

Selección y optimización de un medio para el cultivo sumergido de *Mucor mihei* en la producción de renina microbiana

A. Ruíz

Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba.

Recibido: 14 de octubre de 1980

ABSTRACT. The present paper is related to the selection of a culture media for the mold *Mucor mihei* with the purpose of obtaining a microbial rennet by a fermentative way, of possible application at the cheesemaking industry. A first approach it is done by the selection of the components, utilizing by-products of national industries (seven) and the addition of complementary salts. Once that it has been selected a culture media with good possibilities, it is done the optimization of its composition in two steps. First through a 2^4 factorial it is determined the ascention line to the optimum zone after that the optimum in composition is determined with the aid of a 3^2 quadratic design. It is concluded that the optimal composition of the culture media corresponds with central point of the 3^2 plan.

RESUMEN. El presente trabajo tiene como objeto la selección de un medio de cultivo para el hongo *Mucor mihei* con el propósito de obtener un cuajo microbiano por vía fermentativa de posible aplicación en la industria quesera. Se realiza primeramente la selección de los componentes utilizando sub-productos de industrias nacionales (siete) y adición de sales complementarias, una vez seleccionado un medio con buenas posibilidades se realiza la optimización de su composición en dos etapas: Primeramente mediante un plan factorial 2^4 para determinar la línea de ascenso hacia la zona del óptimo y después se determina el óptimo de composición mediante un diseño cuadrático 3^2 . Se concluye que el óptimo corresponde al punto centro del plan cuadrático 3^2 .

INTRODUCCION

La enzima renina ha sido universalmente empleada para la preparación de distintos tipos de quesos, ésta ha sido empleada bajo la forma de una preparación cruda obtenida del cuajar de terneros lactantes que recibe por ello el nombre de cuajo. Sin embargo, se han realizado intentos para buscar un sustituto procedente de otras fuentes (*Babbar y cols., 1965*)

por dos motivos principales: escases y alto costo y en algunos países como por ejemplo India e Israel por motivos religiosos. Se han buscado sustitutos de origen vegetal, (*Dastur, 1949*) principalmente entre las plantas del género *Ficus* y *Carica*; de origen microbiano, utilizando bacterias (*Srinivasan y cols. 1964*) y hongos (*Richardson y cols. 1967*) y de origen animal utilizando cuajares de corderos, mollejas de aves y una forma nueva de obtenerlo de los terneros, sin sacrificar al animal por medio de la inserción de cánula en el cuajar para extraer el jugo gástrico (*Cisneros y cols., 1972; Cisneros, 1979*). La vía microbiana por su alta productividad y relativas facilidades de proceso ha sido la elegida por nosotros.

Se empleó una cepa de *Mucor mihei* con características de producción en cultivo superficial ya estudiadas (*Chávez, 1972*) para la cual se decidió buscar el medio más apropiado para el cultivo sumergido y realizar la optimización de su composición.

Este trabajo se realiza a través de los métodos del diseño Factorial (*Köllner, 1971*) primeramente como un plan factorial 2ⁿ para determinar la línea de ascenso hacia la zona del óptimo y después con un diseño cuadrático 3ⁿ para determinar el óptimo.

MATERIALES Y METODOS

La actividad coaguladora (*Berridge, 1955 y Foltmann, 1966*) se determinó inoculando 1 ml de la solución enzimática en 10 ml de solución al 12% de leche en polvo descremada, suplementada con CaCl_2 0,01 M., en un tubo de ensayo rotando a 8 r.p.m. con una inclinación de 30° y sumergido en un baño de agua a $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$. El tiempo de coagulación (en minutos) se determina por la aparición de los primeros flóculos, la prueba se realiza por triplicado, la solución enzimática se ajusta por medio de diluciones de modo tal que el tiempo de coagulación quede en el rango de 2-6 minutos.

Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 100 ml de medio, esterilizados a 120°C por 20 minutos, agitados en zaranda rotatoria a 260 r.p.m. durante 6 días y a una temperatura de 32°C.

Los cultivos se inocularon con 1 ml de una solución de esporas de la cepa *Mucor mihei* preparada del modo siguiente: La cepa fue inoculada en cuñas de agar-malta, incubada a 32°C durante 3 días (hasta esporulación) al cabo de los cuales se añade al tubo de cultivo 10 ml de solución estéril de Tween —80 0,01 M raspándose el micelio con el asa de platino y agitando para lograr la suspensión de esporas.

TABLA I

Pruebas previas para la selección de los componentes del medio. Se presenta la actividad coaguladora promedio de las tres réplicas y el pH final del cultivo

Componentes (g)											
Na ₂ SO ₄	0,1	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	0,1	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	0,3	—	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,3	0,3	0,3
Urea	0,6	—	0,6	0,8	—	0,6	—	—	—	—	—
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,2	—	0,2	—	0,8	—	0,2	—	0,8	—	—
CO ₃ Ca	X	X	X	X	X	X	X	—	—	—	0,5
Harina de trigo	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	—
Salvado de trigo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10,0
Salvado de arroz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Suero de leche	—	—	—	—	—	—	—	100	100	100	—
Suero de leche (d)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Harina de maíz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0
Harina de soya	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Agua (dest.)	100	100	100	100	100	100	100	—	—	—	100
Caseína	—	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Actividad coaguladora	6,95	0,47	0,29	0,00	4,11	0,23	2,76	8,80	5,15	6,55	4,00
pH final	7,65	7,80	8,35	8,10	2,80	8,10	2,50	8,15	4,15	4,87	6,40

X = saturación

TABLA II

Pruebas previas para la selección de los componentes del medio. Se presenta la actividad coaguladora promedio de las tres réplicas y el pH final del cultivo

Componentes (g)											
Na ₂ SO ₄	0,1	0,1	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—
KH ₂ PO ₄	0,3	0,3	—	—	0,3	0,3	—	—	—	—	—
SO ₄ (NH ₄) ₂	—	0,8	—	—	0,8	0,8	—	—	—	0,8	0,8
CO ₃ Ca	0,5	—	—	—	—	—	—	—	0,5	—	—
Harina de trigo	—	—	—	—	—	—	2,0	—	2,0	2,0	—
Salvado de trigo	10,0	—	2,0	2,0	2,0	2,0	—	2,0	—	—	2,0
Salvado de arroz	—	5,0	5,0	2,0	5,0	10,0	—	—	—	—	—
Suero de leche	—	100	100	100	100	—	—	—	100	100	100
Suero de leche (d)	—	—	—	—	—	—	100	100	—	—	—
Harina de maíz	3,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Harina de soya	3,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Agua (dest.)	100	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—
Actividad coaguladora	2,54	2,10	5,20	5,50	11,4	7,40	13,2	5,50	1,13	4,10	2,00
pH final	6,5	4,1	6,2	6,0	4,7	4,9	4,65	5,9	7,8	2,3	6,75

TABLA III

Pruebas previas para la selección de los componentes del medio. Se presenta la actividad coaguladora promedio de las tres réplicas y el pH final del cultivo

Componentes (g)							
Na ₂ SO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Urea	—	—	—	—	—	—	—
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,8	0,8	—	0,8	—	0,8	0,8
CO ₃ Ca	X	—	0,5	0,5	0,5	—	0,5
Harina de trigo	—	—	—	—	—	—	—
Salvado de trigo	10,0	10,0	—	—	2,0	—	2,0
Salvado de arroz	—	—	—	—	—	—	—
Suero de leche	—	—	—	—	—	—	—
Suero de leche (d)	—	—	—	—	—	—	—
Harina de maíz	—	—	3,0	3,0	—	3,0	—
Harina de Soya	—	—	3,0	3,0	—	3,0	—
Agua (dest.)	100	100	100	100	100	100	100
Actividad Coaguladora.	2,0	18,8	2,93	2,0	13,5	2,36	4,50
pH final	6,75	6,6	8,0	7,45	6,10	7,2	6,8

X = saturación

TABLA IV

Composición de los medios de las corridas experimentales. Se presenta el número de orden en el plan experimental 2^a la composición de los medios en g por 100 ml de medio y el orden de realización de las corridas

No. del experimento	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Orden de corrida
I	8,0	0,6	0,0	0,0	12
II	12,0	0,6	0,0	0,0	8
III	8,0	1,0	0,0	0,0	2
IV	12,0	1,0	0,0	0,0	7
V	8,0	0,6	0,2	0,0	16
VI	12,0	0,6	0,2	0,0	1
VII	8,0	1,0	0,2	0,0	3
VIII	12,0	1,0	0,2	0,0	9
IX	8,0	0,6	0,0	0,6	13
X	12,0	0,6	0,0	0,6	5
XI	8,0	1,0	0,0	0,6	11
XII	12,0	1,0	0,0	0,6	14
XIII	8,0	0,6	0,2	0,6	15
XIV	12,0	0,6	0,2	0,6	6
XV	8,0	1,0	0,2	0,6	10
XVI	12,0	1,0	0,2	0,6	4

Los cultivos se sometieron a centrifugación a 6000 r.p.m. 20 minutos para la separación del salvado de trigo y el micelio.

El trabajo se desarrolló según un diseño estadístico de un plan factorial 2^4 seguido de un diseño cuadrático 3^2 .

Se determinó este plan 2^4 en base a pruebas previas que se realizaron para la selección de los componentes del medio cuyos resultados se muestran en las Tablas I, II y III de las cuales se tomó el medio que mejores resultados dio, este tiene cuatro componentes:

$X_1 =$ Salvado de trigo	10 g
$X_2 =$ $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,8 g
$X_3 =$ SO_4Na_2	0,1 g
$X_4 =$ $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,3 g

Se toma éste como centro del plan factorial 2^4 . Como este plan considera dos niveles para cada variable tomados a ambos lados del valor que ésta tiene en el punto central y que se codifican como -1 y $+1$ es necesario designar un módulo para cada variable.

TABLA V

Matriz del plan cuadrático 3^2

D =	-1	-1	I
	0	-1	II
	1	-1	III
	-1	0	IV
	0	0	V
	1	0	VI
	-1	1	VII
	0	1	VIII
	1	1	IX

Para SO_4Na_2 y PO_4KH_2 , -1 se tomó igual a cero y de ahí se determinaron sus módulos, para salvado de trigo se tomó un módulo igual a 2 y para $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ igual a 0,2.

El orden de realización de las corridas se eligió aleatoriamente como se muestra en la Tabla IV.

Con los resultados del plan 2^4 se procedió a diseñar las corridas del plan 3^2 , es decir de dos variables en tres niveles. En este caso los niveles codifican como: -1 , 0 y $+1$ (Tabla V).

Siendo el diseño de la composición de los medios de cultivo como se muestra en la Tabla VI.

TABLA VI

Composición de los medios de las corridas experimentales según el plan cuadrático 3^2 , en gramos por 100 ml de medio de cultivo

	X_1	X_2	X_3	X_4
I	6,0	1,2	0,2	0,6
II	7,0	1,2	0,2	0,6
III	8,0	1,2	0,2	0,6
IV	6,0	1,3	0,2	0,6
V	7,0	1,3	0,2	0,6
VI	8,0	1,3	0,2	0,6
VII	6,0	1,4	0,2	0,6
VIII	7,0	1,4	0,2	0,6
IX	8,0	1,4	0,2	0,6

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla VII se presentan los resultados de las corridas del plan 2^4

Determinaciones de actividad enzimática de cada uno de los triplicados, la actividad promedio, varianza y desviación standard en cada triplicado. Los coeficientes del polinomio se obtuvieron mediante la aplicación de la expresión:

$$B = \begin{vmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ . \\ . \\ . \\ b_{1234} \end{vmatrix} = [X'X]^{-1}X'Y$$

Donde:

X = matriz de las variables independientes del plan factorial (ampliada)

Y = matriz de los resultados experimentales (columna No. 5 de la Tabla VII).

$$y = 22,98 - 2,90X_1 + 3,89X_2 + 0,95X_3 - 0,22X_4 - 0,82X_1X_2 - 0,05X_1X_3 - 4,39X_1X_4 - 1,04X_2X_3 + 0,66X_2X_4 + 1,17X_3X_4 + 0,33X_1X_2X_3 - 1,64X_1X_2X_4 + 1,58X_1X_3X_4 + 0,17X_2X_3X_4 + 2,12X_1X_2X_3X_4$$

Por un análisis de varianzas se determina el error experimental:

$$(S^2)_{\text{prom.}} = 11,85$$

E = error de los coeficientes

$$E = [(S^2)/16]^{1/2} = 0,86$$

para un 95% de confianza $E = 0,86 \times 2 = 1,72$

Este error experimental es usado para discriminar los coeficientes no significativos quedando el polinomio simplificado a:

$$y = 22,98 - 2,90X_1 + 3,98X_2 - 4,39X_1X_4$$

Del análisis del polinomio se concluye que la variación del contenido de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y SO_4Na_2 no tienen significación al menos para los módulos usados. Aunque existe una fuerte interacción entre X_1 y X_4 ésta se toma en consideración trabajando con el valor mayor (0.6) de la variable X_4 , luego el proceso de optimización se puede realizar según un diseño cuadrático en dos variables en un punto determinado por la línea de ascenso que dice que se debe disminuir la concentración de salvado de trigo y aumentar la de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ expresado a través del coeficiente negativo de X_1 (salvado de trigo) y positivo de X_2 (Sulfato de amonio).

TABLA VII

Resultados de las corridas del plan 2^a

No.	Actividad coaguladora U/ml Prom.				S ²	S
I	20,00	16,85	18,75	18,46	2,86	1,69
II	22,70	23,20	12,61	19,50	35,70	5,97
III	19,00	24,00	23,40	22,13	7,45	2,73
IV	33,60	33,60	3,15	33,60	0,00	0,00
V	25,00	15,80	19,60	20,13	21,37	4,62
VI	24,00	20,70	20,70	21,80	3,63	1,90
VII	28,30	21,20	28,90	26,13	18,34	4,28
VIII	28,69	24,44	18,50	23,87	26,19	5,11
IX	15,60	23,87	17,93	19,13	16,86	4,10
X	9,70	12,80	11,35	11,28	2,41	1,55
XI	41,00	—	38,60	39,80	2,88	1,69
XII	10,30	13,80	12,84	12,31	4,37	2,09
XIII	20,70	29,10	31,05	26,95	30,24	5,50
XIV	14,48	13,32	18,56	15,45	7,57	2,75
XV	35,20	33,50	—	34,35	1,44	1,20
XVI	19,50	25,50	23,40	22,80	9,27	3,04

La razón $X_2/X_1 = 3,89/-2,90 = -1,34$
da la pendiente de la línea de ascenso (Fig. 1)

Como la línea de ascenso, da la dirección hacia la zona donde se debe buscar el óptimo, para mayor facilidad en los cálculos se toma la pendiente como -1 en lugar del valor calculado de $-1,34$.

El diseño de la composición de los medios siguiendo estos criterios se muestra en la Tabla VI.

El cálculo de los coeficientes y del error experimental para cada punto da los resultados siguientes:

$$b_0 = 37,18 \pm 7,66$$

$$b_1 = 5,35 \pm 2,30$$

$$b_2 = 2,27 \pm 2,30$$

$$b_{11} = -14,34 \pm 6,90$$

$$b_{22} = 7,97 \pm 6,90$$

$$b_{12} = 2,07 \pm 3,45$$

Siendo el polinomio completo:

$$y = 37,18 - 5,35X_1 - 2,27X_2 - 14,34X_1^2 - 7,97X_2^2 + 2,07X_1X_2$$

Discriminando los coeficientes no significativos en base al error experimental en cada punto el polinomio queda simplificado a:

$$y = 37,18 - 5,35X_1 - 14,34X_1^2 - 7,97X_2^2$$

Derivando con respecto a X_1 y X_2 e igualando a cero para el óptimo obtenemos:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = -5,35 - 26,68X_1 = 0$$

de donde:

$$X_1 = -0,186$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = -15,94X_2 = 0$$

de donde:

$$X_2 = 0$$

CONCLUSIONES

Al analizar los resultados de la derivación del polinomio simplificado se pueden hacer las conclusiones siguientes:

$X_2 = 0$ indica que la concentración de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ no debe ser distinta a la que tiene el punto central del plan factorial (0,0).

$X_1 = 0,186$ indica que la concentración de salvado de trigo debe ser disminuida del valor que tiene en el punto central, pero en una magnitud muy pequeña.

En base al error experimental que se obtiene en la realización de este trabajo se puede tomar como valor óptimo de la composición del medio de cultivo el que presenta el punto centro del plan 3^2 es decir:

$$X_1 = 7,0 \text{ g (salvado de trigo)}$$

$$X_2 = 1,3 \text{ g (SO}_4\text{(NH}_4\text{))}_2\text{)}$$

$$X_3 = 0,2 \text{ g (SO}_4\text{Na}_2\text{)}$$

$$X_4 = 0,6 \text{ g (KH}_2\text{PO}_4\text{)}$$

$$y = 40,4 \pm 4,80$$

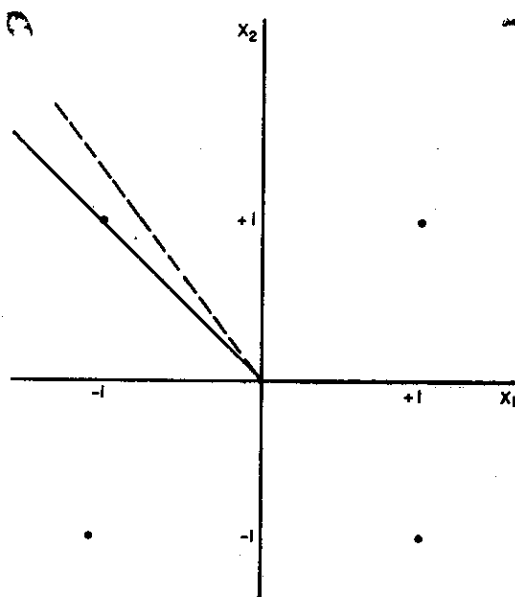


Fig. 1. Línea de ascenso acelerado. X_1 = Salvado de trigo, X_2 = $\text{SO}_4 \text{ (NH}_4\text{))}_2$

TABLA VIII

Resultados de las corridas del plan cuadrático 3²

No. matriz	Actividad coaguladora U/ml. Prom.			S ²	S	
I	25,50	27,0	—	26,25	1,12	1,05
II	23,00	23,00	22,00	22,60	0,34	0,58
III	17,60	18,40	14,40	16,80	4,48	2,11
IV	28,00	33,60	34,00	31,87	11,25	3,35
V	46,00	37,40	38,00	40,40	23,06	4,80
VI	10,40	10,50	10,50	10,46	0,00	0,00
VII	9,50	10,50	11,00	10,33	0,58	0,76
VIII	29,00	36,00	—	32,50	24,50	4,94
IX	11,00	8,00	8,50	9,16	2,58	1,60

RECONOCIMIENTOS

Queremos agradecer la valiosa cooperación prestada por los compañeros Martha Montejo y Gerardo Pérez en la realización de las corridas experimentales y del C. Sc. Reinaldo López por sus valiosos consejos en el análisis estadístico de los datos.

REFERENCIAS

- BABBAR I. J., SRINIVASAN R. A., CHAKRAVORTY S. C. AND DUDANI A. T. Microbial Rennet Substitutes-A Review. *Indian Journal of Dairy Science*. 18, 89, 1965.
- BERRIDGE N. J. Methods in enzymology II, 69. ED. S. P. Colowick, N. J. Kaplan. Acad. Press, 1955.
- CISNEROS F. Producción de cuajo con terneros vivos fistulados. Tesis en opción al grado de Candidato a Dr. en Ciencias. CENIC, 1979.
- CISNEROS F., VALLES E., MOCQUOT G. ET TOMASSONE R. Obtention de présure a partir de veaux fistulés. *Le Lait*. 52, 517, 1972.
- CHÁVEZ M. Comunicación personal. Escuela de Bioquímica Farmacéutica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana, 1972.

- DASTUR N. N. Milk Clotting Enzymes from Plants. *Indian Farming*. 9, 451, 1949.
- FOLTMAN B. C. R. Trav. Lab. *Carlsberg*, 35, 140, 1966.
- KÖLLNER H. Planificación de Investigaciones experimentales en la Ingeniería Química. Universidad de la Habana. Tecnología. Serie 6, 1971.
- RICHARDSON G. H., NELSON J. H., LUBNOW R. E. AND SCHARBERG R. L. Rennin-Like Enzyme from *Mucor pusillus* for Cheese Manufacture. *J. Dairy Science* 50, 7, 1967.
- SRINIVASAN R. A., IYENGAR M. K., BABBAR I. J., CHAKRAVORTY S. C., DUDANI A. T. AND IYA K. K. Milk-Clotting Enzymes from Microorganisms. *Applied Microbiology*. 12, 475, 1964.