

## Influencia de la velocidad de agitación, el pH inicial y el tiempo de fermentación en la obtención de cuajo microbiano de *Rhizomucor miehei*

✉ Miguel Ángel Mujica<sup>1</sup>, Lenis Matute-Almeida<sup>1</sup>, Sonia Rodas-Espinoza<sup>2</sup>, Hazel Román-Rojas<sup>1</sup>, Daniel Vargas-Guzmán<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

Apartado Postal 4579. Avenida Universidad. Maracay 2101A, Venezuela

<sup>2</sup> Cátedra de Biotecnología. Facultad de Ingeniería. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Chimborazo.

Avenida Leopoldo Freire y La Paz, Riobamba 060110, Ecuador

<sup>3</sup> Sección de Bovinos, Instituto de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

Apartado Postal 4579. Maracay 2101<sup>a</sup>, Venezuela

✉ lenismat@gmail.com

### RESUMEN

La quimosina es una proteasa (EC 3.4.23.4) que se requiere para la fabricación del queso. Debido a los altos costos de producción de esta enzima, su obtención ha sido investigada en procesos de fermentación microbiana como los generados por *Rhizomucor miehei*. Los investigadores han señalado que esta enzima tiene una alta actividad de coagulación de la leche y su producción se ve afectada por algunos parámetros operativos. Por lo tanto, en este trabajo se estudió el efecto de la velocidad de agitación, el pH inicial del medio de cultivo y el tiempo de fermentación en la obtención del cuajo microbiano producido por *Rhizomucor miehei*. Para ello, se seleccionó un diseño factorial 2<sup>2</sup> completamente al azar, se evaluó el pH inicial (4.0 y 6.0) y la velocidad de agitación (200 y 300 rpm), se determinó la variación del pH, el consumo de glucosa y la actividad enzimática a las 0, 24, 48 y 72 horas de fermentación. Los resultados demostraron que la mayor actividad enzimática se obtuvo a las 72 horas de fermentación con pH inicial de 4.0 y una agitación de 300 rpm ( $p < 0.05$ ). Asimismo, se determinó que la interacción de la velocidad de agitación, pH inicial y tiempo de fermentación influyó de forma altamente significativa sobre la actividad enzimática ( $p < 0.01$ ) y que no hay correlación lineal entre la tasa de consumo de la glucosa en el medio y la actividad enzimática obtenida. Por último, se observó que suplementar el medio con lactosa disminuyó la actividad coagulante de la leche.

*Palabras clave:* proteasa, agitación, pH, enzima

### ABSTRACT

**Influence of stirring speed, initial pH and fermentation time on obtaining microbial rennet from *Rhizomucor miehei*.** Chymosin is a protease (EC 3.4.23.4) that is required in the manufacture of cheese. Due to the high production costs of this enzyme, its obtention has been investigated in microbial fermentation processes, such as those generated by *Rhizomucor miehei*. Researchers have pointed out that this enzyme has a high milk coagulation activity and its production is affected by some operational parameters. Therefore, in this work, the effect of the agitation speed, the initial pH of the culture medium and the fermentation time in obtaining the microbial rennet produced by *Rhizomucor miehei* was studied. For this, a factorial 2<sup>2</sup> design completely random was selected, the initial pH (4.0 and 6.0), the agitation speed (200 and 300 rpm), the variation of pH, the glucose consumption and the enzymatic activity at 0, 24, 48 and 72 hours of fermentation were determined. The results showed that the highest enzymatic activity was obtained after 72 hours of fermentation with an initial pH of 4.0 and agitation of 300 rpm ( $p < 0.05$ ). Likewise, it was determined that the interaction of the agitation speed, initial pH and fermentation time had a highly significant influence on the enzymatic activity ( $p < 0.01$ ) and that there is no linear correlation between the rate of glucose consumption in the medium and the enzymatic activity obtained. Finally, it was observed that supplementing the medium with lactose decreased the coagulant activity of the milk's protease enzyme.

*Keywords:* protease, agitation, pH, enzyme

#### How to cite (Vancouver style):

Mujica MA, Matute-Almeida L, Rodas-Espinoza S, Román-Rojas H, Vargas-Guzmán D. Influencia de la velocidad de agitación, el pH inicial y el tiempo de fermentación en la obtención de cuajo microbiano de *Rhizomucor miehei*. Biotecnol Apl. 2020;37(3):3201-7.

### Introducción

La leche fue uno de los primeros alimentos sometidos a procesos fermentativos debido a la facilidad con la cual los microorganismos logran su acidificación, obteniéndose leche fermentada y muy probablemente a

partir de ésta, los primeros quesos con el desarrollo en paralelo del uso de la quimosina (renina) [1]. Esto implica que la elaboración de quesos es probablemente el uso empírico más antiguo de una enzima en for-

1. García Garibay M, Quintero Ramírez R, Lóez-Mungía Canales A. Biotecnología Alimentaria. México: Editorial Limusa, S.A.; 1999.



Publicación libre de costo  
para el autor  
No article processing charges

ma industrial; asimismo, en 1874, Christian Hansen, inició la extracción de la quimosina de soluciones salinas del abomaso de ternero, marcando el inicio de la tecnología enzimática [1].

La quimosina es una enzima proteolítica (EC 3.4.23.4), que cataliza la hidrólisis específica de la k-caseína de la leche. Es una proteasa del ácido aspártico o aspartoproteasa (EC 3.4.23.), perteneciente al grupo de enzimas endopeptidasas [2]. Debido a los elevados costos de producción, problemas asociados con la matanza de animales y a la demanda requerida por la industria quesera, ha sido necesaria la búsqueda de alternativas para la sustitución de la renina de ternero.

Las investigaciones se han orientado hacia la obtención de proteasas de origen microbiano, animal o fuentes vegetales [3]. Sin embargo, las proteasas animales y vegetales han demostrado ser enzimas de acción inespecífica en la coagulación de la leche, con la obtención de quesos con sabores amargos y texturas no deseadas. Es por ello que los esfuerzos se han centrado en las fuentes microbianas, debido a su especificidad y las ventajas competitivas de su producción [4, 5].

Algunos microorganismos utilizados para producir enzimas proteolíticas que sirven como sustitutos de la quimosina (las cuales reciben el nombre de cuajos microbianos) en la elaboración de quesos, son los hongos. Entre las especies fúngicas empleadas para la obtención a escala industrial de proteasas aspárticas, se encuentran: *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Rhizomucor pusillus* y *R. miehei*, los cuales excretan las enzimas al medio de cultivo y facilitan su recuperación [1, 6-8].

Asimismo, se ha afirmado que esta enzima presenta una alta actividad de coagulación de la leche y que su producción se ve afectada por algunos parámetros operativos [6, 9]. Es por ello, que en este trabajo se estudió el efecto de la velocidad de agitación y el pH inicial del medio de cultivo en la obtención de cuajo microbiano producido por *R. miehei* en fermentaciones sumergidas.

## Materiales y métodos

### Microorganismo

El material biológico que se empleó en el ensayo fue *R. miehei* CVCV 3037 (ATCC 26282) proveniente del cepario del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela). Dicha cepa fue conservada bajo refrigeración a 4 °C y propagada en cuñas de papa dextrosa agar (PDA) [10].

### Medio de cultivo

La composición de un litro de medio de cultivo fue formulado como se describe a continuación: 4 g de caseína de leche bovina (Sigma-Aldrich, US), 20 g de glucosa (Merck, US), 4 g de extracto de malta (Merck, US), 4 g de peptona bacteriológica (Oxoid, UK) y 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, US) [2]. Se dispuso de 100 mL del medio de cultivo en erlenmeyers con capacidad para 500 mL, se ajustó el pH a un valor de 4 o de 6 y se esterilizó en autoclave (All American, modelo 75X, US) a 121 °C por 20 min [6].

### Proceso de fermentación

Se inocularon las esporas de *R. miehei* a razón de  $10^7$  esporas/mL y se incubaron a 37 °C durante 72 h a dos velocidades: 200 o 300 rpm para favorecer la fermentación aerobia, empleando para ello una incubadora Biobase (Modelo BJPX-2012, China), efectuándose la toma de las muestras (por triplicado) durante las 0, 24, 48 y 72 h de incubación. Las muestras se centrifugaron en centrifuga refrigerada Beckman (modelo GS15R, USA) a 4 °C y al sobrenadante colectado se le determinó el pH, el contenido de glucosa y la actividad enzimática.

### Técnicas analíticas

#### Medición del pH

Se empleó un potenciómetro Apera, modelo PH700 (China) para registrar la variación del pH durante los procesos fermentativos [11].

#### Determinación del contenido de glucosa

El consumo de glucosa se cuantificó por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores [12]. La tasa de consumo de glucosa se estimó por regresión lineal de los datos [2].

#### Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se expresó como la actividad coagulante de la leche (ACL) del sobrenadante del medio de cultivo y se midió incubando 5 mL de sustrato (leche) a 35 °C durante 5 min, para luego incorporar 0.5 mL del sobrenadante [13]. Se midió el tiempo que toma la formación de las primeras partículas (coágulos) a partir de la adición del sobrenadante del medio de cultivo calculando la ACL a través de la siguiente ecuación [8, 14]:

$$ACL = \frac{2400 \times 5 \times D}{t \times 0.5}$$

Donde: ACL es la actividad coagulante de la leche, 5 es la cantidad de leche en mL, D es la dilución de la enzima, t es el tiempo que le toma a la enzima la coagulación de la leche expresado en s, 0.5 es la cantidad de sobrenadante empleada, expresada en mL y 2400 es el tiempo estándar en s, en el que cuaja la leche a 35 °C con un cuajo comercial. La ACL fue expresada en unidades Soxhlet (US), la cual se define como la cantidad de enzima (mg de quimosina/L (o kg) de cuajo) requerida para coagular 5 mL de sustrato en 40 min a una temperatura de 35 °C.

#### Efecto de la lactosa como inductor de la actividad enzimática

Para comprobar si la lactosa ejerce algún efecto sobre la actividad enzimática, se incorporó al medio 4% de este carbohidrato en medio basal con pH ajustado a los valores que previamente presentaron mayor actividad enzimática.

#### Determinación de los sólidos solubles

La medición de los sólidos solubles se efectuó empleando refractómetro digital Atago Pocket PAL-1, los resultados expresados en °Brix que corresponden al porcentaje de sólidos solubles en el medio [15, 16].

2. Morillo Piña OT, García Lugo PJ, Ruiz B, Guerrero Cardena G, Torres Vielma Y, Castañeda Ruiz RF. Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor* spp. Rev Colombiana Biotecnol. 2015;17(1):54-60.

3. Merheb-Dini C, Gomes E, Boscolo M, Da Silva R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucorindicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucorindicae-seudaticae* N31). Food Chem. 2010;120:87-93.

4. Cheng Q, Bai X, Wang Y. Isolation and fermentation condition of milk-clotting enzyme producing strain from glutinous rice wine. Chinese J Biotechnol. 2008;24(6):999-1003.

5. Khademi, F, Abachi S, Mortazavi A, Ehsani MA, Tabatabaei MR, Malekzadeh FA. Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor naititalensis*. Under Solid Substrate Fermentation system. IOSR J Pharm Biol Sci. 2013;5(2):115-21.

6. Silveira G, Moneteiro de Oliveira G, Ribeiro EJ, Monti R, Contiero J. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. Braz Arch Biol Technol. 2005;48(6):931-7.

7. Nouani A, Belhamiche N, Slamani R, Belbraquet S, Fazouane F, Bellal MM. Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. Int J Dairy Technol. 2009;62(1):112-7.

8. AmerAbeer EA, Hashem MI, Amer ME, Gomaa AM. Using sweet whey for production of milk clotting enzyme by *Mucor miehei* NRRL 3420 in production of white soft cheese. Middle East J Appl Sci. 2015;5(4):1068-81.

9. Kazemi-Vaysari A, Kheirrolomoom A, Arjmand M, Habibollahi M. Optimization of *Mucor-miehei* rennin production and recovery. Scientia Iranica. 2002;9(1):99-104.

10. Matute L, Bertsch A, Diaz I. Evaluación de la actividad amilolítica de *Aspergillus niger* ANM-1 en fermentaciones en estado sólido y sumergido para la obtención y caracterización de aditivos enzimáticos. Rev Fac Agron Universidad Central de Venezuela. 2012;38(1):9-17.

11. Sánchez-Henao CP, Escobar Kousen JM, Rodríguez de Stouvenel A. Características de la producción de la renina microbiana de *Mucormiehei* en un proceso de alimentación por lote. Rev Colombiana Biotecnol. 1999;2(1):28-34.

12. Miller GL. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426-8.

13. Otani H, Mitsuhiro I, Akiyoshi H. The screening of trees having milk activity. Animal Sci Technol. 1991;62:417-23.

14. Kawai M, Mukai N. Studies on milk-clotting enzyme produced by *Basidiomycetes*. 1. Screening tests of *Basidiomycetes* for the production of milk clotting enzymes. Agric Biol Chem. 1970;34:159-63.

### Diseño del experimento y análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental factorial  $2^2$ , completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y tres réplicas para cada parámetro estudiado [17, 18] y se estudiaron los siguientes factores y niveles: agitación (200 y 300 rpm), pH (4 y 6). Con los datos recolectados se efectuó un análisis de varianza (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ) con la finalidad de determinar si las interacciones eran estadísticamente significativas o no, y se aplicó la prueba de comparación de medias de las mínimas diferencias significativas (LSD) [18]. Finalmente, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la distribución normal de la data empleada y comprobar la validez de ajuste del coeficiente de determinación,  $R^2$ [18]. La información recopilada fue procesada con los programas informáticos IBM® SPSS® Statistics versión 20 [19].

### Resultados y discusión

#### Influencia de la velocidad de agitación, el pH inicial y el tiempo de fermentación en la producción del cuajo microbiano

En la figura 1, se observa la variación del pH en el transcurso de las fermentaciones, constatándose que en todos los tratamientos el pH se mantuvo por debajo de 6.5. Además, la prueba de mínimas diferencias significativas demostró que a las 72 h de incubación se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pH de los tratamientos bajo estudio ( $p < 0.05$ ), siendo de 5.2 a 200 rpm y de 4.58 a 300 rpm, cuando el pH inicial fue de 6.0. También de 3.17 a 200 rpm y 3.29 a 300 rpm cuando se ajustó el pH inicial a un valor de 4.0, sin diferencias significativas entre los tratamientos bajo estudio a este pH ( $p > 0.05$ ). Al respecto, se ha señalado que la ACL es menor conforme el pH se incrementa, indicando que a valores de pH 8.5 la proteasa se torna inestable, y reporta las mayores ACL a pH 4 y 4,5 [8].

En cuanto al contenido de glucosa en el sustrato, se observó que este disminuyó bajo ambas condiciones de agitación y pH. El consumo de glucosa fue similar durante las primeras 24 h de fermentación; en tanto que se determinó la existencia de diferencias significativas en el contenido de glucosa en el medio a las 48 y 72 h ( $p < 0.05$ ) bajo las condiciones en estudio (Figura 2). A las 72 h de fermentación, el tratamiento con agitación a 200 rpm y pH inicial ajustado a 6.0 fue el que consumió menos glucosa, quedando en el medio 6.64 g de glucosa/L, diferenciándose significativamente ( $p < 0.05$ ) de los demás tratamientos en los que quedaron 2.07 g de glucosa/L en promedio.

De acuerdo con el ANOVA aplicado (Tabla 1), la interacción de la velocidad de agitación, el pH inicial y el tiempo de fermentación, influyeron de forma altamente significativa ( $p < 0.01$ ) sobre el consumo de glucosa. Ninguno de los parámetros estudiados por sí solo, evidenció afectar el consumo de la glucosa en el medio.

Con respecto a la velocidad de consumo de la glucosa, esta resultó en 0.14 g/L·s a pH 6 con 200 rpm, de 0.22 g/L·s (pH 4 con 200 rpm y a pH 6 a 300 rpm) y de 0.23 g/L·s a pH 4 con 300 rpm de agitación. Estos valores fueron superiores a los obtenidos en otras

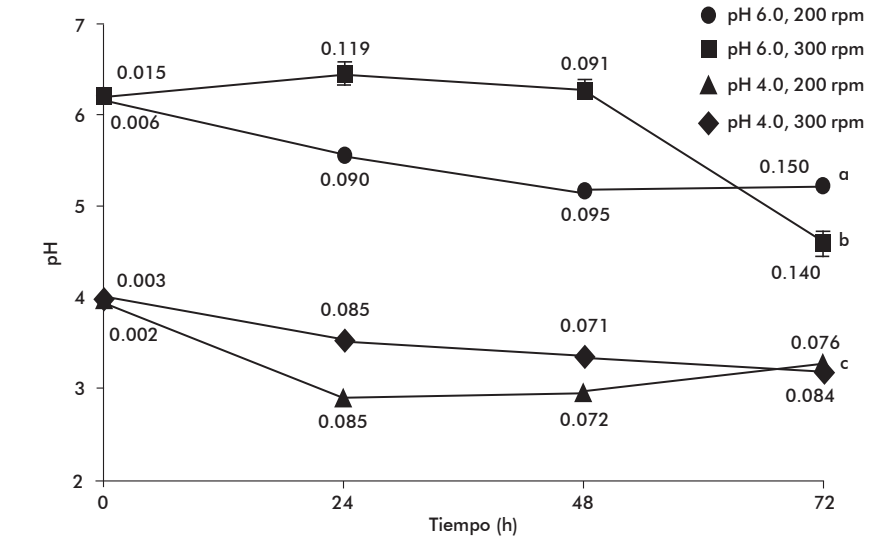


Figura 1. Variación del pH en el transcurso de las fermentaciones de *Rhizomucor meihe*. Se midieron los cambios de pH en los tratamientos con pH inicial ajustado a 4 y a 6, empleando 200 y 300 rpm como las velocidades de agitación y tomando lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas). Se efectuaron tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones y se muestra el valor del error típico por cada conjunto de datos. Se aplicó la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher para determinar cuál o cuáles tratamientos se diferencian entre sí. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

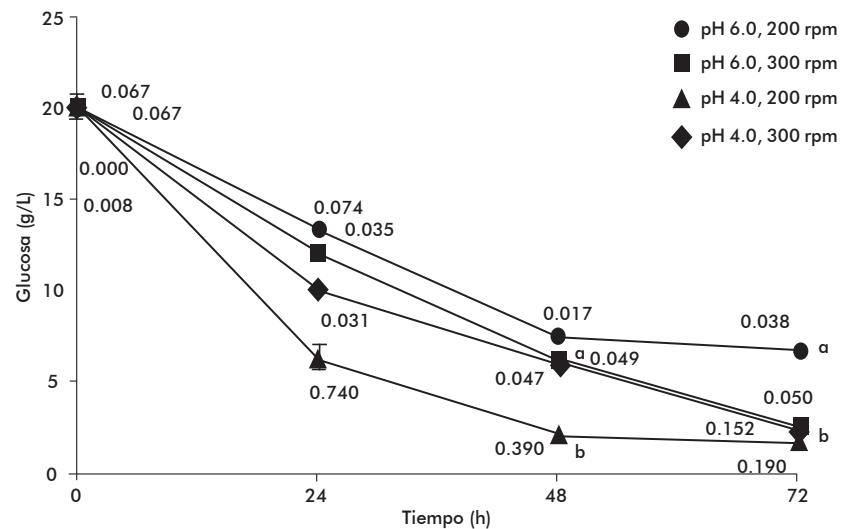


Figura 2. Variación del contenido de glucosa en el medio de cultivo de las fermentaciones de *Rhizomucor meihe*, a diferentes velocidades de agitación y tiempos de fermentación. Se midió la disminución del contenido de glucosa en los tratamientos con pH inicial ajustado a 4 y a 6, empleando 200 y 300 rpm como las velocidades de agitación y tomando lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas). Se efectuaron tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones y se muestra el valor del error típico por cada conjunto de datos. Se aplicó la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher para determinar cuál o cuáles tratamientos se diferencian entre sí. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

investigaciones, cuya mayor tasa de consumo fue de 0.124 g/L·s a 150 rpm de agitación y en las que se señala que esto es un indicador del uso de este carbohidrato como fuente de energía por parte del hongo [2]. Las tasas de consumo de la glucosa determinadas en este trabajo pueden ser atribuibles a las velocidades de agitación y al pH inicial empleados, así como al

15. Yasni S, Maulidya A. Development of Corn Milk Yoghurt Using Mixed Culture of *Lactobacillus delbruekii*, *Streptococcus salivarius*, and *Lactobacillus casei*. *J Biosci.* 2014;21(1):1-7.

tiempo de fermentación, ya que las pruebas estadísticas demostraron diferencias altamente significativas en la tasa de consumo de la glucosa como consecuencia de estos factores ( $F = 45.73$ ;  $\alpha = 0.05$ ;  $p < 0.01$ ; Tabla 1).

Sobre la base de los resultados obtenidos a través de las cinéticas evaluadas para lograr la descripción cuantitativa de los efectos de las diferentes variables sobre la actividad enzimática, se aplicó un ANOVA (Tabla 2). El estudio estadístico demostró que existen diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los tratamientos respecto al proceso de obtención del cuajo microbiano. Durante las fermentaciones se observó (Figura 3) que no se presentó actividad enzimática en las primeras 24 h de fermentación. Al respecto, se ha afirmado que durante las primeras horas de cultivo, la glucosa y la caseína presentes en el medio son utilizadas como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente, para el crecimiento del microorganismo, y se logra la producción de las enzimas proteolíticas cuando se registran concentraciones bajas de glucosa en el medio [2]. En esta investigación se registró actividad enzimática cuando las concentraciones de glucosa fueron menores que 8 g/L (48 horas a pH inicial 6; Figuras 2 y 3).

La mayor actividad enzimática (ACL), se obtuvo a las 72 h de cultivo a 300 rpm de agitación con pH inicial ajustado a 4.0 (667 US), la cual se diferenció significativamente ( $p < 0.05$ ) de las ACL más altas a pH 6 con 200 rpm y 300 rpm (493.7 US a las 72 horas y 558.48 US a las 48 horas, respectivamente) y a pH inicial 4, con 200 rpm de agitación (570.4 US a las 72 horas, Figura 3). Estos resultados se encuentran dentro del intervalo informado a las 120 horas de incubación (279-1076 US) usando diferentes concentraciones iniciales de glucosa (desde 18 a 35 g/L) a 150 rpm de agitación [6], y fueron mayores a los obtenidos por otros autores, quienes determinaron actividades enzimáticas de entre 75-80 US a las 125 h de fermentación con 250 rpm de agitación [11].

Por otra parte, se estudió la correlación entre la ACL y el consumo de glucosa en el medio (Figura 4). Al respecto todos los coeficientes de determinación  $R^2$  fueron menores a 0.52, a excepción del obtenido cuando el pH inicial fue de 6 y cuando se agitó a 200 rpm ( $R^2 = 0.78$ ), con una actividad enzimática máxima de 493.68 US a las 72 h, la menor actividad entre los máximos obtenidos durante las fermentaciones (Figura 3). Se observa, como se ha afirmado, que la tasa de consumo de glucosa no es un factor que influye en la excreción de las enzimas [2].

De acuerdo con los resultados obtenidos, las mejores condiciones para la obtención de la proteasa aspártica ocurrieron cuando se ajustó el pH inicial a 4 y se empleó 300 rpm de agitación (Figura 3). Por ello, se puede inferir que un pH ácido contribuye a la producción y estabilidad de la proteasa [7, 8, 20, 21].

#### Efecto de la lactosa como fuente de carbono

Las fuentes de carbono y nitrógeno suelen tener un rol crítico en la producción de la proteasa aspártica en procesos fermentativos con *R. miehei* [22, 23]. Al respecto, las Figuras 5, 6 y 7 muestran el efecto de la incorporación de lactosa como fuente de carbono en

Table 1. Análisis de varianza para el consumo de la glucosa en el medio

Fuente		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significancia
Tiempo	Hipótesis	2007.447	3	669.149	142.558	0.227
	Error	2.223	0.474	4.694		
Agitación	Hipótesis	33.584	1			
	Error					
pHi	Hipótesis	64.149	1	64.149	38.557	0.776
	Error	0.109	0.066	1.664		
Tiempo × Agitación	Hipótesis	12.268	3	4.089	0.543	0.686
	Error	22.586	3	7.529		
Tiempo × pHi	Hipótesis	24.400	3	8.133	1.080	0.475
	Error	22.586	3	7.529		
Agitación × pHi	Hipótesis	1.059	1	1.059	0.141	0.733
	Error	22.586	3	7.529		
Tiempo × Agitación × pHi	Hipótesis	22.586	3	7.529	45.737	0.000
	Error	5.267	32	0.165		

\* Gl: grados de libertad; F: estadístico de Fisher; pHi: pH inicial.

Table 2. Análisis de varianza para la actividad enzimática

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significancia
Inter-grupos	2 235 894.643	11	203 263.149	391.945	0.000
Intra-grupos	12 446.419	24	518.601		
Total	2 248 341.062	35			

\* Gl: grados de libertad; F: estadístico de Fisher.

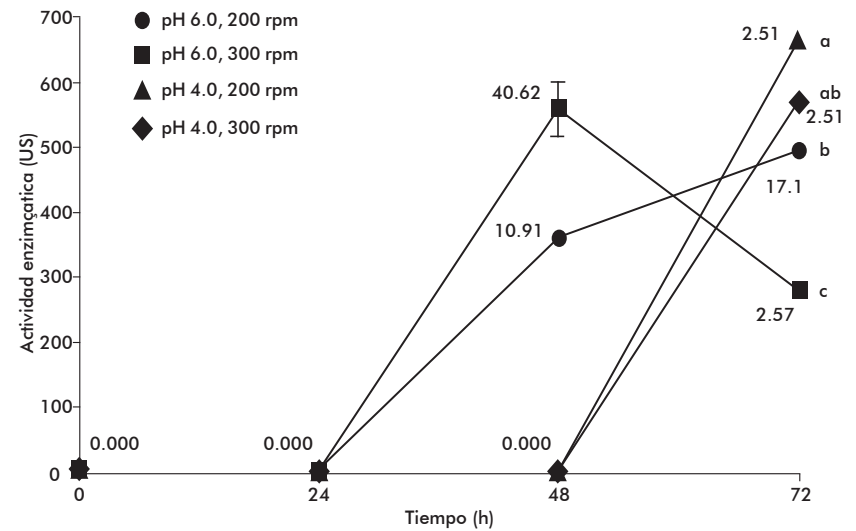


Figura 3. Actividad enzimática proteasa de las fermentaciones de *Rhizomucor miehei*. Se midió la actividad de la proteasa aspártica en los tratamientos con pH inicial ajustado a 4 y a 6, empleando 200 y 300 rpm como las velocidades de agitación y tomando lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas). Se efectuaron tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones y se muestra el valor del error típico por cada conjunto de datos. Se aplicó la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher para determinar cuál o cuáles tratamientos se diferencian entre sí. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

el medio de cultivo, en contraposición al empleo de glucosa. Se observa que el pH a las 48 h de fermentación fue de 2.97 (Figura 5) en ambos medios. No obstante, a las 72 horas del proceso el pH se diferenció significativamente ( $p < 0.05$ ), reduciéndose en el medio suplementado con lactosa (2.72) e incrementándose en el medio con glucosa (3.29). Se ha indicado que el pH del medio de cultivo es un factor que influye sobre la actividad de la enzima proteasa, de

16. Association of Analytical Communities. AOAC 931.12. Refractometría. In: 16. Association of Analytical Communities International. Official methods of analysis. (18.a ed.). 2005.

17. Camacho-Ruiz L, Pérez-Guerra N, Pérez-Roses R. Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid state fermentation. Electron J Environ Agric Food Chem. 2003;2:531-42.



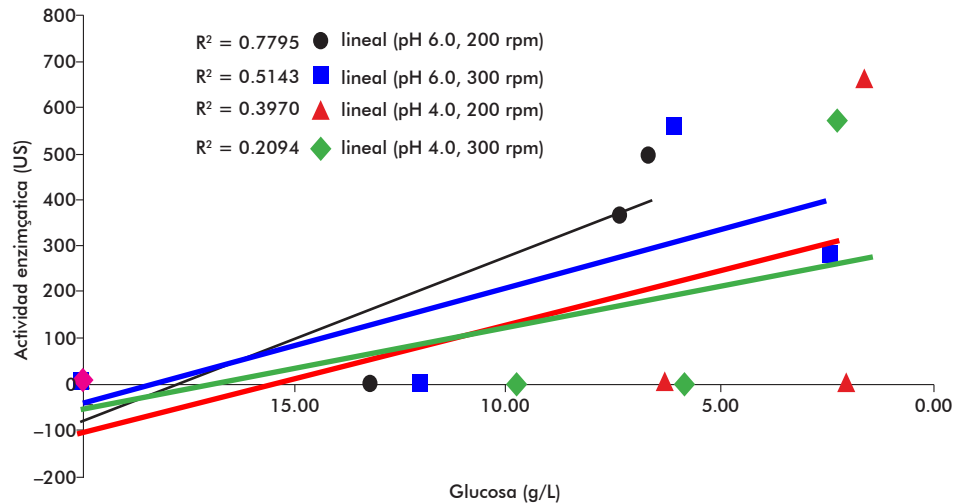


Figura 4. Actividad enzimática con respecto al consumo de glucosa en el sustrato de las fermentaciones de *Rhizomucor meihei*. Se midió la actividad de la proteasa aspártica en los tratamientos con pH inicial ajustado a 4 y a 6, empleando 200 y 300 rpm como las velocidades de agitación y tomando lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas), para determinar si existe correlación con la disminución del contenido de glucosa en el medio de cultivo. Se efectuaron tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones. El único coeficiente de determinación  $R^2 = 0.7795$  fue el del tratamiento con pH inicial ajustado a 6 con 200 rpm de agitación, cuya máxima actividad fue de 493.68 US a las 72 horas de fermentación, la menor actividad enzimática obtenida en este trabajo, por lo que puede decirse que no hay correlación entre el contenido de glucosa en el medio y la actividad enzimática.

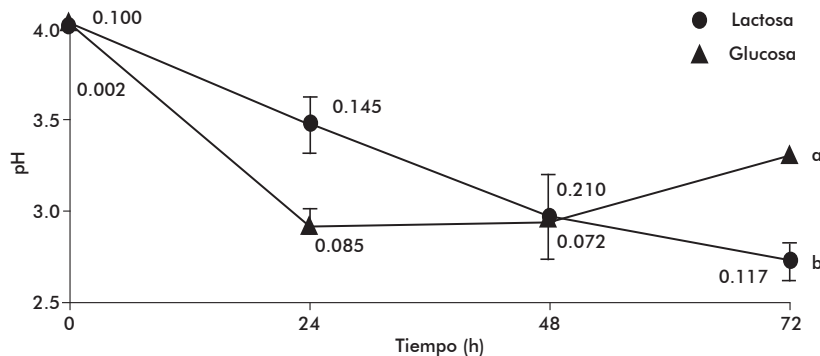


Figura 5. Variación del pH en el transcurso de las fermentaciones de *Rhizomucor meihei* en presencia de lactosa o glucosa. Se midieron los cambios en el pH en tratamientos con pH inicial ajustado a 4, empleando 300 rpm de agitación (bajo estas condiciones se alcanzó la mayor actividad enzimática). Se tomaron lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas), efectuando tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones y se muestra el valor del error típico por cada conjunto de datos. Se aplicó la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher para determinar cuál o cuáles tratamientos se diferencian entre sí. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

acuerdo con la especie de *Rhizomucor* empleado para la fermentación, siendo los pH óptimos aquellos que se encuentran entre 3.9 y 7.9 [24]. Además, estudios demostraron que las mayores actividades de la proteasa producida por *Mucor bacilliformis*, ocurrieron cuando el pH del medio estuvo en el rango de 3 a 4 [21]. Mientras que para la enzima proteasa generada por *R. meihei*, la mayor actividad ocurrió cuando el medio presentó pH 4 [25].

En cuanto a los sólidos solubles (Figura 6), se observa una acelerada disminución de los azúcares disponibles en el medio suplementado con glucosa, probablemente debida al consumo de los mismos. Estos iniciaron en 3 °Brix, disminuyeron a 2 °Brix a las 24 horas y 1.8 °Brix al final de la

incubación, diferenciándose significativamente ( $p < 0.05$ ) del medio con lactosa, el cual finalizó con 2.1 °Brix.

Por último, en la Figura 7, se observa la actividad de la enzima proteasa en los medios suplementados con diferentes fuentes de carbono. La actividad enzimática presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos estudiados, siendo de 667 US a las 72 h en el medio suplementado con glucosa, en tanto que la mayor actividad de la enzima en el medio con lactosa fue de 8.11 US a las 48 h. Aun cuando los resultados de la actividad enzimática en el medio en el que se empleó lactosa bajo las condiciones en las que se efectuó este trabajo, fueron menores a los informados por otros investigadores, todos coinciden en

18. Gutiérrez H, de la Vara R. Análisis y Diseño de Experimentos. Segunda edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2008.

19. IBM Corp. Released. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, New York: IBM Corporation; 2011.

20. Yuqiu L, Hua T, Da L, Zhoulin L, Yanping C, Yuanyuan J, et al. Screening and characterization of a mutant fungal aspartic proteinase from *Mucor pusillus*. Open Biotechnol J. 2015;9:119-26.

21. Arecs L, Biscoglio de Jiménez M, Parry M, Fraile E, Fernández H, Cascone O. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. Appl Biochem Bio-technol. 1992;37:283-94.

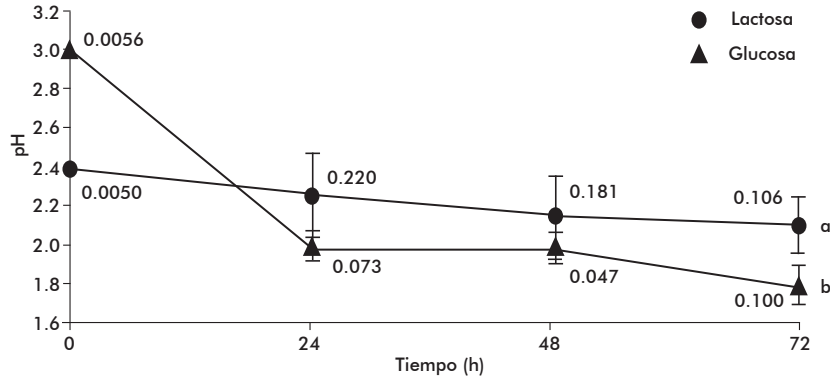


Figura 6. Consumo de los azúcares en el transcurso de las fermentaciones de *Rhizomucor miehei*. Se midieron los cambios en el contenido de glucosa (o lactosa) en tratamientos con pH inicial ajustado a 4, empleando 300 rpm de agitación (bajo estas condiciones se alcanzó la mayor actividad enzimática). Se tomaron lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas), efectuando tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones y se muestra el valor del error típico por cada conjunto de datos. Se aplicó la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher para determinar cuál o cuáles tratamientos se diferencian entre sí. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

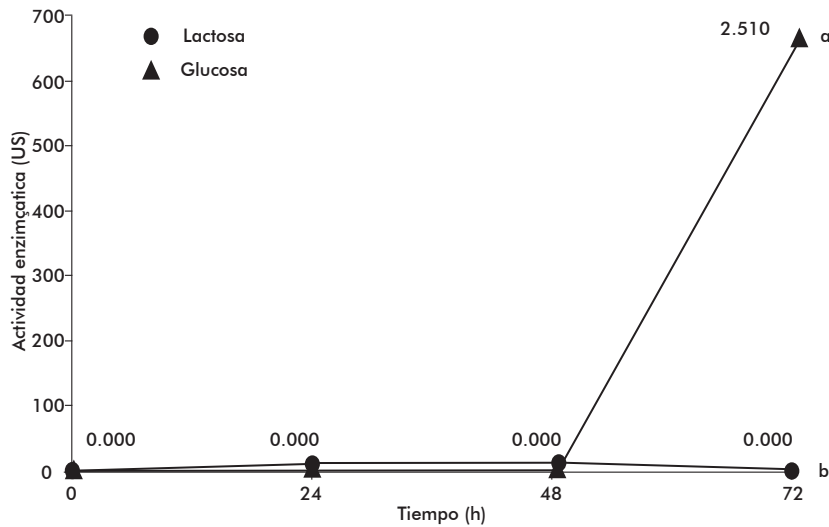


Figura 7. Actividad enzimática proteasa en el transcurso de las fermentaciones de *Rhizomucor miehei*. Se midió la actividad de la proteasa aspártica en los tratamientos con pH inicial ajustado a 4, empleando 300 rpm de agitación (bajo estas condiciones se alcanzó la mayor actividad enzimática). Se tomaron lecturas cada 24 horas en el transcurso del tiempo de fermentación (de 0 a 72 horas), efectuando tres repeticiones por lectura. Cada punto en el gráfico representa la media de las repeticiones y se muestra el valor del error típico por cada conjunto de datos. Se aplicó la prueba de mínimas diferencias significativas de Fisher para determinar cuál o cuáles tratamientos se diferencian entre sí. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

que la lactosa parece ejercer un efecto inhibitorio en la actividad de esta enzima [25, 26]. Cualitativamente, estos resultados son similares a otros en los que se empleó lactosa al 4 %, observándose la inhibición de la actividad de la proteasa, aún cuando *R. miehei* tiene la capacidad de desdoblar este disacárido a través de la enzima  $\beta$ -galactosidasa [25].

En síntesis, los resultados de este trabajo demostraron que la interacción de la velocidad de agitación, el pH inicial del medio y el tiempo de fermentación influyeron sobre la actividad enzimática. Así mismo, se constató que los bajos valores de pH favorecen la actividad de la proteasa producida por *R. miehei* y que la suplementación del medio con lactosa inhibió la actividad enzimática.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que bajo las condiciones empleadas, la mayor actividad de proteasa aspártica o cuajo microbiano a partir de fermentaciones con *R. miehei* CVC3M 3037 (ATCC 26282), se logró al ajustar el pH inicial del medio basal a 4.0 con agitación constante a 300 rpm durante 72 h y glucosa como fuente de carbono. Por lo tanto, puede afirmarse que los parámetros bajo los cuales se llevaron a cabo los procesos, influyen en la actividad de la proteasa generada por *R. miehei*. La interacción de la velocidad de agitación, pH inicial y tiempo de fermentación influyó de forma altamente significativa sobre la actividad enzimática, y no hay

22. Thakur MS, Karanth NG, Nand K. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 1990;32:409-13.

correlación lineal entre la tasa de consumo de glucosa y la actividad enzimática. Además, se observó que suplementar el medio con lactosa disminuyó la actividad coagulante de la leche.

### **Declaración de conflictos de interés**

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

23. Escobar J, Barnnet S. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. *Enzyme Microbiol Technol.* 1993;15:1009-13.

24. Alves MH, de Campos-Takaki G, Okada K, Ferreira Pessoa I, Milanez AI. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:114-7.

25. De Lima CJB, Cortez M, Lovaglio RB, Ribeiro EJ, Contiero J, De Araújo EH. Production of rennet in submerged fermentation with the filamentous fungus *Mucor miehei* NRRL 3420. *World Appl Sci J.* 2008;4(4):578-85.

26. Rocha da Silva C, BoechatDelatorre A, Leal Martins ML. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by

thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity. *Braz J Microbiol.* 2007;38:253-8.

---

Recibido en febrero, 2020.

Aprobado en abril, 2020.