L., Liu, Z., Yan, M., Li, Y., & Ouyang, P. (2015). Series fermentation production of ornithine and succinic acid from cane molasses by *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.017>
- Yokota, A., & Ikeda, M. (2017). *Amino Acids Fermentation*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1007/978-4-431-56520-8>
- Zahoor, A., Lindner, S. N., & Wendisch, V. F. (2012). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210004. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210004>
- Zapp, K.-H., Wostbrock, K.-H., Schäfer, M., Sato, K., Seiter, H., Zwick, W., ... Leiter, H. (2012). Ammonium Compounds. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 263–285. <https://doi.org/10.1002/14356007.a02>
- Zenova, G. M., & Zvyagintsev, D. G. (2002). Actinomycetes of the genus *Micromonospora* in meadow ecosystems. *Microbiology*, 71(5), 570–574. <https://doi.org/10.1023/A:1020562820639>
- Zhao, Z.-J., Zou, C., Zhu, Y.-X., Dai, J., Chen, S., Wu, D., ... Chen, J. (2011). Development of l-tryptophan production strains by defined genetic modification in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 1921–1929. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0978-8>

ANEXOS



Anexo 1. Salida de campo para extracción de muestras de suelo. A y B. Zona de la rizosfera, C. Muestras de suelo etiquetadas.

Anexo 2.

Datos técnicos de la zona Rizosfera – descomposición

| ACT-01: Descomposición árbol - Rizosfera / 11:41 am | |
|--|--|
| Cantidad de submuestras tomadas | 4 submuestras de 200 gr. |
| Profundidad | 10 cm |
| Ubicación GPS | 18 N 0177961, 0030580 (UTM) |
| Altura | 3028 m |
| pH | 5.97 |
| Temperatura | 11.6 °C |
| Observación | Se observo colonias de color blanco en la parte de la rizosfera del resto del árbol. |

Anexo 3.

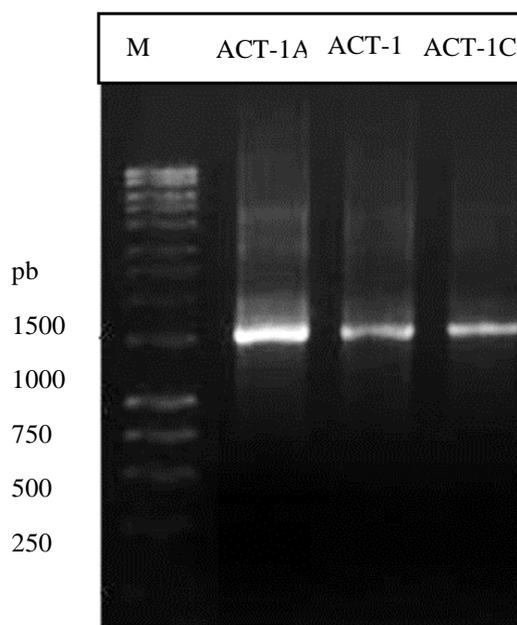
Datos técnicos de la zona matorral

| ACT-02: Matorral / 12:11 pm | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Cantidad de submuestras tomadas | 4 submuestras de 200 gr. |
| Profundidad | 10 cm |
| Ubicación GPS | 18 N 0177974, 0030580 (UTM) |
| pH | 5.75 |
| Temperatura | 11.6 °C |
| Observación | Se encontró gran número de piedras |

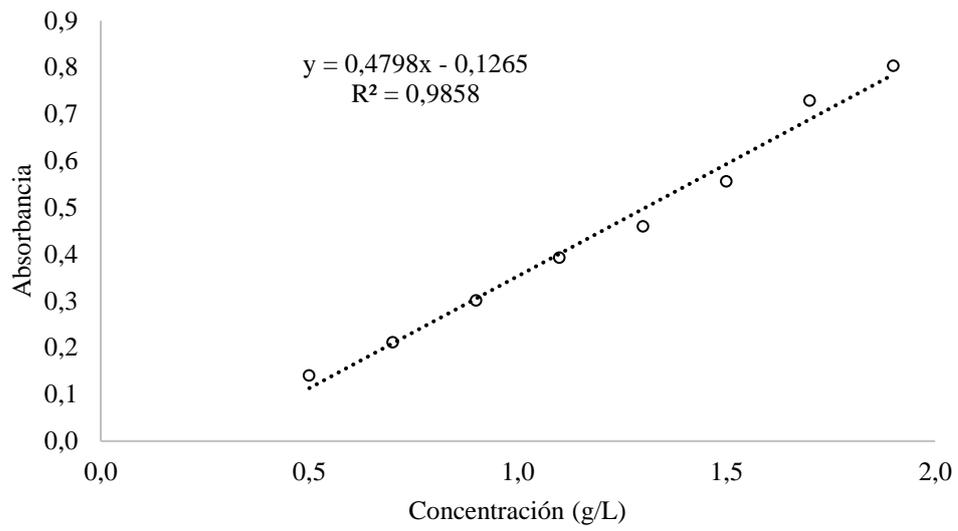
Anexo 4.

Datos técnicos de la zona raíces de arboles

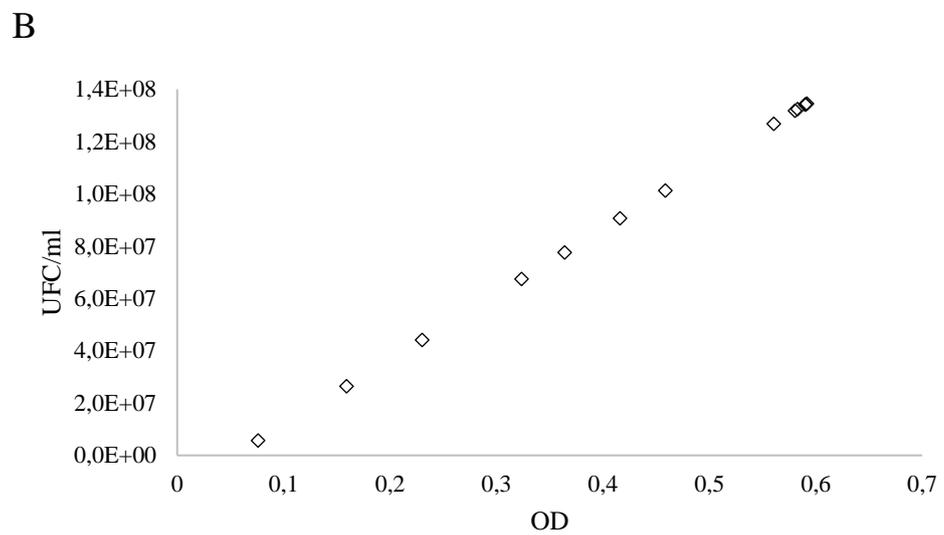
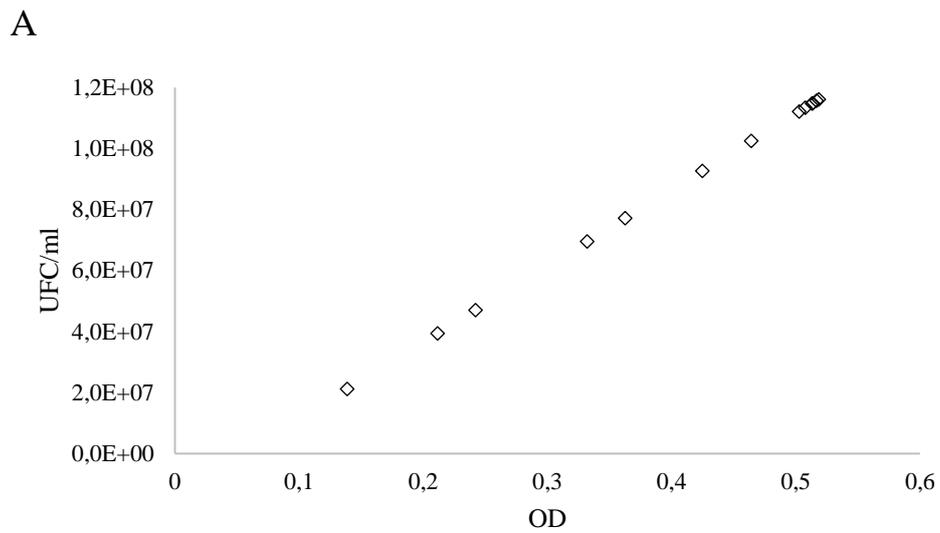
| ACT-03: Árbol / 13:06 pm | |
|---------------------------------|--------------------------|
| Cantidad de submuestras tomadas | 4 submuestras de 200 gr. |
| Profundidad | 10 cm |
| Ubicación GPS | 18 N 0177973, 0030573 |
| pH | 5.30 |
| Temperatura | 11,6 °C |
| Observación | |



Anexo 5. Visualización en gel de agarosa 2% de los tres amplicones de aproximadamente 1500 pb – 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases.



Anexo 6. Curva de calibración glucosa – Método DNS



Anexo 7. Cinética de crecimiento relacionando UFC y absorbancia 600 nm. A, ACT-1A - *Micromonospora sp.* B, ACT-1B - *Micromonospora sp.*

Anexo 8.

Esquema del análisis de la varianza como variable dependiente la concentración de aminoácidos.

| Variable dependiente: | Concentración de Aminoácido (g/l) | | |
|------------------------------|--|----------|-----------|
| Origen | Grados de libertad | F | Sig. P |
| Cepa | 1 | 2238.691 | 4.22 E-12 |
| Fuente_Carbono | 1 | 1235.051 | 6.04 E-11 |
| Fuente_Carbono * Cepa | 1 | 184.557 | 2.66 E-07 |
| Repetición | 3 | 0.457 | 0.719 |
| Error | 9 | | |
| Total, corregido | 15 | | |

a. R al cuadrado = 0.998 (R al cuadrado ajustada = 0.996)

Anexo 9.

Promedio de Rf de cada punto por cepa (ACT-1A y ACT-1B)

| Muestras /puntos | RF | | | |
|-------------------------|-----------------|--------------------|-----------|------------|
| | P1 | P2 | P3 | P4 |
| A1 | 0.33 | 0.44 | 0.55 | 0.72 |
| A2 | 0.32 | 0.44 | 0.55 | 0.73 |
| A3 | 0.33 | 0.44 | 0.55 | 0.72 |
| A4 | 0.31 | 0.43 | 0.56 | 0.71 |
| Promedio | 0.32 | 0.44 | 0.55 | 0.72 |
| DVS | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| Aminoácido | Ácido glutámico | Tirosina - prolina | Metionina | Isoleucina |
| B1 | 0.28 | 0.42 | 0.53 | 0.71 |
| B2 | 0.27 | 0.42 | 0.53 | 0.71 |
| B3 | 0.27 | 0.42 | 0.54 | 0.70 |
| B4 | 0.28 | 0.43 | 0.55 | 0.72 |
| Promedio | 0.27 | 0.43 | 0.54 | 0.71 |
| DVS | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Aminoácido | Serina-Glicina | Prolina-tirosina | Metionina | Isoleucina |