



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DE *Mucor sp*
PARA LA PRODUCCIÓN DE UREASA Y SU POSTERIOR
INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

AUTOR

Angel Roberto Pilco Paguay

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DE *Mucor sp* PARA LA
PRODUCCIÓN DE UREASA Y SU POSTERIOR INMOVILIZACIÓN
ENZIMÁTICA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesora Guía
PhD Vivian Morera Córdova

Autor
Angel Roberto Pilco Paguay

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante Angel Roberto Pilco Paguay, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Vivian Morera Córdova

PhD en Ciencias Biomédicas

CC: 1756346811

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Mayra Fernanda Chico Terán

Máster en Biotecnología ambiental

CC: 1003327044

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Angel Roberto Pilco Paguay

CC: 0604255489

AGRADECIMIENTOS

A Vivian Morera Córdova y Edgar Velastegui quienes me guiaron en la realización de este proyecto y por aportar conmigo todos sus conocimientos sin objeción alguna.

A Javier Panchano y Mariuxy James por su ayuda incondicional y por formar parte no solo de este proyecto sino de mi vida, por sus consejos y apoyo.

DEDICATORIA

A la memoria de alguien muy especial en mi vida, mi amada madre Gladys Paguay porque siempre supe que desde el cielo junto a Dios me guiaba y a mi padre Angel Pilco porque su amor y consejos me levantaban cuando era seguro que iba desistir.

A mis queridas hermanas Yolanda y Cindy porque siempre me protegieron, me cuidaron y me instruyeron que las cosas se dan bajo la voluntad de Dios. A mis hermanos Angel y Luis porque su apoyo siempre estuvo presente.

A mis amigos del alma Daniela U, Michael M, Xavier C, Alfredo G y Nathaly B quienes me brindaron su amistad incondicional y me enseñaron a crecer como persona.

RESUMEN

La ureasa es un tipo de metaloenzima hexamérica que depende de dos iones de níquel por subunidad e hidroliza la urea para producir amoníaco y carbamato. El último compuesto se hidroliza espontáneamente para formar ácido carbónico y otra molécula de amoníaco. Las aplicaciones de esta enzima son variadas, se la utiliza para la determinación total de urea en la sangre y orina, en la industria vinícola, para la eliminación de la urea durante la diálisis, y se la emplea como controlador del pH. El objetivo del presente trabajo consistió en optimizar el medio de crecimiento de un hongo filamentoso *Mucor sp* para la producción y la inmovilización de ureasa. Se empleó un diseño experimental de superficie de respuesta 2^k rotacional donde se evaluaron las variables: pH y concentración de níquel para la optimización del medio de crecimiento del hongo, % glutaraldehído y tiempo para la inmovilización de la ureasa. La actividad enzimática fue la variable de respuesta. Los mejores resultados de este diseño se obtuvieron a pH 6.65 y concentración de Ni^{2+} 0.044 g/L. Estas condiciones produjeron una actividad enzimática teórica de 0.213 U/mL. Al llevar a cabo los experimentos con los parámetros óptimos, el valor experimental de la actividad enzimática fue de 0.2209 U/mL; en cuanto a la enzima inmovilizada la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación óptimos fueron de 1.37% y 81.31 minutos, respectivamente y una actividad teórica de 1.3107 U/mL y al llevar cabo el experimento con los parámetros óptimos la actividad enzimática fue de 1.239 U/mL. Además, se evaluaron las constantes cinéticas K_m y V_{max} tanto de la enzima libre como de la enzima inmovilizada mediante el método de Lineweaver-Burk. La K_m de la enzima inmovilizada resultó de 1.42 en comparación con 8.04 de la enzima libre. Este resultado indica que existe gran afinidad del sustrato por el sitio activo de la enzima ureasa.

ABSTRACT

Urease is a type of hexameric metalloenzyme, it depends of two nickel ions per subunit and hydrolyzes urea to produce ammonia and carbamate. The latter compound is spontaneously hydrolysed to form carbonic acid and another molecule of ammonia. The applications of this enzyme are varied, it is used for the total determination of urea in the blood and urine, in the wine industry, for the removal of urea during dialysis and is used as a pH controller. The aim of the present work was to optimize the growth medium of a filamentous fungus *Mucor sp* for the production and immobilization of urease. An experimental design of a rotational 2^k response surface was used to evaluate the variables: pH and nickel concentration for the optimization of the fungus growth medium, % glutaraldehyde and time for urease immobilization. The enzymatic activity was the response variable. The best results of this design were obtained at pH 6.65 and concentration of Ni^{2+} 0.044 g/L. These conditions produced a theoretical enzymatic activity of 0.213 U/mL. When carrying out the experiments with the optimal parameters, the experimental value of the enzymatic activity was 0.2209 U/mL. As for the immobilized enzyme, the optimal glutaraldehyde concentration and activation time were 1.37% and 81.31 minutes, respectively, and a theoretical activity of 1.3107 U/mL, and when the experiment was carried out with the optimal parameters, the enzymatic activity was 1,239 U/mL. In addition, the kinetic constants K_m and V_{max} of both the free enzyme and the enzyme immobilized by the Lineweaver-Burk method were evaluated. The K_m of the immobilized enzyme resulted in 1.42 compared to 8.04 of the free enzyme. This result indicates that there is high affinity of the substrate for the active site of the urease enzyme.

ÍNDICE

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Justificación	4
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Enzimas	5
2.2 Ureasas.....	7
2.4 Aplicaciones de la ureasa.....	15
2.5 Hongos filamentosos	18
2.5.1 <i>Mucor sp</i>	19
2.6 Inmovilización de enzimas	20
2.7 Metodología de superficie de respuesta	27
CAPITULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	29
CAPITULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	30
4.1 Muestra	30
4.2 Materiales y métodos	30
4.3 Evaluación estadística	39
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40

5.1	Identificación morfológica del hongo filamentoso <i>Mucor sp</i> mediante tinción con azul de lactofenol	40
5.2	Evaluación de la medición de la actividad catalítica de la enzima ureasa en <i>Mucor sp</i>	42
5.3	Diseño rotacional 2 ^k : medio de crecimiento de <i>Mucor sp</i>	44
5.6	Diseño rotacional 2 ^k : Inmovilización enzimática.....	51
5.7	Cálculo de parámetros cinéticos: Km y Vmax	56
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
6.1	Conclusiones	58
6.2	Recomendaciones.....	58
	REFERENCIAS	60
	ANEXOS	73

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas. Estas biomoléculas han sido objeto de estudio en los últimos años debido a la variedad de reacciones que llevan a cabo (Teijón, 2006). Las enzimas se clasifican en diferentes grupos de acuerdo al tipo de reacción que catalizan: oxido-reductasa, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (F. C. Rodríguez, 2005).

La ureasa (E.C.3.5.1.5) pertenece al grupo de las amidasas sub grupo importante dentro de las hidrolasas. Esta enzima cataliza la hidrólisis de las amidas, es decir, que provoca la ruptura de los enlaces peptídicos en amidas lineales con la incorporación de 2 moléculas de agua (Ferreiro, 2006; MacFaddin, 2003). La ureasa es una metaloenzima hexamérica dependiente de dos iones de níquel por subunidad e hidroliza la urea para producir amoníaco y carbamato; el último compuesto se hidroliza espontáneamente para formar ácido carbónico y otra molécula de amoníaco (Sujoy & Aparna, 2013).

La ureasa fue la primera enzima purificada y cristalizada, siendo este descubrimiento un hito en la historia de la Bioquímica (Sumner, 1926). Estos acontecimientos permitieron estudiar la estructura de una enzima para así determinar su funcionalidad.

La ureasa tiene diferentes aplicaciones. Por ejemplo, esta enzima se emplea en la determinación total de urea en la sangre y la orina, en la fabricación de vinos, para determinar metales pesados en aguas naturales, residuales y suelos, en la determinación de la creatinina, la arginina y la IgG, en la eliminación de la urea en la diálisis en pacientes con enfermedades renales, para el control de pH y la hidrólisis de la urea como fuente de amoníaco o dióxido de carbono dentro de la industria química (Yingjie & Cabral, 2002). Esta enzima se encuentra en fuentes naturales como son las plantas, las levaduras, las algas y los hongos filamentosos (Danial, Hamza, & Mahmoud, 2015).

Mucor spp es un hongo muy empleado en la Biotecnología desde hace algunos años para la producción de enzimas (Schuster, Dunn-Coleman, Frisvad, & Van Dijck, 2002). Algunos estudios han revelado que este hongo filamentoso está en

la capacidad de producir ureasa por lo que para la utilización de este microorganismo y la producción a gran escala de esta enzima es necesario optimizar los parámetros del medio de crecimiento del hongo (Brizova, Kralova, Demnerova, & Vins, 1992).

El uso de enzimas es a menudo limitado por el alto costo de producción y de purificación. Es por ello que hoy en día se observa una tendencia a emplear las enzimas inmovilizadas, lo que brinda la posibilidad de recuperarlas del medio de reacción para su posterior reutilización. (Sujoy & Aparna, 2013).

La inmovilización de una enzima se refiere al confinamiento de esta en una determinada región del espacio reteniendo su actividad catalítica (Seguel, 1971). Se puede realizar mediante el método físico donde no hay interacción química entre la enzima y el soporte o mediante el método químico con la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. La elección de un método de inmovilización depende del uso que se desea dar a la enzima y del tipo de método a utilizar (Ochoa, 2010.). El método físico de inmovilización resulta económicamente viable, pero provoca baja estabilidad de la enzima y también se produce la pérdida de la misma; en cuanto al método químico resulta relativamente caro pero la ventaja es que no ocurre la pérdida de la enzima ya que la unión por medio de los enlaces covalentes resulta en una unión fuerte y la estabilidad de la enzima puede mejorar (Rodríguez, 2005).

1.2. Planteamiento del problema

La producción a gran escala de ureasa empleando microorganismos y plantas resulta costosa y atenta contra la seguridad alimentaria y/o la salud humana (Ral, 2006).

Estudios anteriores han indicado que para la extracción de ureasa se emplean plantas de consumo humano como: *Phaseolus vulgaris*, *Citrullus lanatus*, *Canavalia ensiformis* y *Cucumis melo* (Sujoy, 2013; El-Hefnawy, et al., 2014; Mohamed, et al., 1999) quebrantando el estatuto principal de la FAO que plantea: *“Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos*

para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana.” (Ral, 2006).

Otros trabajos indican el empleo para la producción de ureasa de microorganismos tales como *Helicobacter pilory*, *Staphylococcus leei*, *Actinomyces naeslundii*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus pasteurii*, *Brucella suis*, *Helicobacter hepaticus*, *Bacillus sphaericus*, *Streptococcus salivarius* y *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, estos microorganismos requieren de mucha precaución para su manipulación ya que son altamente patógenos y pueden alojarse dentro del ser humano y los animales ocasionando enfermedades gastrointestinales como son las úlceras gástricas y el cáncer en el estómago (Serrano, 2013; Sujoy, 2013).

Todo esto conlleva a la necesidad de encontrar nuevas formas de producción de la enzima ureasa como lo es el empleo de microorganismos inocuos que, mediante la optimización de sus condiciones de cultivo, favorezcan la producción de ureasa.

Una de las alternativas es el empleo de un hongo filamentoso *Mucor sp* para la producción de ureasa. Este género es considerado de gran importancia económica por su fácil manejo, el rápido crecimiento y la producción de enzimas que son de fácil recuperación al emplear un método de fermentación líquida (Reyes & Aguilar, 2011). En cuanto a la patogenicidad de *Mucor sp* en el hombre, estos casos son reportados muy rara vez y dependen únicamente de especies que sean termotolerantes (Ellis, 2016).

Actualmente no se han reportado estudios científicos donde se optimice el medio de crecimiento de *Mucor sp* para la producción de ureasa ni para su inmovilización.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Optimizar las condiciones de crecimiento de un hongo filamentoso para la producción de ureasa y su posterior inmovilización química.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad enzimática de la ureasa de un hongo filamentoso.
- Optimizar las condiciones de crecimiento de *Mucor sp* para la producción de ureasa.
- Mejorar las condiciones de inmovilización de la enzima ureasa en soportes de quitosano por medio de enlaces covalentes.

1.4. Justificación

Campos como la medicina, el ambiental y vinícola, son sectores económicos importantes a nivel mundial que incorporan tecnologías para que los procesos que llevan a cabo sean eficaces y suministren mejores rendimientos con el uso de enzimas (Sujoy & Aparna, 2013).

La sostenibilidad de un proceso, se refiere a la cantidad de materia prima usada, la energía aplicada, la seguridad del proceso y la calidad del producto; si alguno de estos parámetros puede ser mejorado, los costes de producción disminuirían y se beneficiaría la competitividad del producto en el mercado. Tal es el caso del análisis de iones de metales pesados, donde se usa un equipo con ureasa que detecta los metales pesados. A comparación de otros equipos que se basan en técnicas más complejas (Yingjie & Cabral, 2002).

La ureasa ha sido reportada como una enzima cotizada a nivel industrial, es por eso que este trabajo ofrece una alternativa eficiente y viable económicamente de producir ureasa sin riesgos, ni perjuicios para la salud humana ni para la seguridad alimentaria.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Enzimas

Las enzimas son importantes para los seres vivos por todas las reacciones bioquímicas que catalizan dentro de ellas. Las enzimas aceleran la velocidad de una reacción sin que estas reacciones se alteren (Teijón, 2006).

Las enzimas, desde el punto de vista de su estructura química son grandes estructuras moleculares denominadas proteínas las cuales pueden tener entre 60 y 2500 aminoácidos. Sin embargo, sólo una pequeña parte de la estructura de la enzima, alrededor de 3 a 4 aminoácidos, va a interactuar con el sustrato para acelerar la reacción que cataliza. Esta zona de interacción se denomina sitio activo. Como todo catalizador, las enzimas intervienen en la transformación de sustratos en productos, pero no se consumen (Rodríguez, 2005).

Una misma molécula de enzima puede actuar un gran número de veces porque permite que la transformación de los reactivos a productos transcurra por un mecanismo de reacción, que requiere una menor barrera energética para producirse; a esta barrera energética se le llama energía de activación. Hoy en día las enzimas se emplean en una variedad de procesos industriales y domésticos (Voet & Voet, 2006).

Algunos ejemplos del uso de las enzimas a nivel industrial son la producción de: detergentes, las proteasas que se encuentran agregadas a los desinfectantes para aumentar su poder de limpieza; en la industria textil, las celulasas que degradan la tela jean dando un aspecto de prelavado; en la industria quesera, la quimosina se emplea para el cuajo y así darle su forma semisólida (Ferrández, 2002).

Por otra parte, es relevante recalcar las constantes cinéticas K_m y V_{max} , que son valores cinéticos importantes de una enzima, es por ello que al calcularlas proporcionará una aproximación de la afinidad de la enzima hacia el sustrato, es decir, el complejo enzima-sustrato (ES) y también la estimación de un número aproximado de los centros activos de la enzima.

La constante de Michaelis-Menten (K_m) indica dos características importantes para una enzima. Primero, indica la concentración de un sustrato cuando la mitad de los centros activos de la apoenzima se encuentran ocupados en una reacción catalítica, es decir, K_m brindará un valor de sustrato aproximado para que se realice una catálisis significativa. Segundo, K_m también indica la afinidad que existe al unirse la enzima con el sustrato; si k_2 es mayor que k_1 el valor que toma la constante de K_m (ES) será mayor. Por tanto la afinidad de la enzima por el sustrato es poca. Si k_1 es mayor que k_2 el valor de la constante de K_m será menor y por ende mayor afinidad de tal forma que menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima (Figura 1) (Berg, et al., 2007).

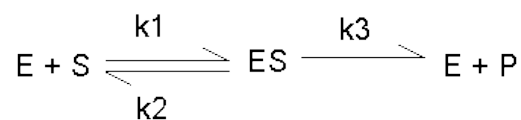


Figura 1. Reacción de la ecuación de Michaelis-Menten.

La velocidad máxima (V_{max}) se obtiene al conocer la K catalítica (K_{cat}) cuando la cantidad de sustrato convertido a producto por una unidad de tiempo cuando toda una molécula de sustrato se encuentra saturado por una molécula de enzimas. Por tanto, la velocidad con la que se da la reacción no va a depender de la concentración de sustrato y cuando esto ocurre la velocidad alcanza un valor máximo. Este valor depende de la cantidad de enzima que tengamos. Además, con la V_{max} se puede conocer el número de recambios o K_{cat} cuando se conoce el número de centros activos de la enzima (McGilvery, 1977; Berg, et al., 2007).

Conocer K_m y V_{max} es de mucha importancia, puesto que estos parámetros se pueden obtener de forma poco rigurosa a partir de la curva de Michaelis-Menten, donde primero se obtendría el valor de V_{max} y después, el valor de K_m . Pero existen métodos gráficos más fiables que facilitan el cálculo preciso de los valores de K_m y V_{max} . Los cálculos se hacen en base a transformaciones

matemáticas de la ecuación de Michaelis-Menten; uno de los métodos matemáticos más representados es Lineweaver-Burk (dobles inversos) (Figura 2). Donde se representa $1/V$ frente a $1/S$, que en otras palabras no es más que la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato. Así se obtiene una recta cuya intersección con el eje X es $-1/K_m$ y con el eje Y es $1/V_{max}$, siendo la pendiente K_m/V_{max} (Lieberman, et al., 2007).

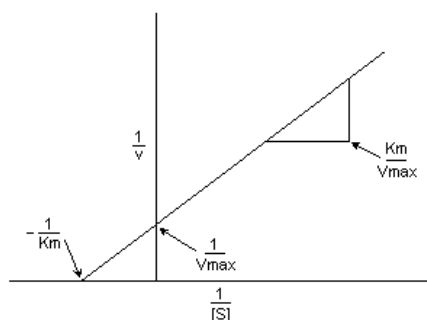


Figura 2. Gráfica de Lineweaver-Burk.

Tomado de (Lieberman, et al., 2007).

2.2 Ureasas

La ureasa o urea amidohidrolasa (E.C.3.5.1.5) fue la primera enzima estudiada varias décadas atrás y la primera en ser aislada y cristalizada por James Summer en 1926. Estos resultados sentaron las bases para demostrar que la ureasa y otras enzimas son también proteínas (Britannica, 2016). La ureasa se encuentra en semillas de plantas, microorganismos e invertebrados y está compuesta de dos a tres subunidades diferentes (alfa, beta y gamma) (Sujoy & Aparna, 2013).

En 1975 fue el primer ejemplo de *proteína más metal*, llamándoles a ese grupo específico de enzimas *metaloenzimas*. La ureasa es dependiente del ion níquel (Ni^{2+}), un metal importante para el centro activo de la apoenzima que cataliza la reacción de hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono.

La ureasa posee en su estructura dos iones de níquel (Ni^{2+}) en el centro activo, conectados por residuos de lisina carbamida y un donador de oxígeno, con una

distancia interatómica de 3,5Å. El primer ion de níquel está coordinado por dos histidinas y una molécula de agua, el segundo ion de níquel es similar al primer níquel, pero ésta tiene además de dos residuos de histidina un aspartato (Nordlander & Carlsson, 2010). La estructura del sitio activo de la ureasa está compuesta por cuatro histidinas, un aspartato y residuos de lisina carbamida que sirven como ligando para el níquel (figura 3) (InterPro, 2016).

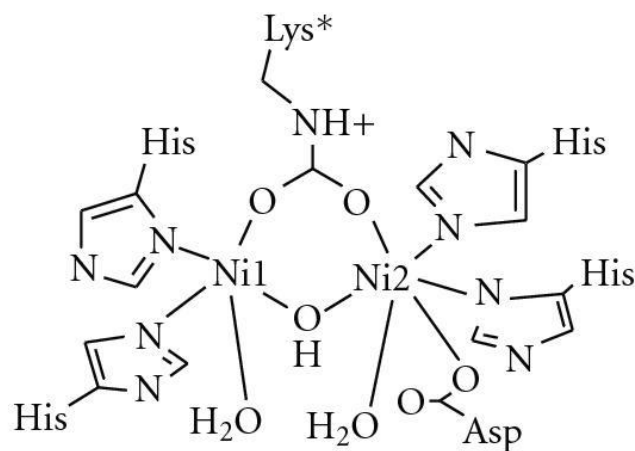


Figura 3. Estructura química del sitio activo de la ureasa.

Tomado de (InterPro, 2016).

La ureasa es una proteína que independientemente de su origen y estructura cuaternaria, comparte una identidad del 50-60% en la secuencia de aminoácidos. La ureasa de hongos y plantas poseen un solo tipo de subunidad, alrededor de 840 aminoácidos. Por el contrario, la ureasa de bacterias son multiméricas de dos o tres cadenas de polipéptidos. Esta enzima es codificada por tres genes ureA, ureB y ureC. La diferencia entre las especies son las subunidades que posee, esto se debe a que el marco de lectura abierta (ORFs) se superponen por un solo nucleótido en urea y ureB (Sujoy & Aparna, 2013).

Es importante recalcar que los análisis genéticos de la ureasa son de suma importancia vislumbrarlos aquí para poder comprender la afinidad y la eficacia con la que la ureasa cataliza la urea. A continuación se detallan cuatro genes importantes implicado con el uso del ion níquel (Ni²⁺) dentro del centro activo

para la catálisis de la urea, demostrando así lo significativo de este ion metálico para la enzima y en este estudio (Sujoy & Aparna, 2013).

Los análisis genéticos de microorganismos revelaron que existe una gran posibilidad de eliminar la actividad de la ureasa al interrumpir distintos genes que codifican la información de subunidades de la ureasa implicados en el montaje del ion metálico en la proteína. Demostrando que cuatro genes accesorios llamados ureD, ureE, ureF y ureG están involucrados en la biosíntesis de centro activo de níquel (figura 4) (Fong et al., 2013).

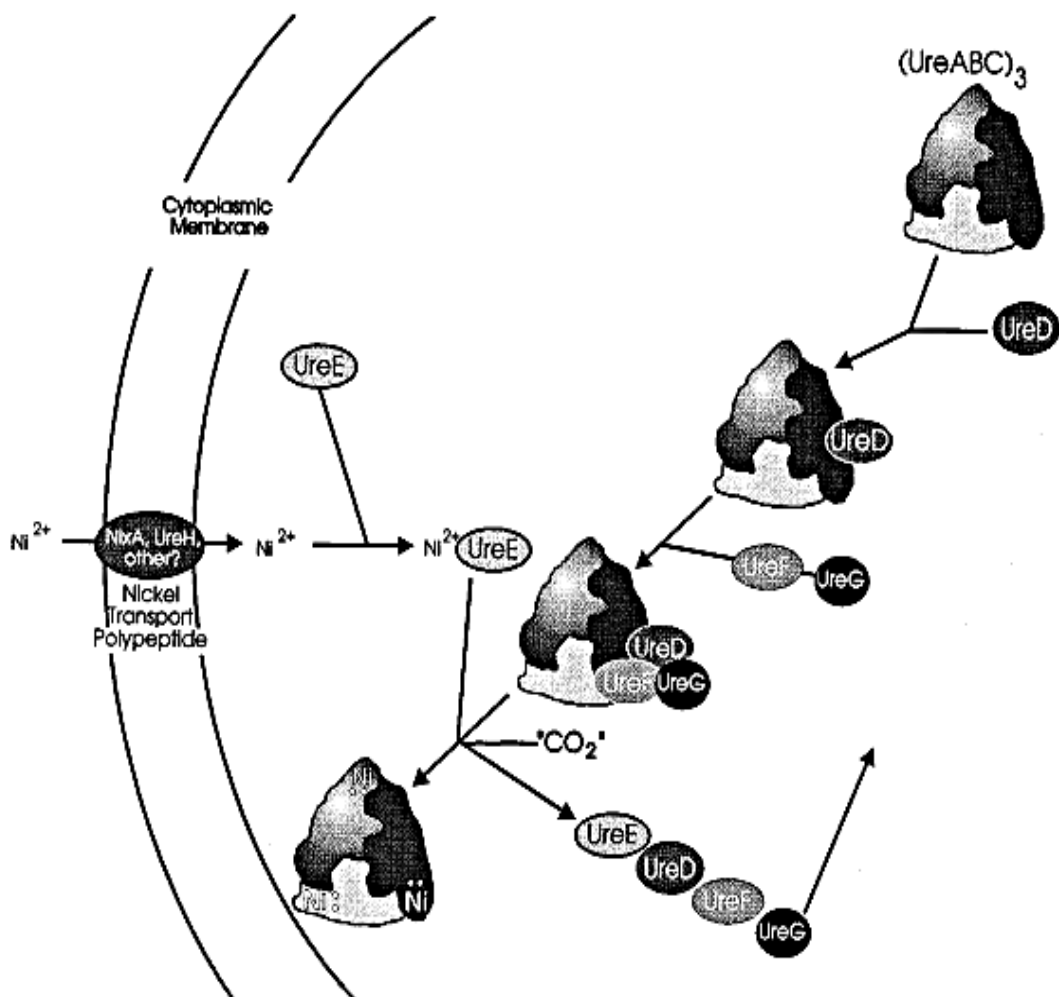


Figura 4. Genes involucrados en la activación de la ureasa por medio del ion níquel.

Tomado de (Fong et al., 2013).

La apoenzima de la ureasa se ensambla a partir de tres copias de cada subunidad diferente de polipéptido, siendo estos: ureA, ureB, y ureC, estequiométricamente (ureABC). En la activación *in vivo* de la apoenzima se requiere la presencia de iones de níquel, dióxido de carbono, y numerosos productos de los genes accesorios de ureasa (Bakhtiari et al., 2006).

ureD, sirve como una proteína chaperona específica que facilita el montaje correcto del centro metálico; ureF o ureG se unen al complejo, por lo que la apoenzima ya es capaz de aceptar iones de níquel (Ni^{2+}) en el sitio activo de una manera productiva. La función de estas proteínas incluye la generación o el suministro de dióxido de carbono para el lugar de montaje del centro metálico, facilitando la interacción productiva entre la apoproteína ureasa y la holoproteína ureE (Sujoy & Aparna, 2013).

Tras la activación, ureD, ureE, ureF, y ureG se disocian de la enzima y se reciclan para la interacción con la siguiente molécula de apoenzima ureasa o con otra "ureABC" que son unidades en la misma molécula. El resultado neto es que la ureasa se une dos iones de níquel por subunidad (Sujoy & Aparna, 2013).

La ureasa es una enzima completamente específica por su sustrato que es la urea y no por análogos como la thiourea, entre otros (Vicente, Nieto, & Legaz, 1983). Esta enzima se encuentra en el citoplasma de la célula, es decir, está intracelular (Bakhtiari et al., 2006).

El pH es también importante para la estabilidad de la metaloenzima, ya que si bien es estable a pH neutro, ésta se inactiva a pH inferior a 4,5 (Athmann et al., 2000) y en el medio en la que actúa tiende a incrementar ya que la solución es protonada por los productos de la hidrólisis. Los aminoácidos esenciales del centro activo se ven afectados por un cambio de pH. Este cambio influye en la ionización de estos aminoácidos que están involucrados en la formación de productos por catalizar el sustrato (Khan, Javed, & Zahoor, 2013).

El mecanismo de acción de la ureasa empieza cuando el níquel (Ni^{2+}) se comporta como un ácido de Lewis y polariza el grupo carbonilo de la urea e inmediatamente ocurre un ataque nucleofílico de la ureasa hacia su sustrato. El

oxígeno y uno de los átomos de nitrógeno desplazan las dos moléculas de agua permitiendo que el grupo carbonilo (polarizado) sea atacado por el hidróxido con la transferencia de protones adecuados, es decir, a uno de los dos grupos amino de la urea (Serrano, 2013). La unión C-O expulsa uno de los iones de amonio y el segundo oxígeno forma una doble cadena desplazando los electrones hacia la segunda molécula de amonio y la formación de CO_2 en el proceso, de forma explícita se observa en la Figura 5 (Nordlander & Carlsson, 2010).

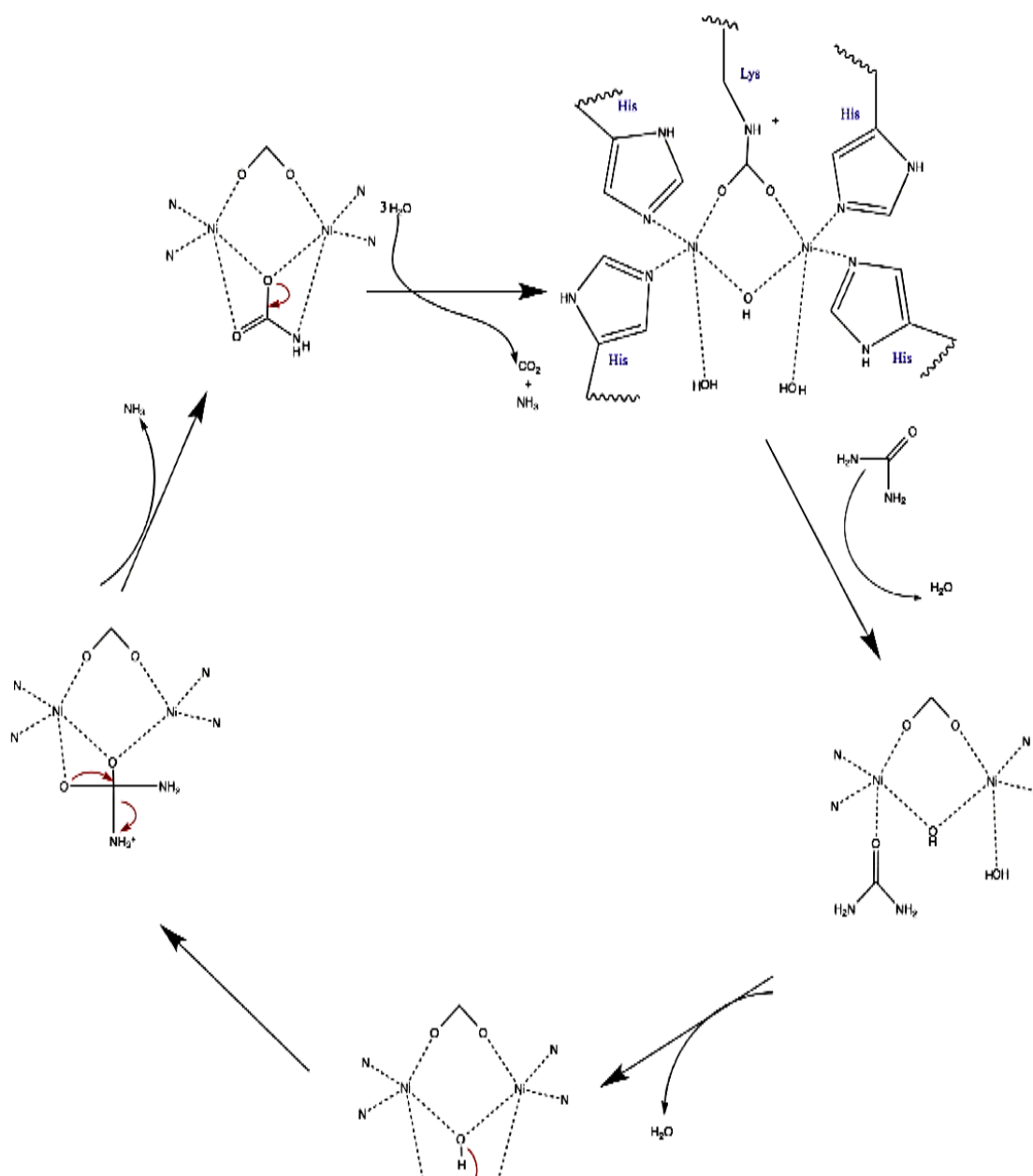
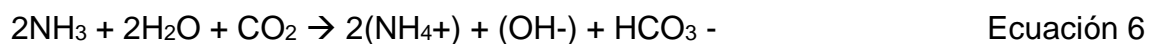


Figura 5. Mecanismo de hidrólisis de la ureasa.

Tomado de (Nordlander & Carlsson, 2010).

La reacción completa de hidrólisis de la urea incluye varios pasos: la metaloenzima hidroliza la urea, produciendo amoníaco y carbamato (ecuación 1). Posteriormente el carbamato se hidroliza produciendo otra molécula de amoníaco y dióxido de carbono (ecuación 2). En la solución el dióxido de carbono y el amoníaco mantienen un equilibrio entre sus formas de hidronación y dehidronación, según la nomenclatura IUPAC (ecuación 3, 4), dando como resultado un incremento en el pH (Adriana Acosta Gómez, 2006). Luego la carbamida ácida se descompone de manera rápida para formar amonio y dióxido de carbono (ecuación 5). Finalmente, se forman 2 moléculas de amonio, 2 moléculas de agua y una molécula de dióxido de carbono (ecuación 6) (Serrano, 2013).



2.3 Actividad catalítica de la ureasa

Se define como la cantidad de enzima (E) que convertirá una cierta cantidad de sustrato (S) a producto (P) en un período de tiempo específico y en condiciones de temperatura y pH constante (Abdi, 2012). La actividad de mide de acuerdo a la actividad catalítica de la enzima (figura 6) (Velastegui & Granja, 2014).

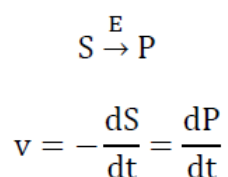


Figura 6. Representación actividad enzimática.

Los factores que afectan a la actividad de una enzima incluyen concentraciones de sustrato (S), pH, fuerza iónica y la naturaleza de las sales presentes, y la temperatura (Scopes, 2002).

El cálculo de la actividad catalítica de la ureasa se basa en determinar la cantidad de sustrato catalizado o producto formado, para esto es necesario realizar una curva de calibración o una recta de regresión, cuyo principio físico es determinar la variación de absorbancia (nanómetros nm) mediante espectrofotometría (Velastegui & Granja, 2014).

El reactivo de Nessler es usado para la determinación de amonio en un medio acuoso, por lo que al añadir urea (S) y la ureasa, se da una reacción de hidrólisis. Cuando el reactivo capta la molécula de amonio inmediatamente torna su color de blanco a uno amarillento. Esta solución es finalmente medida en un espectrofotómetro a una absorbancia específica que al ser interpolada en una curva de calibración con estándares de sustrato conocido, se puede determinar la concentración de producto formado en la muestra de interés (Albeiro, 2009).

Esta curva de calibrado arroja una ecuación algebraica lineal del tipo (Ecuación 7):

$y = mx + b$, despejando

$$x = (y - b) / m \quad \text{Ecuación 7}$$

Dónde: y = Absorbancia, m = sensibilidad de calibración del método, x = concentración y b = error sistemático.

Cuyo resultado de la estandarización, como la concentración con unidades de Molar (M) o Milimolar (mM), cambia respecto a la cantidad de producto (Albeiro, 2009).

Usando el valor de la pendiente (Ecuación 7) es indispensable para el cálculo de la actividad ureasa, sus unidades son U/mL proteína total. Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el

número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml), mediante la ecuación 8 se calcula definitivamente la actividad de la ureasa (Velastegui & Granja, 2014).

$$\frac{\text{Pendiente}}{\text{L rx min}} \times \frac{1 \text{ L rx}}{1000 \text{ mL rx}} \times \frac{\text{Volumen total de la celda}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1000 \text{ umol}}{1 \text{ mmol}} = \text{actividad enz U/mL proteína total}$$

Ecuación 8. Cálculo de actividad enzimática.

La urea como sustrato de la ureasa

Llamada carbamida o diaminometanona, de fórmula $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ se observa en la figura 7; es cristalina e incolora, se produce de forma natural en mamíferos como desechos de la deaminación de compuestos como proteínas y ácidos nucleicos, este proceso se da a nivel del hígado y sale en forma líquida ya que la urea es soluble en agua (Lorenc, 2008).

Este compuesto químico es el sustrato perfecto de la enzima ureasa ya que existe un ataque nucleofílico específico en el grupo carbonilo de la urea lo que permite la hidrólisis de este compuesto en dióxido de carbono y amonio (Vicente et al., 1983).

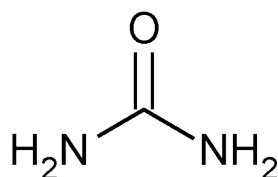


Figura 7. Estructura química de la urea.

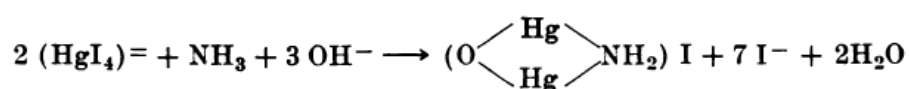
Tomado de (Lorenc, 2008).

Reactivo de Nessler

Llamado teraiodomercurio de potasio (II), es una sustancia acuosa de yoduro de potasio, cloruro de mercurio e hidróxido de potasio y se usa como prueba

para la detección de amonio y amoniaco en soluciones acuosas como en sangre, agua u orina, formando un color amarillento, en la ecuación 9 se puede ver la reacción producida entre el reactivo de Nessler con el amonio (MerriamWebster, 2015).

La concentración mínima de mercurio requerido para la reacción de Nessler con el amonio o amoniaco se aproxima a 86% del valor estequiométrico por lo que el nitrógeno se puede determinar mediante espectrofotometría aun cuando la concentración de mercurio sea baja (Leonard, 1961).



Ecuación 9. Reacción del reactivo de Nessler con el amonio.

2.4 Aplicaciones de la ureasa

Las aplicaciones de la ureasa una vez pura son muy variadas a nivel industrial y otros campos en la Biotecnología, entre ellas tenemos:

Medicina

Análisis de la concentración de urea en la sangre

El análisis de urea en los líquidos biológicos es importante en las investigaciones médicas. Estudios han sido publicados en cuanto a la determinación de la urea en la sangre mediante el uso de ureasa. Una vez que la urea es hidrolizada por la ureasa formando dióxido de carbono y amonio, se obtiene un método analítico donde el amonio se convierte en glutamato por presencia de cetoglutarato y NADH y por acción de la glutamato deshidrogenasa; esta reacción se mide en un espectrofotómetro a 340nm por medio de la disminución de la absorbancia al oxidarse el NADH a NAD⁺ proveyendo la concentración de urea en la muestra de sangre y sirve como un indicador de la función renal, evitando así la enfermedad ozotemia que es el aumento anormal de la urea en el plasma sanguíneo (Linear, 2016).

Análisis de Creatinina

La creatinina es un compuesto nitrogenado que se encuentra en el tejido muscular y en células. En la medicina se utiliza la creatinina para determinar el equilibrio peritoneal (PET) de los órganos. Por tanto, evaluar la concentración de la creatinina resulta relevante para una adecuada diálisis (Predovan & Klari, 2012). Para ello el método de análisis por inyección de flujo (FIA) es uno de los más usados al utilizar una mezcla de ureasa y creatinina deimidasa que actúan como biosensores el cual es conectado a la salida del dializador para determinar su concentración (Almirall, Jurkiewicz, & Alegret, 1999).

Análisis de L-arginina

La arginina es un aminoácido esencial en la nutrición humana, esta puede ser metabolizada para apoyar la síntesis de glucosa o catabolizada para producir energía, dependiendo de las necesidades del cuerpo. Es también utilizada para detectar enfermedades cardiovasculares. Por lo que su determinación es de interés en los procesos biológicos (Karacaoğlu, Timur, & Telefoncu, 2003). Mediante el biosensor IFET se determina a la L-arginina basándose en el efecto de la inhibición de la ureasa donde la ureasa es inhibida por la arginina permitiendo conocer la concentración aproximada de L-arginina (Sheliakina, et al., 2014).

Medición de IgG

La IgG es un anticuerpo humoral, se encuentra en la sangre y se activa cuando hay infecciones por virus, hongos y bacterias. Para poder medir IgG se inmovilizó ureasa sobre la superficie de una membrana de acetato de celulosa como soporte y a través de una reacción inmunoquímica y una muestra de sangre se determina la concentración de esta inmunoglobulina por medio de espectrofotometría (Yingjie & Cabral, 2002). El biosensor se podría utilizar como un inmunosensor de IgG. La cantidad mínima de IgG que se podía medir era aproximadamente 0,1 mg / ml, que está en el rango clínico. Es muy usado cuando hay infecciones por *Helicobacter pylori* (Anwar & Asrar, 2015).

Remoción de urea para la insuficiencia renal

El principio físico para remover urea en pacientes con enfermedades renales es realizar una recirculación de ureasa inmovilizada en sus dializados para la transformación de la urea en amonio y un eficaz reductor de amonio con óxido de zirconio ya que el amonio y los compuestos nitrogenados como la urea resultan ser tóxicos en el cuerpo humano (Rodríguez, Díaz, & Pedroso, 2014).

Ambiental

Análisis de iones de metales pesados

La ureasa también se utiliza en el análisis a nivel de trazas de iones de metales pesados. El método se basa en el fuerte efecto inhibitor de estos iones de metales pesados sobre la actividad ureasa. Se ha utilizado para determinar iones de metales pesados en el agua potable, aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas residuales y suelos mineralizados (Li, Cheng, & Guo, 2013).

Tratamiento de aguas residuales con urea

Una de las primeras fases para tratar aguas contaminadas con urea o nitrógeno orgánico es hidrolizarla con la ureasa y producir dióxido de carbono que siendo un gas se evapora y amonio el cual requiere de un segundo tratamiento para su biorremediación total (Pérez et al., 2007).

Vinícola

Eliminación de la urea de bebidas alcohólicas

El contenido de la urea en el vino es de particular importancia, ya que es el principal precursor de carbamato de etilo, un carcinógeno conocido por aparecer durante el almacenamiento. Por tanto, su eliminación es primordial en la elaboración del vino. Para ello se inmoviliza la ureasa, reduciendo los costos en la elaboración del vino ya que una vez inmovilizada la enzima se puede reutilizar con una recuperación fácil debido a que se encuentra retenida en esferas, caso contrario se tendría que pasteurizar el vino cambiando sus propiedades organolépticas y además removerla por aclaración para evitar cálculos urinarios (Yingjie & Cabral, 2002).

2.5 Hongos filamentosos

Existe alrededor de 1 millón de especies de hongos filamentosos, se pueden encontrar prácticamente en todos los ecosistemas, son particularmente apreciados debido a su fácil cultivo y su alta producción de enzimas extracelulares como intracelulares de gran potencial a nivel industrial (Guimarães et al., 2006).

El uso de estos microorganismos, en especial los hongos y las bacterias, han tomado gran auge en los últimos años. Se emplean en la industria farmacéutica, alimenticia, biomédica, ambiental, detergentes, textil, química, entre otras (Weng, A, 2005).

Estos hongos empezaron a abrirse campo en la Biotecnología tradicional cuando en 1929 la penicilina fue aislada de *Penicillium chrysogenum* por el científico británico Alexander Fleming ayudando a prevenir desde ese año hasta el actual infecciones provocadas por bacterias (Manzi & Mayz, 2003).

Los hongos filamentosos son microorganismos heterótrofos, cenocíticos (varios núcleos en una misma célula), eucarióticos, aerobios facultativos y su reproducción puede ser sexual o asexual mediante esporas (Arias & Piñeros, 2008).

Morfológicamente el cuerpo del hongo filamentoso está formado por hifas y el conjunto del mismo se denomina micelio. Las hifas se clasifican de acuerdo a la función que cumplen siendo vegetativas (crecimiento) o fértiles (reproducción). La mayoría son hialinas (transparentes), pero también pueden ser septadas (con tabiques transversales) o no septadas (García, 2005).

El crecimiento del hongo es apical o distal ya que se da a nivel de los extremos de las hifas. Una vez formada la hifa el citoplasma circula hacia el nuevo lugar de alargamiento hasta formar un tipo de maraña. La temperatura óptima para el desarrollo del hongo es de 25-37°C (Tortora, Funke, & Case, 2007). En cuanto al cultivo el micelio vegetativo penetra en el medio y por adsorción los nutrientes pasan por la pared celular. Cuando los nutrientes son insolubles el hongo necesita producir enzimas para aprovecharlos (García, 2005).

Los hongos filamentosos pueden reproducirse rápidamente a partir de cualquier fragmento de micelio, pero generalmente se reproducen mediante esporas sexuales o asexuales. Las esporas son formadas por las hifas aéreas del hongo las que se separan de la célula de origen y dan lugar un nuevo hongo (Tortora et al., 2007). Las esporas asexuales se encuentran en esporangiosporas (esporas dentro del esporangio), conidiosporas (esporas libres), artrosporas (esporas por cada septo) y clamidosporas (esporas con pared celular gruesa) (García, 2005). En cuanto a las esporas sexuales son haploides donde dos células tienen que unirse para formar un cigoto (Arias & Piñeros, 2008).

2.5.1 *Mucor* sp.

Es un glomeromycete microscópico perteneciente al orden de los Mucorales y a la familia Mucoraceae (Solera, Rodríguez, & Soto, 2010). Además, se reporta que este orden es uno de los más abundante de la clase, con 9 familias, 51 géneros y unas 205 especies (Gallego & Sánchez, 2015). Muchos de los cuales aún no se explotan por el hombre a pesar de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Mucor spp se encuentra presente en las frutas, en el suelo y en las plantas. Esta clase de hongo crece alrededor de 25 y 30°C, y no a más de 37°C, a menos que sean especies de *Mucor spp* termoestables que normalmente son los que se aíslan de humanos (Tangarife, 2011).

Este hongo filamentosos es de crecimiento rápido e invade toda la superficie donde crece. Los tres primeros días es de color blanco, luego se torna gris oscuro y/o negruzco debido a la aparición de los esporangios que se desarrollan de forma vertical. El micelio es hialino, cenocítico y con hifas no septadas (Rodríguez, 2016).

El hongo *Mucor sp* tienen una reproducción anamórfica por medio de esporas, las cuales se pueden visualizar fácilmente dentro de los esporangioforos con forma esférica (figura 8) (Bonifaz, 2012).

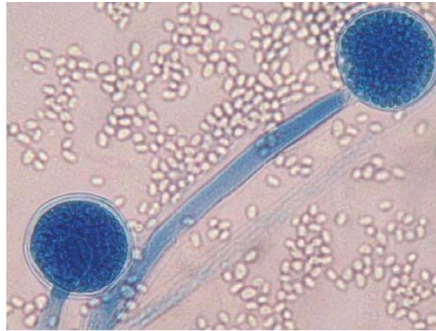


Figura 8. *Mucor* sp 40X: esporangioforos y endoesporas.

Tomado de (Rodríguez, 2016).

Investigaciones anteriores han demostrado el potencial uso de *Mucor spp* en la producción de enzimas para uso a nivel industrial. Las enzimas que este hongo es capaz de producir son: las proteasas, las amilasas, las lipasas, las poligalacturonasas y las quitosanasas (Alves, et al., 2002; Andrade et al., 2002) compuestos orgánicos como etanol (Karimi, Emtiazi, & Taherzadeh, 2006) y polímeros como el quitosano (Araki & Ito, 1974). Es importante recalcar que los componentes del medio donde crece un hongo filamentoso son fundamentales para la producción de enzimas específicas (Kumar et al., 2012), tal es el caso de la ureasa muy usada en diferentes ámbitos industriales (Bakhtiari et al., 2006).

2.6 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas se emplea desde 1950 aproximadamente y no es más que restringir la movilidad de la enzima en un determinado espacio físico (Barabino, Gray, & Keyes, 1978). En las últimas décadas ha demostrado ser particularmente valiosa, ya que permite que las enzimas sean fácilmente reutilizadas numerosas veces en la misma reacción, aumentando su capacidad de vida media y menos degradación. Además, ha proporcionado que el control de la velocidad de reacción, así como la reacción de inicio y finalización, entre otros parámetros como la temperatura, el pH y la cantidad de oxígeno, sean fáciles de controlar (Tischer & Wedekind, 1999).

Inmovilizar enzimas ayuda también a evitar contaminaciones entre el sustrato y la enzima u otros compuestos, lo que disminuye los costos de purificación. Los

beneficios de la inmovilización de enzimas han permitido que sean altamente aplicables en la Biotecnología (Spahn & Minteer, 2008).

Trabajos experimentales realizados anteriormente han demostrado que las enzimas inmovilizadas mejoran su estabilidad al catalizar un sustrato y su vida promedio, permitiendo que trabajen estas enzimas inmovilizadas efectivamente en un rango más amplio de condiciones ambientales como a diferentes temperaturas, con distintos valores de pH o al mismo tiempo que interactúen con más enzimas sin que se afecten unas con otras (Mansee, Chen, & Mulchandani, 2005).

Una aplicación tradicional de enzimas inmovilizadas ha sido para la síntesis de productos químicos, donde las enzimas son capaces de catalizar selectivamente reacciones, es decir, tienen la capacidad de sintetizar un compuesto de interés de un sustrato específico. Las aplicaciones industriales de las enzimas inmovilizadas son muchas, como ejemplo tenemos: analíticas, los biosensores analíticos (con enzimas inmovilizadas) los cuales se disponen en contacto con un fluido biológico y determinar la concentración de diferentes compuestos como las IgG; medicina, el tratamiento con enzimas microencapsuladas para pacientes con alteraciones genéticas a causas de insuficiencia de enzimas; y la industrial como la producción de L-isómeros activos de aminoácidos que se realiza con enzimas encapsuladas (Cedillo et al., 2014).

De esta manera se proporcionan métodos para evitar que las enzimas en estado libre se desechen fácilmente sino que sean reutilizable al momento de estar inmovilizadas para la producción de productos a través de reacciones catalíticas, junto con la producción de compuestos deseados. Las enzimas inmovilizadas también tienen la capacidad de catalizar compuestos dañinos o no deseados que proporcionan un campo adicional de aplicación en la purificación y remediación (Spahn & Minteer, 2008).

Existen dos formas de inmovilizar enzimas: la inmovilización física y química; en la primera forma se enclaustra a la enzima en un determinado espacio por medio de métodos físicos y en la segunda forma se generan enlaces químicos entre el soporte y la enzima (Illanes et al., 2013).

La inmovilización química se realiza mediante la aparición de enlaces químicos sin un soporte, los cuales son: CLEA y CLEC o con un soporte, los que cuales se destacan: Adsorción y enlace covalente (Velastegui & Granja, 2014).

CLEA (agregados enzimáticos reticulados) forma enlaces sin necesidad de un soporte. En este método se usan solventes orgánicos o sales como el sulfato de amonio en las proteínas que va generar una diferencia de densidades entre las proteínas y la solución para obtener proteínas precipitadas estables sin necesidad de cristalizar la enzima. La única desventaja es que se debe obtener un protocolo de precipitación de proteínas por cada enzima (Velastegui & Granja, 2014).

CLEC (cristalización y reticulados de enzimas), en este método las enzimas son cristalizadas y posteriormente son reticuladas con glutaraldehído (reactivo bifuncional), formando uniones intermoleculares entre las enzimas; la estabilidad depende del armazón cristalino, de tal manera que la misma enzima actúa como soporte para sí misma; tienes además canales microscópicos (20-50Å) por donde el sustrato es catalizado. La ventaja de este método son las altas temperaturas y pH extremos que soporta (Benitez, 2012).

En cuanto, a los enlaces químico con un soporte tenemos el método más simple de la inmovilización que es la adsorción no específica, que se basa principalmente en la adsorción física donde las enzimas se unen a una matriz de apoyo a través de enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones hidrófobas. La naturaleza de las fuerzas que intervienen en los resultados de inmovilización no covalentes en un proceso puede ser revertido por el cambio de las condiciones que influyen en la fuerza de la interacción (por ejemplo, pH, fuerza iónica, la temperatura, o la polaridad del disolvente). La inmovilización por adsorción es un proceso fácil suave, para llevar a cabo, y por lo general conserva la actividad catalítica de la enzima. Tales métodos son, por tanto, económicamente atractiva, pero pueden sufrir de problemas tales como fugas de la enzima de la matriz cuando las interacciones son relativamente débiles (Brena & Batista-viera, 2000).

Otro método de inmovilización con enlaces mediante a un soporte es aquella que se basa en la formación de enlaces covalentes el cual se encuentra entre los más utilizados. Una de las ventajas de este método es que debido a la naturaleza estable de los enlaces formados entre la enzima y de la matriz, la enzima no se libera en la solución en uso (Velasategui & Granja, 2014). Hay 20 aminoácidos distintos y algunos de ellos pueden estar en la estructura de una enzima, los que se usan para formar enlaces con la matriz, estos son: la histidina, la cisteína (grupo tiol), la tirosina y la lisina (grupo ϵ -amino); las menos usadas son el ácido glutámico y el aspártico (grupo carboxílico), la arginina, el triptófano y la metionina. Los demás debido a que son hidrófobos no pueden formar enlaces covalentes ya que están expuestos hacia el exterior de la proteína (Arroyo, 1998). Los procesos de activación están diseñados generalmente para generar grupos electrofílicos en el soporte que en la etapa de acoplamiento reacciona con los fuertes nucleófilos en las proteínas. Los principios básicos que controlan el curso de acoplamiento covalente a las matrices son análogos a los utilizados para la modificación química de las proteínas (Brena & Batista-viera, 2000).

Por otra parte, uno de los soportes más usados para la inmovilización por medio de enlaces covalentes es el quitosano, el cual se genera por medio de un proceso químico a partir de la quitina (N-acetil-glucosamina) que es un polisacárido lineal.

Cada año se producen aproximadamente 10 mil millones de toneladas de quitina ya que este polímero se encuentra en el exoesqueleto de los moluscos, los crustáceos, los insectos y también están en hongos y algas. La quitina es insoluble en disolventes orgánicos comunes y disolventes acuosos diluidos, ya que es altamente hidrófobo debido a la estructura semicristalina con enlaces de hidrógeno. Su derivado, el quitosano, es preparado por desacetilación y despolimerización de quitina en su estado puro (figura 9) y en condiciones alcalinas (NaOH concentrado), o hidrólisis enzimática en presencia de una quitina desacetilasa (Zargar, Asghari, & Dashti, 2015).

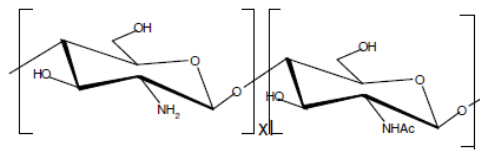


Figura 9. Desacetilación parcial de la quitina.

Tomado de (Zargar, Asghari, & Dashti, 2015).

La diferencia entre la quitina y el quitosano radica en los grupos de glucopiranososa deacetilados. En el caso del quitosano, este polímero posee una mayor cantidad de residuos de glucopiranososa en la forma desacetilada. La quitina se encuentra con frecuencia en su totalidad con la forma de N-acetilo (figura 10) (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004).

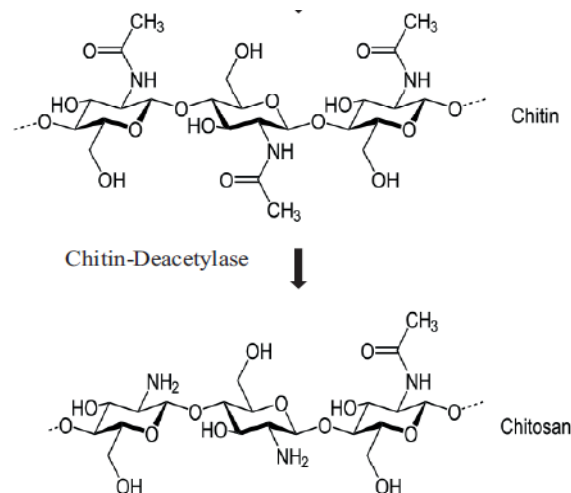


Figura 10. Estructura química de la quitina y el quitosano.

Tomado de (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004).

La gelificación del quitosano en una solución alcalina (N-OH) se da mediante tres mecanismos importantes: (I) el transporte de los grupos hidroxilos (OH^-) hacia la superficie del quitosano; todo este proceso se controla primordialmente por la hidrodinámica (densidad, viscosidad y presión) de la zona en la solución; (II) difusión de los grupos hidroxilos (OH^-) a través del sistema polimérico (desde la parte superior a la parte inferior); y (III) una reacción química entre los grupos hidroxilos (OH^-) y las cadenas de polímero de quitosano, que están inicialmente bajo forma protonada y posteriormente son desprotonados por la reacción química (Venault et al., 2011).

En contexto, lo que permitirá la formación de enlaces covalente con el medio de soporte es el glutaraldehído. Este es un compuesto químico ($C_5H_8O_2$) creado comercialmente en 1951, es alifático, bajo peso molecular (100,1 g/mol), incoloro y de olor acre. Este reactivo es soluble en compuestos orgánicos, además es un compuesto quelante para grupos carbonilo, hidroxilo, amino y sulfhídrido (DowChemicalCompany, 2016).

Su uso en inmovilización de enzimas ha sido crucial, ya que posee características únicas que lo hacen uno de los reactivos de reticulación más eficaces de proteínas. Puede estar presente en al menos 13 formas diferentes dependiendo de las condiciones de la solución tales como pH, concentración y temperatura; en cuanto a la estructura simple de glutaraldehído no es una muestra de la complejidad de su comportamiento en solución acuosa y su reactividad (Migneault et al., 2004). En la Figura 11 que se visualiza a continuación se muestran las posibles formas que toma el glutaraldehído en una solución acuosa, la estructura I es la forma monomérica del glutaraldehído. La estructura II, III y IV son las formas hidratadas, su forma cis y trans, respectivamente. La estructura V su forma de oligómeros, la estructura VI eran capaces de formar anillos. La estructura VII había una pérdida de moléculas de agua por condensación aldólica y la estructura VIII se forma tetrámero o pentámero soluble que contiene aproximadamente un grupo aldehído libre por molécula formada a través de la través de la polimerización de propagación intermolecular con formación de anillo (Migneault et al., 2004).

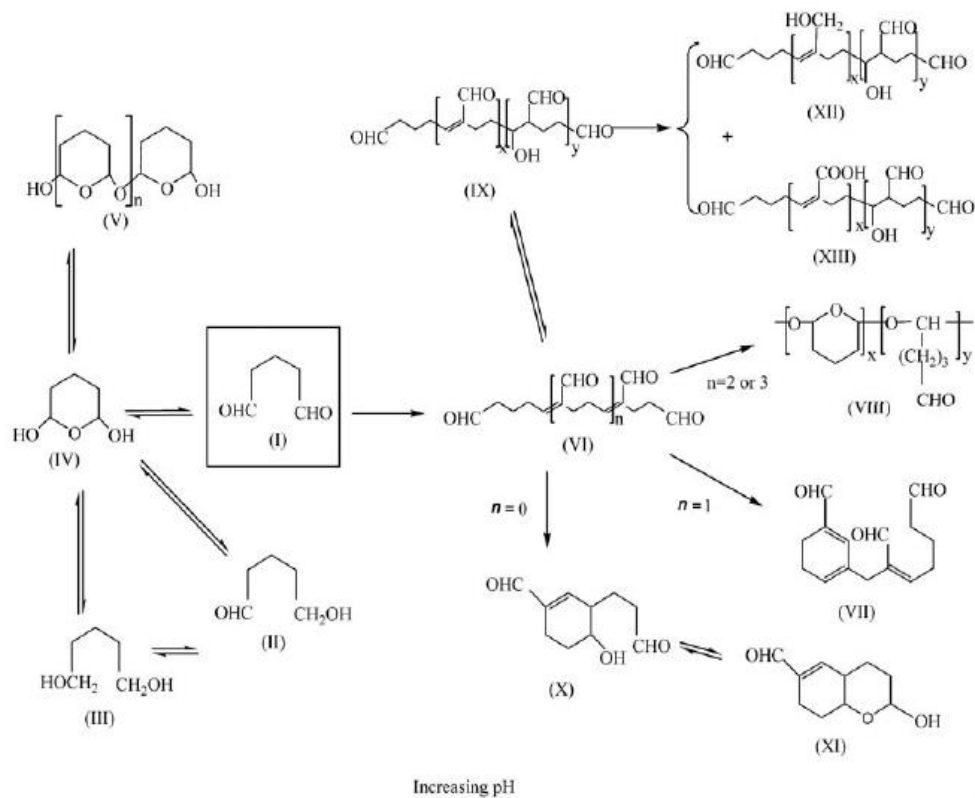


Figura 11. Formas del glutaraldehído en solución acuosa.

Tomado de (Migneault et al, 2004).

Sin embargo, el uso de glutaraldehído es una de las técnicas más populares para inmovilizar enzimas. Es un método simple, muy eficiente y en la mayoría de los casos se ha utilizado en muchos procesos de inmovilización de diferentes enzimas y soportes. El glutaraldehído actúa con una reticulación intermolecular en las proteínas o puede mejorar la unión de la molécula de la enzima en el soporte. Esta técnica puede ser aplicada en diferentes maneras en el proceso de inmovilización de enzimas. El soporte puede ser tratado previamente con glutaraldehído, que consiste en la activación en primer lugar el apoyo y luego proceder a inmovilizar la enzima. Alternativamente, la enzima también se puede añadir al soporte en el primer paso y después tratarla con glutaraldehído. En algunos casos, tanto glutaraldehído y la enzima se pueden añadir juntos al soporte (Costa et al., 2013).

2.7 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta mediante un Diseño central rotacional fue introducida por Box y Wilson en el años de 1951, es una experimentación de modelación y secuencial que permite la localización de valores óptimos, maximizándolos, minimizándolos o cumpliendo ciertas restricciones en la variable de respuesta, en este caso la actividad enzimática (Jiménez, 2015).

El estudio inicia cuando se desea determinar la respuesta óptima Y , planeando un diseño experimental piloto que permite el acercamiento a la superficie mediante la representación matemática de los modelos más simples, entre estos tenemos: Un modelos de primer orden lineal donde se usan experimentos factoriales completos 2^k , con el fin de estimar las respuestas medias para un modelo lineal o de primer orden y un modelo de segundo orden o cuadrático (Tabla 1) (CICA, 2015).

Tabla 1
Modelos de superficie de respuesta de primer y segundo orden.

Modelo Primer orden	Modelo Segundo orden
$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$	$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$

Tomado de (CICA, 2015).

El diseño compuesto central rotacional se usa cuando se desea verificar la existencia de términos cuadráticos en un modelo de regresión. Este tipo de planeamiento consiste de una parte referente al planeamiento factorial 2^k el cual indica que se estimará el efecto que sobre la variable de respuesta presentan k factores, cada uno de estos probado en 2 niveles; se probarán entonces 2^k tratamientos (Velasategui & Granja, 2014).

Hay que tomar en cuenta dos parámetros importantes: la distancia desde el centro del plano hasta los puntos axiales α y el número de puntos centrales n_c . El parámetro de α es llamado de rotabilidad. Es importante para el modelo de segunda orden ya que provee de suposiciones, a través de la región de interés, que tengan una varianza razonablemente consistente y estable en los puntos de interés de las variables independientes. Un planeamiento de compuesto central

se puede tornar rotacional dependiendo del valor de α que por su vez depende del número de puntos en la porción factorial del planeamiento. El valor dado por $\alpha=(n_f)^{1/4}$ en la realidad, es dictado principalmente por la región de interés (Montgomery, 2005). El valor de $\alpha=1,4$ que son valores codificados, luego de generar la superficie de respuesta, estos valores codificados deben ser decodificados para poder encontrar los niveles que optimizarán el modelo mediante derivadas parciales con respecto a cada variable independiente X_1 y X_2 (Velasategui & Granja, 2014).

CAPITULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Para el presente estudio se propuso el siguiente diagrama de flujo, el cual consta de 8 fases continuas para obtener resultados favorables.

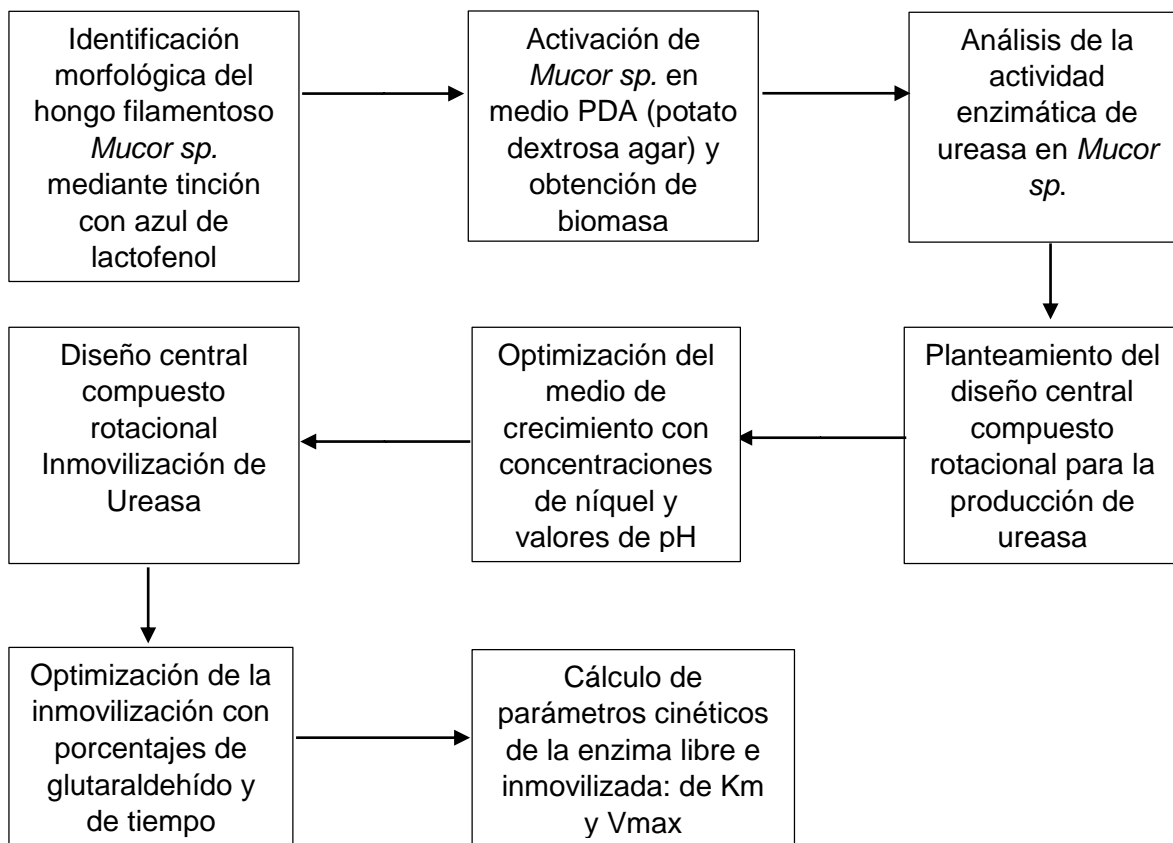


Figura 12. Diagrama de flujo de la metodología usada para la realización del presente trabajo experimental.

CAPITULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Muestra

La muestra de *Mucor* sp. se obtuvo del laboratorio docente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Américas UDLA, de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias FICA.

4.2 Materiales y métodos

Identificación morfológica de *Mucor* sp. mediante microscopía y tinción.

Para la identificación morfológica se realizó un sembrado del organismo en estudio mediante un corte de 2 cm² con un bisturí estéril en la parte central del medio de cultivo, con el fin de obtener un pedazo con las conidias del hongo, se tomó este pedazo y se depositó en un nuevo medio PDA y se incubó a 26°C. La identificación del hongo filamentoso *Mucor* sp se realizó cada 24 horas durante 4 días. Para esto se tomó 1 mL de azul de lactofenol y ácido láctico, con una pipeta Pasteur de plástico. Seguidamente se depositó una gota en dos portaobjetos diferentes, luego con una cinta adhesiva se tomó una muestra del hongo y se hizo contacto con el reactivo. Las distintas fases de crecimiento del hongo y sus estructuras morfológicas fueron observadas con un microscopio óptico a 10X, 40X y 100X, y para su identificación se utilizaron las guías de identificación “medically important FUNGI: a guide to identification” y “THE IDENTIFICATION OF FUNGI” (Anexo 1) (Honing, 1976; Dugan, 2006).

Activación *Mucor* sp.

La activación del hongo se realizó en un medio PDA y se incubó a 26°C durante 5 días para la obtención de conidias (Anexo 2).

Producción de la biomasa en un medio de crecimiento selectivo

Para la obtención de la biomasa de *Mucor* sp se preparó un medio selectivo a pH 5.6 (tabla 2). En matraces de vidrio se dispensaron 50 mL del medio, se sellaron los matraces con tapones de gaza y algodón y se autoclavaron a 121°C durante 15 minutos. A continuación se realizó el conteo de endoesporas de

Mucor sp en la cámara de Neubauer para inocular 10^6 esporas/mL en el medio de fermentación sumergido. Los matraces con el inóculo se incubaron a 37°C con agitación a 127 rpm durante 5 días (Anexo 3).

Tabla 2

Medio de crecimiento de Mucor sp para la obtención de biomasa.

Reactivos	Cantidad % (p/v)
Sucrosa	2,000
Urea	0,085
Extracto de levadura	0,340
NiSO_4	0,003
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,050
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,004
KH_2PO_4	0,550
K_2HPO_4	0,035
Agua destilada mL	1,000

Liofilización de la biomasa

Una vez transcurridos los 5 días de crecimiento del hongo, se vertió el contenido de los matraces en tubos falcon de 50 mL en un ambiente aséptico. Los tubos se centrifugaron a 10.500 rpm y 12°C durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y se realizaron tres lavados con PPB 100 mmol/L, pH 7,6 y en las mismas condiciones del primer centrifugado. Posteriormente los tubos con la biomasa precipitada se almacenaron a -80°C por una hora y finalmente se procedió a liofilizar la biomasa a una presión de 1230 mT y una temperatura de -59°C durante 24 horas.

Extracción de la enzima ureasa

Una vez obtenida la biomasa liofilizada se pesaron 55 mg en una balanza analítica y se procedió a moler en un mortero hasta que la biomasa liofilizada quedó pulverizada. Esta se resuspendió en 700 μL de PPB y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agitó en vórtex para homogenizar la muestra y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se

recuperó como extracto crudo de ureasa intracelular para medir la actividad de la enzima.

Medición de la actividad catalítica de la enzima ureasa

Para la medición de la actividad enzimática, se procedió como se describe a continuación: en un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 100 μ L del extracto de la enzima ureasa intracelular se añadió 500 μ L de urea y 500 μ L PPB. El blanco consistió en 100 μ L del extracto de la enzima ureasa intracelular, 500 μ L de agua destilada y 500 μ L PPB. Ambas muestras se incubaron a 37°C y con agitación a 127 rpm durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se midió la actividad enzimática en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm durante 300 segundos con intervalos de 1 segundo; la celda espectrofotométrica contenía 800 μ L de la muestra y 200 μ L del reactivo de Nessler (Anexo 4).

Curva de calibración con sulfato de amonio

Para determinar la actividad enzimática, fue necesario realizar una curva de calibración del sustrato hidrolizado o de producto formado. En este caso se realizó una curva de producto formado en el tiempo para obtener una ecuación tipo $y=mx+b$. Para ello, se tomaron diferentes concentraciones de sulfato de amonio y en una celda espectrofotométrica se añadió 800 μ L de la solución de sulfato de amonio a diferentes concentraciones y luego 200 μ L del reactivo de Nessler y rápidamente se midió en el espectrofotómetro en punto fijo y 475 nm (tabla 3).

Tabla 3
Concentraciones de sulfato de amonio para la curva de calibración.

Muestra	Sulfato de amonio mmol/L	Absorbancia 475 nm
Blanco	0,00	0,00
1	0,25	0,54
2	0,50	1,04
3	0,75	1,38
4	1,00	1,61
5	1,25	1,84
6	1,50	2,31
7	1,75	2,61
8	2,00	2,75
9	2,25	2,83
10	2,50	2,78

Diseño rotacional 2^k : medio de crecimiento de *Mucor sp.*

La optimización del medio de cultivo se realizó mediante el método de delineamiento compuesto central rotacional 2^k , donde existen dos variables dependientes: pH y concentración de níquel, y una variable de respuesta que es la actividad de la enzima.

Considerando estudios anteriores se plantearon rangos estimados de pH y de concentración de níquel que necesita el hongo para producir ureasa (Ghasemi et al., 2004). Mediante una fórmula ya establecida por el diseño experimental se determinó la cantidad de ensayos a realizar para la optimización del medio de crecimiento de *Mucor sp.*

Los valores de los puntos axiales máximos y mínimos se determinaron mediante la siguiente fórmula:

X_1 pH:

- $+1.4 (0.5) + 6.5 = 7.2$
- $-1.4 (0.5) + 6.5 = 5.8$

X_2 Concentración de níquel (g/L):

- $+1.4 (0.02) + 0.05 = 0.078$

- $-1.4 (0.02) + 0.05 = 0.022$

En la tabla 4 se muestran los valores axiales establecidos, considerando un salto de $X_1 = 0.5$ y $X_2 = 0.02$.

Tabla 4

Valores de pH y Ni (g/L) a evaluar para la optimización del medio de crecimiento de *Mucor sp.*

Puntos axiales	Variable X_1 pH	Variable X_2 [Ni] g/L
1,4	7,2	0,078
1	7	0,070
0	6,5	0,050
-1	6	0,030
-1,4	5,8	0,022

En la tabla 5 se muestran los experimentos realizados por duplicado para la optimización del medio de crecimiento de *Mucor sp.*

Tabla 5

Experimentos realizados para la optimización del medio de crecimiento de *Mucor sp* y la producción de ureasa.

Experimentos	Niveles (Codificados)		Niveles (Decodificados)	
	pH (X_1)	Ni ²⁺ (X_2)	pH (X_1)	Ni ²⁺ (X_2) g/L
1	+1	+1	7,00	0,070
2	+1.4	0	7,20	0,050
3	+1	-1	7,00	0,030
4	0	-1.4	6,50	0,022
5	-1	-1	6,00	0,030
6	-1,4	0	5,80	0,050
7	-1	+1	6,00	0,070
8	0	+1.4	6,50	0,078
9	0	0	6,50	0,050

Evaluación experimental de las variables dependientes: pH y Ni (g/L)

En la tabla 6 se muestra la composición del medio de crecimiento de *Mucor sp* para la producción de ureasa variando las variables dependientes.

Tabla 6

Evaluación de las variables dependientes: pH y Ni (g/L) en el medio de crecimiento de Mucor sp para la producción de ureasa.

Reactivos	Cantidad % (p/v)
Sucrosa	2,000
Urea	0,085
Extracto de levadura	0,340
NiSO ₄	Variable de estudio
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,050
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,004
KH ₂ PO ₄	0,550
K ₂ HPO ₄	0,035
Agua destilada mL	1,000

Las concentraciones de sulfato de níquel y los valores de pH (variables de estudio) en los medios de crecimiento se modificaron en un rango de 0.0022 hasta 0.0078 (p/v) y de 5.8 hasta 7.2, respectivamente, conforme el diseño experimental. Estos medios se autoclavaron a 121°C por 15 minutos. Pasado este tiempo se inoculó una concentración de 10⁶ esporas/mL y se incubó a 37°C y 127 rpm durante 5 días. La medición de la actividad enzimática se realizó como se describió anteriormente.

Diseño rotacional 2^k: inmovilización enzimática

Las variables de estudio de este diseño experimental fueron el porcentaje (v/v) de glutaraldehído para la activación de grupos amino y carboxilo de las esferas de quitosano y el tiempo de activación. La variable de respuesta fue la actividad enzimática de la ureasa. Al igual que en el primer diseño se establecieron los puntos axiales (tabla 7).

Los valores de los puntos axiales máximos y mínimos se realizaron con la siguiente fórmula y se estableció un salto de X₁= 0.5 y X₂= 15:

X₁ % glutaraldehído (v/v):

- +1.4 (0.5) + 1.25 = 1.95
- -1.4 (0.5) + 1.25 = 0.55

X₂ Tiempo de activación (min):

- +1.4 (15) + 80 = 101
- -1.4 (15) + 80 = 59

Tabla 7

Porcentaje (v/v) de glutaraldehído y tiempo de activación para la optimización de la inmovilización de la enzima ureasa.

Puntos axiales	Variable X ₁ % glutaraldehído (v/v)	Variable X ₂ Tiempo de activación (min)
1,4	1,95	101
1	1,75	95
0	1,25	80
-1	0,75	65
-1,4	0,55	59

En la tabla 8, se muestran los experimentos realizados por duplicado para la optimización de la inmovilización de la enzima ureasa.

Tabla 8

Experimentos realizados para la optimización de la Inmovilización de la enzima ureasa.

Experimentos	Niveles (Codificados)		Niveles (Decodificados)	
	%glutaraldehído (v/v) (X ₁)	Tiempo de activación (min) (X ₂)	%glutaraldehído (v/v) (X ₁)	Tiempo de activación (min) (X ₂)
1	+1	+1	1,75	95
2	+1.4	0	1,95	80
3	+1	-1	1,75	65
4	0	-1.4	1,25	59
5	-1	-1	0,75	65
6	-1,4	0	0,55	80
7	-1	+1	0,75	95
8	0	+1.4	1,25	101
9	0	0	1,25	80

El punto central tanto para la variable X₁ y X₂ en este diseño se estableció mediante un cribado del porcentaje de glutaraldehído y tiempo.

Cribado de la concentración de glutaraldehído

El cribado se realizó tomando en cuenta referencias bibliográficas donde habían usado glutaraldehído para la inmovilización de una enzima lipasa y de una ureasa (Krajewsk, Leszko & Zaborska, 1990; Velasteguí & Granja, 2010) lo que permitió establecer rango de glutaraldehído entre 0.7 y 2 % (v/v).

Se evaluaron ensayos entre estos diferentes rangos de porcentajes de glutaraldehído, para determinar en qué punto el porcentaje de glutaraldehído podía mejorar la actividad enzimática, y realizar la optimización de la inmovilización.

Cribado del tiempo de activación

Se tomó un punto de partida de acuerdo a referencias bibliográficas (Krajewsk, Leszko & Zaborska, 1990; Velasteguí & Granja, 2010). El rango de tiempo de activación que se evaluó fue desde 30 hasta 101 minutos para determinar en qué punto específico de tiempo se podía mejorar la actividad enzimática, y realizar la optimización de inmovilización.

Obtención de las esferas de quitosano

Las esferas de quitosano se obtuvieron mediante la técnica descrita por Velastegui & Granja (2014). Se tomaron 0.2 gramos de quitosano de bajo peso molecular, se depositaron en un vaso de precipitación y se añadieron 5 mL de ácido acético 1.6 mol/L. Con una microespátula se mezcló hasta formar una preparación homogénea, posteriormente se depositó esta mezcla dentro de una jeringa con 0.8 mm de diámetro de aguja y se goteó en 20 mL de una solución de NaOH 1 mol/L agitando a 290 rpm durante una hora.

Activación de los grupos amino y carboxilo del quitosano con glutaraldehído

La activación de grupos amino y carboxilo de las esferas de quitosano se realizó modificando del protocolo de Velastegui & Granja (2014). Pasada una hora después de la obtención de las esferas de quitosano se efectuaron tres lavados

con agua destilada e inmediatamente se depositaron las esferas de quitosano en tubos falcon con 5 mL de una solución de bicarbonato de sodio 0,5 mol/L y pH 9,5. Estas soluciones se dejan en un rotor orbital a 35 rpm y contenían desde 0.55 hasta 1.95% de glutaraldehído (primera variable independiente) y con el empleo de un cronómetro se manejó el tiempo de activación que iba desde los 59 hasta los 101 minutos (segunda variable independiente) (tabla 7).

Inmovilización de la enzima ureasa

Una vez transcurrido el tiempo de cada experimento se realizaron tres lavados con agua destilada y en el mismo tubo falcon de cada experimento se añadieron 5 mL del extracto crudo de la enzima ureasa, luego se deja en un rotor orbital a 35 rpm durante 3 horas.

Medición de la actividad enzimática de la ureasa inmovilizada

Para la medición de la actividad enzimática de la ureasa inmovilizada se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL 16 perlas de quitosano con la enzima, 500 μ L de urea y 500 μ L PPB 100 mM, pH 7.6. Para el blanco se emplearon 16 perlas de quitosano con la enzima inmovilizada, 500 μ L de agua destilada y 500 μ L PPB. Ambas muestras se incubaron a 37°C y con agitación de 127 rpm durante 30 minutos. Pasado este tiempo se midió la actividad enzimática en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm durante 300 segundos con intervalos de 1 segundo; la celda espectrofotométrica contenía 800 μ L de la muestra y 200 μ L del reactivo de Nessler.

Cálculo de los parámetros cinéticos de la enzima ureasa libre e inmovilizada: K_m y V_{max}

Para el cálculo de K_m y V_{max} se midió la actividad de la enzima libre e inmovilizada mediante la variación de la concentración molar del sustrato (urea 80 mmol/L). Posteriormente, se determinó la concentración molar de este sustrato para la obtención de K_m y V_{max} , se realizó además el cálculo de estos parámetros cinéticos mediante tres métodos: Lineweaver-Burk, Eadi-Hosftee y

Hanes-Wolf para cerciorarse de que los valores de los parámetros cinéticos sean similares.

En la tabla 9 se reflejan los volúmenes (mL) de las soluciones de urea 80 mM (columna 1) y PPB (columna 2) a depositar en tubos eppendorf de 1,5 mL. Para ello fue importante calcular la concentración de urea de cada ensayo individualmente como se visualiza en la columna 3. Finalmente, se midieron los ensayos en el espectrofotómetro y se realizaron las curvas para el cálculo de K_m y V_{max} .

Tabla 9
Variación de la concentración de urea para la obtención de K_m y V_{max} .

Urea mL	PPB mL	Concentración de urea mM
1	0	80
0,9	0,1	72
0,8	0,2	64
0,7	0,3	56
0,6	0,4	48
0,5	0,5	40
0,4	0,6	32
0,3	0,7	24
0,2	0,8	16
0,1	0,9	8

4.3 Evaluación estadística

Para la evaluación de los resultados estadísticos se usó el software Statistica 13.2. Se realizó el diseño central compuesto rotacional 2^k de la optimización del medio de crecimiento de *Mucor sp* para la producción de ureasa y la optimización de la inmovilización de la enzima. El programa proporcionó un gráfico en 3 dimensiones con una ecuación cuadrática que facilitaba el valor de la variable de respuesta teórica, la cual se comprobó para determinar su validez.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación morfológica del hongo filamentoso *Mucor* sp. mediante tinción con azul de lactofenol

La evaluación morfológica del hongo filamentoso *Mucor* sp fue relevante en este estudio para valorar su morfología y determinar el género del hongo, como se mencionó con anterioridad, la identificación se utilizaron las guías de identificación “medically important FUNGI: a guide to identification” y “THE IDENTIFICATION OF FUNGI” (Honing, 1976; Dugan, 2006). Se llegó a la conclusión que es *Mucor* sp debido a la estructura que presenta, detallada en una revisión bibliográfica. Por ejemplo, se menciona que una de las características fundamentales de *Mucor* sp es que a los primeros días de ser cultivado en un medio PDA, este torna su color blanco a negruzco debido a que los esporangioforos y las esporas maduran completamente en el anexo 2 se visualiza el cambio de color (Rodríguez, 2016), en este estudio después de 48 horas de ser cultivado el hongo, el micelio se empezaba a tornar de color negruzco. Estudios anteriores han demostrado que *Mucor* sp. cuenta con un micelio hialino, cenocítico y con hifas no septadas. Las esporas se pueden visualizar fácilmente dentro de los esporangioforos con forma esférica (Bonifaz, 2012) y en las figuras 13, 14, 15 y 16 se muestran estructuras que acreditan que el hongo filamentoso es *Mucor* sp ya que las características mencionadas con anterioridad establecen una similitud en cuanto a la morfología del genero Mucor.

24 horas

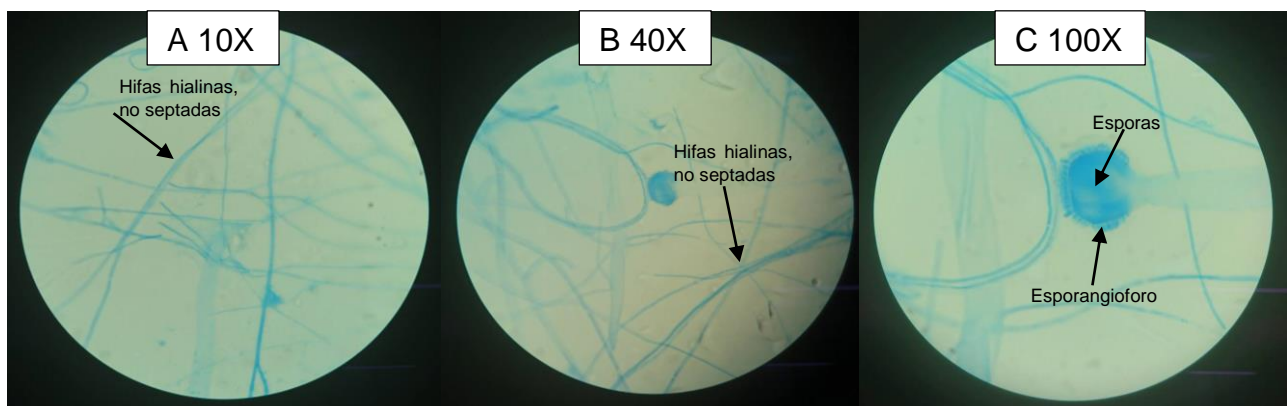


Figura 13. Imágenes de las estructuras morfológicas de *Mucor* sp. por observación al microscopio.

Después de 24 horas se pudo observar en la flecha la formación de una maraña de hifas (A y B) hialinas no septadas y a los esporangioforos y esporas en formación como se visualiza en la fotografía C. Además, se observan estructuras claras por lo que los primeros días la colonia es blanca.

48 horas

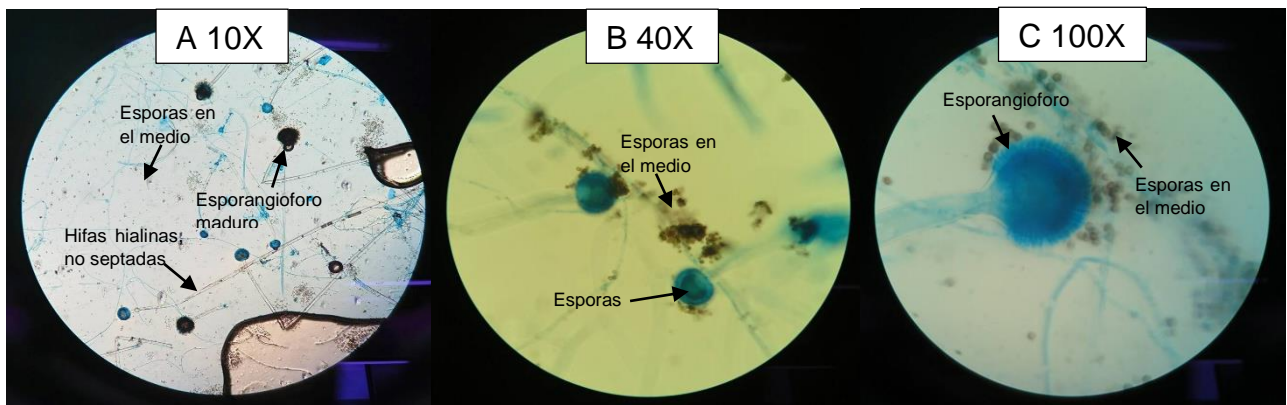


Figura 14. Estructuras morfológicas de *Mucor* sp. después de 48 horas.

Se observaron después de 48 horas, hifas hialinas que seguían no septadas. En la fotografía A se muestra una visión global de hifas con esporangioforos y esporas fuera de los esporangioforos. En la figura B y C se observa esporangioforos maduros y formados completamente. Aquí el color de la colonia se tornó negruzco debido a la maduración de los esporangioforos, propio de *Mucor* sp.

72 horas

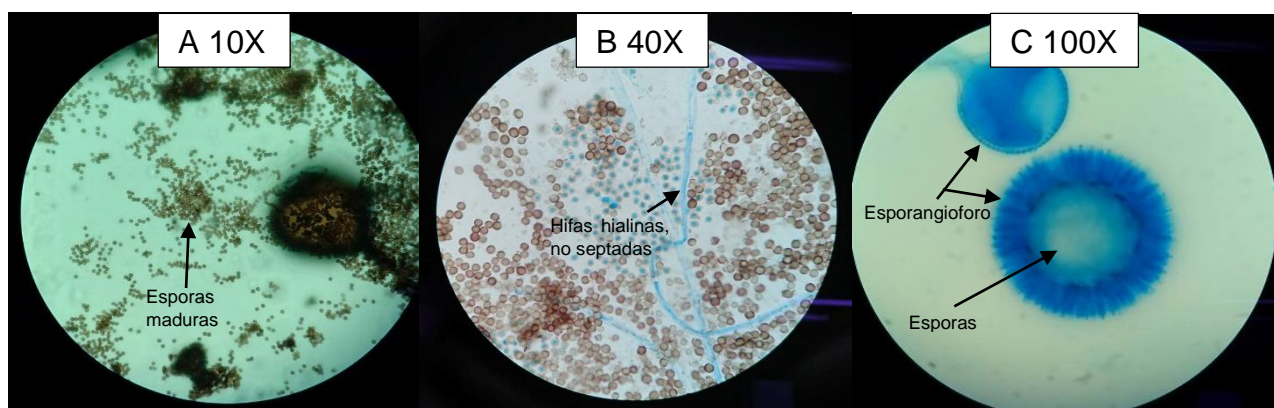


Figura 15. Estructuras morfológicas de *Mucor* sp. después de 72 horas.

Se observó en la fotografía A y B muchas más esporas debido a que se formaban nuevas hifas y esporangioforos como se ve en la fotografía C. Dando como resultado más esporangioforos maduros.

96 horas

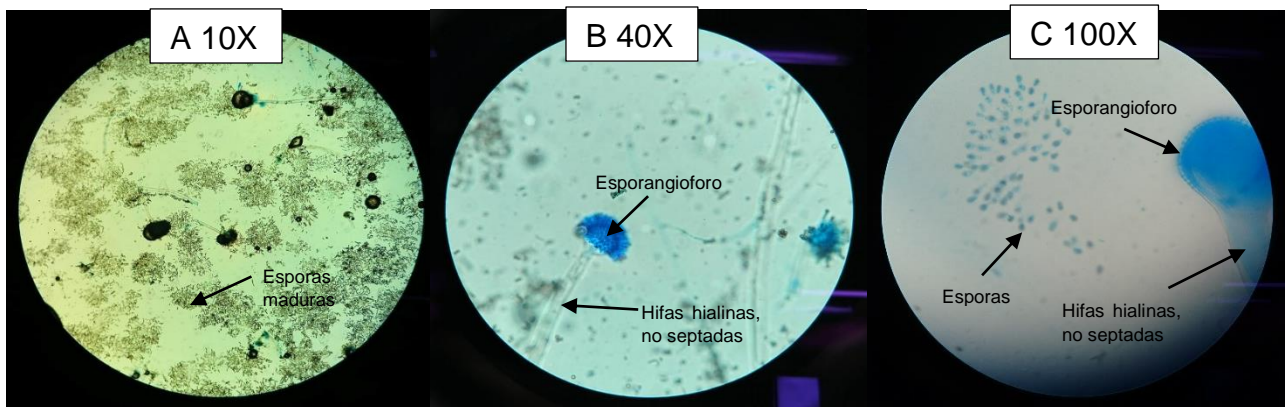


Figura 16. Estructuras morfológicas de *Mucor* sp. después de 96 horas.

Después de 96 horas, se observaron la formación de nuevas hifas como en las fotografía B y C, estas hifas se estructuran hialinas no septadas, esporas maduras en el medio, esporangioforos en formación y maduros como en la fotografía A.

5.2 Evaluación de la medición de la actividad catalítica de la enzima ureasa en *Mucor* sp.

Para poder calcular la actividad de la ureasa se realizó una línea de tendencia (figura 17) en la gráfica hay 8 puntos que forman la recta y cada uno de ellos representa la liberación de amonio mediante una reacción colorimétrica frente a un determinado valor de absorbancia. Esta gráfica nos aporta una ecuación algebraica de tipo lineal $y = m x + b$, donde $y =$ absorbancia, $m =$ pendiente (1,2538), $x =$ concentración mmol/L y $b =$ error sistemático o intercepto (0,3499). Además, un R^2 de 0,98 es decir que tiene un 98% de confiabilidad.

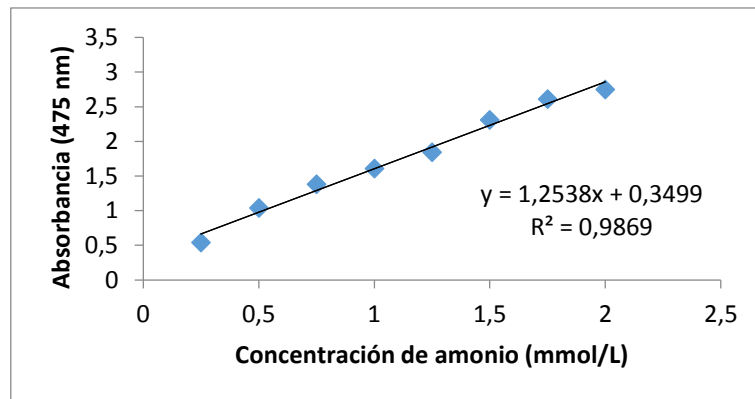


Figura 17. Curva de calibrado: absorbancia (nm) vs concentración (mmol/L).

Una vez que se obtuvieron las lecturas de las reacciones catalíticas en el espectrofotómetro, se calcula la aparición de amonio mmol/L, esta aparición de amonio genera una coloración café (Anexo 4) y se realiza mediante la ecuación 7 (propuesta en el epígrafe 2.3):

$$x = \left(\frac{y-b}{m} \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde x= la concentración de amonio mmol/L, y= absorbancia, b= el intercepto de la curva de calibrado (0,3499) y m= la pendiente de la curva de calibrado (1,2538). Luego se realizó otra regresión lineal de tiempo versus la concentración de amonio mmol/L y se obtuvo un gráfico y su ecuación algebraica lineal, en este caso la pendiente de la nueva ecuación (tiempo vs concentración de amonio mmol/L) es la que nos ayudó a calcular la actividad enzimática mediante la ecuación 7 anteriormente mencionada. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 10 donde se realizaron 5 ensayos y cada uno en las mismas condiciones para evaluar si existía o no actividad enzimática.

Tabla 10
Evaluación de actividad enzimática de ureasa.

Pendiente de los ensayos	Actividad enzimática (U/mL prot)
0,0192	0,192
0,0260	0,260
0,0196	0,196
0,0191	0,191
0,0251	0,251
Media de la actividad enzimática	0,218
Desviación estándar	0,034

En los 5 ensayos realizados existe actividad de la enzima ureasa con una actividad catalítica promedio de 0,218 U/mL proteína. Aunque hay pocas referencias bibliográficas en la que mencionen cuál fue la actividad de la enzima ureasa por *Mucor sp*, se cree que estos resultados son relevantes a comparación con la actividad enzimática de 0,5000 U/mL proteína de “proteasa” en *Mucor Circinelloides*, después de haber optimizado el consumo de D-glucosa como una fuente de sustrato (Andrade, et al., 2002).

Así mismo se visualizar que la desviación estándar es mínima de 0,034 entre los 5 experimentos en las mismas condiciones y con un pH sin modificar de 5,6. Por lo tanto, *Mucor sp* es un hongo filamentoso capaz de producir la enzima ureasa.

5.3 Diseño rotacional 2^k: medio de crecimiento de *Mucor sp*

Una vez determinada la capacidad de *Mucor sp* de producir ureasa, se realizaron los 9 experimentos de acuerdo al diseño experimental planteado para este proyecto e indicado en la sección de metodología.

Los resultados de la actividad enzimática se muestran en la tabla 11 y fueron replicados dos veces de forma aleatoria. Se visualiza los valores codificados (valores axiales del diseño) y decodificados de pH y concentración de níquel que se expuso en el diseño experimental. Además, en la sección de estadística el promedio de la actividad catalítica de 0,236 U/mL proteína de las réplicas realizadas y también su desviación estándar indicando que la variación entre las réplicas fueron significativos a comparación de los 0,218 U/mL proteína de la evaluación de la actividad catalítica de la ureasa en *Mucor sp*.

Tabla 11

Resultado de la actividad enzimática en la optimización del medio de cultivo.

Codificados		Decodificados		Estadística	
pH	Ni ²⁺	pH	Ni ²⁺	Desvest	Actividad enzimática (U/mL)
-1	-1	6,00	0,030	0,04	0,24
-1	1	6,00	0,070	0,00	0,34
1	-1	7,00	0,030	0,01	0,05
1	1	7,00	0,070	0,00	0,06
-1,4	0	5,80	0,050	0,05	0,45
1,4	0	7,20	0,050	0,02	0,18
0	-1,4	6,50	0,022	0,01	0,11
0	1,4	6,50	0,078	0,06	0,42
0	0	6,50	0,050	0,03	0,27
Promedio					0,236

Para ampliar el panorama de la actividad de la enzima ureasa en este diseño experimental, se observa en la figura 18 un gráfico de barras con líneas de error y sus respectivas desviaciones estándar, el cual indica la influencia del pH y la contracción de níquel en la actividad catalítica de la ureasa. Cada barra de color azul representa la reacción colorimétrica entre el producto formado amonio y la interacción con el reactivo de Nessler, de cada ensayo. Por ejemplo la primera barra (-1,-1) es el valor codificado e indica un pH 6 y una concentración de níquel de 0,030 (g/L) (tabla 11).

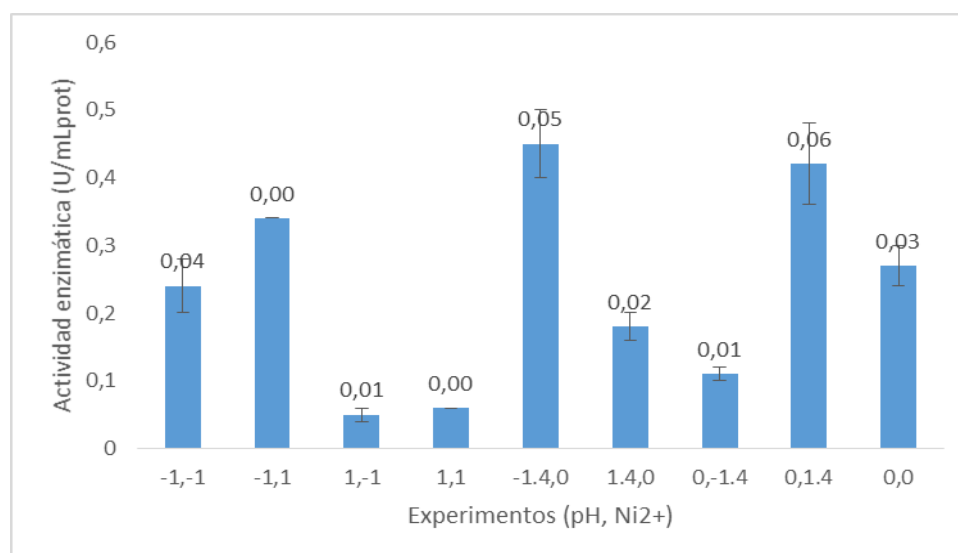


Figura 18. Gráfico de barras con línea de error y su respectiva actividad enzimática.

Además se puede observar en la misma figura 18 que la mayor actividad enzimática se encuentra en los experimentos -1.4, 0 y 0, 1.4 que corresponden a un pH de 5.8 y una concentración de níquel de 0.050 (g/L) y un pH de 6.5 y una concentración de níquel de 0.078 (g/L), respectivamente. Lo que se puede deducir es que existe una relación directamente proporcional en cuanto al pH y la concentración de níquel, ya que a medida que el pH aumenta la concentración de níquel también y como resultado una mayor actividad enzimática.

Entonces al verse el microorganismo afectado por el pH y teniendo en cuenta que para sobrevivir en aquel medio debe transformar los sustratos insolubles (como la urea) de alimentación mediante la producción de enzimas, su propio organismo toma del medio concentraciones más altas de níquel para poder establecer un equilibrio.

En cuanto al pH, menciona Puican, 2010 en su estudio que este factor tiene una drástica influencia en la supervivencia de un microorganismo debido a que los iones de hidrógeno H^+ se difunden a través de la membrana celular, lo que va a producir a continuación es una inhibición en el transporte celular, inhibiendo así la producción de enzimas y/o mal formando su estructura terciaria, por lo tanto afecta la actividad de cualquiera de las enzimas producidas.

La ureasa para mantenerse estable en cuanto a su actividad catalítica debe unirse a dos iones de níquel por subunidad y ésta puede variar dependiendo el microorganismo que las produce (Sujoy & Aparna, 2013), siendo importante esta variable en la producción de la enzima. Por tanto, valores de pH y de Ni^{2+} más allá del punto óptimo, repercutirá en la actividad de la enzima.

Por otra parte, con los datos que se obtuvieron de actividad enzimática como variable de respuesta y los niveles de experimentación que corresponden a $X_1 = \text{pH}$ y $X_2 = Ni^{2+}$ (g/L) se realizó un gráfico de superficie de respuesta en el software estadístico STATISTICA 13.2, usando una regresión multivariable que se muestra en la figura 19. Este gráfico en 3 dimensiones relaciona las variables de estudio X_1 y X_2 con la variable de respuesta.

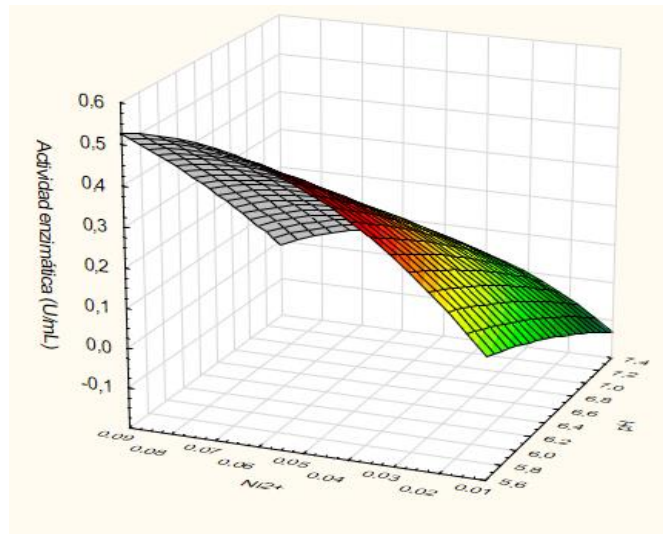


Figura 19. Superficie de respuesta 3D relacionando las variables X_1 : pH y X_2 : Ni^{2+} con la variables de respuesta: actividad enzimática.

En la figura 19 se observa una zona de color rojo que indica un sinnúmero de probabilidades en la que el pH y la concentración de Ni^{2+} pueden generar una mayor actividad enzimática. Las complejidades y las incertidumbres asociadas a la fermentación de hongos, por lo general no se conocen y tampoco las interacciones sofisticadas entre varios factores (pH y Ni^{2+}). Por tanto, la metodología de superficies de respuesta (RSM) ha sido cada vez más utilizada para las diversas fases de un proceso de optimización en fermentación sumergida (Chang, et al., 2002). Por otra parte, se obtuvo un R^2 de 0.77, es decir 77% en la variable de respuesta se ajusta al modelo y el F crítico es menor que el valor de F lo cual apoya además que el modelo de segundo orden es muy adecuado para aproximar la superficie de respuesta del diseño experimental. (Tabla 12).

Tabla 12
Estadística regresión multivariable.

Estadística de la regresión	
R^2	0,77
F	2,61
F crítico	0,19

La regresión multivariable del diseño experimental proporciona además una ecuación cuadrática (Ecuación 10) en la que se describe cómo influyen las variables X_1 y X_2 con la variable de respuesta: la actividad enzimática.

$$y = f + aX_1 + bX_2 + c(X_1)^2 + d(X_2)^2 + eX_1X_2 \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde $f = -0.20$, $a = 0.14$, $b = 25.29$, $c = -0.02$, $d = -2.11$ y $e = -81.27$.

Una vez identificados los valores, se procede a realizar el cálculos de los puntos críticos mediante derivadas parciales, donde la derivada parcial toma el valor de cero (Velasategui & Granja, 2014) por lo que se derivó la Ecuación 10 en función a cada variable de estudio X_1 (Ecuación 11) y X_2 (Ecuación 12).

$$\frac{dy}{dX_1} = 0.14 - 0.04X_1 - 2.11X_2 \quad \text{Ecuación 11}$$

$$\frac{dy}{dX_2} = 25.29 - 2.11X_1 - 162.53X_2 \quad \text{Ecuación 12}$$

Al derivar parcialmente permite que queden dos ecuaciones con dos incógnitas, de tal modo que se despeje una variable a la vez y se puedan obtener los valores codificados de cada una de ellas: $X_1 = 0.31$ y $X_2 = -0.29$ estos valores codificados sobresalen de los puntos de la zona roja de la Figura 12, para decodificar los valores de X_1 (Ecuación 13) y X_2 (Ecuación 14) es necesario convertirlo a los valores óptimos del estudio.

$$X_{1opt} = (X_{1codificado} * 0.5) + 6.5 \quad \text{Ecuación 13}$$

$$X_{2opt} = (X_{2codificado} * 0.02) + 0.05 \quad \text{Ecuación 14}$$

Con las ecuaciones 13 y 14 se obtuvieron los siguientes valores considerado óptimos en este diseño experimental de $X_{1(pH)} = 6.65$ y $X_{2(Ni^{2+})} = 0.044$ g/L. Una vez que se obtuvieron estos valores, son reemplazados en la Ecuación 10 surgiendo una actividad enzimática teórica de $y = 0,213$ U/mL. Con los valores óptimos se hacen nuevamente los ensayos con 2 réplicas y se evaluó la actividad enzimática, dando una actividad de $y = 0,2209$ U/mL. La excelente correlación entre los valores predichos y medidos de estos experimentos justifica la validez del modelo de respuesta y la existencia de un punto óptimo.

No existen estudios en el cual se informe un valor exacto de la actividad de la enzima ureasa en *Mucor sp.* pero estudios con *Aspergillus niger* indican que al optimizar el medio de crecimiento donde incluyen otros factores como fuente de nitrógeno, de carbono y de sulfato de níquel obtuvieron una actividad enzimática de 1.93 U/mLp para la ureasa (Bakhtiari et al., 2006), siendo este valor 5 veces más alto que el valor que se obtuvo con *Mucor sp* probablemente porque existen más estudios científicos acerca de cómo mejorar la producción de ureasa en *Aspergillus* y otros microorganismo que en *Mucor*.

5.4 Cribado de la concentración de glutaraldehído

Los resultados se replicaron tres veces. A continuación se muestra en la figura 20 una gráfica con barras de error. Cada barra azul representa la actividad catalítica de la ureasa con respecto a una determinada concentración de glutaraldehído. Además, se puede observar que el error es muy mínimo lo que indica una buena reproducibilidad en los ensayos y sus repeticiones.

El resultado óptimo fue a una concentración de glutaraldehído de 1.25 % (v/v). Esta concentración de glutaraldehído fue también muy similar a la de las referencias bibliográficas mencionadas en la sección de materiales y métodos, al inmovilizar la enzima de estudio.

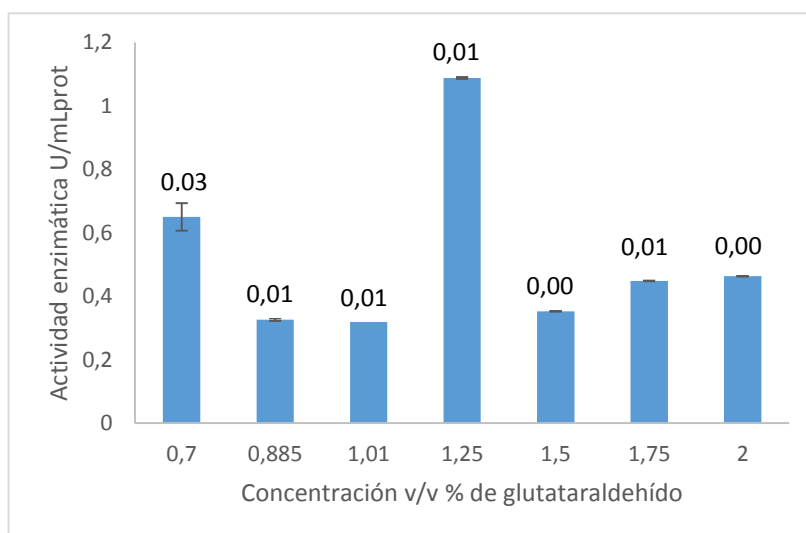


Figura 20. Cribado de la concentración de glutaraldehído %(v/v) con barras de error.

5.5 Cribado del tiempo de activación

En la figura 21 se muestran los resultados de cada ensayo con tres replicas tomando en cuenta el 1.25 % (v/v) de la concentración de glutaraldehído obtenido anteriormente. Al igual que el cribado de la concentración de glutaraldehído se realizó una gráfica con barras de error. Cada barra azul representa la actividad catalítica de la ureasa con respecto al tiempo. El error es mínimo lo que indica una buena reproducibilidad en los ensayos y sus repeticiones.

El ensayo 6 fue quien mayor resultados proporcionó y corresponde a 80 minutos del tiempo de activación junto con 1.25 % (v/v) de glutaraldehído. Tomando en cuenta la importancia del tiempo de activación en este estudio se realizó este cribado, puesto que en un determinado lapso de tiempo se forman enlaces químicos entre el soporte y los nucleófilos de la proteína (Arroyo, 1998).

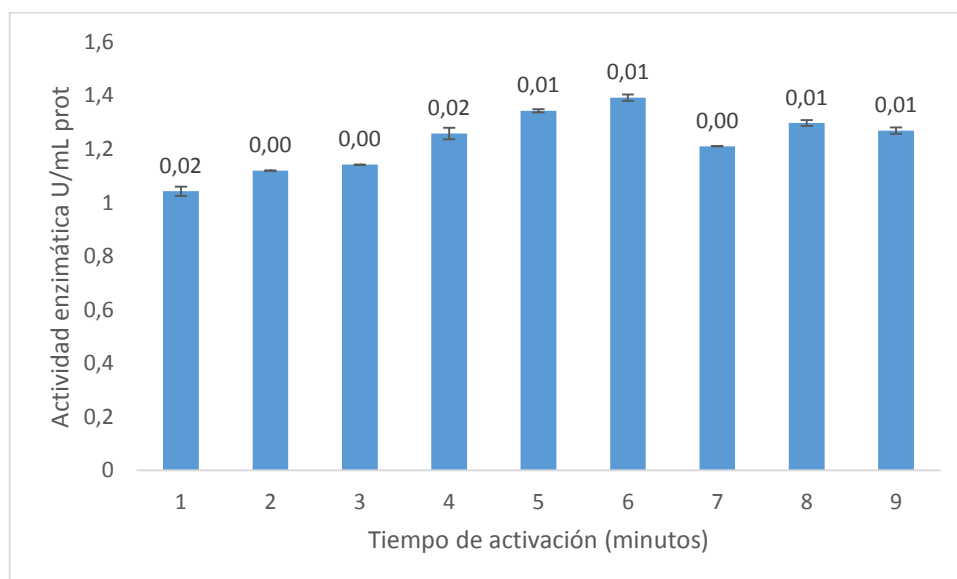


Figura 21. Cribado del tiempo de activación (minutos) con barras de error.

5.6 Diseño rotacional 2^k : Inmovilización enzimática

Los resultados de la inmovilización enzimática de la enzima ureasa se representan a continuación en la Tabla 13 y fueron replicados dos veces cada uno de forma aleatoria con 16 capsulas cada una.

En la parte de estadística se puede visualizar los valores codificados y decodificados del % de glutaraldehído y el tiempo. En la parte de estadística, la media indica la actividad de la enzima inmovilizada de cada experimento. Además, se puede observar la desviación estándar de las réplicas es muy baja e indican que no diferencia significativa entre las réplicas y que la reproducibilidad de las misma fue un éxito.

Tabla 13

Resultados de la actividad enzimática en la Inmovilización de la enzima ureasa.

Codificados		Decodificado		Estadística	
% Glutaraldehído	Tiempo	% Glutaraldehído	Tiempo	Media	Desvest
-1	-1	0,75	65	1,14	0,005
-1	1	0,75	95	1,25	0,007
1	-1	1,75	65	1,70	0,001
1	1	1,75	95	1,66	0,006
-1,4	0	0,55	80	0,43	0,002
1,4	0	1,95	80	1,89	0,026
0	-1,4	1,25	59	1,38	0,005
0	1,4	1,25	101	1,46	0,005
0	0	1,25	80	1,22	0,001

En la Figura 22 más adelante se representa de mejor manera los resultados en un gráfico de barras y sus respectivas desviaciones estándar. Cada barra azul representa los experimentos del diseño en la inmovilización de la ureasa. También se aprecia que el error es mínimo en los 9 ensayos lo que indica que la variabilidad de cada ensayo con su réplica se mantenían en el mismo valor de actividad catalítica.

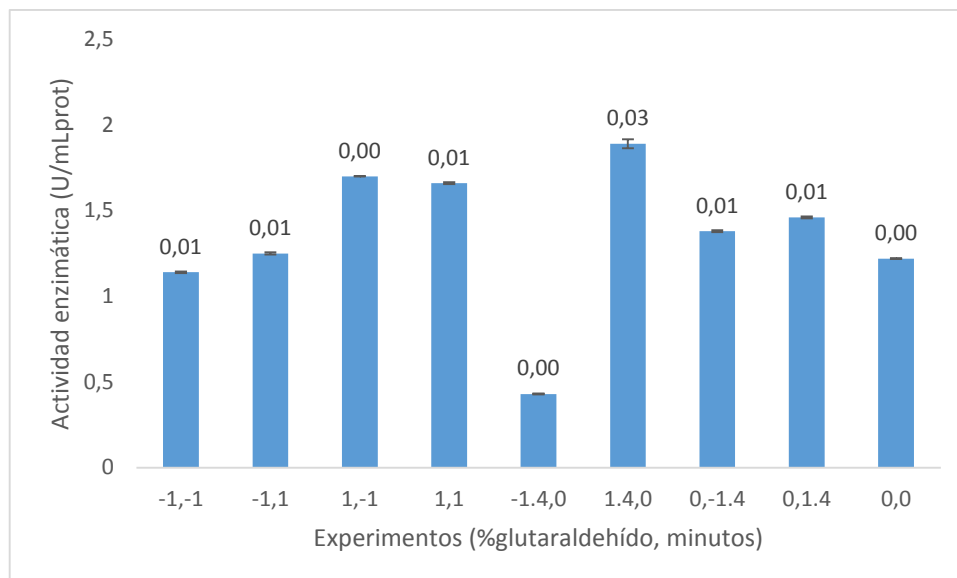


Figura 22. Gráfico de barras con líneas de error y su respectiva actividad enzimática

Como se puede observar en la figura 22, los ensayos quienes proporcionaron una mayor actividad fueron 1.4, 0 y 1, -1 que corresponde una concentración de glutaraldehído de 1.95 %(v/v) y un tiempo de activación de 80 minutos y otra concentración de glutaraldehído de 1.75 %(v/v) y un tiempo de activación de 65 minutos, respectivamente; con una actividad enzimática de 1.89 y 1.70 U/mL.P.

Se puede entonces inferir que no existe una relación específica entre la concentración de glutaraldehído (v/v) y el tiempo de activación (minutos) sino que van en conjunto. En un rango de glutaraldehído de 0.55 a 1.95 % (v/v) le corresponde un tiempo de activación de 59 a 101 minutos específicamente, es decir, si la concentración de glutaraldehído % (v/v) es pequeña le corresponde un tiempo de activación (minutos) pequeño en los rangos antes mencionados. Tal es el caso del ensayo -1.4, 0 y sus réplicas, al cual se le puso una concentración de glutaraldehído de 0.55 % (v/v) y un tiempo de activación de 80 minutos y el resultado de la actividad enzimática no fue significativa relativamente con los demás ensayos.

Velastegui y Granja (2014) mencionan que altas concentraciones de glutaraldehído inhiben la actividad de las enzimas, por lo tanto sería erróneo

pensar que a mayores concentraciones de glutaraldehído habrá mayor estabilidad de la enzima y una significativa actividad enzimática.

La concentración de aldehídos es importante al inmovilizar una enzima y extremadamente sustancial para precisar y preservar la actividad de la misma. Esto se debe a que a altas concentración de aldehídos implica la formación de múltiples enlaces químicos (cross-linking) entre la enzima y el soporte, provocando la deformación en la estructura terciaria de las enzimas y afectando su actividad enzimática frente a un tiempo determinado (Hayat, 2012). Tal es el caso del ensayo -1.4, 0 que pese a que la concentración de glutaraldehído fue baja 0.55 % (v/v) se dejó 80 minutos para activar los enlaces entre el quitosano y la enzima, provocando que demasiado tiempo también influya en la deformación de la estructura morfológica de la enzima y por tal su actividad enzimática.

El tiempo de activación como se mencionó anteriormente es importante dependiendo de la concentración de glutaraldehído, es decir, el tiempo de 80 minutos es relativo en cuanto a la formación de enlaces químicos. Y menciona Chen y otro (2013) que tiempos sumamente excesivos provocará una colosal maraña de enlaces químicos que provocará daños en su conformación física y por tanto su desnaturalización.

Por otra parte, con los datos que se obtuvieron de actividad enzimática como variable de respuesta y los niveles de experimentación que corresponden a X_1 = %glutaraldehído y X_2 = Tiempo de activación se realizó un gráfico (figura 23) de superficie de respuesta al igual que el primer diseño de la optimización del medio de cultivo.

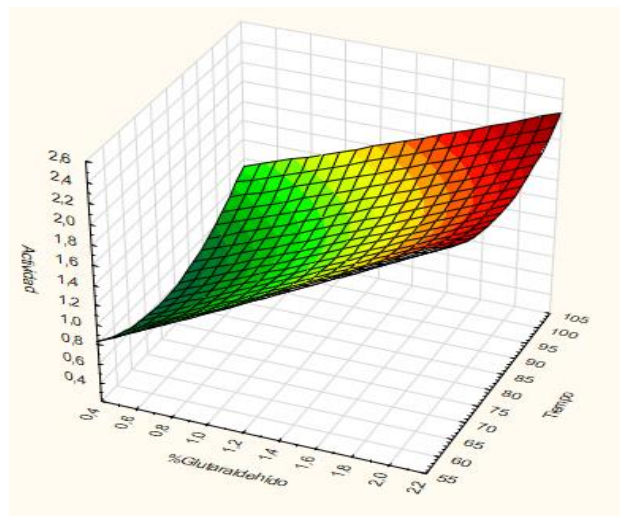


Figura 23. Superficie de respuesta 3D relacionando las variables X_1 : Glutaraldehído y X_2 : Tiempo con la variable de respuesta: Actividad enzimática.

En la figura 23 la zona de color rojo que indica muchas probabilidades en la que el %glutaraldehído y el tiempo de activación pueden generar una mayor actividad enzimática. Por otra parte, se obtuvo un R^2 de 0.87, este R^2 de 87% indica que el diseño experimental fue robusto ya que se trata de microorganismos y el F crítico es mucho menor que el valor de F (Tabla 14).

Tabla 14

Estadística de regresión multivariable en la inmovilización de la enzima ureasa.

Estadística de la regresión	
R^2	0,87
F	24,41
F crítico	7,08E-08

La ecuación cuadrática de la regresión multivariable del diseño experimental es la misma que la Ecuación 10, en este caso las variables independientes X_1 y X_2 son valores codificados y necesitan ser decodificados como en la primera optimización. Los valores de los coeficientes de la ecuación cuadrática en este caso son: $f= 1.22$, $a= 0.35$, $b= 0.02$, $c= -0.02$, $d= 0.15$ y $e= -0.04$

Aquí también se deriva la Ecuación 1 en función a cada variable de estudio X_1 (Ecuación 15) y X_2 (Ecuación 16).

$$\frac{dy}{dX_2} = 0.35 - 0.06X_1 + 0.15X_2 \quad \text{Ecuación 15}$$

$$\frac{dy}{dX_1} = 0.02 + 0.15X_1 - 0.08X_2 \quad \text{Ecuación 16}$$

Al derivar parcialmente permite que queden dos ecuaciones con dos incógnitas, de tal modo que se despeje una variable a la vez y se puedan obtener los valores codificados de cada una de ellas: $X_1 = 0.25$ y $X_2 = 0.06$ estos valores codificados sobresalen de los puntos de la zona roja de la Figura 5, para decodificar los valores de X_1 (Ecuación 17) y X_2 (Ecuación 18) es necesario convertirlo a los valores óptimos del estudio.

$$X_{1opt} = (X_{1codificado} * 0.5) + 1.25 \quad \text{Ecuación 17}$$

$$X_{2opt} = (X_{2codificado} * 15) + 80 \quad \text{Ecuación 18}$$

Con las ecuaciones 17 y 18 se obtuvieron los siguientes valores considerado óptimos en este diseño experimental de $X_{1(\%glutaraldehído)} = 1.37$ v/v y $X_{2(tiempo)} = 81.31$ minutos. Una vez que se obtuvieron estos valores, estos son reemplazados en la Ecuación 10 surgiendo una actividad enzimática teórica de $y = 1.311$ U/mL. Con los valores óptimos se hacen nuevamente réplicas y se evalúa la actividad enzimática, dando una actividad de $y = 1.239$ U/mL lo que indica que el modelo se ajustó en un 87% al diseño experimental.

En estudios anteriores donde inmovilizaron ureasa se menciona que valores superiores a 2.83 % (v/v) de glutaraldehído y un tiempo de activación mayor a 100 minutos hacen que las membranas se quiebren como resultado de la reticulación del quitosano. Además mencionan que la concentración óptima de glutaraldehído es de 0.9 % (v/v) y con tiempos de activación menores a 100 minutos (Krajewsk, Leszko & Zaborska, 1990) obtuvieron una actividad enzimática de 1.56 U/mL, lo que indica que la actividad enzimática en este estudio está en el promedio aceptable con otros estudios.

Una de las ventajas de la inmovilización covalente es que este es el más adecuado para producir enlaces más fuerte y duradero entre la enzima y el

soporte mejorando así su estabilidad, reusabilidad y lo más importante la actividad enzimática, aunque en otros casos la inmovilización no está diseñada adecuadamente por lo que realmente no se puede mejorar la rigidez de la enzima, incluso en algunos casos, la estabilidad de la enzima puede disminuir después de la inmovilización (Wu, et al., 2015). En este caso, la estabilidad de la enzima mejoró y también su actividad enzimática cinco veces más que la enzima libre.

5. 7 Cálculo de parámetros cinéticos: Km y Vmax

Las constantes cinéticas Km y Vmax tanto de la enzima libre como inmovilizada se puede visualizar en la Tabla 15, donde se obtuvieron mediante la linealización de Lineweaver-Burk (L-B) que se representa como 1/v versus 1/[S] para la enzima libre e inmovilizada. La naturaleza lineal de (L-B) demuestra que en los rangos de concentración de urea examinadas ambas enzimas siguen la cinética de Michaelis-Menten representada por la siguiente ecuación

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} \quad \text{Ecuación 19}$$

Tabla 15
Parámetros cinéticos: Valores Km y Vmax de la enzima libre e inmovilizada.

Ensayo enzima	Parámetros cinéticos	Valores
Libre	Km	8,04
	Vmax	4,52
Inmovilizada	Km	1,42
	Vmax	0,60

A bajas concentraciones de sustrato la reacción es de primer orden, para altas concentraciones cambia en orden cero cuando la velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato. Este intervalo de concentración se utilizó para determinaciones de la actividad enzimática. Los valores calculados de los parámetros cinéticos: las constantes de Michaelis y las velocidades máximas de reacción se listaron en la tabla 15 (Berg, et al., 2007).

La ureasa inmovilizada con quitosano exhibió valores de K_M de 1.42 a comparación de 8.04 de la ureasa libre. Esta disminución resulta ser bastante favorable ya que indica que hubo una excelente afinidad entre el sustrato y la enzima ureasa y puede ser el resultado de cambios estructurales óptimos en la enzima por el procedimiento de inmovilización (enlaces covalentes) y mayor accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima inmovilizada. Estos últimos pueden ser resultado de que no se haya presentado resistencias difusionales de capas de disolvente estancadas que suelen producirse alrededor de las moléculas inmovilizadas o del confinamiento de varias moléculas de enzimas dentro de la piel de la membrana durante el proceso de inmovilización. En efecto, la tasa máxima de reacción catalizada por la ureasa inmovilizada fue menor que la de la ureasa libre (Krajewsk, Leszko & Zaborska, 1990).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Mediante la observación microscópica de las estructuras morfológicas mediante azul de lactofenol en estadios de 24, 48, 72 y 96 horas y la revisión bibliográfica se concluyó que el hongo filamentoso con el cual se trabajó en este estudio pertenece al género *Mucor spp.*

Se concluye que el valor óptimo de pH y la concentración de níquel fueron 6.65 y 0,044 (g/L), respectivamente para obtener una mayor actividad catalítica de la enzima ureasa, estos valores se obtuvieron mediante el modelo matemático central compuesto rotacional 2^k de superficie de respuesta.

En cuanto a la inmovilización, se logró obtener resultados óptimos para el % de glutaraldehído y tiempo de activación, estos fueron 1.37 %(v/v) y 81.31 minutos, respectivamente. Por tanto se determinó que estos valores proporcionan una actividad enzimática cinco veces mayor que la actividad catalítica de la enzima libre.

Los parámetros cinéticos fueron muy favorables, la estabilidad al almacenamiento, estabilidad térmica, reutilización y estabilidad operativa de la enzima inmovilizada demuestra el potencial superior de la enzima inmovilizada para la industria.

6.2 Recomendaciones

Para estudios futuros es transcendental ejecutar un análisis genético y molecular del hongo *Mucor sp* para determinar su especie.

Se recomienda estudiar otras variables para de la optimización del crecimiento del hongo y la producción de ureasa, como: la temperatura, fuentes de nitrógeno, estabilidad de la enzima, concentración de enzima en la inmovilización y tiempo de vida media.

Con el fin de obtener un modelo matemático más robusto es importante realizar un estudio posterior al presente trabajo donde los puntos centrales para la optimización del medio de crecimiento sean pH: 6.65 y una concentración de

níquel de 0.044 (g/L); y para la optimización de la inmovilización de la enzima ureasa que los valores de los puntos centrales sean: glutaraldehído de 1.37 % (v/v) y el tiempo de 81.31 minutos.

REFERENCIAS

- Abdi, S. (2012). *Enzyme Kinetics and enzyme activity*. Recuperado el 27 de noviembre de 2016 de <http://fac.ksu.edu.sa/sabdi/home>
- Acosta, A. (2006). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado el 18 de diciembre de 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=4szLuVOtgC0C>
- Albeiro, C. (2009). *Estandarización y validación de una técnica para medición de la demanda bioquímica de oxígeno por el método respirométrico y la demanda química de oxígeno por el método colorimétrico (tesis de pregrado)*. Universidad tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia. Recuperado el 18 de diciembre de 2016 de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1780/57253L563.pdf;jsessionid=98266910D0D6436C407872A5EA02E604?sequence=1>
- Almirall, J., García, M., Jurkiewicz, M., Alegret, S., & Fábregas, E. (1999). *Desarrollo y validación de un biosensor biparamétrico de urea y creatinina para la monitorización de la sesión de hemodiálisis*. Rev de Nefrología. (XIX). Recuperado el 15 de enero de 2017 de <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-articulo-desarrollo-validacion-un-biosensor-biparametrico-urea-creatinina-monitorizacion-sesion-hemodialisis-X021169959901153X>
- Alves, M., Campos-takaki, G., Figueiredo, A., & Ivo, A. (2002). *Screening of mucor spp. for the production of amylase , lipase , polygalacturonase and protease*. Rev brasileira de microbiología. 33. 325–330. Recuperado el 23 de enero de 2017 de <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v33n4/v33n4a09.pdf>
- Andrade, S., Sarubbo, A., Fukushima, K., Miyaji, M., & Nishimura, K. (2002). *Production of Extracellular Proteases By Mucor Circinelloides Using D-Glucose As Carbon Source / Substrate*. Rev brasileira de

microbiología. 33 (2). 106–110. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000200002

Anwar, I., Ur, k., & Asrar, A. (2015). *Comparison between IgG Antibodies and Urease Activity to Helicobacter pylori in patients with different Gastroduodenal conditions*, 9(2), 737–739. Recuperado el 26 de octubre de 2016 de http://www.pjmhsonline.com/2015/apr_june/pdf/737%20%20%20Comparison%20between%20IgG%20Antibodies.pdf

Araki, J., & Ito, E. (1974). *Biochemical and biophysical research communications*, 56(3), 669–675. Recuperado el 03 de marzo de 2016 de <https://www.journals.elsevier.com/biochemical-and-biophysical-research-communications>

Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guazca y Cruz Verde* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>

Arroyo, M. (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*, Ars Pharmaceutica. 39 (2). 1–17. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/125.pdf>

Athmann, C., Zeng, N., Kang, T., Marcus, E., Scott, D., & Rektorschek, M. (2000). *Local pH elevation mediated by the intrabacterial urease of Helicobacter pylori cocultured with gastric cells*. *Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 339–347. Recuperado el 14 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1172/JCI9351>

Bakhtiari, M., Faezi, M., Fallahpour, M., Noohi, A., Moazami, N., & Amidi, Z. (2006). *Medium optimization by orthogonal array designs for urease*

production by Aspergillus niger PTCC5011. *Process Biochemistry*, 41(3), 547–551. Recuperado el 09 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.002>

Barabino, C., Gray, N., & Keyes, H. (1978). *Coupled reactions of immobilized enzymes and immobilized substrates: Clinical application as exemplified by amylase assay*. *Clinical Chemistry*, 24(8), 1393–1398. Recuperado el 23 de dde 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/354822>

Benitez, V. (2012). *Biotecnología enzimática e inmovilización celular*. Recuperado el 17 de enero de 2017 de <http://independent.academia.edu/VictorBenitezCabrera>

Bonifaz, A. (2012). *Micología médica básica: Mucor sp.* (M. Bernal, Ed.), *McGrawHill* (4ta ed.). Mexico DF: McGrawHill. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1529§ionid=98865352>

Brena, M., & Batista-viera, F. (2000). *Immobilization of Enzymes A Literature Survey*. Recuperado el 27 de enero de 2017 de http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-550-7_2

Britannica, E. (2016). *Urease*. *Enciclopedia Britannica*. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de <http://www.britannica.com/science/urease>

Brizova, K., Kralova, B., Demnerova, K., & Vins, I. (1992). *Isolation and characterization of alpha-glucosidase from Aspergillus niger*, *Journal Article: ResearchGate*. 593(1-2). 125–131. Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/244079571_Isolation_and_characterization_of_a-glucosidase_from_Aspergillus_niger

Cedillo, R., Marcela, C., Hernández, M., Zapata, S., Paulina, M., & Escareño, L.

(2014). *Application of Immobilized Enzymes*, (11), 1–9. Recuperado el 07 de septiembre de 2016 de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%2011/1.pdf>

Chang, N., Huang, C., Lee, C., Shih, L., & Tzeng, Y. M. (2002). *Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by Monascus ruber*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(7), 889–894. Recuperado el 06 de septiembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00037-6)

CICA. (2015). Metodología de Superficies de Respuesta, gran alternativa para incrementar la productividad de sus procesos, (572). Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://www.cicalidad.com/articulos/RSM.pdf>

Costa, B., Romão, B., Ribeiro, J., & Miriam, M. (2013). *Glutaraldehyde Effect in the Immobilization Process of Alpha-Galactosidase from Aspergillus niger in the Ion Exchange Resin Duolite A-568*, *AIDIC*, 32, 1105–1110. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.aidic.it/cet/13/32/185.pdf>

Curbelo, L., Díaz, A., & Pedroso, O. (2014). *Ventajas de los biosensores en hemodiálisis*. *Revista Archivo Médico de Camagüey-scielo*. 18(2). 240-254. Recuperado el 15 de octubre de 2016 de http://www.redalyc.org/pdf/2111/Resumenes/Resumen_2111315710_10_1.pdf

Danial, N., Hamza, H., & Mahmoud, H. (2015). *Characteristics of immobilized urease on grafted alginate bead systems*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 147–153. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400204>

DowChemicalCompany. (2016). Glutaraldehído. Recuperado el 18 de enero de 2017 de http://www.dow.com/microbial/la/es/glutaraldehyde/Fast_Facts_spafdf

- Dugan, F. (2006). *The identification of fungi: An Illustrated introduction with Keys, Glossary, and guide to Literature*. APS press. 18-20.
- Dutta, K., Dutta, J., & Tripathi, S. (2004). *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. Journal of science & Industrial research, 63(1), 20–31. Recuperado el 17 de enero de 2017 de <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5397/1/JSIR%2063%281%29%2020-31.pdf>
- Ellis, D. (2016). *Mucor*. Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://zygomycetes.org/index.php?id=84>
- Ferrández, A. (2002). *Biotecnología enzimática de vanguardia*. Academia de ciencia de la Región de Murcia, España. Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://www.um.es/acc/biotecnologia-enzimatica-de-vanguardia/>.
- Ferreiro, P. (2006). *Propiedades bioquímicas de suelos de prado de Galicia*. Univ Santiago de Compostela. [versión electrónica]. Recuperado el 25 de enero de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=nul5vDjLjloC>
- Fong, H., Wong, C., Yuen, H., Lau, H., Chen, W., & Wong, B. (2013). *Structure of UreG/UreF/UreH Complex Reveals How Urease Accessory Proteins Facilitate Maturation of Helicobacter pylori Urease*. PLoS Biology, 11(10). Recuperado el 14 de septiembre de 2016 de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001678>
- Gallego, E., & Sánchez, J. (2015). *Myco-ual: subfilos mucoromycotina y kickxellomycotina*. Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://ual.es/GruposInv/myco-ual/mucoral.htm>
- García, V. (2005). *Introducción a la microbiología (2a ed.)*. [versión electrónica]. Recuperado el 18 de enero de 2016 de https://books.google.com.mx/books/about/INTRODUCCI%C3%93N_

A_LA_MICROBIOLOG%C3%8DA_2a_ed.html?hl=es&id=K_ETVnqn
MZIC

- Ghasemi, F., Bakhtiari, R., Fallahpour, M., Noohi, A., Moazami, N., & Amidi, Z. (2004). Screening of urease production by *Aspergillus niger* strains. *Iranian Biomedical Journal*, 8(1), 47–50. Recuperado el 30 de septiembre de 2016 de http://ibj.pasteur.ac.ir/files/site1/user_files_b76aeb/admin-A-10-1-245-2a2dff5.pdf
- Guimarães, S., Peixoto-nogueira, C., Michelin, M., Rizzatti, S., Valéria, C., & Zanoelo, F. (2006). *Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(1). 474–480. Recuperado el 12 de septiembre de 2016 de <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v37n4/v37n4a14.pdf>
- Honig, D. (1976). *Medically important Fungi: a guide to identification*. Harper & Row Publisher, Inc. 84.
- Illanes, A. (2013). *Enzyme biocatalysis*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). Recuperado el 14 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- InterPro. (2016). *Urease active site*. Recuperado el 18 de enero de 2017 de <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR017950>
- Jiménez, M. (2015). *Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto*, 31–36. Recuperado 15 de enero de 2016 de <http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Diseno%20de%20Superficies%20de%20Respuesta.pdf>.
- Karacaoğlu, S., Timur, S., & Telefoncu, A. (2003). *Arginine selective biosensor based on arginase-urease immobilized in gelatin*. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 31(3), 357–363.

Recuperado el 28 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1081/BIO-120023164>

- Karimi, K., Emtiazi, G., & Taherzadeh, J. (2006). *Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae**, 40, 138–144. Recuperado el 23 de enero de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.046>
- Khan, M., Javed, M., & Zahoor, S. (2013). *Kinetics and Thermodynamic Study of Urease Extracted from Soybeans*. *Biología Pakistan*. 59(1), 7–14. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://biosoc.pk/wp-content/uploads/2013/09/02-13-Dr.-Mohsin-Urease.pdf>
- Kumar, B., Charan, T., Nath, S., & Kumar, A. (2012). *Textbook of Biotechnology*. Tata McGraw Hill Education. [versión electrónica]. recuperado el 23 de septiembre de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=YQoDPgAACAAJ&dq=Textbook+of+Biotechnology:+kumar&hl=es&sa=X&redir_esc=y
- Leonard, H. (1961). *Quantitative Range of Nessler's Reaction with Ammonia*, *Clinical Chemistry*. 9(4). 417–422. Recuperado 16 de noviembre de 2016 de <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/9/4/417.full.pdf>
- Li, M., Cheng, X., & Guo, H. (2013). *Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76(1), 81–85. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.016>
- Lieberman, M., Marks, D., Smith, M., & Marks, B. (2007). *Marks' Essential Medical Biochemistry*. [versión electrónica]. Recuperado el 23 de diciembre de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=MgqI-pfk45QC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Linear. (2016). *UREA/BUN BR*. Recuperado el 20 de enero de 2017 de http://www.linear.es/ficheros/archivos/78_1158005C.pdf
- Lorenc, A. (2008). *Investigación de la acción de la Ureasa*. Recuperado el 20 de enero de 2017 de <http://www.scienceinschool.org/es/2008/issue9/urease>
- Mansee, H., Chen, W., & Mulchandani, A. (2005). *Detoxification of the organophosphate nerve agent coumaphos using organophosphorus hydrolase immobilized on cellulose materials*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32(11–12). 554–560. Recuperado el 28 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0059-y>
- Manzi, L., & Mayz, J. (2003). *Valorando los microorganismos*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1). 85–88. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- McGilvery, W. (1977). *Conceptos bioquímicos*. Reverté. Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=A4FlhoNWTn8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- MerriamWebster. (2015). *Medical Dictionary: Nessler's reagent*. Recuperado el 20 de enero de 2017 de <https://www.merriam-webster.com/medical/Nessler's%20reagent>
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, J., & Waldron, C. (2004). *Glutaraldehyde : behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. 37(5). 790-802. Recuperado el 20 de enero de 2017 de http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00037/BTN_A_043

75RV01_O_37190a.pdf

- Montgomery, D. (2005). *Delineamiento de Compuesto Central Rotacional*. 54–64. Recuperado el 20 de enero de 2017 de http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Abril_2011/IF_VIVANCO_FIPA/j_Capitulo%206_Delineamiento%20de%20CCR.pdf
- Nordlander, E., & Carlsson, H. (2010). *Computational modeling of the mechanism of urease*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2010(1). Recuperado el 14 de septiembre de 2016 de <https://doi.org/10.1155/2010/364891>
- Ochoa, H. (1998). *Biotecnología de enzimas : Inmovilización Catálisis enzimática heterogénea*, *Ars Pharmaceutica*. 32(9). 23-39. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/125.pdf>
- Pérez, A., Niño, M., Hernández, V., & Hernández, C. (2007). *Uso de Enzimas de Tipo Ureasa en el Tratamiento de Aguas Residuales con Alto Contenido en Nitrógeno Orgánico*, *Información Tecnológica*. 18(5). 41-48. Recuperado el 28 de septiembre de 2016 de <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n5/art06.pdf>
- Predovan, G., & Klari, D. (2012). *Determination of Creatinine in PETs and Laboratory Calculations of the Peritoneal Dialysis Adequacy*, *Journal Life of Sciences*. 6(1), 670-678. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de <http://www.davidpublishing.com/davidpublishing/Upfile/7/31/2012/2012073101346278.pdf>
- Ral, C. (2006). *Seguridad alimentaria*, *Actividad Diet*, 13(4), 1–4. Recuperado el 15 de enero de 2017 de [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(09\)73425-X](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(09)73425-X)
- Reyes, M., & Aguilar, C. (2011). *Residuos agroindustriales para la producción de*

proteasas fúngicas, Ciencia Cierta. Recuperado el 20 de enero de 2017 de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC27/6.html>

Rodríguez, B. (2016). Atlas de Identificación Micológica. Recuperado el 20 de enero de 2017 de <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/17/mucor-spp/>

Rodríguez, C. (2005). *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar. Recuperado el 23 de diciembre de 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC>

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & Van Dijck, P. (2002). *On the safety of Aspergillus niger*, Applied Microbiology and Biotechnology, 59(4–5), 426–435. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

Scopes, K. (2002). Enzyme Activity and Assays, Nature Publishing Group. 1–6. Recuperado el 23 de marzo de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000712/abstract?systemMessage=WOL+Usage+report+download+page+will+be+unavailable+on+Friday+27th+January+2017+at+23%3A00+GMT%2F+18%3A00+EST%2F+07%3A00+SGT+%28Saturday+28th+Jan+for+SGT%29++for+up+to+2+hours+due+to+essential+server+maintenance.+Apologies+for+the+inconvenience.>

Seguel, M. (1971). *Inmovilización de Enzimas*. 1–17. Recuperado el 20 de enero de 2017 de <http://es.slideshare.net/valnigu/inmovilizacion-de-enzimas>

Serrano, C. (2013). *Aislamiento Y Caracterización Metabólica De Las Bacterias Que Hidrolizan La Urea Contendida En La Orina Humana*, Journal of Chemical Information and Modeling. 53(1). Recuperado 13 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Sheliakina, M., Arkhypova, V., Soldatkin, O., & Saiapina, O. (2014). *Talanta Urease-based ISFET biosensor for arginine determination*, ScienceDirect, 121(1), 18–23. Recuperado el 23 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.042>
- Solera, F., Rodríguez, A., & Soto, B. (2010). *Evaluación de la producción de proteasas en dos cepas de mucor sp. por fermentación sumergida empleando dos tipos de medio de cultivo*, UNICIENCIA. 24(1). 63–68. Recuperado el 19 de septiembre de 2016 de http://www.academia.edu/12371499/2010_-_Vol24_-_Num1_-_Evaluaci%C3%B3n_de_la_producci%C3%B3n_de_proteasas_en_dos_cepas_de_Mucor_sp._Por_fermentaci%C3%B3n_sumergida_empleando_dos_tipos_de_medio_de_cultivo
- Spahn, C., & Minter, S. D. (2008). *Enzyme Immobilization in Biotechnology*, Recent Patents on Engineering, 2(3), 195–200. Recuperado el 15 de marzo de 2016 de <https://doi.org/10.2174/187221208786306333>
- Sujoy, B. (2013). *Potential clinical significance of urease enzyme*, European Scientific Journal. 9(21), 94–102. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de www.ejournal.org/index.php/esj/article/download/1584/1590
- Sujoy, B., & Aparna, A. (2013). *Enzymology, Immobilization and Applications of Urease Enzyme*. International Research Journal of Biological Sciences. 2(6), 51–56. Recuperado 15 de noviembre de 2016 de <http://www.isca.in/IJBS/Archive/v2/i6/10.ISCA-IRJBS-2013-073.pdf>
- Sumner, B. (1926). *Enzyme Urease*, Journal BioChemical. 69(1), 435–441. Recuperado el 30 de noviembre de 2016 de <http://www.jbc.org/content/69/2/435.full.pdf+html>
- Tangarife, V. (2011). *Mucor spp.* Recuperado el 20 de enero de 2017 de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100894>

- Teijón, M. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Editorial Tébar. Recuperado el 30 de julio de 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=avt8LFmp8q4C>
- Tischer, W., & Wedekind, F. (1999). *Immobilized Enzymes: Methods and Applications*, Biocatalysis-from Discovery to Application. 200(1), 95–126. Recuperado el 30 de julio de 2016 de <https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7>
- Tortora, J., Funke, R., & Case, L. (2007). *Introducción a la microbiología*, Médica Panamericana. [versión electrónica]. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4255/Introduccion-a-la-Microbiologia.html>
- Velastegui, E., & Granja, R. (2014). *Optimización de condiciones de inmovilización química de lipasa de Rhizopus arrhizus en soportes de quitosano*. Tesis de pregrado.
- Venault, A., Bounyer, D., Pochat-Bohatier, C., Vachoud, L., & Faur, C. (2011). *Investigation of Chitosan Gelation Mechanisms by a Modeling Approach Coupled to Local Experimental Measurement*, AIChE Journal. 0(0). Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1002/aic>
- Vicente, C., Nieto, J. M., & Legaz, M. E. (1983). *Induction of urease by urea analogues in Evemia prunastri thallus*, Plant Science. 58(3), 325–330. Recuperado el 01 de diciembre de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04188.x/full>
- Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Médica panamericana. [versión electrónica]. Recuperado el 08 de diciembre de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=r5bedH_aST0C

- Weng, A. (2005). *Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?*, Rev Cubana Hig Epidemiol. 43(3), 2–5. Recuperado el 01 de diciembre de 2016 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Yingjie, Q., & Cabral, S. (2002). *Properties and Applications of Urease*, ReseachGate. 20(1), 1–14. Recuperado 16 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1080/10242420290003236>
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). *A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications*, ResearchGate. 0(0), 1–24. Recuperado el 30 de julio de 2016 de <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>

ANEXOS

Anexo 1

Características *Mucor sp.*: Las características se tomaron de las guías de identificación “medically important FUNGI- a guide to identification” y “THE IDENTIFICATION OF FUNGI” (Honing, 1976; Dugan, 2006).

Características <i>Mucor</i>	Positivo	Negativo
Crecimiento rápido, maduro dentro de 4 días.		Dentro de 2 días
Colonia blanca que luego se torna negruzco	X	
Las hifas son hialinas y no septadas	X	
Los esporangioforos son negros y esféricos	X	
Las esporas son visibles dentro del esporangioforo	X	

Anexo 2

Medio PDA: Se cultivó a *Mucor sp* en un medio de cultivo PDA para activarlo y después de 48 horas se puede visualizar la maduración de los esporangioforos lo que torna su color blanco en uno negruzco.



Anexo 3

Medios de cultivo selectivo: Los medios de fermentación sumergida, después de dos días de incubación a 37°C y una agitación de 127 rpm con la finalidad de obtener biomasa.



Anexo 4

Ensayos medición actividad enzimática: Celdas espectrofotométrica con urea, ureasa y tampón fosfato de potasio. Al añadir el reactivo de Nessler, generó un cambio de color debido al amonio generado por la hidrólisis de la ureasa y la urea, y así poder evaluar la actividad enzimática de la ureasa.



