

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



**BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ENZIMAS**  
**HIDROLÍTICAS PROCEDENTES DE LA ZONA NORTE**

**INGENIERO/A EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR/A:**

**HERNÁNDEZ ORTIZ JORGE LUIS**

**DIRECTOR:**

**Ing. SANTIAGO ZARATE BACA. MSc.**

**Ibarra – Ecuador**  
**2023**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERIA EN

BIOTECNOLOGÍA

**“Bioprospección de actinomicetos productores de enzimas hidrolíticas procedentes de la Zona Norte”**

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

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADO:

MSc. Santiago Zarate  
**DIRECTOR**



FIRMA

MSc. Carla Sandoval  
**MIEMBRO TRIBUNAL**



FIRMA

PhD. Tania Sulca  
**MIEMBRO TRIBUNAL**



FIRMA



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

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

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

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

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1002691416		
APELLIDOS Y NOMBRES:	HERNANDEZ ORTIZ JORGE LUIS		
DIRECCIÓN:	13 DE ABRIL Y TULCAN		
EMAIL:	<a href="mailto:jlhernandez01@gmail.com">jlhernandez01@gmail.com</a>		
TELÉFONO FIJO:	062 546 021	TELÉFONO MÓVIL:	0998094361

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ENZIMAS HIDROLITICAS PRODECENDETES DE LA ZONA NORTE
AUTOR (ES):	HERNANDEZ ORTIZ JORGE LUIS
FECHA: DD/MM/AAAA	27/01/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
ASESOR /DIRECTOR:	ING. SANTIAGO ZARATE BACA, 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 la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 27 días del mes de enero del 2023

EL AUTOR:

HERNANDEZ ORTIZ JORGE LUIS

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi familia por el apoyo brindado a lo largo de todo el proceso de mi formación profesional.

A mi madre Pilar Ortiz, que con su sabiduría y esfuerzo me ha motivado durante todos estos años a ser un gran profesional y ser humano.

A mis hermanos Miguel, Kevin y Juan, que siempre estuvieron dispuesto a darme una mano cuando lo necesité y me acompañaron durante toda esta trayectoria.

A mi padre Osvaldo Hernández, que me enseñó el valor de la curiosidad e involucrarme en el mundo de la investigación.

A Katherine Brito, por ayudarme a mejorar como persona cada día. Además, por su incondicional apoyo y cariño durante más de 5 años.

A mis amigos por su compromiso conmigo demostrando amistad una sincera y sana donde siempre pude desenvolverme con naturalidad.

Agradezco especialmente a la Universidad Técnica del Norte y a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, al cuerpo docente por todo el conocimiento impartido que me ayudó a cumplir mis objetivos a nivel de formación académica.

Quisiera agradecer a mi tutor, el Magister Santiago Zárate, por los consejos, seguimiento y lecciones que impartió dentro y fuera del salón de clases que me inspiraron a elegir el camino de la ciencia y luchar por el mejoramiento del país. A mis asesores magister Carla Sandoval y la Doctora Tania Sulca por su tiempo, conocimiento y apreciaciones para mejorar mi trabajo de investigación

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	v
<b>1 RESUMEN</b> .....	x
<b>2 ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
2.1 Antecedentes.....	14
2.2 Planteamiento del problema .....	15
2.3 Justificación .....	16
2.4 Pregunta directriz.....	17
2.5 Objetivos.....	17
2.5.1 Objetivos General .....	17
2.5.2 Objetivos Específicos .....	17
2.6 Hipótesis .....	17
<b>CAPITULO II</b> .....	18
<b>3 MARCO TEÓRICO</b> .....	18
3.1 Bioprospección .....	18
3.2 Ecosistemas marinos.....	18
3.2.1 Manglares .....	19
3.2.2 Reserva Ecológica Manglares Cayapas Mataje.....	19
3.2.2.1 Valores de conservación.....	20
3.3 Actinomicetos .....	20
3.3.1 Generalidades .....	20
3.3.2 Hábitat .....	21
3.3.3 Productos obtenidos a partir de actinomicetos .....	22
3.3.4 Investigaciones sobre actinomicetos realizadas en Ecuador .....	24
3.4 Enzimas .....	24

3.4.1	Definición .....	24
3.4.2	Estructura enzimática .....	25
3.4.3	Clasificación y características generales .....	25
3.4.4	Enzima Amilasa.....	25
3.4.4.1	Método espectrofotométrico (DNS) de Miller .....	26
3.4.5	Enzima Ureasa.....	27
3.4.6	Enzima Caseinasa.....	28
3.4.7	Aplicaciones industriales de las enzimas.....	28
3.4.8	Producción de enzimas a partir de microorganismos .....	29
<b>CAPITULO III .....</b>		<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>31</b>
4.1	Caracterización del área de muestro .....	31
4.2	Descripción del área de experimental.....	32
4.3	Muestreo <i>in situ</i> .....	32
4.4	Aislamiento de cepas nativas.....	33
4.5	Identificación morfológica .....	34
4.6	Determinación de la actividad enzimática de los aislados .....	34
4.6.1	Producción de enzima ureasa .....	34
4.6.2	Producción de enzima amilasa .....	35
4.6.3	Producción de enzima caseinasa.....	35
4.6.4	Producción de enzima celulasa.....	35
4.7	Identificación molecular de las cepas .....	36
4.8	Determinación de la cinética de crecimiento.....	36
4.9	Obtención de extractos enzimáticos .....	37
4.9.1	Medios de cultivo para la producción de enzimas hidrolíticas.....	38
4.10	Evaluación del extracto enzimático .....	39
4.10.1	Extracto con enzima amilasa .....	39

4.10.2	Extracto con ureasas .....	39
4.10.3	Extracto con Caseinasas .....	39
4.11	Análisis estadístico .....	39
<b>CAPITULO IV</b> .....		41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	41
5.1	Aislamiento e identificación de actinomicetos procedentes de la rizósfera de manglares .....	41
5.2	Pruebas actividad enzimática.....	43
5.3	Identificación molecular .....	47
5.4	Cinética de crecimiento de las cepas EEMA (1), (2) y (4).....	49
5.5	Evaluación del extracto enzimático producto de la fermentación .....	50
5.5.1	Producción de amilasa .....	50
5.5.2	Producción de Ureasa .....	52
5.5.3	Producción de caseinasa .....	53
<b>CAPITULO V</b> .....		56
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	56
6.1	Conclusiones.....	56
6.2	Recomendaciones .....	57
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de Bioprospección y descubrimiento de un metabolito secundario .	18
Figura 2. Esquema hidrólisis de almidón por amilasa.....	26
Figura 3. Conversión azúcares reductores mediante DNS .....	27
Figura 4. Hidrólisis enzimática de la urea .....	28
Figura 5. Etapas de un proceso biotecnológico para la obtención de enzimas.....	30
Figura 6. Mapa de ubicación de la Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje, ciudad de San Lorenzo, provincia de Esmeraldas (zona de muestreo). .....	31
Figura 7. Obtención de muestras de la rizosfera de los manglares. (A) Puntos de muestreo cercanos al mangle disposición triangular. (B) obtención de la muestra por punción directa. ....	32
Figura 8. (A) Diluciones seriadas de la muestra de suelo hasta alcanzar la concentración de 10 <sup>-4</sup> . (B) Siembra por expansión en la superficie. ....	33
Figura 9. Bio-proceso para producción, recuperación y semi-purificación de enzimas producidas por actinomicetos. ....	38
Figura 10. Cepas aisladas de actinomicetos que presentan características típicas de este grupo como ramificación bacteriana (EEMA-1, EEMA-2, EEMA-3, EEMA-4, EEMA-5, EEMA-6) y aspecto de colonia sólida-seca (EEMA-1, EEMA-3, EEMA-4) y blanda (EEMA-2, EEMA-5, EEMA-6, EEMA-7, EEMA-8). ....	42
Figura 12. Actividad enzimática en pruebas rápidas para detectar hidrólisis del sustrato específico (A) almidón, (B) Urea y (C) Caseína durante un período de 48 a 72 horas..	45
Figura 13. Cinética de crecimiento de las cepas con mayor actividad enzimática.....	49
Figura 14. Evaluación de la hidrólisis de almidón por el método DNS de los reactores 1,2,3 y el microorganismo control.....	51
Figura 15. Evaluación de la hidrólisis de urea por formación halos (a) (mm) de las repeticiones (1,2,3) y el control positivo (c).....	52
Figura 16. Evaluación de la hidrólisis de caseína por formación halos (a) (mm) de las repeticiones (1,2,3) y el control positivo (c).....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas, forma de alimentación, requerimiento de oxígeno y encapsulamiento de esporas en actinomicetos.....	20
Tabla 2. Moléculas bioactivas producidas por actinomicetos (A) antibióticos, (B) antifúngicos, (C) Bio-herbicidas/plaguicidas, (D) antiparasitarios, (E) antivirales, (F) hipercolesterolemia, (G) antitumorales, (H) inmunoestimulantes, (I) inmunosupresores y (J) antitumoral.....	22
Tabla 3. Enzimas comerciales producidas por actinomicetos, condiciones de fermentación, sustrato específico y campo industrial de uso. ....	23
Tabla 4. Investigaciones sobre con microorganismos del filo actinomicetos realizadas en el Ecuador .....	24
Tabla 5. Clasificación enzimática general.....	25
Tabla 6. Uso industrial de las enzimas en las diferentes áreas.....	29
Tabla 7. Cepas control en las pruebas de actividad hidrolítica. ....	34
Tabla 8. Composición de los medios de cultivo para cada cepa según la producción enzimática presentada.....	38
Tabla 9. Coordenadas geográficas de los tres puntos de muestreo, Reserva Ecológica de Manglares Cayapas – Mataje.....	41
Tabla 10. Características microscópicas y macroscópicas de las colonias de los cultivos puros. ....	42
Tabla 11. Datos moleculares de las colonias aisladas con mayor actividad enzimática	48

## RESUMEN

La bioprospección es una búsqueda, clasificación e identificación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, enzimas y microorganismos con posibles usos benéficos para humanos, el medio ambiente o el progreso industrial. Esta indagación, está en constante desarrollo en los diversos tipos de ecosistemas del planeta contemplando entornos de agua dulce, matorrales, bosques, herbazales, desiertos y ambientes marinos. En esta investigación se caracterizó cepas productoras de enzimas hidrolíticas aislados de la Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje. Las muestras de sedimento fueron recolectadas a 5cm de profundidad de la rizósfera de manglares, con las cuales se realizó un proceso de recuento en placa. La capacidad de producción de enzimas de las cepas aisladas se evaluó por ensayos con medios de cultivo suplementados con urea, almidón, celulosa y caseína como sustratos específicos. Los cultivos con mayor actividad enzimática fueron inoculados en un biorreactor tipo batch de 100ml de volumen con un tiempo de operación de 96horas a 115rpm y  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar este período se obtuvo un extracto semi-purificado por centrifugación a 4500rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , filtrado y conservados en un tapón fosfato. La capacidad amilolítica se calculó por el método de azúcares reductores DNS a partir del sobrenadante. La presencia de ureasa y caseinasa en el extracto semi-purificado, se evaluó por halo de hidrólisis en placa (mm) donde se inoculó 10 $\mu\text{l}$  de extracto en discos de papel filtro. Las cepas se identificaron molecularmente a nivel de especie por el método SANGER amplificando la región rpoB. Se logró aislar ocho cepas por características morfológicas coloniales que fueron codificadas como EEMA (Ecuador, Esmeraldas, Manglar, Actinomiceto) que fueron identificados como bacilos Gram positivos. Se clasificaron en el filo actinomicetos por presentar formas de colonia lisa o rugosa, con aspecto seco o blando, con tonalidad blancas, gris o amarilla. De las ocho cepas siete exhibieron acción ureolítica, seis actividades amilolíticas, cinco degradaciones proteolíticas. Sin embargo, no se observaron casos de acción celulolítica. Por tanto, existe una correlación positiva entre la capacidad de producción de enzimas y los aislados de estuarios marinos.

De las ocho cepas, aquellas que presentaron mayor capacidad de hidrolizar urea, almidón y caseína fueron las cepas EEMA-1, EEMA-2 y EEMA-4 respectivamente. Los ensayos con el extracto enzimático recuperado del proceso de fermentación demostraron que no hay diferencias en la producción amilolítica de la cepa EEMA-1 y la actividad proteolítica de la cepa EEMA-4 con relación a la producida por la cepa control *B. subtilis 11714*. Sin embargo, los ensayos de ureasa parcialmente purificada post proceso fermentativo

presentaron diferencias entre la cepa EEMA-2 y la producida por *K. pneumoniae*. Los resultados demostraron que los sedimentos marinos de la Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje es una fuente de actinomicetos productores de enzimas hidrolíticas.

**Palabras claves: Actinomicetos, bioprospección, enzimas, hidrólisis, manglares.**

## ABSTRACT

Bioprospecting is a search, classification and identification of new sources of chemical compounds, genes, proteins, enzymes and microorganisms with possible beneficial uses for humans, the environment or industrial progress. This inquiry is in constant development in the various types of ecosystems on the planet, contemplating freshwater environments, scrublands, forests, grasslands, deserts, and marine environments. In this research, strains producing hydrolytic enzymes isolated from the Manglares Cayapas-Mataje Ecological Reserve were characterized. Sediment samples were collected at a depth of 5 cm from the mangrove rhizosphere, with which a plate count process was carried out. The enzyme-producing capacity of the isolates is evaluated by tests with culture media supplemented with urea, starch, cellulose, and casein as specific substrates. The cultures with the highest enzymatic activity were inoculated in a 100ml volume batch-type bioreactor with an operating time of 96 hours at 115rpm and  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ . At the end of this period, a semi-purified extract was obtained by centrifugation at 4500rpm for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ , filtered and stored in a phosphate plug. The amylolytic capacity is calculated by the DNS reducing sugar method from the supernatant. The presence of urease and caseinase in the semi-purified extract was evaluated by hydrolysis halo in a plate (mm) where 10 $\mu$ l of extract was inoculated on filter paper discs. The strains were molecularly identified at the species level by the SANGER method, amplifying the rpoB region. Eight isolates were modified by colonial morphological characteristics that were coded as EEMA (Ecuador, Esmeraldas, Manglar, Actinomycete) that were identified as Gram-positive bacilli. They are classified in the Actinomycetes phylum because they present smooth or rough colony forms, with a dry or soft appearance, with white, gray or yellow tones. Of the eight strains, seven exhibited ureolytic action, six amylolytic activities, and five proteolytic degradation. However, no cases of cellulolytic action were observed. Therefore, there is a positive confirmation between the enzyme production capacity and the isolates from marine estuaries.

Of the eight strains, those with the greatest capacity to hydrolyze urea, starch and casein were the EEMA-1, EEMA-2 and EEMA-4 strains, respectively. The tests with the enzymatic extract recovered from the fermentation process showed that there are no differences in the amylolytic production of the EEMA-1 strain and the proteolytic activity of the EEMA-4 strain in relation to that produced by the control strain *B. subtilis* 11714. However, the partially purified urease assays after the fermentative process showed differences between the EEMA-2 strain and the one produced by *K. pneumoniae*. The

results show that the marine sediments of the Manglares Cayapas-Mataje Ecological Reserve is a source of actinomycetes that produce hydrolytic enzymes.

**Keywords: Actinomycetes, bioprospecting, enzymes, hydrolysis, mangroves.**

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

### 2.1 Antecedentes

La Bioprospección, surge con el descubrimiento histórico de los fármacos obtenidos a partir de extractos de especies vegetales utilizadas en comunidades nativas originando la etnobotánica. Siendo el principio de la biotecnología como un mecanismo de investigación, exploración y descubrimiento de la biodiversidad contemplando organismo y microorganismos capaces de producir compuestos con aplicaciones farmacéutica, industriales y agropecuarias. Debido a la variedad de estímulos biótico y abióticos, los microorganismos desarrollaron capacidades internas para favorecer su prevalencia ante depredadores naturales, competencia por recursos y las alteraciones fisicoquímicas de los diferentes ecosistemas (Cooper, 2005; Noriler et al., 2018).

El medio marino alberga millones de especies de microorganismos que desempeñan varios roles importantes como la mineralización de materia orgánica compleja, la degradación desde plancton, plantas, animales, hasta contaminantes tóxicos. Además, existen gran cantidad de hábitats y nichos inexplorados que han atraído a los investigadores en los últimos años como un posible fuente de microorganismos con utilidad en varios campos (Saravanakumar et al., 2016).

Los manglares son un tipo de ecosistema intermareal que presentan condiciones propias como un elevado índice de materia orgánica, humedad y salinidad con un bajo contenido de oxígeno. Debido a que las condiciones del suelo del manglar son extremadamente diferentes de las condiciones terrestres, los microorganismos presentan características adaptativas distintivas y poseen la capacidad potencial de producir nuevos metabolitos bioactivos (Hong et al., 2009; F. Li et al., 2019; Saravanakumar et al., 2016).

Dentro de la gran variedad de microorganismos existentes en los estuarios marinos, los actinomicetos son bacterias heterótrofos y aerobios que se encuentran taxonómicamente descritos dentro del filo Actinobacteria, clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, orden Actinomycetales que actualmente consta de 10 subórdenes, más de 30 familias y por encima de los 160 géneros. Siendo un grupo tan extenso se encuentran ampliamente distribuidos en los ecosistemas naturales de todo el mundo (Charousová et al., 2017; Chavan & Mulaje, 2013).

En un principio los actinomicetos fueron aislados de fuentes terrestres y evaluados por su capacidad de secretar productos como vitaminas, antibióticos, enzimas,

fermentaciones alcohólicas entre otros compuestos de amplio uso y alto valor comercial en la agricultura, medicina y productos naturales ampliamente utilizados en la industria farmacéutica (Genilloud, 2017; Mayanglambam et al., 2020; Saravanakumar et al., 2016).

Las investigaciones realizadas con actinomicetos se centran en la diversidad química de los compuestos que son capaces de producir. Además, se han desarrollado investigaciones que abarcan estrategias innovadoras para aislar especies previamente no cultivadas, herramientas de detección analítica y de duplicación in situ para compuestos.

## **2.2 Planteamiento del problema**

Según la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual OMPI (2019), las investigaciones relacionadas con el potencial biotecnológico de cepas nativas acuáticas y terrestres del Ecuador son escasas. Esta situación, sitúa al país en el puesto 97 dentro del índice mundial de innovación y generación de conocimientos.

A pesar de ser un país con gran biodiversidad y uno de los más grandes productores agrícolas de la región, muchos procesos productivos están basados en los métodos convencionales. Por otra parte, la industria a nivel nacional se encuentra en un constante proceso de transición bajo la premisa de cumplir con los requerimientos ambientales, sin disminuir su capacidad productiva estos procesos involucran gran cantidad de compuestos químicos, biológicos, enzimas y maquinaria que son importados desde otros países (Morocho et al., 2018).

En la provincia de Esmeraldas, la acuicultura y la agricultura son las principales actividades que son desarrolladas con un modelo de producción lineal con la generación de productos a partir de materias primas que originan un conjunto de residuos (Vergara & Sánchez, 2022).

A nivel mundial existen nuevas metodologías con un mejor rendimiento para la producción de enzimas, donde casi el 75% de las enzimas son producidas por 3 enzimas principales Novozymes, DuPont y Roche, debido a su avance en la manipulación genética, diseño experimental y técnicas de moleculares. En Ecuador, esta es un área con bajo nivel de investigación y desarrollo. Debido a que la producción local es insuficiente muchas empresas se ven obligadas a importar enzimas, lo que genera costos fijos anuales y un aumento en el valor del producto dentro del mercado (Malla & Ochoa, 2018).

### 2.3 Justificación

El Ecuador posee condiciones de suelo y cuerpos de agua que forman ecosistemas peculiares resultado de las prolongadas estaciones anuales y la variedad climatológica que convierte al país en el territorio con mayor biodiversidad de la región. Estos ambientes albergan microorganismos únicos con características especiales capaces de producir moléculas bioactivas con propiedades específicas que no han sido estudiadas. Particularmente en la zona norte, las investigaciones realizadas con respecto al componente microbiológico de los estuarios marítimos centran en su utilización como factor de descomposición en compostaje, probiótico y como agentes antagónicos de bacterias y hongos de importancia agroindustrial, ignorando su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas (Bejarano, 2013; F. Li et al., 2019).

En el cantón de San Lorenzo, se localiza parte de la Reserva Ecológica de Manglares Cayapas-Mataje, compuesta por un porcentaje de bosques húmedos tropicales de tierra firme y entornos productivos. De hecho, se sabe que los manglares existentes en la reserva son biotopos, con tolerancia al agua dulce y salada que poseen grandes depósitos microbianos desconocidos. Existen en la actualidad referencias sobre la presencia de actinomicetos en la rizosfera de los manglares capaces de ser introducidos al laboratorio para ser estudiados y documentar la producción de compuestos funcionales, pero en el país este tipo de investigaciones son limitadas (F. Li et al., 2019; Pernía et al., 2019; Zhao et al., 2016).

Por esto, cada vez más evidente que los hábitats con baja o nula exploración como ecosistemas desérticos y marinos podrían ser fuente de actinomicetos aún desconocidos con la capacidad de generar moléculas bioactivas. Debido a que el uso de los catalizadores de origen natural tienen ventajas potenciales como mayor resistencia a los procesos de desnaturalización por pH, concentración salina y temperatura (Gurung et al., 2013).

Debido a las características físico químicas del suelo de los manglares, los microorganismos, especialmente los actinomicetos tienen características adaptativas distintas y el potencial de producir nuevos metabolitos como enzimas hidrolíticas de importancia como amilasas, lipasas, celulasas y proteasas (F. Li et al., 2019).

En los últimos años la biotecnología ha experimentado grandes avances destacando el cultivo de células y la producción de gran variedad de metabolitos primarios y secundarios. Entre estos compuestos se encuentran las enzimas hidrolíticas que son ampliamente utilizadas en diagnósticos médicos, procesos agroindustriales, asimilación y degradación de nutrientes. En la producción nacional, estas enzimas son ampliamente

utilizadas en la industrial textil, alimentaria, papelera, cosmética, biotecnológica y en el área médica (Malla & Ochoa, 2018).

## **2.4 Pregunta directriz**

¿Las cepas de actinomicetos aisladas de la rizósfera de los manglares de la Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje son capaces de producir enzimas hidrolíticas que tengan potencial en la industria?

## **2.5 Objetivos**

### **2.5.1 Objetivos General**

- Identificar cepas nativas de actinomicetos productores de enzimas hidrolíticas procedentes de la Zona Norte.

### **2.5.2 Objetivos Específicos**

- Aislar cepas de actinomicetos procedentes de la rizosfera de manglares.
- Caracterizar molecularmente las cepas de actinomicetos previamente aisladas.
- Evaluar la actividad hidrolítica del extracto enzimático provenientes de las cepas en sustratos específicos.

## **2.6 Hipótesis**

Es posible producir y purificar parcialmente enzimas hidrolíticas secretadas por cepas nativas aisladas de la rizósfera de los manglares.

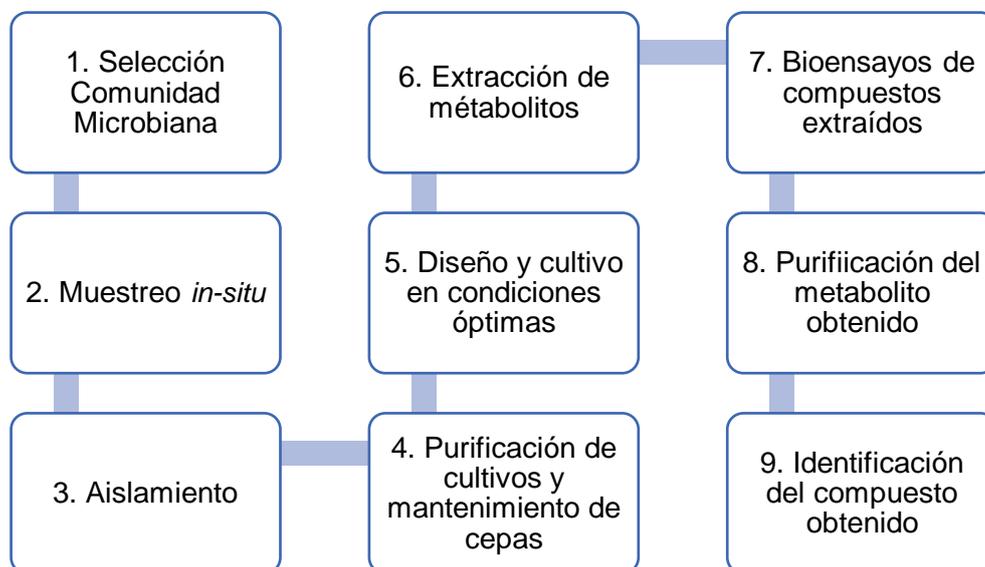
## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Bioprospección

La bioprospección se define como la investigación, clasificación, análisis e identificación de la biodiversidad para detectar la capacidad individual de los organismos para producir compuestos de interés en condiciones naturales. Además, se entiende como la utilización de recursos químicos, genéticos y moléculas bio-activas con valor comercial con posibles usos benéficos para el ser humano, el medio ambiente, el desarrollo industrial y el avance científico (Beattie et al., 2011; Maghembe et al., 2020; Saravanakumar et al., 2016).

La bioprospección busca transferir microorganismos de sus hábitats naturales a placas de laboratorio y biorreactores en un intento de imitar el entorno natural para producir compuestos de interés (Figura1). Este proceso se centra en condiciones como la intensidad de luz, el uso de medios de cultivos selectivos, la optimización de condiciones, eventualmente la caracterización molecular del microorganismo y la determinación de un perfil químico del metabolito obtenido (Maghembe et al., 2020).



**Figura 1.** Proceso de Bioprospección y descubrimiento de un metabolito secundario

#### 3.2 Ecosistemas marinos

Los ecosistemas se definen como un conjunto de comunidades de organismos y el entorno físico, químico y geológico que permiten el crecimiento de distintas especies que

evolucionaron conjuntamente al entorno particular durante largos períodos. En términos generales, sistemas abiertos con límites menos definidos que los ecosistemas terrestres y una mayor variedad de divisiones taxonómicas que están influenciados por las corrientes, las estaciones, temperatura del agua, ambiental, salinidad, pH y otros procesos oceanográficos a las comunidades microbianas están expuestas e intervienen en su desarrollo y recuperación. Entre los ecosistemas acuáticos salinos se pueden identificar los mares, océanos, marismas, arrecifes de coral, manglares, estuarios y lagunas costeras (Grassle, 2013; Rao et al., 2017).

### **3.2.1 Manglares**

Los manglares se encuentran entre los ecosistemas más productivos del mundo. Concentran una comunidad única de plantas leñosas, que habitan en zonas tropicales y subtropicales de las regiones costeras. Los manglares producen compuestos forestales comerciales, respaldan la pesca costera y protegen las costas. Por condiciones a las que están expuestos como alta concentración salina, fuertes vientos, mareas extremas, altas temperaturas y suelos fangosos proporcionan un hábitat que alberga amplia gama de especies de vida silvestres (Azman et al., 2015).

Las características físicas de los manglares los ayudan a la supervivencia en zonas limítrofes entre el océano y la tierra. Estos poseen una adaptación para tener una fijación mecánica en suelos disueltos. Además, los mecanismos de dispersión especializados con raíces respiratorias que sirven como fuente de intercambio de aire para disminuir los efectos del estrés salino (Azman et al., 2015; Z. K. Jiang et al., 2018).

### **3.2.2 Reserva Ecológica Manglares Cayapas Mataje**

La Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje (REMACAM) fue declarada sitio Ramsar por la UNESCO en el año 2003 y creada bajo la resolución N° 052/DE, Registro Oficial N° 822 del 15 de noviembre de 1995. La reserva se encuentra localizada en la zona norte del país, en la provincia de Esmeraldas y comprende los cantones San Lorenzo (parroquias Palma Real, Mataje y Tambillo) y Eloy Alfaro (parroquias Valdez, Pamapanal de Bolívar y La Tola). Actualmente la reserva abarca una superficie aproximada de 51300 hectáreas con más de 49000 manglares con conexiones a la parte baja de las cuencas de los ríos Cayapas y Mataje entre el océano pacífico, hacia el oeste y la frontera con Colombia, al norte. En esta área existe un total de 26 comunidades afro emeraldeñas que habitan dentro de la reserva (Gunther et al., 2008).

### 3.2.2.1 Valores de conservación

La definición de valores de conservación del área protegida se encuentra enfocada en valores naturales y culturales. Son los principales elementos y fueron clasificados en usos extractivos y no extractivos. Estos valores de conservación dan un marco general para el planteamiento de acciones estratégicas y operativas que están reflejadas en los programas de manejo y planificaciones anuales operativas. Entre los valores de conservación se describe una amplia gama de fauna como anfibios, crustáceos, mamíferos, peces, aves y réptiles y flora única como manglares rojo, negro, blanco, botón y pava (Gunther et al., 2008).

## 3.3 Actinomicetos

### 3.3.1 Generalidades

Los actinomicetos son bacterias filamentosas Gram positivas, que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Son microorganismos con propiedades quitinolíticas, alto contenido de guanina y citosina en su ADN. Estas características los hacen morfológicamente diversos entre sí y los diferencia de otras bacterias Gram positivas (Y. Jiang et al., 2016).

Debido a su amplia distribución, se pueden encontrar en superficies rocosas y en suelo rizosférico. Además, están presentes en superficies de humus, hojarasca, estiércol y sedimentos marinos. La mayoría de las especies son heterótrofas, aerobios, mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25°C y 30°C y son poco tolerantes a la acidez, razón por la cual requieren pH neutro para su óptimo crecimiento, aunque crecen en un rango de pH entre 5.0 y 9.0. Su diversidad se sintetiza en géneros y características generales de actinomicetos como se muestra en la tabla 1 (Chavan & Mulaje V, 2013).

**Tabla 1.** Características morfológicas, forma de alimentación, requerimiento de oxígeno y encapsulamiento de esporas en actinomicetos

Género	Características
<i>Nocardioform</i> actinomicetos	-Aeróbico. -Ácido-alcohol resistente. -Morfología de bastoncillos, cocos y filamentos ramificados o forman micelio aéreo que se fragmenta. -Pared quimiotipo IV. -Contienen ácidos micólicos.

Actinomicetos con esporangios multiloculares	-Aerobio a anaeróbico facultativo. -El micelio se divide en todos los planos, sin hifas aéreas. -Pared quimiotipo III.
<i>Actinoplanes</i>	-Las esporas pueden estar encerradas dentro de vesículas. - Sin micelio aéreo -Pared quimiotipo II. -Los hidrolizados de organismos completos contienen arabinosa y xilosa.
<i>Streptomyces</i> y géneros relacionados	-Actinomicetos con esporulación aerobios -Forman colonias extensamente ramificado -Micelio aéreo. -Pared quimiotipo I.
<i>Thermomonospora</i> y géneros relacionados	-Actinomicetos con esporulación aerobios. -Forman colonias extensamente ramificado. -Micelio aéreo. -Pared quimiotipo de pared III.
<i>Termoactinomicetos</i>	-Los filamentos estables producen un crecimiento aéreo. -Se forman esporas individuales (endosporas) en los filamentos aéreos y vegetativos. -Todas las especies son termofílicas. -La pared celular contiene meso-DAP pero no aminoácidos ni azúcares característicos.

---

(Chavan & Mulaje V, 2013).

### 3.3.2 Hábitat

Los actinomicetos son bacterias que habitan en el medio ambiente en ecosistemas terrestres, marinos y de agua dulce. Además, forman parte en la rotación de materiales orgánicos. Los actinomicetos han desarrollado procesos de simbiosis con plantas, hongos, insectos y animales donde la mayoría de las interacciones entre estos actinomicetos y el hospedero son beneficiosas. Por lo que los productos naturales producido por los actinomicetos puede proteger al hospedador de patógenos o plagas, incluso degradar enzimáticamente polímeros naturales resistentes como la fibra de madera (van der Meij et al., 2017).

Estas bacterias suelen formar pequeñas fracciones de flora bacteriana en zonas marinas, que son un recurso excepcional y fascinante para la innovación. Estos microorganismos son productores de bio-activos nuevos y potentes que están presentes principalmente en sedimentos marinos desde 5 cm de profundidad en costas hasta 4290 metros en el océano (Chavan & Mulaje V, 2013; Deepa et al., 2013).

### 3.3.3 Productos obtenidos a partir de actinomicetos

Las diversas aplicaciones en la biotecnología de los actinomicetos es el resultado de su variedad metabólica y su relación con el medio ambiente. Como se muestra en la Tabla 2, entre los productos se encuentran antibióticos (antraciclinas, aminoglucósidos, beta lactánticos, cloranfenicol, tetraciclinas, nucleósidos y péptidos), antimicóticos, herbicidas, inmuno-modificadores y biosurfactantes (Hong et al., 2009b; Leon et al., 2007).

**Tabla 2.** Moléculas bioactivas producidas por actinomicetos

<b>A. Productores de agentes antibacterianos</b>			
Especie	Antibiótico	Especie	Antibiótico
<i>Verrucospora spp.</i>	abisomicina	<i>S. roseosporus</i>	Daptomicina
<i>S. anulatus</i>	actinomicina	<i>S. erythraea</i>	Eritromicina
<i>S. canus</i>	anfomicina	<i>M. purpúrea</i>	Gentamicina
<b>B. Productores de agentes antifúngicos</b>			
Especie	Antifúngicos	Especie	Antifúngicos
<i>S. anulatus</i>	actinomicinas	<i>S. galbus</i>	galbonólidos
<i>S. nodosus</i>	Anfotericina B	<i>S. violaceusniger</i>	guanidilfungina
<i>S. padanus</i>	fungicromina	<i>S. venezuelae</i>	Jadomicina
<b>C. Productores de bioherbicidas y bioplaguicidas</b>			
Especie	Bioherbicidas	Especie	Bioplaguicidas
<i>Actinomadura spp.</i>	Viraloze	<i>S. avermitilis</i>	prasinones
<i>S. hygrosopicus</i>	Ivermectina	<i>S. prasinus</i>	Spinosad insecticidas
<b>D. Productores de agentes antiparasitarios</b>			
Especie	Antiparasitario	Especie	Antiparasitario
<i>S. avermitilis</i>	Avermectinas	<i>S. coelicolor</i>	Prodiginina
<b>E. Productores de agentes antivirales</b>			
Especie	Antiviral	Especie	Antiviral
<i>S. hygrosopicus</i>	higromicina	<i>S. hygrosopicus</i>	Higromicina

**Tabla 3.** Moléculas bioactivas producidas por actinomicetos

<b>F. Productores de agentes de hipercolesterolemia</b>			
Especie	Agente hipercolesterol	Especie	hipercolesterol
<i>S. hygrosopicus</i>	rapamicina		
<b>G. Productores de agentes antitumorales</b>			
Especie	Antitumoral	Especie	Antitumoral
<i>Micromonospora spp.</i>	antraquinonas	<i>Micromonospora spp.</i>	Diazepinomicina
<i>Nocardia asteroides</i>	asterobactina	<i>Actinomadura spp.</i>	IB-00208
<i>S. spp.</i>	borrelidina	<i>Micromonospora spp.</i>	complejo LL-E33288

<b>H. Productores de agentes inmunoestimulantes</b>			
Especie	inmunoestimulantes	Especie	inmunoestimulantes
<i>Nocardia rubra</i>	rubratina	<i>S. olivoreticuli</i>	Bestatina

<b>I. Productores de agentes inmunosupresores</b>			
Especie	inmunosupresor	Especie	inmunosupresor
<i>S. filipinensis</i>	higromicina	<i>S. filipinensis</i>	Pentalenolactona

<b>J. Productores de enzimas terapéuticas (antitumorales)</b>			
Especie	Enzima	Especie	Enzima
<i>S. olivochromogenes</i>	l-glutaminasa	<i>S. spp.</i>	l-asparaginasa

*Streptomyces* = *S.*

Adaptado de (Barka et al., 2016)

Como se muestra en la tabla 3, existen diversos tipos de enzimas obtenidas a partir de actinomicetos que son utilizadas en la industria tanto textil, farmacéutica, alimenticia y veterinaria (Hong et al., 2009; Leon et al., 2007)

**Tabla 4.** Enzimas comerciales producidas por actinomicetos, condiciones de fermentación, sustrato específico y campo industrial de uso.

<b>Enzima</b>	<b>Actinomiceto</b>	<b>pH</b>	<b>T</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Industria</b>
Celulosa	<i>Streptomyces ruber</i>	6	37°C	Carboximetil celulosa	Textil
	<i>Thermobifida halotolerans</i>	7	45°C		Papelera
	<i>Actinoplanes philippinensis</i>	6.5	37°C		Detergente
Proteasa	<i>Streptomyces pactum</i>	7.5	40°C	Caseína	Farmacéutica
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6.5	65°C	Queratina	Textil
	<i>Nocardia spp.</i>	7.5	40°C	Caseína	Detergente Alimentaria
Queratinasa	<i>Actinomadura keratinilytica</i>	10	70°C	Queratina	Textil
Amilasa	<i>Streptomyces erumpens</i>	9	45°C	Almidón	Textil
	<i>Thermobifida fusca</i>	6	60°C	Almidón	Papelera Detergente
Xilinasas	<i>Microbiospora spp.</i>	9	50°C	xilosa	Alimentaria
	<i>Streptomyces spp.</i>	9	50°C	xilosa	animal
Lipasa	<i>Actinomadura sp</i>	4	70°C	xilosa	Papelera
	<i>Streptomyces exfoliates</i>	6	37°C	Triglicéridos	Papelera
	<i>Nocardiopsis alba</i>	7	30°C	Triglicéridos	Cosmética Detergentes
Pectinasa	<i>Streptomyces lydicus</i>	6.5	45°C	Ácido poligalacturónico	Alimentaria Textil

Procedente de (Mukhtar, 2017).

### 3.3.4 Investigaciones sobre actinomicetos realizadas en Ecuador

En el Ecuador, los actinomicetos han sido estudiados en investigaciones como se muestra en la Tabla 4. El estudio científico de estas bacterias a nivel se basa en el aislamiento, caracterización y la evaluación de estos microorganismos como productores de aminoácidos, antimicóticos y antibióticos. Además de su efectividad contra fito patógenos y bacterias clínicas (Conde, 2015; Rivera, 2021; Rubio, 2021; Salazar, 2019)

**Tabla 5.** Investigaciones sobre con microorganismos del filo actinomicetos realizadas en el Ecuador

Tema	Actinomicetos	Referencia
Aislamiento y caracterización de actinomicetos recolectados en ambientes marinos y su potencial antimicrobiano	<i>Micromonospora</i>	Conde L., 2015- Loja
Caracterización de los principales grupos de microorganismos en el suelo volcánico de la Zona Andina del Ecuador.	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> ,	Tamayo P., 2021-Quito
Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador	<i>Streptomyces sp.</i>	Egas C., 2016- Quito
Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Pichincha por su grado de antagonismo a <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn, mediante ensayos in vitro	No identificado molecularmente, (características macroscópicas de actinomicetos)	Salazar P., 2019- Sangolquí
Bioprospección de microorganismos sintetizadores de aminoácidos, nativos de la Zona Norte	<i>Micromonospora sp.</i> <i>Paenibacillus sp.</i>	Rubio J., 2020-Ibarra

## 3.4 Enzimas

### 3.4.1 Definición

Las enzimas son catalizadores biológicos que tienen la capacidad de acelerar las reacciones bioquímicas en los organismos vivos o en la naturaleza. Pueden ser extraídos de las células y utilizarse para catalizar una amplia gama de procesos de importancia comercial. Poseen una especificidad notable para la conversión de un solo tipo de molécula y por esta cualidad son utilizadas a nivel industrial. Las aplicaciones más frecuentes se encuentran en detergentes en polvo y diversos productos de limpieza. Sin embargo, también juegan un papel clave en dispositivos analíticos y ensayos que tienen aplicaciones biotecnológicas, clínicas, forenses y medioambientales (Robinson, 2015).

### 3.4.2 Estructura enzimática

Las enzimas son proteínas globulares de tamaño variable que van desde los 100 hasta más de 2000 residuos de aminoácidos. Estos pueden organizarse como una o más cadenas polipeptídicas que se pliegan para formar una estructura tridimensional específica. Las enzimas contienen una pequeña área denominada sitio activo que le permite al sustrato unirse al coincidir la forma y carga del sitio (Cuesta et al., 2015; Robinson, 2015).

### 3.4.3 Clasificación y características generales

La creciente acumulación de grandes cantidades de datos enzimáticos, las diversas reacciones bioquímicas, cinética enzimática, estructuras cristalográficas e interpretaciones mecanicista, han dado como resultado la generación de la nomenclatura y clasificación enzimática (Cuesta et al., 2015).

El primer nivel corresponde a 6 clases distintas según el tipo de reacción química que estén realizando como se muestra en la tabla 5. Estas se dividen en subclases de segundo y tercer nivel según criterios como enlace químico, centro de reacción, grupo químico transferido, y cofactor de catálisis (Chavan & Mulaje V, 2013; Cuesta et al., 2015; Robinson, 2015).

**Tabla 6.** Clasificación enzimática general.

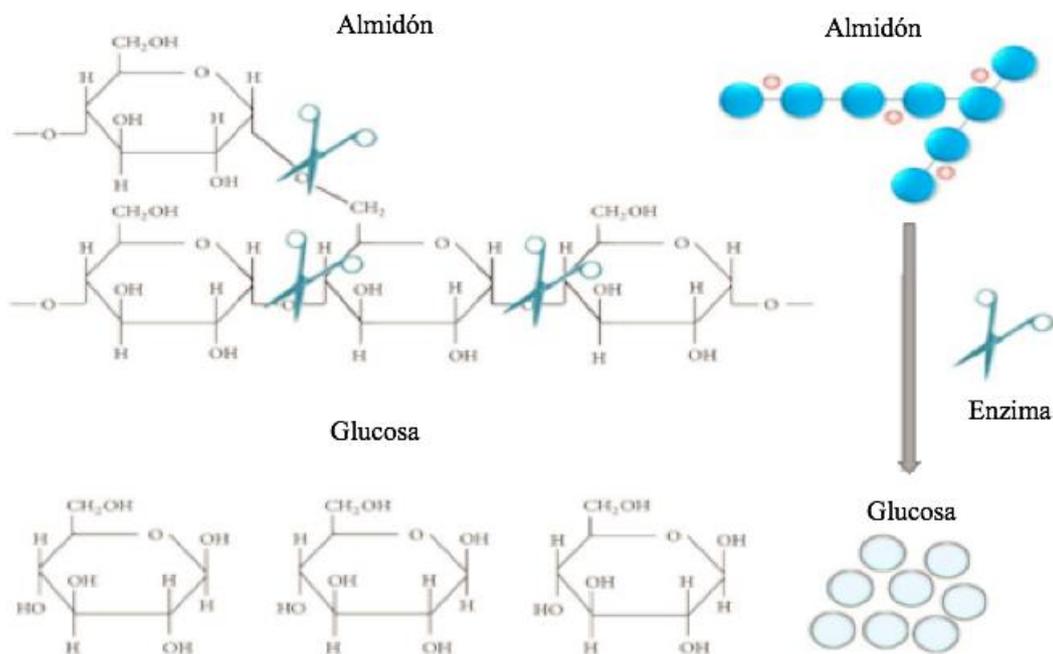
Clase	Enzima	Tipo de Reacción
1.	Oxido-reductasas	Oxidación- Reducción
2.	Transferasas	Transferencia de átomos/grupo
3.	Hidrolasas	Hidrólisis
4.	Liasas	Eliminación de grupos
5.	Isomerasas	Isomerización
6.	Ligasas	Unión de moléculas ligadas a la rotura de enlace pirofosfato

Procedente de (Robinson, 2015)

### 3.4.4 Enzima Amilasa

La amilasa es una enzima digestiva que cumple la función principal de hidrolizar los enlaces glucosídicos 1-4 en las moléculas de almidón convirtiendo los carbohidratos complejos en azúcares simples. Existen tres principales clases de enzimas amilasa alfa, beta y gamma y cada una actúa en diferentes partes de la molécula de carbohidrato. La alfa amilasa se puede encontrar en humanos, animales plantas y microorganismo. Todas las  $\alpha$ -amilasas actúan sobre el almidón (polisacárido) como sustrato principal y producen pequeñas unidades de glucosa y maltosa (figura 2). El almidón se compone de dos

polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, que comprenden moléculas de glucosa que están conectadas por enlaces glucosídicos. Ambos polímeros tienen diferentes estructuras y propiedades. Un polímero lineal de amilasa tiene un máximo de 6000 unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, mientras que la amilopectina se compone de cadenas unidas a  $\alpha$ -1,4 de 10 a 60 unidades de glucosa con un lado unido a  $\alpha$ -1,6. La beta amilasa predomina en microbios y plantas, mientras que la gamma amilasa se encuentra en plantas y animales. Los sustratos específicos están ampliamente distribuidos en fuentes vegetales baratas, lo que hace que las aplicaciones potenciales de la enzima sean más abundantes en términos de costos (Akinfemiwa & Muniraj, 2021; Gopinath et al., 2017)



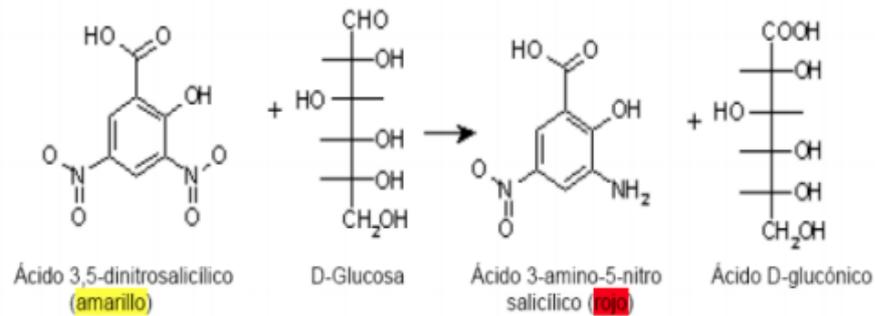
**Figura 2.** Esquema hidrólisis de almidón por amilasa.

Recuperado de (Gopinath et al., 2017)

#### 3.4.4.1 Método espectrofotométrico (DNS) de Miller

El método de ácido 3,5 dinitrosalicílico DNS MILLER, es una técnica colorimétrica que emplea una reacción redox que ocurre entre el ácido 3,5 dinitrosalicílico y los azúcares reductores presentes en la muestra. La valoración del método se realiza por espectro fotométrica a 540nm de los azúcares reductores. El método se basa

principalmente en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Figura 3). Este proceso es aplicable a todos los sistemas de cultivos de medios líquidos y sólidos cuya molécula de sustrato sean azúcares reductores como glucosa, xilosa, entre otros. La coloración final desarrollada es estable durante 24 horas, sensible y adaptable durante la manipulación de un gran número de muestras a la vez (Díaz, 2020)

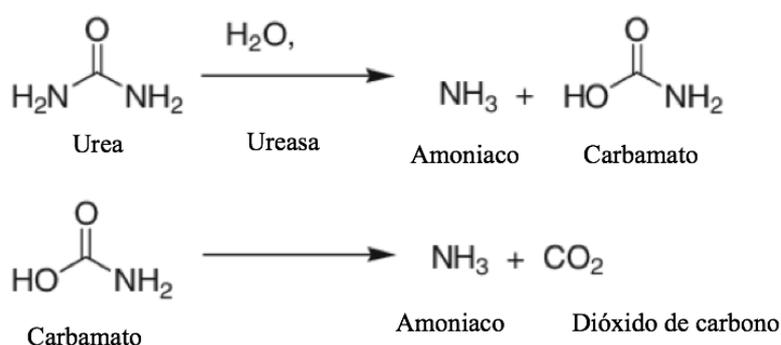


**Figura 3.** Conversión azúcares reductores mediante DNS

Recuperado de (Díaz, 2020)

### 3.4.5 Enzima Ureasa

La ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de la urea. Fue la primera enzima en cristalizarse en 1926 y la primera proteína enzimática en la que se observó iones de níquel. La ureasa desarrolla un papel en la circulación de los compuestos nitrogenados disponibles en el medioambiente. Además, se ha demostrado como factor de virulencia esencial en diversas enfermedades. Como se muestra en la Figura 4, la hidrólisis de la urea es un proceso donde aparece una molécula de amoníaco y una molécula de carbonato. En solución de agua, el carbonato se convierte espontáneamente en una segunda molécula de amoníaco y ácido carbónico y como resultado da un aumento en el pH (Konieczna et al., 2013; Mekonnen et al., 2021).



**Figura 4.** Hidrólisis enzimática de la urea

Adaptado de (Berlicki et al., 2012)

La hidrólisis de la urea es una de las características más útiles en la identificación de bacterias. En algunas infecciones causadas por microbios, la detección de esta actividad es esencial para el diagnóstico de enfermedad (Mohamed et al., 2019).

### 3.4.6 Enzima Caseinasa

La caseína es la principal fuente de proteína de la leche constituye aproximadamente el 90% de su composición de alto valor nutricional. La hidrólisis enzimática es un método comúnmente utilizado en la modificación de la estructura de las proteínas con el fin de mejorar las propiedades funcionales de las proteínas. La caseinasa, es una exo nzima natural secretada por varias bacterias, que hidrolizan la proteína y la convierten una forma soluble biológicamente activa (Hussein et al., 2020; Wang et al., 2013)

### 3.4.7 Aplicaciones industriales de las enzimas

Las enzimas son una de las biomoléculas más importantes que tiene una amplia gama de aplicaciones tanto en el campo industrial como en el biomédico (Tabla 6). Con el crecimiento de la población y el aumento de la necesidad de obtención de productos en menor tiempo. Las enzimas parecen ser una de las moléculas más importantes ya que tienen un gran impacto en sectores como el lácteo, industrial, agrícola o médico (Gurung et al., 2013).

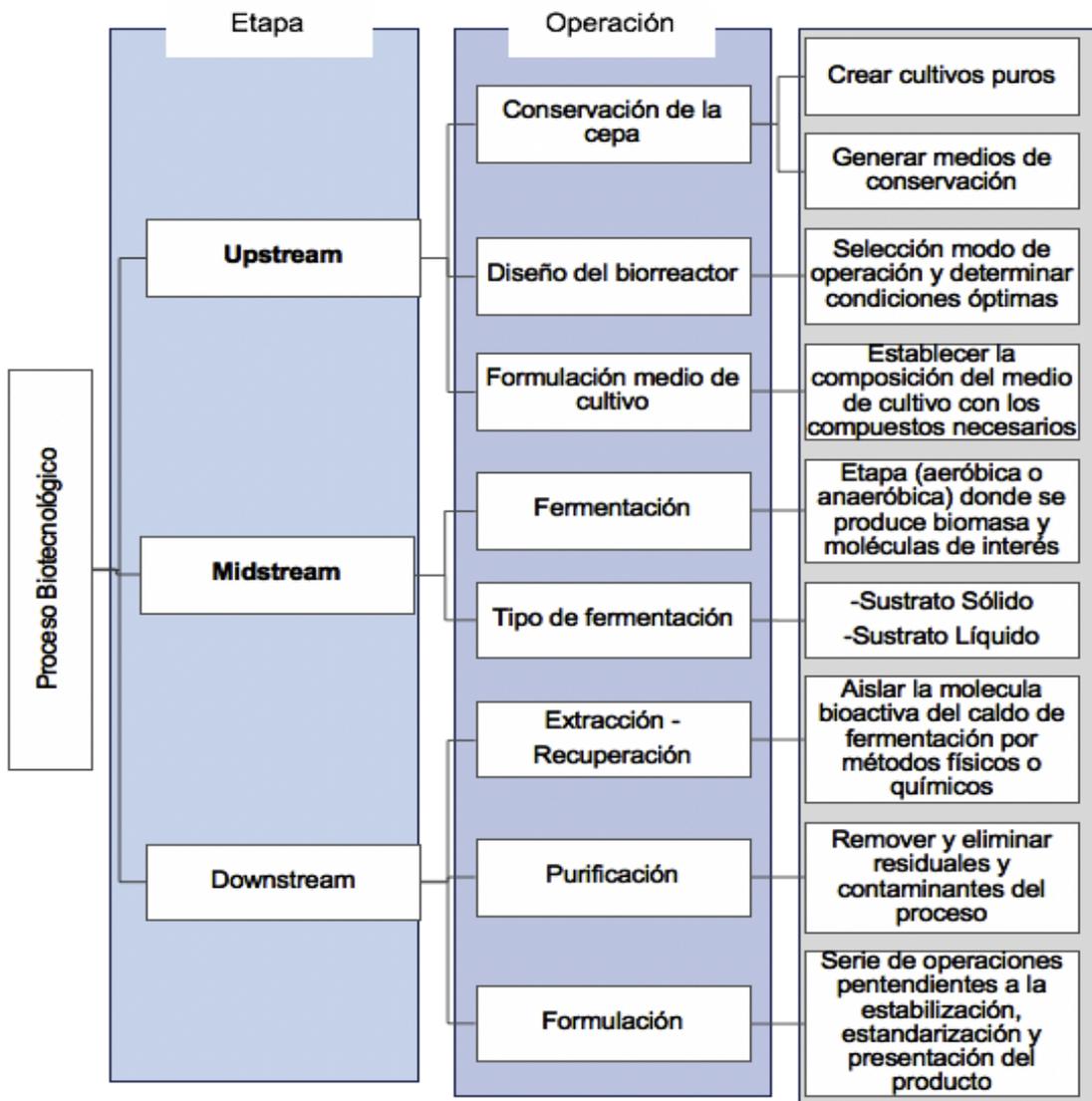
**Tabla 7.** Uso industrial de las enzimas en las diferentes áreas.

<b>Tipo de industria</b>	<b>Enzima</b>	<b>Uso</b>
Alcohol/Bebidas	Amilasa, glucanasas, proteasas, beta-glucanasas, arabinosilanos, amiloglucosidasa, pululanasa y acetolactato descarboxilasa	Degradación de almidón y policarbonato en azúcar simple. También para degradar proteínas complejas en azúcares y así aumentar la eficiencia de la fermentación. Producción de cerveza baja en calorías.
Bebidas de frutas	Celulasa, Pectinasas	Proceso de clarificación de jugo de frutas
Comida para bebé	Tripsina	Alimentos para bebe
Procesamiento de alimentos	Amilasa, proteasa y papaína	Degradación de almidón y proteínas compleja, ablandamiento de carne
Lácteos	Renina, lipasas y lactasas	Hidrólisis de proteínas, producción de queso y producción de glucosa a partir de lactasa.
Biología Molecular	Enzimas de restricción, ADN ligasa y polimerasas	Se utiliza para manipular el ADN en la ingeniería genética, esencial para la restricción de la digestión y la reacción en cadena de la polimerasa, también importante en la ciencia forense.
Petróleo	Celulasas, ligninasas y mananasas	Formación de enlaces cruzados en biopolímeros para producir materiales in situ mediante procesos de polimerización

Procedente de (Gurung et al., 2013)

### 3.4.8 Producción de enzimas a partir de microorganismos

Las enzimas microbianas son biocatalizadores que han sido ampliamente estudiados por sus ventajas frente a catalizadores de origen químico. Estas biomoléculas producidas mediante la biotecnología son tendencia global al tener una mayor especificidad les permite discriminar las moléculas (regia especificidad) e incluso entre isómeros ópticos de una misma molécula (estéreo especificidad). Estas enzimas poseen resistencia a diversas condiciones de reacción como temperatura, pH y presión. Como se muestra en la Figura 5, el proceso biotecnológico está conformado por 3 etapas upstream, midstream y downstream que se desarrollan en un conjunto de operaciones (Chavan & Mulaje V, 2013; S. Li et al., 2012)



**Figura 5.** Etapas de un proceso biotecnológico para la obtención de enzimas.  
Adaptado de (Genilloud, 2017; Mayanglambam et al., 2020; Robinson, 2015)

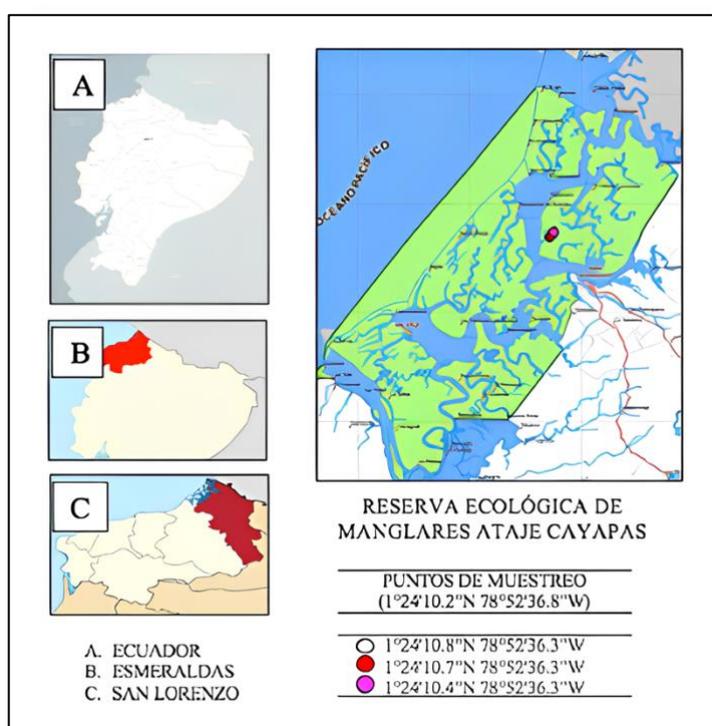
## CAPITULO III

### MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describe los procesos empleados para el desarrollo de la investigación detallando la zona donde se realizó el muestreo y sus características ambientales de ubicación. Además, se describen las técnicas de aislamiento, caracterización morfológica, la identificación molecular de los microorganismos aislados, los protocolos para determinar la cinética de crecimiento y para la producción de enzimas hidrolíticas en biorreactores.

#### 4.1 Caracterización del área de muestro

La recolección de muestras para el aislamiento de actinomicetos se realizó en la Reserva Ecológica de Manglares Mataje-Cayapas, ubicada en la provincia de Esmeraldas, cantón San Lorenzo, al norte del país ( $1^{\circ}24'10.2''N$   $78^{\circ}52'36.8''W$ ) (Figura 6). El muestro fue realizado bajo la autorización ambiental emitida por el Ministerio del Ambiente y Agua “MAAE-ARSFC-2020-0703”. El lugar fue seleccionado debido a la presencia de manglares con baja interacción humana para el aislamiento de actinomicetos productoras de enzimas hidrolíticas.



**Figura 6.** Mapa de ubicación de la Reserva Ecológica Manglares Cayapas-Mataje, ciudad de San Lorenzo, provincia de Esmeraldas (zona de muestreo).

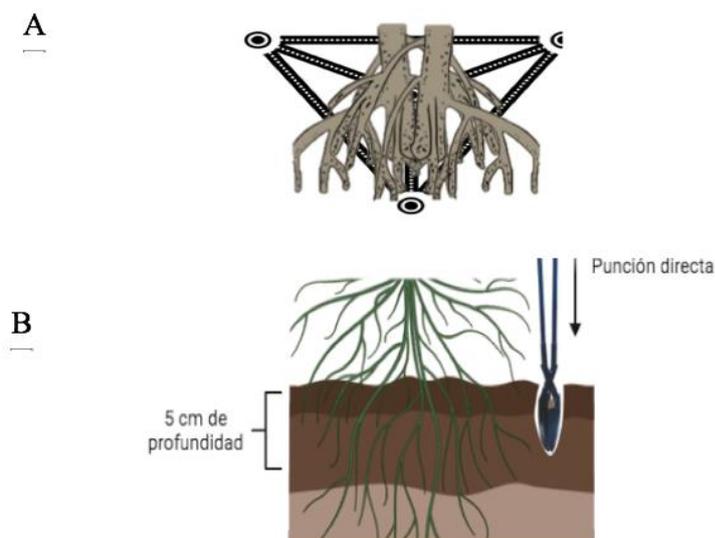
## 4.2 Descripción del área de experimental

La parte experimental del presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte en el Campus Antiguo Hospital San Vicente de Paul ( $0^{\circ}20'49.3''N$   $78^{\circ}06'51.2''W$ ), ubicado en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura.

## 4.3 Muestreo *in situ*

En la Reserva Ecológica Manglares Mataje Cayapa, existen comunidades humanas que realizan actividades de pesca y comercio, lo que limita las áreas donde la interacción humana es baja. Por este motivo, se selecciono un área poco afectada por actividades antrópicas y se aplicó un muestreo por conveniencia sin un arreglo probabilístico.

Para obtener la muestra compuesta se recolectaron 6 submuestras de 100g de suelo tomado de la rizósfera de 3 manglares con una separación de 10m entre cada punto. Con el uso de una doble pala, mediante una punción directa se obtuvieron las muestrasmuestra de suelo a 5cm de profundidad en una disposición triangular (Figura 7). Las muestras fueron almacenadas en bolsas ziploc de polietileno secas y estériles con cierre hermético para ser transportadas en el interior de una nevera portátil una temperatura de  $4^{\circ}$ - $10^{\circ}C$ . Las muestras fueron rotuladas con datos técnicos como temperatura ambiental, temperatura marina, pH del suelo, pH del agua y las coordenadas GPS (Deepa et al., 2013; Hong et al., 2009b; F. Li et al., 2019).

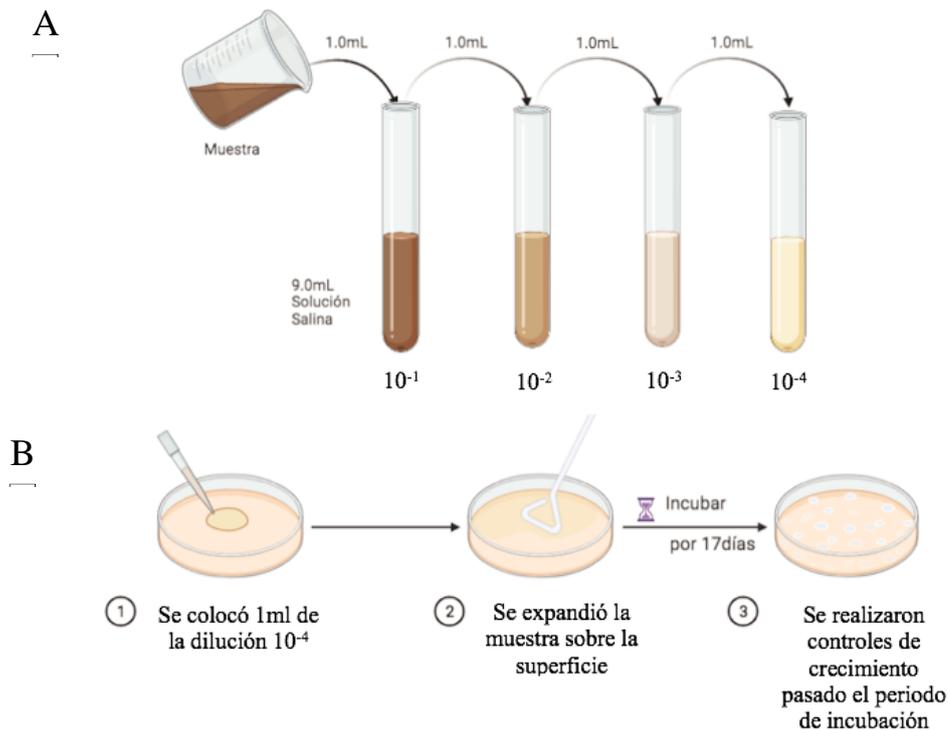


**Figura 7.** Obtención de muestras de la rizósfera de los manglares. (A) Puntos de muestreo cercanos al mangle disposición triangular. (B) obtención de la muestra por punción directa.

#### 4.4 Aislamiento de cepas nativas

De las submuestras de suelo obtenidas, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a la concentración  $10^{-4}$  en solución salina (Figura 8) (F. Li et al., 2019). Se preparó agar de aislamiento de actinomicetos agar (caseinato de sodio 2,00g/L, L-asparagina 0,10g/L, propionato de sodio 4,00g/L, Fosfato dipotásico 0,50g/L, Sulfato de magnesio 0,10g/L, Sulfato ferroso 0,001g/L) adicionando 5ml/L de glicerol y 150mg/L de itraconazol como control fúngico (Leon et al., 2007).

Se inoculó 1ml de la dilución a  $10^{-4}$  que se dispersó sobre toda la superficie con el asa de Drigalsky. Las cajas se incubaron a 21°C por 17 días. Se llevaron a cabo controles del crecimiento cada 24 horas para identificar y seleccionar colonias. Las cepas con características fueron resembradas hasta obtener cultivos puros (Deepa et al., 2013; Hong et al., 2009; F. Li et al., 2019).



**Figura 8.** (A) Diluciones seriadas de la muestra de suelo hasta alcanzar la concentración de  $10^{-4}$ . (B) Siembra por expansión en la superficie.

#### 4.5 Identificación morfológica

Las cepas se identificaron mediante la observación y delimitación de características macroscópicas de actinomicetos como la formación de micelios aéreos, forma, aspecto y color de la colonia. Además, se realizó la observación microscópica para determinar la forma bacteriana y la clasificación Gram de las cepas. Las cuales se codificaron según el país de origen, la provincia, la zona de muestro y el tipo de bacteria a aislarse “EEMA” donde E= Ecuador, E=Esmeraldas, M=Manglar y A= Actinomicetos (Ulrike Tarazona et al., 2018).

#### 4.6 Determinación de la actividad enzimática de los aislados

Las cepas aisladas fueron sometidos a pruebas rápidas colorimétricas para determinar la capacidad de producir enzimas hidrolíticas como amilasa, celulasa, caseinasa y ureasa (Parada et al., 2017; Tarazona J. et al., 2018). Los aislados que presentaron mayor capacidad de degradación de sustrato fueron evaluadas en biorreactores y comparadas con bacterias utilizadas como cepas control (Tabla 7) que fueron obtenidas del cepario bacteriano del laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte (Abbas et al., 2014)

**Tabla 8.** Cepas control en las pruebas de actividad enzimática.

Especie	Código	Prueba de hidrólisis
<i>Bacillus Subtilis</i>	11774	Almidón / Caseína
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-----	Urea

Código: codificación del cepario del Laboratorio de Biotecnología Aplicada- Universidad Técnica del Norte

##### 4.6.1 Producción de enzima ureasa

Se preparó un total de 16 tubos de Agar Urea base (dextrosa 1,00g/L, peptona de gelatina 1,00g/L, rojo fenol 0,012 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,00g/L, NaCl 5,00g/L, agar 2,40g/L). Se pesó 3,84 gramos que se disolvieron en 160ml de agua destilada. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y finalmente se adicionó 8ml de solución estéril de urea al 40%. El medio se dispensó en tubos de ensayo esterilizados y se dejó solidificar en pico de flauta. Se inoculó una colonia de los cultivos puros previamente obtenidos mediante la siembra por estriado. Se incubó durante un periodo 48 a 72 horas a 36°C. Al cabo de las 72 horas se realizó una valoración cualitativa basado en el cambio de tonalidad del

medio. En la que el color amarillo representó una prueba negativa y una prueba de color rojo, rosado o violeta como positiva (Konieczna et al., 2013).

#### **4.6.2 Producción de enzima amilasa**

Se preparó un total de 16 tubos de Agar Almidón (almidón soluble 10g/L, peptona 3g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,10g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,10g/L agar 12,00g/L). Se pesó 4,1g Agar Almidón que fueron disueltos en 160ml de agua destilada. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. El medio se dispensó en tubos de ensayo esterilizados y se dejó solidificar el medio en pico de flauta. Se inoculó una colonia de los cultivos puros previamente obtenidos mediante la siembra por estriado. Se incubó durante un periodo 48 a 72 horas a 36°C (Konieczna et al., 2013). Al cabo de las 72 horas, la producción de amilasa se observó al inundar los tubos con lugol y descartar el sobrante. Se realizó una valoración cualitativa según la tonalidad del medio cercano a la colonia. Donde las pruebas positivas presentaron color translucido, blanco o amarillo y las negativas color azul (Malisorn & Nihome, 2014).

#### **4.6.3 Producción de enzima caseinasa**

Se preparó un total de 16 tubos de Agar de leche desnatada. Se pesó 1.6 gramos de medio de cultivo que fueron disueltos en 160ml de agua destilada. El medio fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos posteriormente se dispensó en tubos de ensayo esterilizados y se dejó solidificar el medio en pico de flauta. Se inoculó una colonia de los cultivos puros previamente obtenidos mediante la siembra por estriado. Se incubó durante un periodo 48 a 72 horas a 36°C. Al cabo de las 72 horas se realizó una valoración cualitativa por la decoloración del medio. Donde las pruebas positivas presentaron color translucido y las negativas color blanco. (Konieczna et al., 2013; Shen et al., 2020).

#### **4.6.4 Producción de enzima celulasa**

Se preparó un total de 16 tubos de Agar CMC (carbo-ximetil-celulosa 10g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,16g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,01g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,01g/L, agar 12,00g/L). Se pesó 4,18g de medio de cultivo que fueron disueltos en 160ml de agua destilada. El medio fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos posteriormente se dispensó en tubos de ensayo esterilizados y se dejó solidificar el medio en pico de flauta. Se inóculo una colonia de

los cultivos puros previamente obtenidos mediante la siembra por estriado. Se incubó durante un periodo 48 a 72 horas a 36°C.(Konieczna et al., 2013).

Al cabo de 72 horas la actividad de celulosa se observó agregando 3ml de agar con rojo Congo al 1% las placas y dejar actuar por 15 minutos. Se eliminó el exceso y se realizó un lavado agregando 2ml de solución de NaCl a 1M dejar reposar por 60 minutos. Se descartó la solución y se realizó un lavado con ácido acético al 2%. Se valoró los resultados de manera cualitativa según la tonalidad del medio cercano a la colonia. Donde las pruebas positivas presentaron color amarillo y una prueba de color rojo como negativa (Malisorn & Nikhome, 2014)

#### **4.7 Identificación molecular de las cepas**

Las cepas aisladas con mayor actividad enzimática fueron enviadas a los laboratorios IDGEN donde se realizó la identificación molecular por el método de SANGER que fueron analizados en programas bioinformáticos.

Los resultados de la identificación se procesaron en el software bioinformático GENEIOUS PRIME versión 2022.2.1, en el cual se eliminó el ruido dentro de las secuencias, se creó reversos complementarios y se creó alineamientos. Estas secuencias se compraron con la base de datos de nucleótidos de GenBank-NCBI mediante la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local.

#### **4.8 Determinación de la cinética de crecimiento**

Se determinó la tasa específica de crecimiento con respecto al medio de cultivo a lo largo del tiempo e identificó las etapas. Las cepas con mayor actividad enzimática EEMA-1, EEMA-2 y EEMA-4. Se inocularon en 100ml de caldo nutriente en un matraz Erlenmeyer. Estos biorreactores estuvieron en un agitador orbital en operación durante 96horas a 150rpm y 30°C (Gebreyohannes et al., 2013).

Las curvas de crecimiento de las cepas se determinaron con 1ml de muestra del caldo de cultivo recolectado dos veces al día con una diferencia de 8 horas entre toma durante 4 días a partir de las 24 horas de la inoculación. Las muestras se depositaron en una cubeta con a ayuda de una micropipeta en la cámara de flujo laminar. Las muestras fueron evaluadas en el espectrofotómetro UV (Jenway 6705 UV/Vis) a una longitud de onda de 600nm (Abbas et al., 2014).

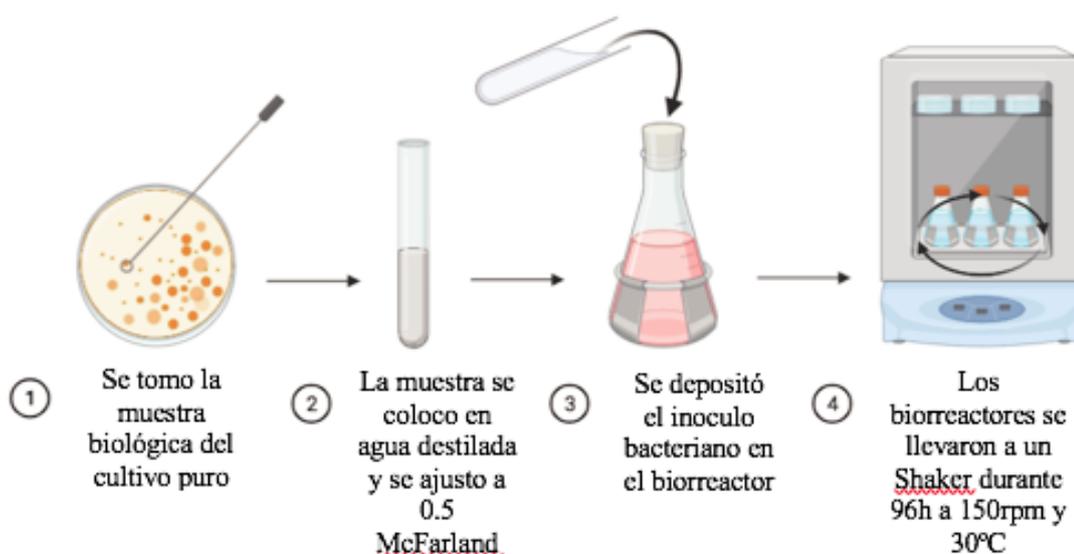
#### 4.9 Obtención de extractos enzimáticos

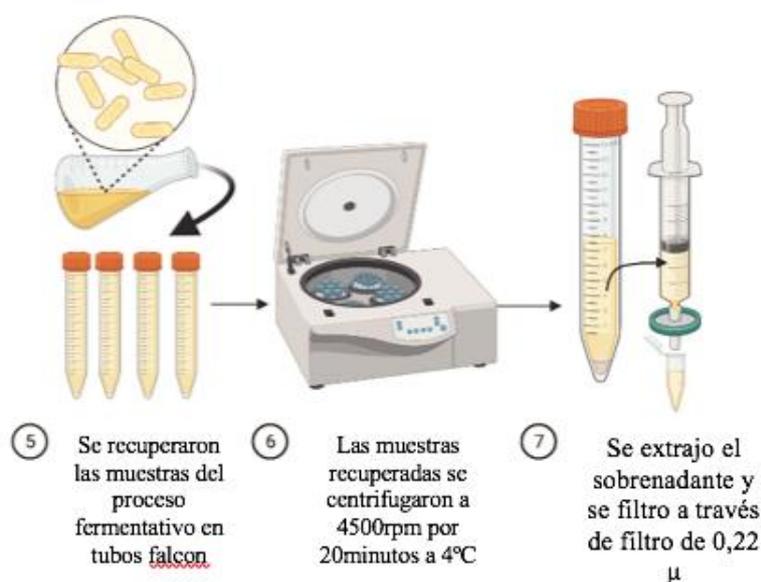
Se preparó un inóculo en 10ml de agua destilada estéril ajustando la concentración bacteriana del tubo a 0.5 en la escalada de McFarland como se muestra en la Figura 9, (Gebreyohannes et al., 2013).

El bio-proceso se realizó en matraces con un volumen de 250ml, operando en forma lote “batch” con tapa de algodón que permitió el intercambio gaseoso para la producción de amilasa y un tapón de plástico para la producción de caseinasa y ureasa, a 115 rpm,  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 96 horas (Leon et al., 2007).

Las muestras de 50ml de los biorreactores de producción de ureasa y amilasa fueron recuperadas en tubos Falcon al cabo de las 96 horas. Estas muestras se centrifugaron a 4500rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Con el fin de determinar la actividad, se tomó el sobrenadante que fue filtrado a través de filtros de 0.22micras para eliminación de residuos bacterianos (Servent et al., 2020).

Las muestras de 1ml de los biorreactores de producción de amilasa fueron recuperados cada 24 horas. Estas muestras se llevaron a la microcentrifuga a 4500rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Con el fin de determinar la actividad, se tomó el sobrenadante que fue filtrado a través de filtros de 0.22micras para eliminación de residuos bacterianos (Servent et al., 2020).





**Figura 9.** Bio-proceso para producción, recuperación y semi-purificación de enzimas producidas por actinomicetos.

#### 4.9.1 Medios de cultivo para la producción de enzimas hidrolíticas

Los medios se formularon basados en la composición de los agares comerciales que inducen la producción de las enzimas hidrolíticas (tabla 8). Las pruebas en biorreactores se realizaron por triplicado con un volumen de 100ml por cada cepa.

**Tabla 9.** Composición de los medios de cultivo para cada cepa según la producción enzimática presentada.

Actividad enzimática	Composición de medio	Cantidad (g/L)
Amilasa	Almidón soluble	10
	Extracto de levadura	3
	CaCl <sub>2</sub>	0,10
	MgSO <sub>4</sub>	0,10
Ureasa	Urea	20
	Extracto de levadura	0,10
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,50
Caseinasa	Glucosa	0,10
	Extracto de levadura	0,05
	Caseína	0,05
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10
	MgSO <sub>4</sub>	0,10

(Hussein et al., 2020; Mazzei et al., 2017; Mukhtar, 2017)

## **4.10 Evaluación del extracto enzimático**

### **4.10.1 Extracto con enzima amilasa**

Se realizó la reacción enzimática amilolítica, creando una muestra al combinar 1ml de sobrenadante más 1ml de almidón al 1% p/v que se colocó en el termo bloque a 60°C durante 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo al sumergir las muestras en agua con hielo durante 5 minutos. Los azúcares liberados (mg/ml) fueron cuantificados con el método DNS (ácido 3, 5 dinitro salicílico). La reacción se preparó en tubos de ensayo, tomando 500µl de la solución y 500µl del reactivo DNS. Los tubos se calentaron en baño María a 100°C por 5min, se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min y se registró la absorbancia en el espectrofotómetro a 540nm (Sánchez Castelblanco et al., 2020).

### **4.10.2 Extracto con ureasas**

La reacción enzimática se evidenció por la formación de halos de hidrólisis y se cuantificó en mm por el cambio de coloración en el medio de cultivo. Se colocó discos de papel filtro que contenían 10µl del extracto semi-purificado tanto de la cepa aislada, del control biológico positivo *Klebsiella pneumoniae* y del control negativo (agua destilada) en placas de agar Urea Christensen.

### **4.10.3 Extracto con Caseinasas**

La reacción enzimática se evidenció por la formación de halos de hidrólisis y se cuantificó en mm por el cambio de tonalidad en el medio de cultivo. Se colocó discos de papel filtro que contenían 10 µl del extracto parcialmente purificado tanto de la cepa aislada como del control biológico positivo *Bacillus subtilis* 11714 y del control negativo (agua destilada) en placas de leche descremada agar.

## **4.11 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de los ensayos fueron analizados con el software estadístico Infostat versión 2020e. La actividad enzimática (ureasa, amilasa, caseinasa y celulasa) se evaluó de manera cualitativa por la formación de halo de hidrólisis para cada uno de los cultivos obtenidos. Se realizó una prueba de Chi Cuadrado ( $\alpha$ : 0,05) no paramétrica para verificar correlación de las frecuencias esperadas sobre las observadas entre la presencia y ausencia actividad hidrolítica formada por las cepas aisladas EEMA-1, EEMA-2, EEMA3, EEMA-4, EEMA-5, EEMA-6, EEMA-6, EEMA-7 y EEMA-8.

Para determinar las diferencias en la actividad enzimática específica (ureasa, amilasa, caseinasa) de las cepas seleccionadas, se realizó un ANOVA ( $\alpha$ : 0,05) y posteriormente una prueba Tukey, usando un control positivo (microorganismo productor de la enzima) y un control negativo (agua destilada).

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos en los ensayos descritos en el apartado de marco metodológico desde las cepas aisladas de Reserva Ecológica de Manglares Cayapas-Mataje, su identificación molecular, se reporta la cinética de crecimiento hasta la producción de enzimas hidrolíticas (amilasa, celulosa y caseinasa) de cada cepa seleccionada.

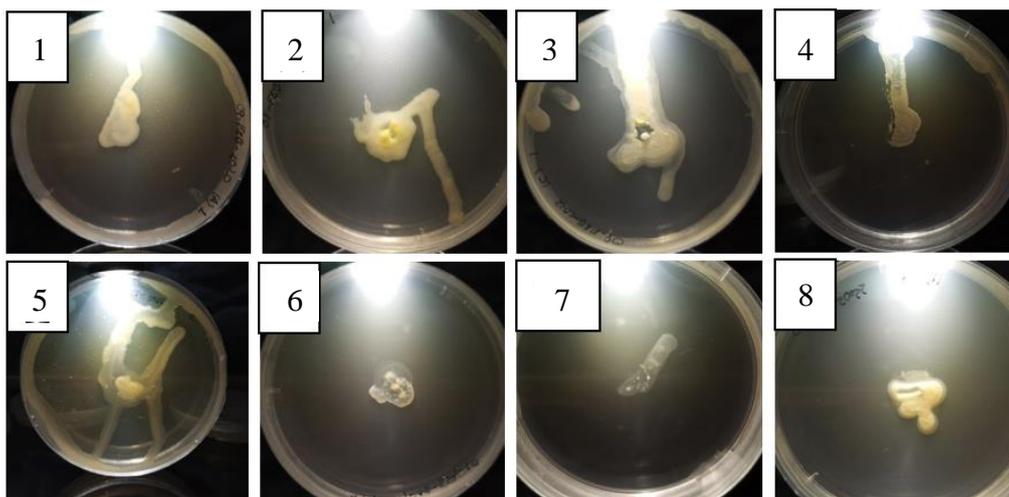
#### 5.1 Aislamiento e identificación de actinomicetos procedentes de la rizósfera de manglares

Las muestras de sedimento marino fueron recolectadas a cinco centímetros de profundidad con condiciones ambientales de 24°C y con un pH 8. Las coordenadas geográficas de cada uno de los puntos seleccionados para el muestreo de Reserva Ecológica de Mantaglares Cayapas-Mataje se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 10.** Coordenadas geográficas de los tres puntos de muestreo, Reserva Ecológica de Manglares Cayapas – Mataje.

Sub-Muestra	Coordenadas
1	1°24'10.8"N78°52'36.3"W
2	1°24'10.7"N78°52'36.3"W
3	1°24'10.4"N78°52'36.3"W

En el proceso de aislamiento se observó contaminación por *Aspergillus spp*, por lo que el medio de cultivo (Agar de Aislamiento de Actinomicetos) fue suplementado con 150 mg/L de itriconazol como control fúngico. Se obtuvieron 12 cultivos puros, de los cuales finalmente se seleccionaron 8 de ellos correspondientes a las cepas que presentaron características macroscópicas del filo actinomicetos (Figura 10).



**Figura 10.** Cepas aisladas de actinomicetos que presentan características típicas de este grupo como ramificación bacteriana (EEMA-1, EEMA-2, EEMA-3, EEMA-4, EEMA-5, EEMA-6) y aspecto de colonia sólida-seca (EEMA-1, EEMA-3, EEMA-4) y blanda (EEMA-2, EEMA-5, EEMA-6, EEMA-7, EEMA-8).

Las unidades formadoras de colonia presentaron una coloración amarilla, blanca y gris. Un aspecto de colonia macroscópico liso o rugoso con consistencia blanda o seca como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 11.** Características microscópicas y macroscópicas de las colonias de los cultivos puros.

Cultivo	Color colonias bacteriana	Aspecto de colonia
EEMA-1	Blanco-Grisáceo	Seco-Rugosa
EEMA-2	Blanco-Amarrillo	Blanda-Lisa
EEMA-3	Amarrillo	Seco-Rugosa
EEMA-4	Blanco-Grisáceo	Seco-Rugosa
EEMA-5	Gris	Blanda-Lisa
EEMA-6	Blanco	Blanda-Lisa
EEMA-7	Blanco	Blanda-Lisa
EEMA-8	Blanco-Amarrillo	Blanda

Todos los aislados fueron identificados como bacterias Gram positivas con morfología de bacilos ramificados.

La mayor parte de las investigaciones reportan en actinomicetos características macroscópicas y microscópicas, fenotípicas, fisiológicas y bioquímicas similares. Los rasgos típicos es la forma de colonia lisa o rugosa, como formación de micelio radial,

presencia o ausencia de formación de cadena de colonias, disposición espacial de cadena, con pigmentaciones blancas, amarillas, rojas y gris. (Azman et al., 2015; Hong et al., 2009; Ulrike Tarazona et al., 2018). Como las características que presentan los aislados en esta investigación.

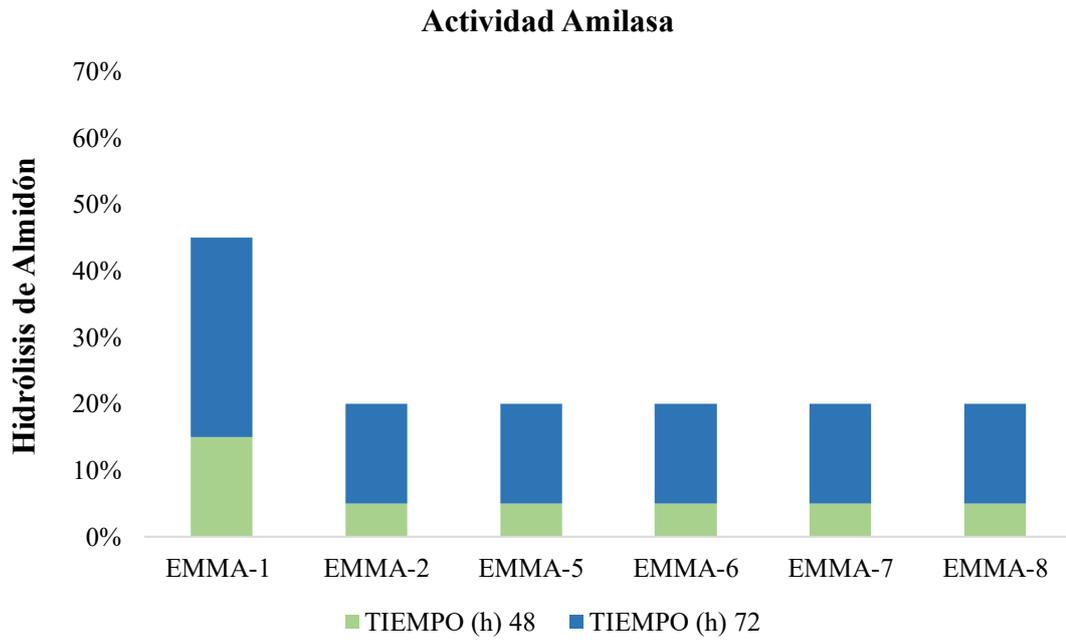
Según Azman et al., (2015) los *Streptomyces* son las especies dominantes con mayor biodisponibilidad en ecosistemas marinos presentes en sedimentos. Sin embargo, existen especies raras son relativamente difíciles de aislar, cultivar y mantener; debido a su entorno natural como lo son los géneros de Actinomadura, Actinoplanes, Amycolatopsis, Cryptosporangium, Microtetraspora, Nocardia, Nonomurae, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharomonospora, Saccharothrix, entre otros.

La dificultad de aislamiento se debe a que el medio de actinomicetos no es estrictamente selectivo porque se han reportado aislados bacterianos correspondientes a otras familias y presencia de crecimiento fúngico por lo que el medio debe ser suplementado con antibióticos y antimicóticos (Parada et al., 2017)

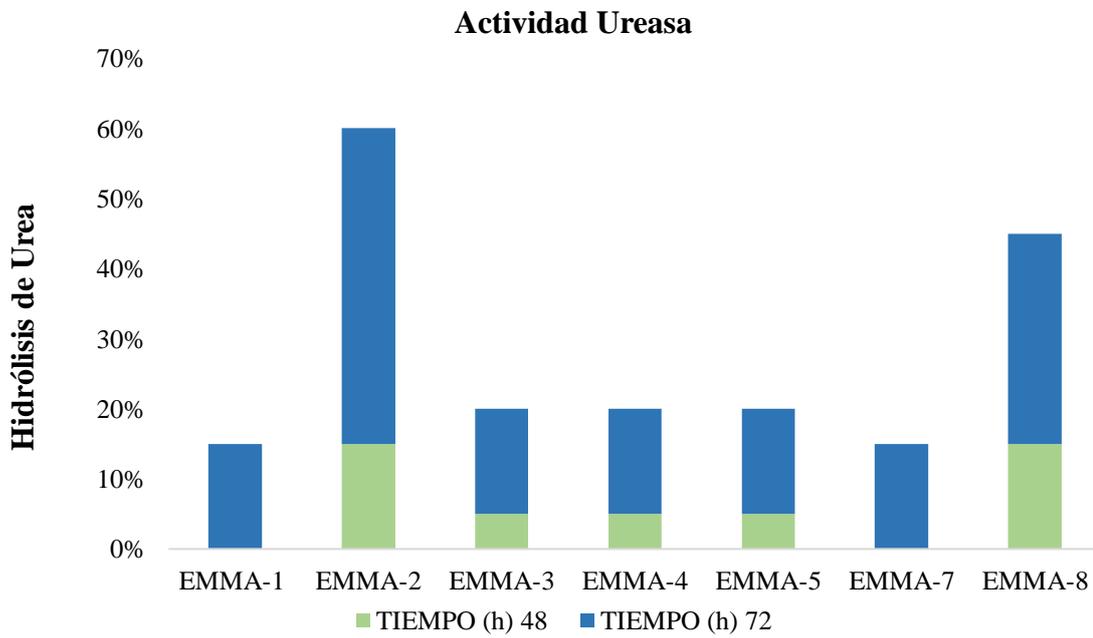
## **5.2 Pruebas actividad enzimática**

La capacidad de secretar enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas aisladas se evidenció en un período de tiempo entre 48 y 72 horas como se muestra en la figura 12. De hecho, el 87,5% presentó actividad amilolítica, el 75% hidrolizaron urea y el 62,5% mostraron actividad proteolítica sobre la caseína. Las cepas EEMA-1, EEMA-2 y EEMA-1 resaltaron por su capacidad amilolítica, ureolítica y proteolítica respectivamente. Sin embargo, ninguna cepa mostró actividad sobre la celulosa.

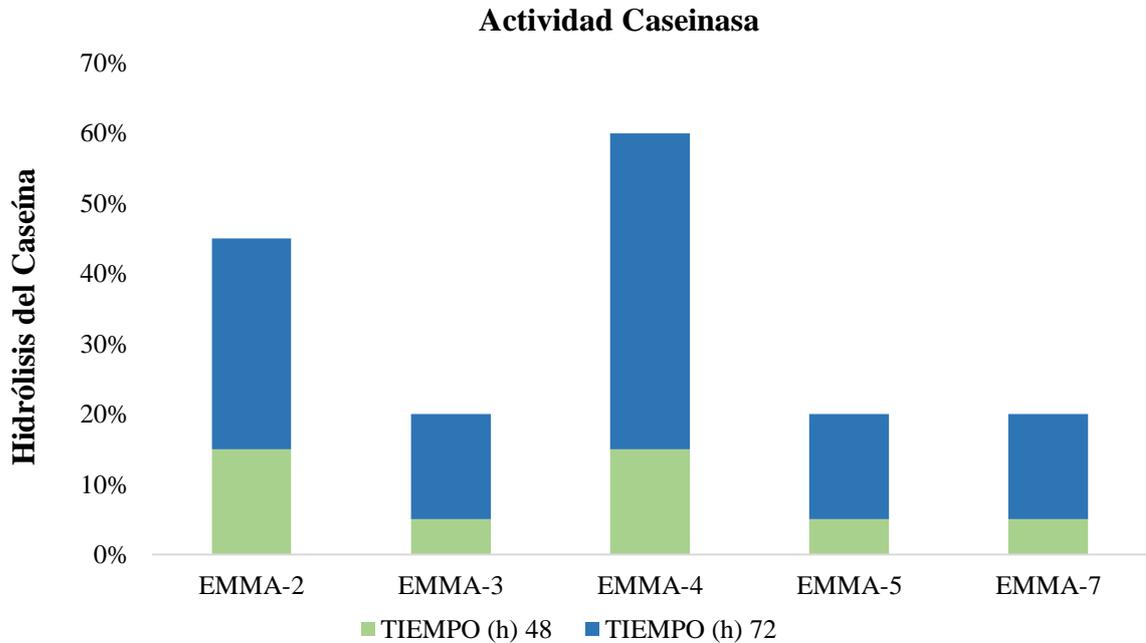
A



B



C



**Figura 11.** Actividad enzimática en pruebas rápidas para detectar hidrólisis del sustrato específico (A) almidón, (B) Urea y (C) Caseína durante un período de 48 a 72 horas

Las cepas aisladas mostraron una zona de aclaramiento en la prueba de hidrólisis del almidón que se observó alrededor del cultivo al añadir lugol al medio. Entre todas las cepas EEMA-2, EEMA-5, EEMA-6, EEMA-7, EEMA-8 mostraron actividad enzimática mientras que las cepas EEMA-3 y EEMA-4 no presentaron actividad. La cepa EEMA-1 mostró mayor capacidad para secretar enzimas que hidrolizan almidón creando un halo de hidrólisis más pronunciado en el medio de cultivo.

Las investigaciones previas señalan a la amilasa como una de las enzimas de interés biotecnológico e industrial más grande debido a sus múltiples aplicaciones. Representando el 25% del mercado mundial según Gopinath et al., (2017), las enzimas amilasas son utilizadas en alimentos dentro de la producción de bebidas alcohólicas, jarabe de maíz o malta y como aditivo alimenticio. Además, se encuentran presentes en detergentes, productos farmacéuticos y textiles. Como describe Al-Agamy et al., (2021), en su investigación donde afirma que los microorganismos marinos funcionan como un complemento para el desarrollo de procesos industriales al poder secretar diversas enzimas útiles.

Así mismo, la actividad ureasa fue identificada por un cambio de color en el medio donde amarillo describe actividad negativa y un color rojo violeta representa actividad positiva. Las cepas EEMA-1, EEMA-3, EEMA-4, EEMA-5, EEMA-7 y EEMA-8 mostraron actividad enzimática. Sin embargo, la cepa EEMA-1 no secreto enzimas

ureolíticas manteniendo una tonalidad amarilla en todo el medio de cultivo durante 72 horas. No obstante, la cepa EEMA-2 demostró mayor capacidad para producir enzimas que hidrolizan urea que se evidenció en la prueba al tener mayor porcentaje de cambio de color en el medio de cultivo.

A partir del descubrimiento y la cristalización de la ureasa se desarrollaron pruebas clínicas para determinar la cantidad de urea presente en fluidos corporales. Sin embargo, esta enzima se encuentra relacionada con factores de virulencia de microorganismos patógenos presentes en el tracto urinario y digestivo de mamíferos de muestras clínicas. Esta enzima también ha sido asociada a la formación de cálculos y úlceras gástricas. (Mekonnen et al., 2021; Robinson, 2015).

En la agricultura, la ureasa permite a los microorganismos obtener nitrógeno del suelo por medio de la síntesis de amoníaco y carbomato. Sin embargo, estudios previos demostraron que estas reacciones liberan amoníaco al ambiente disminuyendo la carga de nitrógeno para las plantas, pero logran contrarrestar el pH del suelo reduciendo el estrés en las plantas (Kappaun et al., 2018).

Además, las cepas aisladas mostraron una zona de aclaramiento en el medio agar leche desnatada que se observó alrededor del cultivo. En la prueba de hidrólisis de caseína fueron las cepas EEMA-2, EEMA-3, EEMA-5 y EEMA-7 las que mostraron actividad enzimática. Sin embargo, las cepas EEMA-1, EEMA-6 y EEMA-8 no presentaron actividad proteolítica manteniendo la tonalidad blanca en el medio de cultivo. La cepa EEMA-4 presentó la mayor capacidad hidrolítica de caseína a lograr un cambio de tonalidad del medio del cultivo equivalente al 50%.

La caseinasa participa en la descomposición de la caseína de la proteína de la leche transformándola en azúcares simples de fácil asimilación en el cuerpo para producir moléculas de ATP y grasa. La caseína puede ser una fuente inmediata de energía y está involucrada en el desarrollo muscular con un proceso de hidrólisis enzimática o ácida. Estas enzimas son ampliamente utilizadas en la industria de elaboración de productos lácteos, papel y textil. Dada la importancia de la caseinasa, la presente investigación obtuvo resultados semejantes a los publicados por Hussein et al., (2020), donde se obtiene caseinasa a partir de microorganismos aislados de suelos pero en condiciones de cultivo diferente con una temperatura de 40°C.

Los resultados fueron analizados con una prueba de Chi cuadrado no paramétrica con un nivel de significancia de 0,05 ( $gl=3$ ;  $p=0,0024$ ) donde existe una correlación

positiva entre las cepas aisladas de la rizósfera de manglares y su capacidad de producir enzimas hidrolíticas de sustrato como el almidón, la urea y la caseína.

En trabajos previo realizados por Tarazona et al., (2018), León et al., (2007), Parada et al., (2017) y Al-Agamy et al., (2021), describen a los microorganismos de estuarios marinos con varias menciones de actinomicetos como productores de vitaminas, antibióticos, antimicóticos y enzimas extracelulares como amilasas, celulasas, lipasas, estereasas, pectinasas y proteolíticas de importancia académica, industrial, ambiental, biológicas y biotecnológicas. Los resultados mostraron la degradación de diferentes sustratos como almidón, urea y caseína directamente relacionados al metabolismo bacteriano en interacción a las condiciones de cultivo y tiempo de incubación.

Así mismo, Parada et al., (2017) y Rao et al., (2017) afirman la habilidad que poseen los microorganismos productores de enzimas aparece como un mecanismo de adaptación a los factores abióticos como temperatura, pH, salinidad, altitud y disponibilidad de nutrientes. En el caso de los microorganismos asociados a los manglares que cumplen la función de descomposición de moléculas, la baja presencia de material vegetal que existe por la constante interacción mareal limita el asentamiento de hojas, ramas y tronco que reduce la población microbiana con capacidad de hidrolizar celulosa. Por tanto, los resultados mostraron que las cepas aisladas de la rizosfera de manglar no poseen capacidad de hidrolizar celulosa.

Sin embargo, Florez, (2016) y Saravanakumar et al., (2016), demostraron que los actinomicetos aislados de bosques tanto de muestras suelo o vegetales en descomposición fueron eficientes en procesos de compostaje y presentan capacidad de hidrolizar la celulosa como mecanismo de adaptación.

### **5.3 Identificación molecular**

Los resultados de la identificación molecular de los aislados a nivel de especie fueron realizados por el método SANGER amplificando el fragmento *rpoB* de las cepas que presentaron mayor actividad enzimática (Laboratorios IDGEN). Los análisis bioinformáticos con el uso de la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) describen los resultados como se muestra en la tabla 11.

**Tabla 12.** Datos moleculares de las colonias aisladas con mayor actividad enzimática

Muestra	Actividad enzimática	Longitud Pb	Organismo	Fragmento	% de Identidad	N° Acceso NCBI
EEMA1	Amilolítica	361	<i>Pseudomona simiae</i>	<i>rpoB</i>	91,82	CP005975.1
EEMA2	Ureolítica	961	<i>Pseudomona simiae</i>	<i>rpoB</i>	99,90	CP093333.1
EEMA4	Proteolítica	1201	<i>Bacillus piramycoides</i>	<i>rpoB</i>	98,79	MT642947.1

Al realizar una bioprospección, la información de un microorganismo desconocido es esencial para establecer su relación con otros organismos, el ecosistema y sus aspectos funcionales. El aislamiento e identificación molecular a partir de los marcadores más comunes del RNA ribosomal es el más utilizado debido a la cantidad de datos existentes de acceso público (Das et al., 2014).

La implementación de genes codificadores de proteínas, implicados en el mantenimiento celular que describen una mayor tasa evolutiva que las regiones conservadas son más usados en la taxonomía como el gen *atpD* (que codifica la subunidad F1-Beta de la ATP-Sintasa), *recA* (recombinasa A), *rpoB* (subunidad de ARN polimerasa) que es esencial para la transcripción del ADN y la supervivencia celular.

Dado que la mayoría de las bacterias codifican un único gen *rpoB* y este marcador molecular ha demostrado que la divergencia es significativamente mayor entre especies que como lo describe los genes de la región 16s rARN en el que el porcentaje de homología entre diferente especie oscila entre el 83 y el 99%. Estos porcentajes son inferiores a los observados en la identificación con el gen 16s rARN que podría atribuirse a la falta de base de datos de acceso público, la falta de protocolos estandarizados para generar datos de secuencias de *rpoB*, la falta de integración de datos en las plataformas de acceso público de aislamientos caracterizados que pueden genera posibles errores experimentales en el proceso de identificación molecular (Das et al., 2014; Gaballa et al., 2021; Sinha et al., 2020).

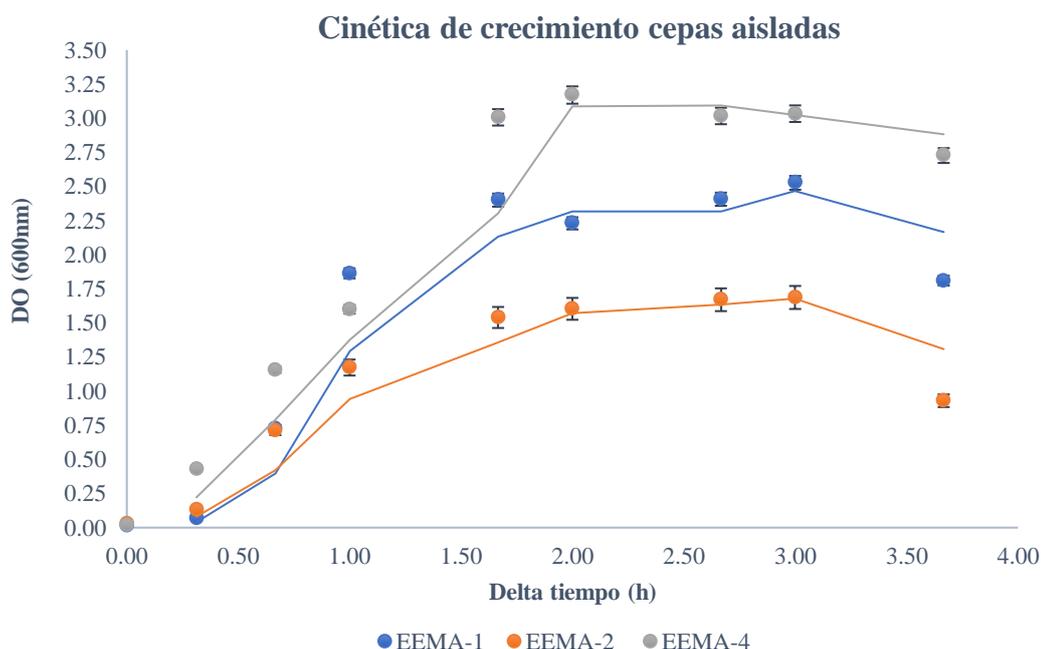
Las secuencias resultantes se compararon con bases de datos genómicas globales con la herramienta básica de alineamiento local para obtener la identificación molecular del microorganismo con mayor probabilidad, describiendo una similitud entre 97 y 99,9 %. Sin embargo, las bacterias fueron aisladas en medio de cultivo selectivo para

actinomicetos por esto se limito la comparación implementando un filtro al filo de actinomicetos en el proceso donde las cepas EEMA-1, EEMA-2 y EEMA-4 presentan un porcentaje de identidad con *Myceligenans indicum* y *Streptomyces avermitillis* con un 92,92%, 96,73% y 99,57% respectivamente, que podría estar relaciona a esta deficiencia de la base de datos de secuencias a partir del gen rpoB describiendo un resultado de tipo parcial y no genómico completo.

Debido a esto, los resultados obtenidos sin restricciones poseen una mayor credibilidad, dado que la comparación se realizó con todos los datos genómico de acceso público disponibles.

#### 5.4 Cinética de crecimiento de las cepas EEMA (1), (2) y (4).

Al analizar la cinética de las tres cepas seleccionadas por presentar mayor actividad enzimática, se identificaron en todos ellos tres fases de crecimiento bacteriano (fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaría) como se muestra en la Figura 13.



**Figura 12.** Cinética de crecimiento de las cepas con mayor actividad enzimática.

Las cepas seleccionadas experimentan fase de latencia durante un período inferior a 24 horas. Los cultivos se mantuvieron en fase exponencial durante 48 horas. Cabe mencionar que el tiempo transcurrido para cada fase es dependiente de la cepa. la fase estacionaría se presentó a partir de las 72 horas donde se presenta la máxima

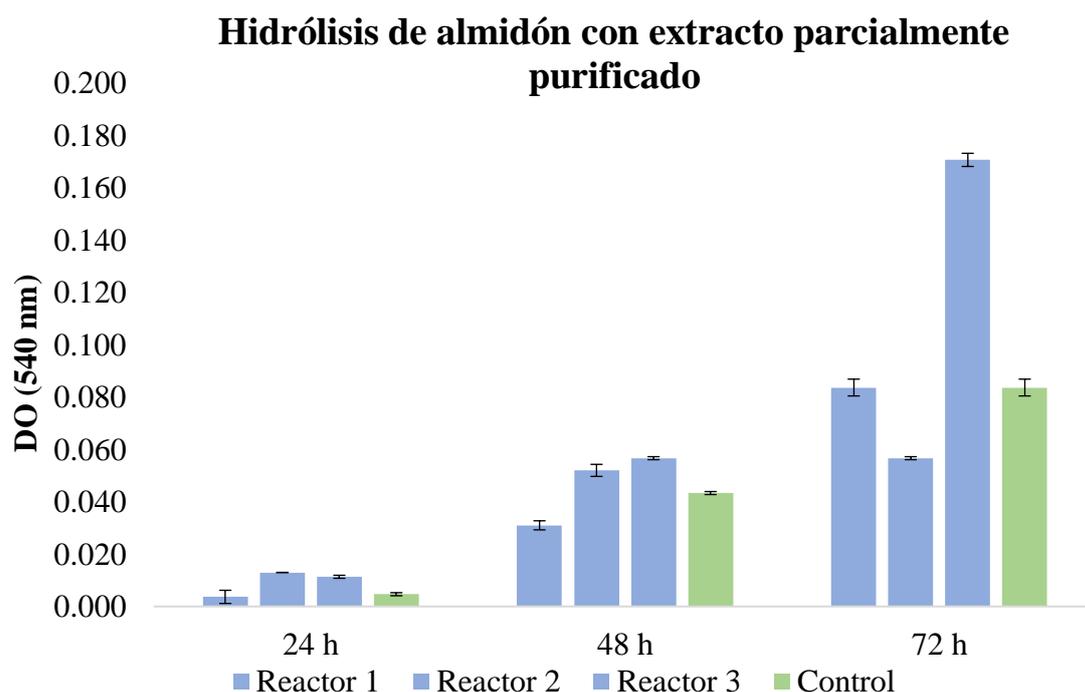
concentración celular en el medio describiendo una tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) (EEMA-1= 0,545  $h^{-1}$ , EEMA-2= 0,486  $h^{-1}$  y EEMA-4 = 0,511  $h^{-1}$ ). La fase estacionaria fue la etapa más importante para la recuperación enzimática disuelto en el biorreactor.

En la biotecnología el estudio de la cinética de crecimiento bacteriano es importante para optimizar la producción de metabolitos y biomasa. La fase de latencia de las bacterias es el periodo de ajuste metabólico y adaptación al medio en el que los microorganismos sintetizan RNA, enzimas y otras moléculas necesarias para comenzar la fase exponencial. Por tanto, cuando las bacterias entran en la fase estacionaria los nutrientes se agotan y se acumulan metabolitos secundarios, desechos metabólicos y moléculas de interés generadas durante las fases de latencia y exponencial. En esta investigación las enzimas hidrolíticas extracelulares presentes en el medio de cultivo alcanzaban su concentración máxima a partir de las 72 horas (Vishal, 2017).

## **5.5 Evaluación del extracto enzimático producto de la fermentación**

### **5.5.1 Producción de amilasa**

La cepa EEMA-1 que describió mayor actividad enzimática en los ensayos preliminares fue evaluada en la producción enzimática en un biorreactor. Como se muestra en la Figura 14, los extractos enzimáticos se obtuvieron a las 24, 48 y 72 horas de operación del reactor y se evaluó la transformación del almidón en glucosa por el método DNS y su disponibilidad en el caldo de cultivo.



**Figura 13.** Evaluación de la hidrólisis de almidón por el método DNS de los reactores 1,2,3 y el microorganismo control.

El análisis estadístico ANOVA muestra que en la (Figura 14), no existe una diferencia significativa entre los extractos enzimáticos parcialmente purificados recuperados y utilizados para valorar hidrólisis de almidón (mm) producido por EEMA-1 y el control positivo (*Bacillus subtilis 11714*) ( $F=0,30$ ;  $gl=3$ ;  $P= 0,8229$ ) a lo largo del proceso fermentativo.

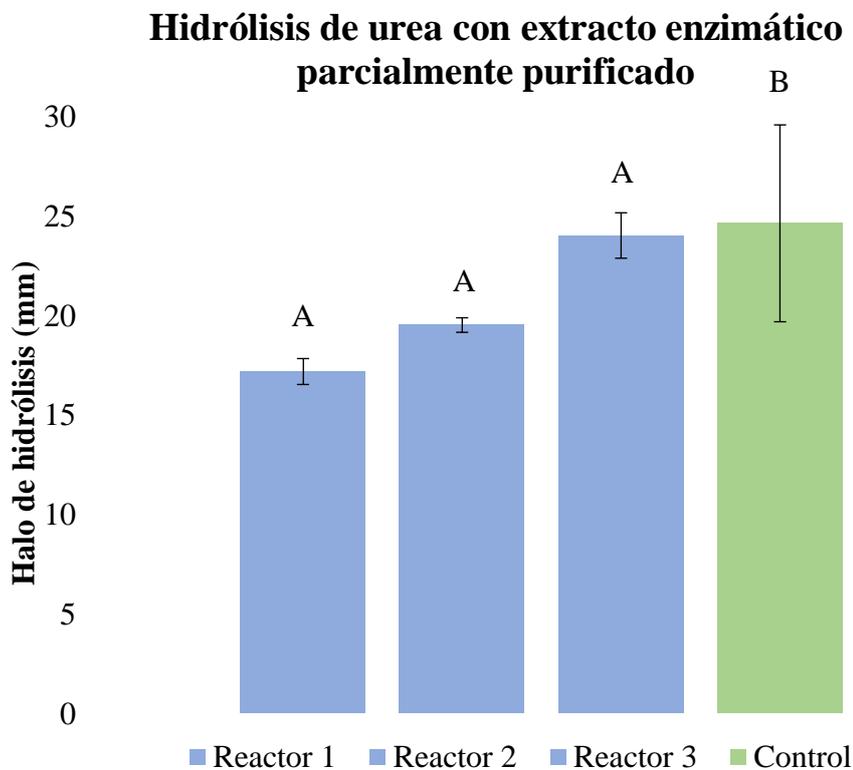
El tiempo de incubación desempeña un rol importante en la producción enzimática. En el presente trabajo la máxima concentración de amilasa fue observada durante la fase estacionaria de las bacterias a partir de las 72 horas. Así como se señala en trabajos previos realizados por Al-Agamy et al., (2021) en donde se reporta que al concluir la fase exponencial las bacterias alcanzan su producción de amilasa.

Por otra parte, el almidón soluble como sustrato sirve como una fuente de carbono con mayor biodisponibilidad en el medio para potenciar el crecimiento bacteriano y la producción enzimática, fenómeno descrito por una variedad de bacterias entre estas *Streptomyces* por Al-Agamy et al., (2021) y Mayanglambam et al., (2020).

Los extractos enzimáticos se recuperaron de los biorreactores EEMA-1 a partir de las 24 horas como en estudios de obtención de enzimas amilasas con otros microorganismos más comunes como es el caso de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus* como se detalla en la investigación realizada por Kanpiengjai et al., (2015)

### 5.5.2 Producción de Ureasa

La producción de enzima por la cepa se evaluó por la distancia (mm) formada por halo de hidrólisis en placas de Christensen Medio (urea agar base) como se muestra en la Figura 15.



**Figura 14.** Evaluación de la hidrólisis de urea por formación halos (a) (mm) de las repeticiones (1,2,3) y el control positivo (c).

El análisis estadístico muestra que en la (Figura 14) la hidrólisis enzimática de ureasa, existe una diferencia significativa en la dimensión (mm) de los halos de hidrólisis formados en placas Christensen Medio (urea agar base) producidos por los extractos enzimáticos parcialmente purificados de la cepa EEMA-4 ( $F=15,93$ ;  $gl=1$ ;  $P= 0.0013$ ) con respecto al control biológico *K. pneumoniae* durante el proceso fermentativo.

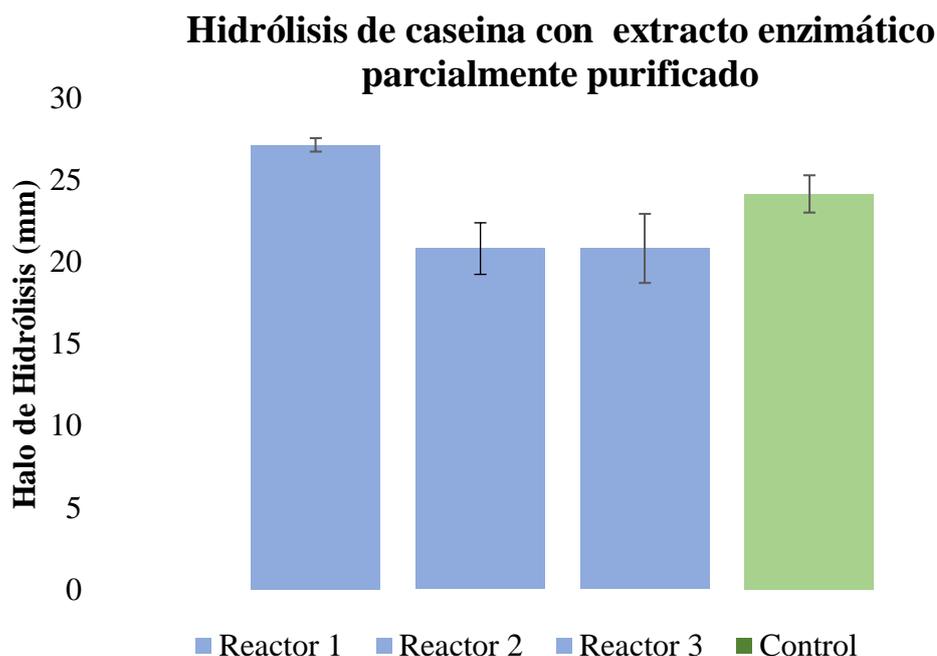
La urea es la fuente de nitrógeno para plantas y microorganismos presentes en el suelo que es metabolizada después de ser hidrolizada. La reacción catalizada por la ureasa es la transformación de la urea en amonio y un ion bicarbonato si el pH es mayor a 6.3 pero si el pH es menor a 6.2 se descompone en amonio, dióxido de carbono y agua (Bundale et al., 2015; Xu et al., 2014).

Según Corrales et al. (2015), en toda la naturaleza solamente las bacterias especializadas son capaces de realizar la fijación de nitrógeno, convirtiéndolo en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) que es asimilado fácilmente por todos los organismos y necesario para la formación de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Estas bacterias son muy importantes ecológicamente y son a menudo esenciales para la supervivencia de ecosistemas grandes.

La fijación de nitrógeno se puede encontrar en varios géneros bacterianos y en otros microorganismos, pero no es universal, depende del tipo de microorganismo, el ambiente en el cual se desarrolla y las condiciones para el mismo, además de la presencia de enzimas que les ayudan en los diferentes procesos metabólicos que suceden para llegar finalmente a la fijación según lo descrito por Mekonnen et al., (2021) en donde la literatura mostró microorganismo de géneros Actinomicetos, Bacillus, Citrobacter, Enterobacter, Pseudomonas, Serratia y Yersinia con capacidad ureolítica presente en diversos ecosistemas naturales con un suelo base alcalino.

### **5.5.3 Producción de caseinasa**

La producción de enzima se evaluó por distancia (mm) formada por halo de hidrólisis en placa con medio agar leche desnatada como se muestra en la Figura 16.



**Figura 15.** Evaluación de la hidrólisis de caseína por formación halos (a) (mm) de las repeticiones (1,2,3) y el control positivo (c).

El análisis estadístico ANOVA con un nivel de significancia de 0.05, demostró que no existe una diferencia significativa ( $F= 0,16$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,69$ ) aceptando la hipótesis nula que plantea que la dimensión de los halos de hidrólisis (mm) generados por la enzima proteolítica con acción sobre la caseína por parte de la cepa EEMA-4 respecto a la cepa control *Bacillus subtilis* 11714 son semejantes.

Las caseínas son un grupo de fosfoproteínas específicas de la leche de carácter hidrofóbico inicialmente que se pueden ser precipitadas por acidificación o bien por acción hidrolítica. La cadena está conformada de péptidos (aminoácidos y grupos fosfatos) de las cuales los microorganismos obtienen nitrógeno, aminoácidos y calcio por un proceso enzimático como los obtenidos en este estudio con acción similar a microorganismos presentes en la leche o bien como modelo de producción de desdoblamiento proteolítico como son *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Hussein et al., 2020b; Wang et al., 2013)

En mamíferos rumiantes como lo son bovinos, ovinos y caprinos se encuentran reservorios de este tipo de microorganismos a lo largo del sistema digestivo en los que tienen interacción con material vegetal y compuestos lácteos propios de cada especie lo que origina su capacidad proteolítica sobre la caseína (Mendoza, 2021; Tena et al., 2015).

Las investigaciones previas señalan, en especial que los Streptomyces marinos son capaces de hidrolizar diferentes polímeros como el almidón, gelatina, celulosa, caseína y urea que esta relacionada con el hospedero o condiciones ambientales, debido a que su metabolismo ayuda al desdoblamiento de macromoléculas (Ulrike Tarazona et al., 2018)

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- Se aislaron ocho cepas a partir de sedimentos marinos de la rizósfera de los manglares de la reserva ecológica Mataje-Cayapas clasificadas en el filo *Actinomicetos* según el estudio morfológico colonial (tamaño, color, aspecto y forma), su observación al microscópico (forma y tamaño celular) y la determinación Gram.
- Al evaluar la actividad enzimática de las cepas, siete de las ocho cepas presentaron actividad ureolítica, seis capacidades amilolíticas y cinco, acción proteolítica de caseína. Sin embargo, no se evidenció de actividad celulítica en ninguna de las cepas asiladas (EEMA).
- Debido a la falta de base de datos genómicos de acceso público del marcador rpoB, no se puede aseverar que las cepas EEMA (1) y (2) sean actinomicetos. Sin embargo, por su alto contenido de similitud la cepa EEMA-4 se identificó como *Streptomyces avermitilis*.
- Se encontraron similitudes al comparar la dimensión de los halos de hidrólisis (mm) creados por los extractos enzimáticos parcialmente purificados que contenían amilasa y caseinasa de las cepas EEMA-1 y EEMA-4 con extractos parcialmente purificados de la cepa control *Bacillus subtilis* 11714M. Sin embargo, el extracto de la cepa EEMA-2 parcialmente purificado que contenía ureasas presentó diferencias en las dimensiones de los halos de hidrólisis (mm) que los obtenidos por el extracto semi purificado de la cepa de control *Klebsiella pneumoniae*.

## 6.2 Recomendaciones

- Replicar el estudio en otras Reservas Naturales contemplando ecosistemas como el páramo andino y bosque húmedo amazónico para expandir la variedad genómica de actinomicetos en el Ecuador.
- Durante el proceso de obtención de la curva de crecimiento bacteriano realizar toma de muestras con intervalos de 6 horas, con el objetivo de tener mayor cantidad de datos experimentales que permitan mejorar y ajustar el modelo experimental describiendo mayor exactitud entre cada una de las fases (latencia, exponencial y estacionaria) de crecimiento bacteriano.
- Ampliar el estudio utilizando sustratos específicos como ácido fítico, pectinas, grasas y ésteres. Con el fin de evidenciar la capacidad de las cepas para producir fitasas, lipasas y pectinasas que son de interés biotecnológico.
- En la identificación molecular realizar un reconocimiento primario mediante marcadores moleculares con una base de datos más amplia como el 16s rRNA y realizar una delimitación más específica con el uso de genes con mayor precisión como son el *atpD* (que codifica la subunidad F1-Beta de la ATP-Sintasa), *recA* (recombinasa A), *rpoB* (subunidad de RNA polimerasa
- En el proceso de aislamiento de microorganismos marinos se recomienda realizar una fase de adaptación en medio de cultivo nutriente o selectivo con un porcentaje de salinidad equiparable al agua de mar y posteriormente realizar reducciones parciales del porcentaje de salinidad en el medio para lograr mantener y conservar las cepas en medio de cultivos bases como agar nutriente o caldo de soya trípico BD.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S. Z., Riaz, M., Ramzan, N., Tariq Zahid, M., Shakoori, F. R., & Rafatullah, M. (2014). *Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater*. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)
- Akinfemiwa, O., & Muniraj, T. (2021). Amylase. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557738/>
- Al-Agamy, M. H., Alhuzani, M. R., Kelany, M. S., & Hamed, M. M. (2021). *Enzyme from Marine Actinomycetes*. <https://doi.org/10.1155/2021/5289848>
- Azman, A. S., Othman, I., Velu, S. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue AUG, p. 856). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00856>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/mubr.00019-15>
- Beattie, A. J., Hay, M., Magnusson, B., de Nys, R., Smeathers, J., & Vincent, J. F. V. (2011). Ecology and bioprospecting. *Austral Ecology*, 36(3), 341–356. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02170.x>
- Bejarano, M. S. (2013). Bioprospección en el Ecuador: Los Casos de la Ayahuasca y el Convenio ESPOCH. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 154–167. [http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/enfoque/Documents/enfoque\\_001.pdf](http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/enfoque/Documents/enfoque_001.pdf)
- Berlicki, Ł., Bochno, M., Grabowiecka, A., Białas, A., Kosikowska, P., & Kafarski, P. (2012). N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases. *Amino Acids*, 42(5), 1937–1945. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0920-4>
- Bundale, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2015). Optimization of Culture Conditions for Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces* spp. Isolated from Soil. *Advances in Microbiology*, 05(06), 441–451. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56045>
- Charousová, I., Medo, J., Halenárová, E., & Javoreková, S. (2017). Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 8(2), 46–51. <https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR-161-16>
- Chavan, S., & Mulaje V. (2013). a Review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(5),

- Cooper, E. L. (2005). Bioprospecting: a CAM Frontier. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1093/ECAM/NEH062>
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., & Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55. <https://doi.org/10.22490/24629448.1717>
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. (2015). Biophysical Perspective The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysj*, 109, 1082–1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80–100. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>
- Deepa, S., Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2013). *Studies on biodiversity of Actinobacteria isolated from Mangroves of Vellappallam , Tamilnadu part of Bay of Bengal , India . 1(6)*, 614–617.
- Díaz, Y. (2020). *Determinación del contenido de azúcares, proteínas y nitrógeno presentes en el medios de cultivos modificados para el crecimiento vitro del hongo Colletotrichum sp fitopageno (Dioscorea alata) en Montería-Córdoba.*
- Florez, P. (2016). Capability and diversity of Cellulolytic bacteria isolated from three tropical habitats in Boyaca, Colombia. *Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos / Biodiversity and Ecosystem Services Acta Agron*, 65(4), 362–367. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- Frederick Grassle, J. (2013). Marine Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 5, 45–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00290-2>
- Gaballa, A., Cheng, R. A., Trmcic, A., Kovac, J., Kent, D. J., Martin, N. H., & Wiedmann, M. (2021). Development of a database and standardized approach for rpoB sequence-based subtyping and identification of aerobic spore-forming Bacillales. *Journal of Microbiological Methods*, 191, 106350. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106350>
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., & Raja, N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 426–435. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60092-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60092-1)
- Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Natural Product*

*Reports*, 34(10), 1203–1232. <https://doi.org/10.1039/c7np00026j>

- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Gunther, R., Erazo, G., Álvaro, R., & Arriaga, L. (2008). *Plan de Manejo Reserva Ecológica Manglares Cayapas Mataje - REMACAM*.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., & Ruan, J. S. (2009a). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24–44. <https://doi.org/10.3390/md7010024>
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., & Ruan, J. S. (2009b). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24–44. <https://doi.org/10.3390/md7010024>
- Hussein, N. N. A., Ibrahim, A. I., Kamar, F. H., & Nechifor, A. C. (2020a). Caseinase production and media optimization from *Bacillus subtilis*. *Revista de Chimie*, 71(11), 1–9. <https://doi.org/10.37358/RC.20.11.8368>
- Hussein, N. N. A., Ibrahim, A. I., Kamar, F. H., & Nechifor, A. C. (2020b). Caseinase production and media optimization from *Bacillus subtilis*. *Revista de Chimie*, 71(11), 1–9. <https://doi.org/10.37358/RC.20.11.8368>
- Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., & Jiang, C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, February 2016. <https://doi.org/10.5772/61457>
- Jiang, Z. K., Tuo, L., Huang, D. L., Osterman, I. A., Tyurin, A. P., Liu, S. W., Lukyanov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Korshun, V. A., Li, F. N., & Sun, C. H. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00868>
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Nguyen, T. H., Haltrich, D., & Khanongnuch, C. (2015). Characterization of a maltose-forming  $\alpha$ -amylase from an amyolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2015.06.010>

- Kappaun, K., Piovesan, A. R., Carlini, C. R., & Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 3. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2018.05.010>
- Konieczna, I., Zarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesinska, B., Fraczyk, J., Kaminski, Z., & Kaca, W. (2013). Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 789–806. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
- Leon, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patino, L., & Zerpa, R. (2007). Bioactives actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. *The Peruvian Journal of Biology*, 14(2), 259–270.
- Li, F., Liu, S., Lu, Q., Zheng, H., Osterman, I. A., Lukyanov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Liu, S., Ye, J., Huang, D., & Sun, C. (2019). Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable actinobacteria isolated from mangrove soil in futian and maowei-hai of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3476567>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Maghembe, R., Damian, D., Makaranga, A., Nyandoro, S. S., Lyantagaye, S. L., Kusari, S., & Hatti-Kaul, R. (2020). Omics for bioprospecting and drug discovery from bacteria and microalgae. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 5, p. 229). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050229>
- Malisorn, K., & Nikhome, K. (2014). Isolation and screening of Actinomycetes from soil for their enzymatic and antifungal activity. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(4), 151–156.
- Malla, J., & Ochoa, C. (2018). *Análisis financiero sobre la regulación a las importaciones como medidas de protección para el mejoramiento y desarrollo de las PYMES Alimenticias - subsector harinas, panificación y cereales ubicadas en la Provincia de Pichincha cantón Quito, periodo 201*.
- Mayanglambam, C. S., Singh, A. K., Singh, S., Ngathem, T. C., Lukram, S., Yengkhom, D. S., Mohanty, J., Angami, T., & Ashok, C. (2020). Enzymes from mangrove endophytes and their biotechnological/industrial applications. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819532-1.00017-2>
- Mazzei, L., Musiani, F., & Ciurli, S. (2017). Urease. In *RSC Metallobiology* (Vols. 2017-January, Issue 10, pp. 60–97). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788010580-00060>
- Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G., & Tafesse, M. (2021). *Isolation*

*and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria.*  
<https://doi.org/10.1155/2021/8888641>

- Mendoza, G. (2021). Manejo agronómico de plagas que afectan el sistema radical del viñedo. *INTA*, 1–34.  
[https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/10025/INTA\\_CRMendoza-SanJuan\\_EEAMendoza\\_Mendoza\\_G\\_Manejo\\_agronomico\\_de\\_plagas\\_que\\_afectan\\_al\\_sistema.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/10025/INTA_CRMendoza-SanJuan_EEAMendoza_Mendoza_G_Manejo_agronomico_de_plagas_que_afectan_al_sistema.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Mohamed, J., Raja, M., & REEHANA, N. (2019). Biochemical Screening of Marine Micromonospora Marina Kpms1 (Mh036351) and Its Antibacterial Activity Against Multidrug Resistant Bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(2), 405–410. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i2.29872>
- Morocho, F. A., Donoso, D. N. B., Armas, C. S. B., & Valenzuela, M. A. R. (2018). Importancia de la calidad para el desarrollo del diseño industrial en el Ecuador. *INNOVA Research Journal*, 3(7), 1–16.  
<https://doi.org/10.33890/innova.v3.n7.2018.565>
- Mukhtar, S. (2017). *Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes.*  
<https://doi.org/10.4172/0974-276X.1000456>
- Noriler, S. A., Savi, D. C., Aluizio, R., Palácio-Cortes, A. M., Possiede, Y. M., & Glienke, C. (2018). Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, pantanal, and Cerrado. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1526. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01526/FULL>
- OMPI. (2019). *Índice Mundial de Innovación 2019: La India experimenta un importante avance, mientras que Suiza, Suecia, los Estados Unidos de América, Los Países Bajos y el Reino Unido lideran la clasificación; el proteccionismo comercial constituye un riesgo para el f.*  
[https://www.wipo.int/pressroom/es/articles/2019/article\\_0008.html](https://www.wipo.int/pressroom/es/articles/2019/article_0008.html)
- 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.
- Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., & Zambrano, J. (2019). Impactos de la contaminación sobre los manglares de Ecuador. *Manglares de América*, November, 375–419.
- Rao, T. E., Imchen, M., & Kumavath, R. (2017). Marine Enzymes: Production and Applications for Human Health. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.006>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays*

*Biochem*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>

- Sánchez Castelblanco, E. M., Heredia Martín, J. P., Buitrago Morales, S. M., & Medina Rodríguez, J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 36–44. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- Saravanakumar, K., Rajendran, N., Kathiresan, K., & Chen, J. (2016). Bioprospects of Microbial Enzymes from Mangrove-Associated Fungi and Bacteria. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 79). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.08.003>
- Servent, A., Abreu, F. A. P., Dhuique-Mayer, C., Belleville, M. P., & Dornier, M. (2020). Concentration and purification by crossflow microfiltration with diafiltration of carotenoids from a by-product of cashew apple juice processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 66(September), 102519. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102519>
- Shen, T., Lei, Y., Pu, X., Zhang, S., & Du, Y. (2020). Identification and application of *Streptomyces microflavus* G33 in compost to suppress tomato bacterial wilt disease. *Applied Soil Ecology*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103724>
- Sinha, P., Srivastava, G. N., Tripathi, R., Mishra, M. N., & Anupurba, S. (2020). Detection of mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains inhibiting wild type probe hybridization in the MTBDR plus assay by DNA sequencing directly from clinical specimens. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-020-01967-5/FIGURES/4>
- Tarazona J., U., León Q., J., Galindo C., N., Vallejo, M., & Marguet, E. (2018). Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su actividad antagonista frente a *Vibrio* sp aislados de «langostino blanco» *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 676. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14499>
- Tena, A. R., Rincón Enríquez, G., Evangelista Martínez, Z., & Quiñones Aguilar, E. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Universitaria Digital*, 16. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
- Ulrike Tarazona, J., Jorge León, Q., Nadia Galindo, C., Vallejo, M., & Marguet, E. (2018). Characterization of actinomycetes of marine sediment and their antagonistic activity against *vibrio* sp. Isolated from «whiteleg shrimp» *litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(2), 676–691. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14999>
- van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical

- ecology of antibiotic production by actinomycetes. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 3, pp. 392–416). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
- Vergara, M., & Sánchez, F. (2022). *Determinantes de la poca industrialización dentro del cantón esmeraldas*.
- Vishal, T. (2017). *Fundamentals of Biotechnology, IIT Lecture 9: Microbial Growth Kinetics*. 44–49.
- Wang, J., Su, Y., Jia, F., & Jin, H. (2013). *Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis*. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-62>
- Xu, D.-B., Ye, W.-W., Han, Y., Deng, Z.-X., & Hong, K. (2014). marine drugs Natural Products from Mangrove Actinomycetes. *Mar. Drugs*, 12, 2590–2613. <https://doi.org/10.3390/md12052590>
- Zhao, X. Q., Xu, X. N., & Chen, L. Y. (2016). Production of Enzymes from Marine Actinobacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*, 78, 137–151. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.06.002>
- Abbas, S. Z., Riaz, M., Ramzan, N., Tariq Zahid, M., Shakoori, F. R., & Rafatullah, M. (2014). *Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater*. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)
- Akinfemiwa, O., & Muniraj, T. (2021). Amylase. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557738/>
- Al-Agamy, M. H., Alhuzani, M. R., Kelany, M. S., & Hamed, M. M. (2021). *Enzyme from Marine Actinomycetes*. <https://doi.org/10.1155/2021/5289848>
- Azman, A. S., Othman, I., Velu, S. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue AUG, p. 856). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00856>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00019-15>
- Beattie, A. J., Hay, M., Magnusson, B., de Nys, R., Smeathers, J., & Vincent, J. F. V. (2011). Ecology and bioprospecting. *Austral Ecology*, 36(3), 341–356. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02170.x>
- Bejarano, M. S. (2013). Bioprospección en el Ecuador: Los Casos de la Ayahuasca y el Convenio ESPOCH. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 154–167. [http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/enfoque/Documents/enfoque\\_001.pdf](http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/enfoque/Documents/enfoque_001.pdf)

- Berlicki, Ł., Bochno, M., Grabowiecka, A., Białas, A., Kosikowska, P., & Kafarski, P. (2012). N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases. *Amino Acids*, 42(5), 1937–1945. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0920-4>
- Bundale, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2015). Optimization of Culture Conditions for Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces* spp. Isolated from Soil. *Advances in Microbiology*, 05(06), 441–451. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56045>
- Charousová, I., Medo, J., Halenárová, E., & Javoreková, S. (2017). Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 8(2), 46–51. <https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR-161-16>
- Chavan, S., & Mulaje V. (2013). a Review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(5), 1730. [www.ijpsr.com](http://www.ijpsr.com)
- Cooper, E. L. (2005). Bioprospecting: a CAM Frontier. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1093/ECAM/NEH062>
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., & Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55. <https://doi.org/10.22490/24629448.1717>
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. (2015). Biophysical Perspective The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysj*, 109, 1082–1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80–100. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>
- Deepa, S., Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2013). *Studies on biodiversity of Actinobacteria isolated from Mangroves of Vellappallam , Tamilnadu part of Bay of Bengal , India .* 1(6), 614–617.
- Díaz, Y. (2020). *Determinación del contenido de azúcares, proteínas y nitrógeno presentes en el medios de cultivos modificados para el crecimiento vitro del hongo Colletotrichum sp fitopageno (Dioscorea alata) en Montería-Córdoba.*
- Florez, P. (2016). Capability and diversity of Cellulolytic bacteria isolated from three tropical habitats in Boyaca, Colombia. *Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos /*

- Biodiversity and Ecosystem Services Acta Agron*, 65(4), 362–367.  
<https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- Frederick Grassle, J. (2013). Marine Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 5, 45–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00290-2>
- Gaballa, A., Cheng, R. A., Trmcic, A., Kovac, J., Kent, D. J., Martin, N. H., & Wiedmann, M. (2021). Development of a database and standardized approach for rpoB sequence-based subtyping and identification of aerobic spore-forming Bacillales. *Journal of Microbiological Methods*, 191, 106350. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106350>
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., & Raja, N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 426–435. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60092-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60092-1)
- Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 34(10), 1203–1232. <https://doi.org/10.1039/c7np00026j>
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Gunther, R., Erazo, G., Álvaro, R., & Arriaga, L. (2008). *Plan de Manejo Reserva Ecológica Manglares Cayapas Mataje - REMACAM*.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., & Ruan, J. S. (2009a). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24–44. <https://doi.org/10.3390/md7010024>
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., & Ruan, J. S. (2009b). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24–44. <https://doi.org/10.3390/md7010024>
- Hussein, N. N. A., Ibrahim, A. I., Kamar, F. H., & Nechifor, A. C. (2020a). Caseinase production and media optimization from *Bacillus subtilis*. *Revista de Chimie*, 71(11), 1–9. <https://doi.org/10.37358/RC.20.11.8368>
- Hussein, N. N. A., Ibrahim, A. I., Kamar, F. H., & Nechifor, A. C. (2020b). Caseinase production and media optimization from *Bacillus subtilis*. *Revista de Chimie*,

71(11), 1–9. <https://doi.org/10.37358/RC.20.11.8368>

- Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., & Jiang, C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, February 2016. <https://doi.org/10.5772/61457>
- Jiang, Z. K., Tuo, L., Huang, D. L., Osterman, I. A., Tyurin, A. P., Liu, S. W., Lukyanov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Korshun, V. A., Li, F. N., & Sun, C. H. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00868>
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Nguyen, T. H., Haltrich, D., & Khanongnuch, C. (2015). Characterization of a maltose-forming  $\alpha$ -amylase from an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2015.06.010>
- Kappaun, K., Piovesan, A. R., Carlini, C. R., & Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 3. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2018.05.010>
- Konieczna, I., Zarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesinska, B., Fraczyk, J., Kaminski, Z., & Kaca, W. (2013). Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 789–806. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
- Leon, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patino, L., & Zerpa, R. (2007). Bioactives actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. *The Peruvian Journal of Biology*, 14(2), 259–270.
- Li, F., Liu, S., Lu, Q., Zheng, H., Osterman, I. A., Lukyanov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Liu, S., Ye, J., Huang, D., & Sun, C. (2019). Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable actinobacteria isolated from mangrove soil in futian and maowei hai of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3476567>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Maghembe, R., Damian, D., Makaranga, A., Nyandoro, S. S., Lyantagaye, S. L., Kusari, S., & Hatti-Kaul, R. (2020). Omics for bioprospecting and drug discovery from bacteria and microalgae. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 5, p. 229). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050229>
- Malisorn, K., & Nikhome, K. (2014). Isolation and screening of Actinomycetes from soil for their enzymatic and antifungal activity. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(4),

151–156.

- Malla, J., & Ochoa, C. (2018). *Análisis financiero sobre la regulación a las importaciones como medidas de protección para el mejoramiento y desarrollo de las PYMES Alimenticias - subsector harinas, panificación y cereales ubicadas en la Provincia de Pichincha cantón Quito, periodo 201.*
- Mayanglambam, C. S., Singh, A. K., Singh, S., Ngathem, T. C., Lukram, S., Yengkhom, D. S., Mohanty, J., Angami, T., & Ashok, C. (2020). Enzymes from mangrove endophytes and their biotechnological/industrial applications. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819532-1.00017-2>
- Mazzei, L., Musiani, F., & Ciurli, S. (2017). Urease. In *RSC Metallobiology* (Vols. 2017-January, Issue 10, pp. 60–97). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788010580-00060>
- Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G., & Tafesse, M. (2021). *Isolation and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria*. <https://doi.org/10.1155/2021/8888641>
- Mendoza, G. (2021). Manejo agronómico de plagas que afectan el sistema radical del viñedo. *INTA*, 1–34. [https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/10025/INTA\\_CRMendoza-SanJuan\\_EEAMendoza\\_Mendoza\\_G\\_Manejo\\_agronomico\\_de\\_plagas\\_que\\_afectan\\_al\\_sistema.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/10025/INTA_CRMendoza-SanJuan_EEAMendoza_Mendoza_G_Manejo_agronomico_de_plagas_que_afectan_al_sistema.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Mohamed, J., Raja, M., & REEHANA, N. (2019). Biochemical Screening of Marine Micromonospora Marina Kpms1 (Mh036351) and Its Antibacterial Activity Against Multidrug Resistant Bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(2), 405–410. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i2.29872>
- Morocho, F. A., Donoso, D. N. B., Armas, C. S. B., & Valenzuela, M. A. R. (2018). Importancia de la calidad para el desarrollo del diseño industrial en el Ecuador. *INNOVA Research Journal*, 3(7), 1–16. <https://doi.org/10.33890/innova.v3.n7.2018.565>
- Mukhtar, S. (2017). *Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes*. <https://doi.org/10.4172/0974-276X.1000456>
- Noriler, S. A., Savi, D. C., Aluizio, R., Palácio-Cortes, A. M., Possiede, Y. M., & Glienke, C. (2018). Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, pantanal, and Cerrado. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1526. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01526/FULL>
- OMPI. (2019). *Índice Mundial de Innovación 2019: La India experimenta un importante avance, mientras que Suiza, Suecia, los Estados Unidos de América, Los Países*

*Bajos y el Reino Unido lideran la clasificación; el proteccionismo comericla constituye un riesgo para el f.*  
[https://www.wipo.int/pressroom/es/articles/2019/article\\_0008.html](https://www.wipo.int/pressroom/es/articles/2019/article_0008.html)

- 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.
- Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., & Zambrano, J. (2019). Impactos de la contaminación sobre los manglares de Ecuador. *Manglares de América, November*, 375–419.
- Rao, T. E., Imchen, M., & Kumavath, R. (2017). Marine Enzymes: Production and Applications for Human Health. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.006>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Sánchez Castelblanco, E. M., Heredia Martín, J. P., Buitrago Morales, S. M., & Medina Rodríguez, J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 36–44. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- Saravanakumar, K., Rajendran, N., Kathiresan, K., & Chen, J. (2016). Bioprospects of Microbial Enzymes from Mangrove-Associated Fungi and Bacteria. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 79). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.08.003>
- Servent, A., Abreu, F. A. P., Dhuique-Mayer, C., Belleville, M. P., & Dornier, M. (2020). Concentration and purification by crossflow microfiltration with diafiltration of carotenoids from a by-product of cashew apple juice processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 66(September), 102519. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102519>
- Shen, T., Lei, Y., Pu, X., Zhang, S., & Du, Y. (2020). Identification and application of *Streptomyces microflavus* G33 in compost to suppress tomato bacterial wilt disease. *Applied Soil Ecology*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103724>
- Sinha, P., Srivastava, G. N., Tripathi, R., Mishra, M. N., & Anupurba, S. (2020). Detection of mutations in the rpoB gene of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains inhibiting wild type probe hybridization in the MTBDR plus assay by DNA sequencing directly from clinical specimens. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-020-01967-5/FIGURES/4>
- Tarazona J., U., León Q., J., Galindo C., N., Vallejo, M., & Marguet, E. (2018).

- Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su actividad antagonista frente a *Vibrio* sp aislados de «langostino blanco» *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 676. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14499>
- Tena, A. R., Rincón Enríquez, G., Evangelista Martínez, Z., & Quiñones Aguilar, E. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Universitaria Digital*, 16. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
- Ulrike Tarazona, J., Jorge León, Q., Nadia Galindo, C., Vallejo, M., & Marguet, E. (2018). Characterization of actinomycetes of marine sediment and their antagonistic activity against *vibrio* sp. Isolated from «whiteleg shrimp» *litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(2), 676–691. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14999>
- van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 3, pp. 392–416). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
- Vergara, M., & Sánchez, F. (2022). *Determinantes de la poca industrialización dentro del cantón esmeraldas*.
- Vishal, T. (2017). *Fundamentals of Biotechnology, IIT Lecture 9 : Microbial Growth Kinetics*. 44–49.
- Wang, J., Su, Y., Jia, F., & Jin, H. (2013). *Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis*. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-62>
- Xu, D.-B., Ye, W.-W., Han, Y., Deng, Z.-X., & Hong, K. (2014). marine drugs Natural Products from Mangrove Actinomycetes. *Mar. Drugs*, 12, 2590–2613. <https://doi.org/10.3390/md12052590>
- Zhao, X. Q., Xu, X. N., & Chen, L. Y. (2016). Production of Enzymes from Marine Actinobacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*, 78, 137–151. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.06.002>

## ANEXOS

### Anexo 1. Salida de campo para extracción de muestras de suelo.



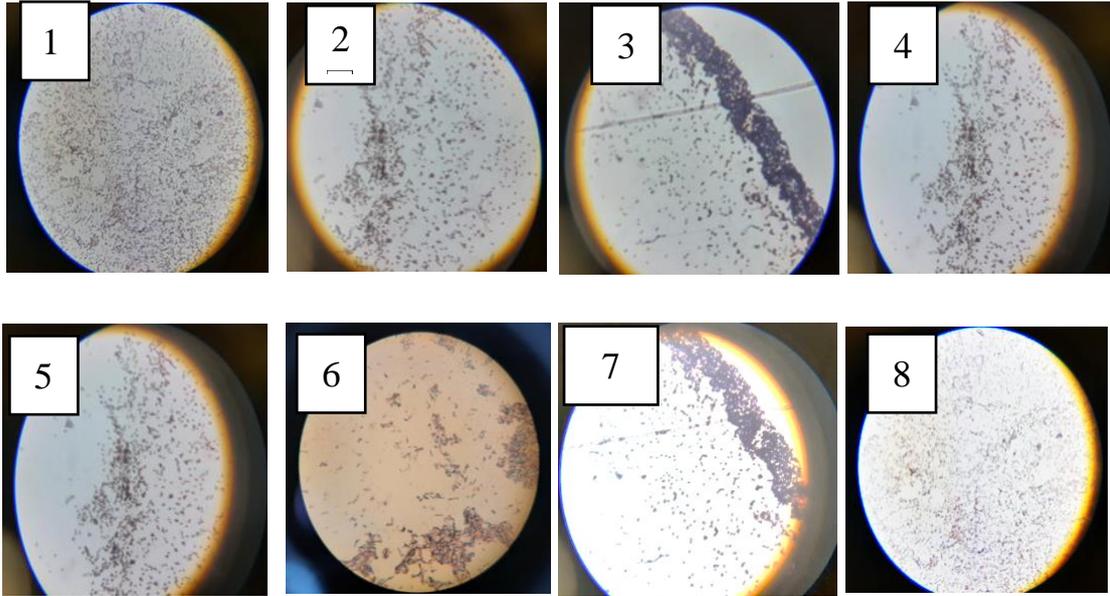
A. Rizofera de manglares, B. disposición puntos de muestras

### Anexo 2. Datos sub-muestras y punto de muestreo

Sub muestra	°T S.m	pH S.m	P	°T. A	pH .A	Coordenadas
1.1	17,2	8	5cm	24.6	8	1°24'10.8"N 78°52'36.3"W
1.2	17,2	8	5cm	24.7	8	1°24'10.8"N 78°52'36.3"W
2.1	18	8	5cm	24.7	8	1°24'10.7"N 78°52'36.3"W
2.2	17,8	8	5cm	24.7	8	1°24'10.7"N 78°52'36.3"W
3.1	17	8	5cm	24.7	8	1°24'10.4"N 78°52'36.3"W
3.2	17,1	8	5cm	24.7	8	1°24'10.4"N 78°52'36.3"W

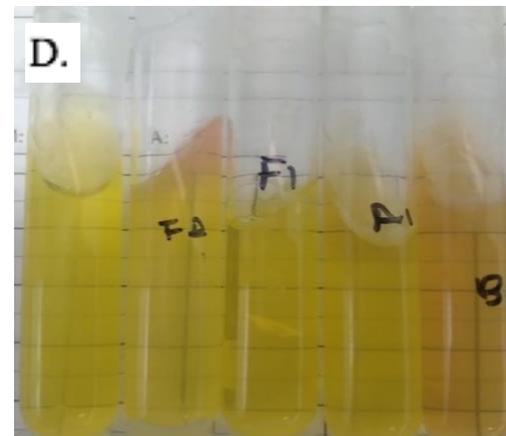
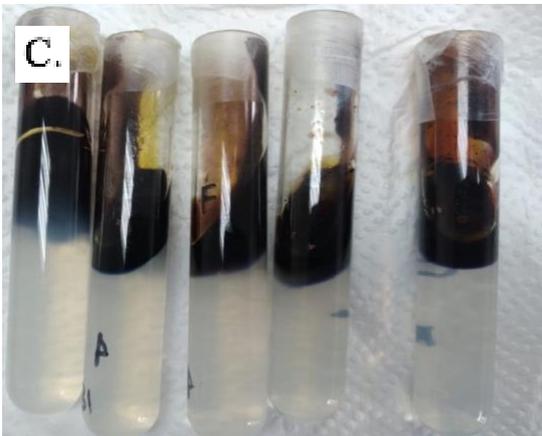
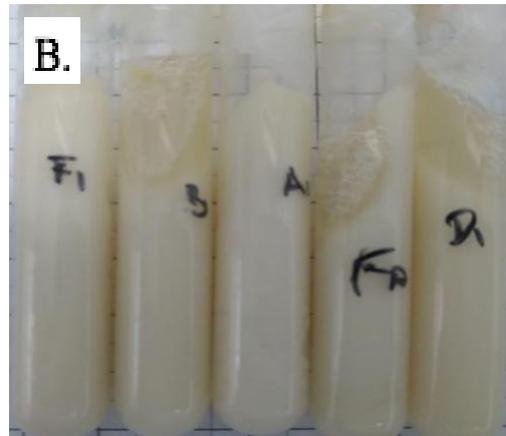
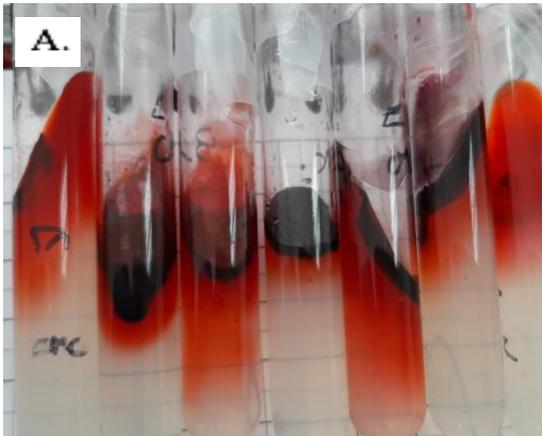
Código de submuestra; Temperatura sub muestra (°T, S.m); pH submuestra (pH. S.m); Profundidad de la que se tomo la muestra (P); Tempertura ambiental (°T.A); pH del agua (pH. A);

### Anexo 3. Morfología de cultivos aislados



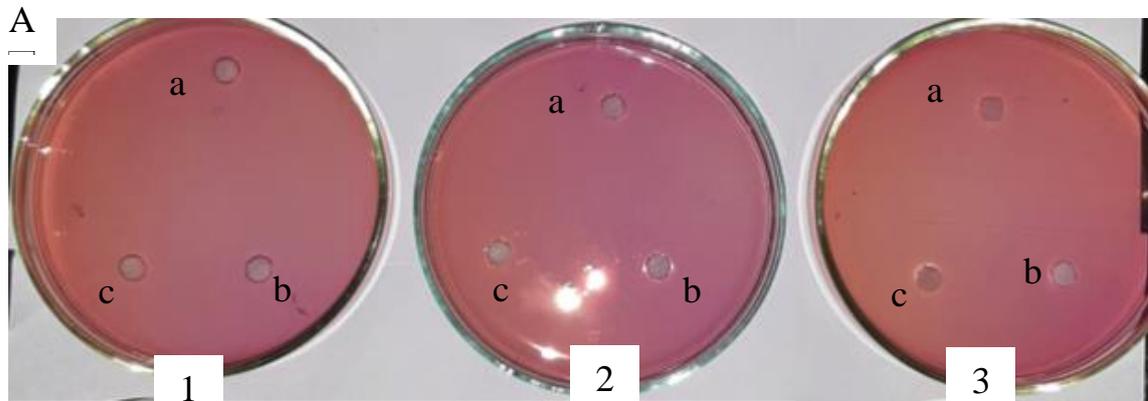
Morfología de cultivos aislados del conjunto bacteriano inicial observados en lente óptico 40x. Los cultivos presentan una morfología de bacilos Gram positivos ramificados (EEMA-1, EEMA-2, EEMA-3, EEMA-4, EEMA-5, EEMA-6, EEMA-7 y EEMA-8).

**Anexo 4. Pruebas enzimáticas para determinar la capacidad de producir enzimas hidrolíticas**



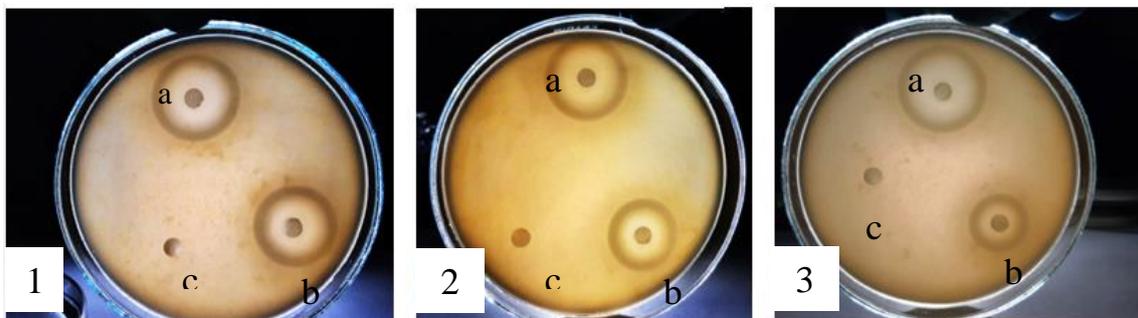
A. Prueba de actividad celulítica con rojo Congo como indicador, B. Prueba de actividad proteolítica, C. Prueba de actividad amilolíticas con lugol como indicador y D. Prueba de actividad ureasa con rojo fenol como indicador

**nexo 4.** Formación de halo de hidrólisis del extracto enzimático en placas Christensen Medio (urea agar base).



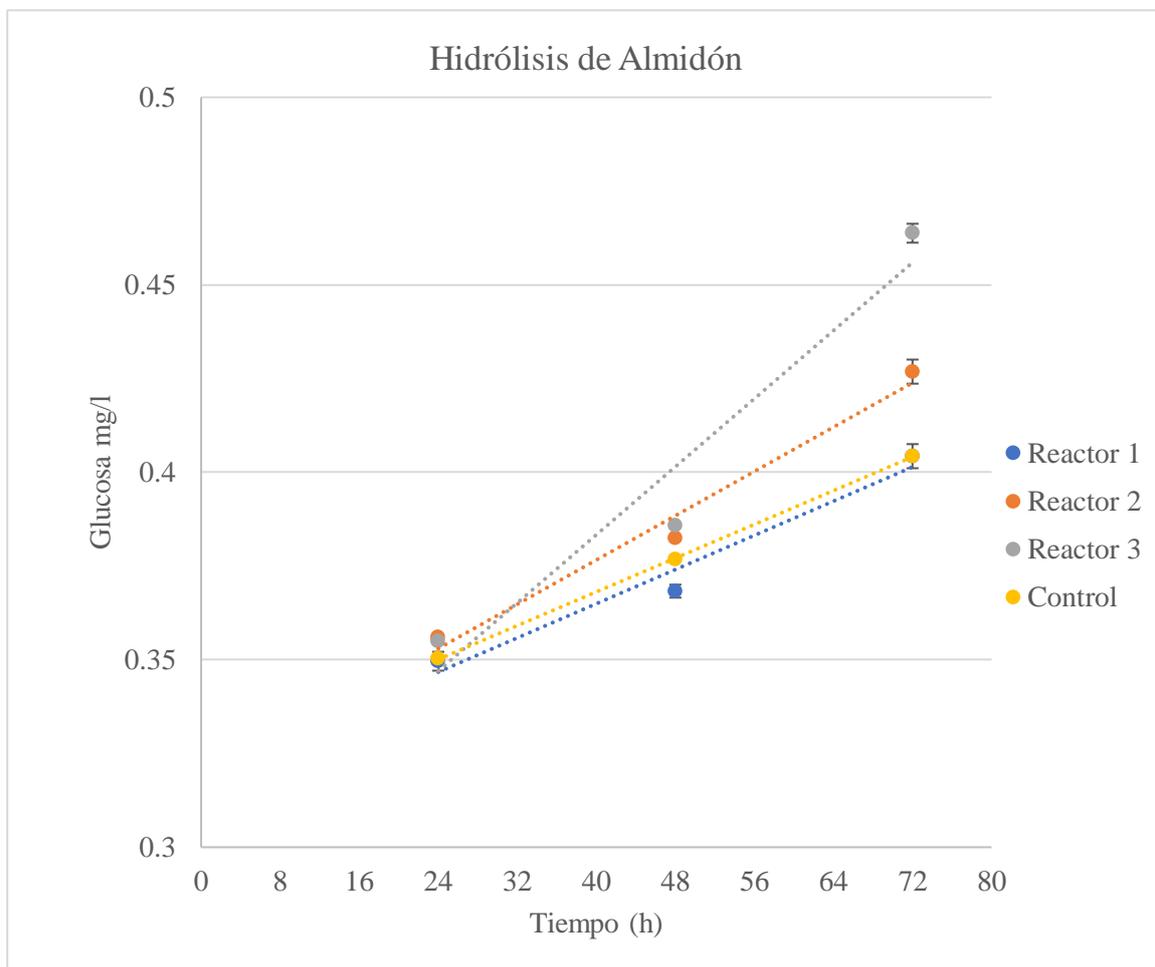
Placas de urea agar base con discos de papel filtro inoculados con 10 microlitros de extracto enzimático semi-purificado recuperado de biorreactores de EEMA-2 (a) y del control biológico positivo *K. pneumoniae* (b) y discos de control negativo. (c)

**Anexo 5.** Formación de halo de hidrólisis del extracto enzimático en placas de medio agar leche desnatada.



Placas de agar leche desnatada con discos de papel filtro inoculados con 10 microlitros de extracto enzimático semi-purificado recuperado de biorreactores de EEMA-1 (a) y del control *B. subtilis* (b) y discos de control negativo. (c)

**Anexo 5.** Glucosa mg/l liberados por la transformación enzimática del almidón cuantificada por el método de DNS



**Anexo 6.** *Cepas aisladas con mayor actividad enzimática*

A



B



C



Cepas aisladas de rizosfera de manglar con mayor actividad enzimática. (A) EEMA-1 “amilasa”, (B) EEMA-2 “ureasa” y (C) EEMA-4 “caseinasa”