

Características de la producción de la renina microbiana de *Mucor miehei* en un proceso de alimentación por lote

Mucor miehei's microbial rennin production characteristics in a fed-batch process

C. P. Sánchez Henao, J. M. Escobar Kousen* y A. Rodríguez de Stouvenel

RESUMEN

El moho zigomiceto *Mucor miehei* produce una proteasa de tipo ácido (EC: 3.4.23.10) semejante a la renina o cuajo de ternero. Se ha encontrado que la síntesis de la enzima está parcialmente asociada al crecimiento, y que altas velocidades de consumo de glucosa dan como resultado una mayor producción de la renina microbiana (Escobar and Barnett, 1993, 1995). Durante el proceso de producción de la proteasa se observó que cuando la velocidad de producción de la misma aún es alta, los niveles de glucosa alcanzan a ser mínimos, niveles que se consideraron como una de las posibles causas de la finalización de la producción de la enzima (Escobar and Barnett, 1993,1995). Frente a esta limitación fisiológica, se planteó un proceso de dos etapas para mejorar la producción de la proteasa y superar el fenómeno mencionado.

La primera consistió en estudiar la relación entre la producción de la renina y el consumo de azúcares (especialmente la glucosa) en el transcurso de la fermentación, para determinar aquellos momentos en los que la rata de producción de enzima es alta y la concentración de glucosa se encuentra cercana a cero. En la segunda etapa se aplicó un proceso de alimentación por lote de glucosa durante esos momentos, para observar si la producción de la enzima aumentaba.

Se obtuvo un valor máximo de actividad enzimática (AE) de 165 unidades coagulantes (UC)/ml para el proceso en cocheda y una velocidad de consumo de azúcares promedio de 0,1813 g de glucosa/1/h. Con base en los resultados

anteriores se determinaron condiciones para el proceso de alimentación por lote de glucosa, tales como velocidad, tiempo y concentración. Las condiciones para el proceso de alimentación por lote fueron un flujo de 0,06 ml/min y una concentración de glucosa de 50 g/l sin obtenerse aumento considerable en el valor de la AE (95 UC/ml). Se obtuvo una concentración celular promedio de 11 g/l y un rendimiento del nutriente en masa celular (YX/SA) promedio de 0,3 g de células/g de azúcar total.

Los resultados sugieren que el *M. miehei* no produce su proteasa ácida directamente por el consumo de glucosa, sino a través de un(os) paso(s) intermedio(s) que conduce(n) finalmente a la síntesis de la enzima y donde los fenómenos de represión e inducción desempeñan un papel importante.

Palabras clave: proteasa ácida, quimosina, caseína, queso, zigomiceto.

SUMMARY

The *Mucor miehei* zygomycete produces an acid protease (EC:3.4.23.10) resembling calf rennet chymosin characteristics. It has been suggested that low glucose concentration levels could be why enzyme synthesis, comes to an end even though enzyme production is still great (Escobar and Barnett, 1993, 1995). To overcome this possible limitation, a two stage research process was designed; the relationship between protease production and sugar consumption was studied initially to determine the periods of time when enzyme production is still high and glucose concentration close to zero. The following stage concentrated on developing a glucose fed-batch process during the afore mentioned time periods to observe any increase or decrease in enzyme production. During the batch studies, it was found that maximum enzyme activity (EA) was 165 UC/ml for an average glucose consumption rate of 0.1813 g/l h. Based on the previous

* Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Los Andes, Bogotá, D.C., Colombia.

results, the conditions for the fed-batch process were determined as follows: 0.06 ml/min, glucose flow, 50 g/l glucose concentration and feeding time depended on each fermentation process characteristics. No increase in enzyme production were observed and EA remained around 150 UC/ml. Average cell concentration was 11 g/l and average cell mass yields per nutrient (YX/SA) were 0.30 g cell/g total sugar. Results suggest that *M. miehei* produces its acid protease through a series of steps not directly relate to glucose consumption. Induction and repression play important role in this process.

Key words: acid protease, chymosin, casein, cheese, zygomycete.

INTRODUCCIÓN

En la producción de queso se ha empleado la enzima denominada renina o cuajo que se extrae del estómago del ternero en lactancia y que está compuesta principalmente por una proteasa ácida llamada quimosina (EC:3.4.23.4), la cual tiene la propiedad de atacar enlaces peptídicos específicos en la caseína, desestabilizando los micelios de la misma y dando como resultado la coagulación de la leche (Rickertand Elliott, 1973; Lasure, 1960). En los últimos años, debido a la alta producción de queso a nivel mundial, se ha presentado escasez de la renina proveniente del ternero, lo cual ha creado la necesidad de buscar otras fuentes para reemplazarla. Numerosas alternativas provenientes de fuentes de origen animal, vegetal, microbiano y por técnicas de AON recombinante se han planteado como sustituidas del cuajo de ternero. Las dos últimas alternativas se presentan como las dominantes en el mercado.

Numerosos microorganismos producen enzimas coagulantes, tales como: *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Endothia parasítica*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *B. Alcaligenes*, *Corinebacterias*, *Lactobactitus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Streptomices* y el *Rhizopus oligosporus*. Solo las enzimas de las tres primeras especies (que son mohos) se han comercializado debido a su mejor calidad, sobresaliendo particularmente la del *Mucor miehei* por su posición dominante en el mercado (Sardinas, 1972, 1976; Schmidt and Morris, 1984; Pszezoia, 1989; Crueger and Crueger, 1990).

La proteasa ácida (E.C. 3.4.23.10) del *M. miehei* presenta unas características muy similares a la quimosina del ternero, especialmente en lo que se refiere a propiedades que son fundamentales para obtener quesos de buena calidad: su especificidad al partir enlaces peptídicos similares en la caseína (particularmente el enlace 105 -106 fenilmetionina) y una relación alta de la actividad coagulante (AC) a la actividad proteolítica (AP), inferior a la del ternero

pero superior a la de cualquier renina microbiana (Krause *et al.*, 1992; Lasure, 1980; Sardinas, 1972, 1976; Schmidt and Morris, 1984; Smith and Yada, 1991). El proceso de fermentación empleado para la producción de la enzima es discontinuo, y las mayores compañías productoras de enzimas en el mundo, incluyendo Novo, producen y comercializan la proteasa ácida de *M. miehei* (Sardinas, 1972; Lasure, 1980; Baitey and Siika, 1988; Escobar and Barnett, 1993; Krause *et al.* 1992, 1995).

Existe información relacionada con el proceso de producción de la enzima por el moho. Se sabe que este proceso está parcialmente asociado con el crecimiento. La concentración de la enzima (AE) esta directamente relacionada con la velocidad de consumo del sustrato r_A que, a su vez, es una función de la concentración de células y sustrato, así como de las velocidades de transferencia de masa (Escobar and Barnett, 1993). Para este bioproceso se observó que la enzima es inestable para valores de pH por encima de 6,5 (Baitey, 1988; Escobar and Barnett, 1993). El microorganismo es sensitivo a la agitación, puesto que a velocidades altas se reduce la producción de la enzima (Escobar and Barnett, 1993). Se sabe que la enzima es inducible y se ha encontrado que la caseína es el principal inductor (Lasure, 1980).

La producción de enzima disminuye a medida que los productos finales se empiezan a acumular, sugiriendo que la síntesis de la proteasa puede estar afectada por represión del tipo feed-back (Escobar and Barnett, 1993). Lasure (1980) encontró evidencias que sugieren que éste tipo de represión está presente, ya que al añadir aminoácidos (productos finales de la proteasa) la producción de la enzima disminuye o se detiene totalmente. Escobar y Barnett (1995) confirmaron que concentraciones elevadas de aminoácidos efectivamente reprimían la producción de la enzima, y diseñaron una combinación de un bioreactor anexo a una membrana de ultrafiltración para superar el problema mencionado, logrando un aumento en la producción de la proteasa ácida de *M. miehei*. La combinación mencionada de fermentador más membranas de filtración tangenciales se conoce como bioreactor de membranas (BM) y ha demostrado ser una combinación muy eficaz para mejorar la eficiencia y la productividad de bioprocesos (Chsryan and Mehaia, 1985; Holst and Mattiason, 1990) principalmente debido a la remoción de productos tóxicos para el microorganismo y a un aumento considerable en la concentración celular. Con el BM se logra también evitar o retardar posibles efectos de inhibición, ya sea causados por el producto en sí o porque el equilibrio de la reacción es limitado (Michaels and Matson, 1985; Prazeres, 1994).

El proceso fed-batch o cultivo de lote alimentado (CLA) es adecuado también para procesos limitados por la existencia de represión catabólica, inhibición por sustrato y cons-

tante de saturación muy alta. Con el CLA se obtienen mejores resultados de productividad en los procesos mencionados, que en operaciones por cochada (Crueger and Crueger, 1990; Acevedo *et al.*, 1991).

Este trabajo se propuso debido a que en investigaciones anteriores (Escobar and Barnett, 1993, 1995) se observó que todos los carbohidratos se consumen rápidamente al comienzo del bioproceso, coincidiendo la disminución de la velocidad de producción de la proteasa ácida de *M. miehei* con el agotamiento de la glucosa. Estos niveles bajos de glucosa se consideraron como una de las posibles causas de la finalización de la producción de la enzima. Por tanto, en este trabajo se pretende suplir la necesidad de glucosa del microorganismo, alimentándolo continuamente de manera que disponga de mayores cantidades del azúcar mencionado, esperando un aumento importante en la producción de la enzima si la hipótesis es correcta. Se buscó agregar el monosacárido durante el período de más alta producción de la proteasa ácida, con el fin de incrementar el rendimiento del proceso. Se consideró que esta alternativa era más sencilla de implementar que el BM realizado por Escobar and Barnett (1993, 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de experimentos

En este trabajo experimental la variable respuesta fue la actividad enzimática (AE) como una función de la adición de glucosa antes o después del máximo de actividad enzimática. Lo anterior requirió mantener constantes las velocidades de agitación y aireación y la concentración de los demás componentes, basados en los resultados obtenidos por Escobar y Barnett (1993). Estos autores estudiaron la influencia de las velocidades de agitación y aireación sobre la actividad enzimática.

Cultivo del inoculo

El inoculo del microorganismo (*M. miehei* CBS370.65) se sembró por punción sobre agar PDA, en una cabina de flujo laminar (IFV Industrias, modelo 120, 1995). Luego se mantuvo a 37°C durante 12 días en una cabina incubadora con agitación orbital (Mora Equipos, modelo multiusos, 1997).

Con el inoculo en medio sólido se preparó una suspensión de esporas en 50 ml de agua destilada estéril. Se usó un agitador magnético y perlas de vidrio para homogeneizar las esporas en la solución acuosa. Luego se extrajo con una micropipeta la cantidad de inoculo necesario para tener 2×10^5 esporas/ml en 1 l de medio de cultivo.

Cultivos en reactor

Los cultivos se inocularon en el fermentador (SGI de 2 l de capacidad, TYPE SET 0.02M, 1995, Francia) con el volumen necesario para obtener una concentración de 2×10^5 esporas/ml, calculado mediante recuento en hemocitómetro. La incubación se realizó en incubadora con agitación rotatoria (Mora Equipos, modelo multiusos, agitación de 40-400 +/- 8 rpm, 1997, Bogotá). Las condiciones de la fermentación fueron: agitación 250 rpm, T de 37°C, tiempo 8-10 días, V: 1 l. Para medir el pH se utilizó un pH-metro (Marca: ORION, Modelo 710^a, 1997) y el electrodo propio del fermentador.

La toma de muestra para hacer los análisis tanto de biomasa como de azúcares y de AE se realizaron en un tiempo promedio de 12 h, empleando una macropipeta. Para realizar la fermentación por lote alimentado se empleó una bomba peristáltica (COLE-PARMER 7553-80, 1-100 rpm) y una manguera con un flujo de 0,06 ml/min.

Determinación de la biomasa

Un volumen de 5 ml de muestra homogénea se filtra al vacío a través de papel de filtro Whatman No. 2 secado previamente y luego pesado. Se calcula por diferencia de pesos entre el papel de filtro solo y el papel de filtro con la muestra el peso de la biomasa en gramo por litro.

Determinación de azúcares

Para determinar el consumo de azúcares, se analizaron los azúcares totales y azúcares en forma de glucosa y maltosa.

Los azúcares totales se determinaron de acuerdo con el método de Dubois y colaboradores (1958), basado en la hidrólisis de polisacáridos en medio ácido a alta temperatura. El reactivo de Antrona reacciona con las hexosas y aldopentosas para dar un complejo verde-azul que presenta un máximo de absorbancia a 625 nm. Este método permite cuantificar azúcares en concentración de 0-50 mg/l.

La separación y cuantificación de la glucosa y la maltosa se realizó aplicando la técnica de cromatografía líquida (HPLC, Marca: MERCK-HITACHI. Modelo: L-6000^a).

Determinación de actividad enzimática (AE)

Ésta se determina siguiendo la técnica de Berridge y las modificaciones sugeridas por Rand y Ernstrom (1964). Consiste en la medición del tiempo de coagulación de diferentes muestras de fermentación sobre un sustrato de leche descremada que contiene cloruro de calcio (0,1 M). Esta determinación se logra haciendo rotar muestras de 25 ml de

leche en frascos al baño María a 30°C y 20 rpm (Mora Equipos, Modelo especial, 25-60°C +/- 0,1 °C y 5-40 +/- 1 rpm, Bogotá). Para determinar el tiempo de coagulación se emplea un cronómetro (Sport Timer, 1.800s +/- 0,01 s, 1997); la lectura del momento de coagulación se hace cuando la película interna del frasco cambia de fluido laminar a viscoso.

Para determinar el valor de la AE en unidades coagulantes (UC) por mililitro, se empleó la siguiente expresión:

$$AE = \frac{11500 \text{ UC/ml} \cdot \text{dilución} \cdot \text{tiempo del estándar}}{\text{tiempo de la muestra} \cdot \text{dilución de la muestra}}$$

Con el fin de correlacionar de forma directa la AE obtenida en UC/ml con US/ml (unidades Soxhlet) para comparar con los datos reportados por Escobar (1993,1995), se trabajó con la enzima suministrada por Rhone Poulenc en las condiciones descritas por Ernstron (1958) y Rand (1964), y se obtuvo la siguiente relación: 1 UC = 2,3 US.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para realizar el cultivo por lote alimentado fue preciso efectuar fermentaciones por lote para determinar las características cinéticas de la fermentación: consumo de azúcares totales y de glucosa, producción de enzima, comportamiento del pH y variación de la biomasa. Conocidas estas variables, se hallaron las condiciones de alimentación de glucosa en el cultivo por lote alimentado: flujo, tiempo de adición (t_a), concentración de glucosa en el alimento (S_a), valores determinados a partir de las velocidades de consumo (VC) y la concentración de la enzima (AE). Para evitar la represión catabólica, la glucosa se alimentó en forma continua antes y después de alcanzar el valor máximo de actividad enzimática.

El comportamiento de la glucosa y la AE con el tiempo para las fermentaciones por lote y lote alimentado se presentan en la figura 1, empleando un flujo de aire de 25 l/h. La velocidad de consumo (VC) se halló utilizando la tangente de la curva glucosa vs. tiempo, mostrada en la parte inferior de cada gráfica. En la ecuación correspondiente a esta tangente ($y = mx + b$), la pendiente representa el consumo de azúcares. El comportamiento del consumo de glucosa no varió mucho en relación con las fermentaciones por lote (F-B). La máxima velocidad de AE antes de agregar medio de cultivo nuevo se presentó entre las 25 y las 125 h, como se ve en F-B en la figura 1, intervalo que se mantuvo en otros experimentos realizados (valores no presentados).

En la fermentación por lote del modelo (F-B) se obtuvo una concentración celular de 11 g/l. El máximo valor de AE se obtuvo aproximadamente a las 125 h y la máxima pro-

ducción de enzima se presentó entre las 50 y las 100 h. El ensayo se realizó por duplicado.

El primer proceso de fermentación por lote se llevó a cabo después de obtener el máximo valor de la AE (F-FD). Se obtuvo también un buen crecimiento celular (11g/l). En F-FD tardó más tiempo en consumirse la glucosa, pero conservó la misma tendencia que todas las fermentaciones realizadas, alcanzándose una velocidad de consumo (VC) de 0,164 g/l*h. El promedio de los valores de VC obtenido fue de 0,1813 g/l*h, valor que se utilizó para la fermentación por lote alimentado. La glucosa se alimentó a flujo mínimo (F) de 0,06 ml/min y a alta concentración para evitar la represión catabólica. En esta forma se evita la dilución del medio y el aumento en el volumen del reactor. Se realizó el siguiente cálculo para encontrar la concentración de glucosa (S_a) para un volumen de 1 l de medio de cultivo, teniendo en cuenta que velocidad de alimentación (VA) sea igual a la velocidad de consumo (VC):

$$VA = VC = F \cdot S_a$$

$$S_a = 0,1813/3,6 \cdot 10^{-3}$$

$$S_a = 50 \text{ g/l}$$

En todas las fermentaciones (figura 1) se observó que la máxima velocidad de producción de enzima se presenta entre las 50 y las 125 h. El valor máximo de actividad enzimática (AE) se obtiene entre las 125 y las 150 h. Con la alimentación de sustrato a las 170 h, se mantiene por más tiempo el valor de la AE en su máximo, pero sin observar ningún aumento en la concentración de la enzima. Al observar la figura 1, se confirma la tendencia de la AE de aumentar con el consumo de glucosa, presentando un máximo. En las fermentaciones por lote (F-B), se observó que antes de llegar al máximo de AE, el valor de la glucosa está entre 0 y 5 g/l a las 100 h.

En un segundo conjunto de experimentos, se alimentó glucosa a las 85 h, antes de obtener el valor máximo de AE (F-FA) (ver la figura 1), y se observó alto consumo de glucosa sin aumento en la concentración de la enzima. Inicialmente el valor de la AE disminuye, debido probablemente a un proceso de adaptación por parte del hongo y de dilución por el nuevo medio; posteriormente tiende a aumentar sin alcanzar los valores máximos de AE entre 150-160 UC/ml obtenidos en las F-B y F-FD. Según los resultados alcanzados, la fermentación se puede suspender alrededor de las 150 h, correspondientes a un tiempo de fermentación de 8 días, lo cual concuerda con la literatura (Escobar, 1993).

En la figura 2 se presenta el comportamiento de la AE con el tiempo obtenido para todas las fermentaciones, donde se observó que el máximo valor de AE para las fermen-

taciones F-B y F-FD se obtiene a las 125 h y con un valor promedio de 150-160 UC/ml que corresponde a 75-80 US/ml. Éstos fueron los valores más altos de AE obtenidos en las fermentaciones realizadas en nuestro laboratorio. Sin embargo, los resultados son muy bajos, comparados con los reportados en la literatura, y que están entre 1.121 US/ml a 270 rpm en matraz (Escobar and Barnett, 1993) y 820 US/ml a 400 rpm en 500 ml de sustrato en un fermentador de 2 l (Escobar and Barnett, 1995). La causa principal de los bajos rendimientos la atribuimos a las condiciones de velocidad y forma de agitación. La velocidad de agitación influyó en la obtención de mayores concentraciones enzimáticas y, de hecho, los valores obtenidos son similares a los reportados (Escobar and Barnett, 1993) pero a las más bajas velocidades de agitación (70 rpm): 90 US/ml comparado con 75-80 US/ml en nuestro caso. Prescindiendo de la AE se observó un comportamiento similar a los reportados en los consumos de sustrato y producción de enzima, aunque más lentos.

RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD

En la tabla 1 se presentan las condiciones para las que se obtuvo el máximo valor de AE y los rendimientos y productividad para todas las fermentaciones, tanto las realizadas en esta investigación como la realizadas en otros trabajos.

Las expresiones utilizadas son:

$$Y_{P/SG} \text{ o } Y_{P/SA} \text{ (US/ml o UC/ml)}$$

$$Y_{X/SG} \text{ o } Y_{X/SA} \text{ (g de células/g de sustrato)}$$

$$\text{Prod.} = P/t_f$$

donde $Y_{P/SG}$ o $Y_{P/SA}$ es el rendimiento de la producción de enzima con respecto a la glucosa y a los azúcares totales, respectivamente. $Y_{X/SG}$ o $Y_{X/SA}$ es el rendimiento celular con respecto a la glucosa y a los azúcares totales. Prod. es la productividad expresada en las unidades Soxhlet o unidad coagulante (US/l*h o UC/l*h). P es la concentración del producto (AE), medida en unidades Soxhlet (US) o en unidades coagulantes (UC) por ml; t_f es el tiempo de fermentación en horas.

La tabla 1 permite establecer una comparación importante entre los diferentes experimentos realizados por diferentes investigadores incluyendo los primeros resultados en nuestro laboratorio (Rodríguez, 1996). La diferencia observada en la concentración de enzima con respecto a Escobar y Barnett es importante y enfatiza la necesidad de obtener velocidades de agitación y aireación adecuadas en esta fermentación. También se observa en la tabla que los valores de concentración celular (X), aunque un poco más

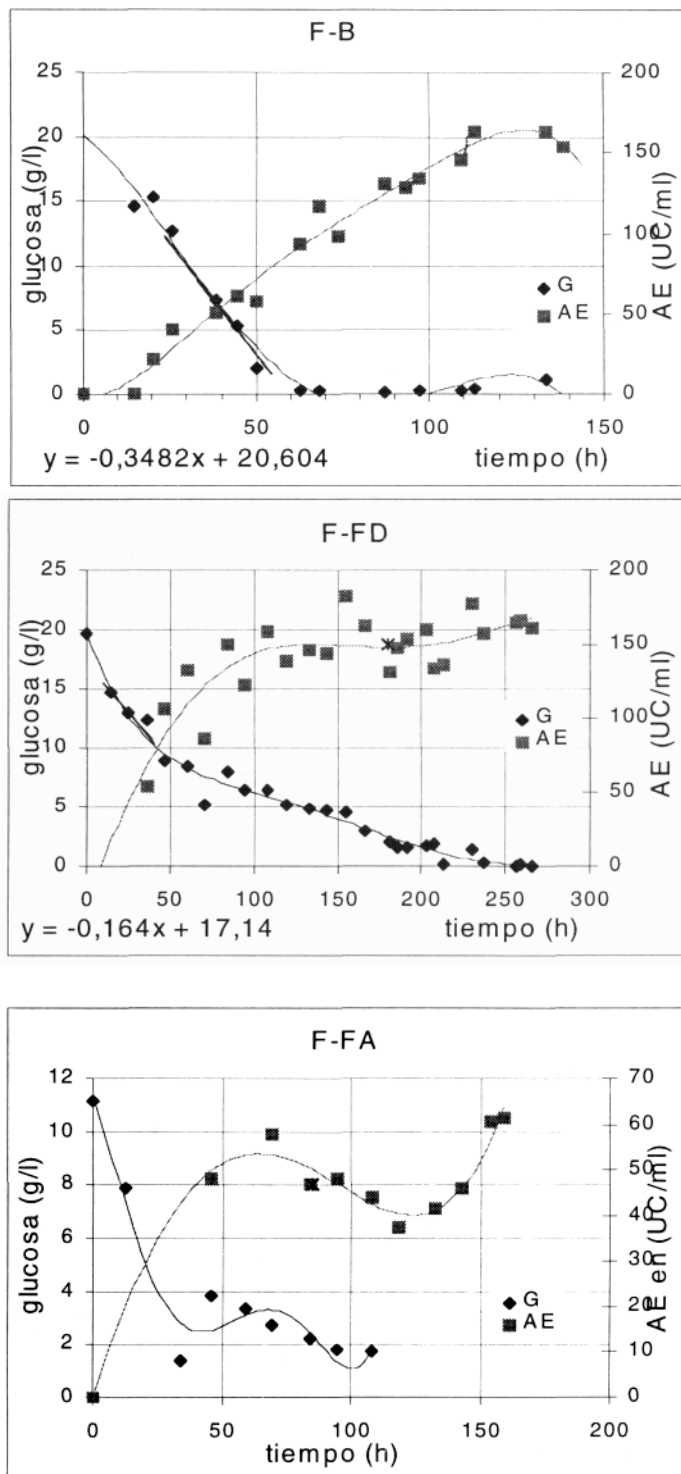


Figura 1. Comportamiento de la AE y el consumo de azúcares en la fermentación lote (F-B) y lote alimentado después y antes de alcanzar el máximo valor de la AE (F-FD, F-FA). Y representa la ecuación de la rapidez de consumo de glucosa

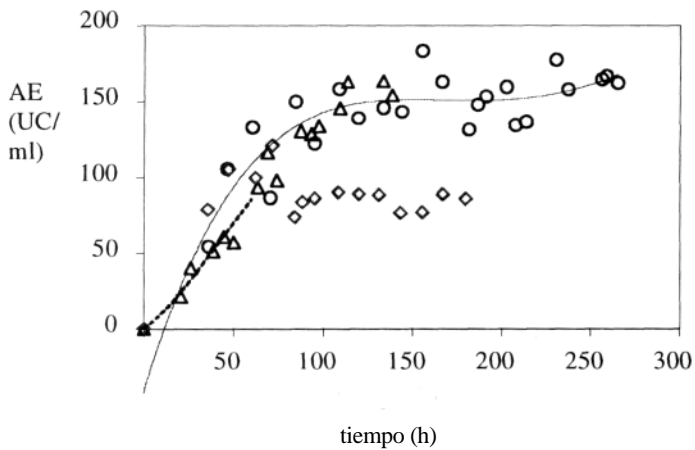


Figura 2. Comportamiento de la AE en las fermentaciones.

bajos, no resultaron tan afectados por las condiciones de agitación y son comparables a los de Escobar y Barnett (1993). Las condiciones de la fermentación F-B son las que permiten obtener el mejor rendimiento en la producción de enzima.

CONCLUSIONES

En la producción de la proteasa ácida de *M. miehei* es fundamental obtener velocidades adecuadas de agitación y aireación si se desea obtener rendimientos importantes en la producción de la enzima.

Al realizar un proceso de lote alimentado a temperatura de 37°C, velocidad de agitación 250 rpm y flujo de 0,06 ml/min con una concentración de glucosa de 50g/l, no se presenta un aumento considerable en la actividad enzimática. Lo anterior es independiente de la adición de sustrato (glucosa), sea ésta antes o después de alcanzarse el máximo valor de la actividad enzimática.

Los resultados sugieren que la producción de la proteasa de *M. miehei* no depende directamente de la concentración de glucosa, sino que ésta actúa posiblemente como un sustrato necesario pero intermedio en la síntesis de la enzima.

Tabla 1. Productividad y rendimiento de las fermentaciones

Fermentaciones		F-B	F-FD	F-FA	Escobar/93	Rodríguez/96
AE	US/ml	72	65	41	1.121	15
	UC/ml	165	150	95		70
SG0 (g/l)		20	20	15		
SG (en AE máx) (g/l)		0	5	2		
SGf (g/l)		0	0	0		
X(máx)(g/l)		11	10	8	21	5
SA0 (g/l)		35	47	60	60,5	65
SA (g/l)AE máx		18	28	38	7,7	47
SAF (g/l)		18	10	23	4	35
t AEmáx (h)		125	125	50	96	96
t F. (h)		144	265	182	168	192
$Y_{P/SA}$	US/g	4.314	3.684	1.781	21.200	833
	UC/g	9.706	7.895	5.058	3.889	
$Y_{P/SG}$	US/g	3.660	4.666	3.153		
	UC/g	8.250	10.000	8.561		
Prod. (US/l*h)A		510	264	225	6.670	80
Prod (UC/l*h)G		1.150	570	609		360
YX/SA		0,65	0,27	0,22	0,37	0,17
YX/SG		0,55	0,5	0,53		

SG0, SG (AE máx), SGf (g/l): concentraciones de glucosa inicial, cuando se llega a la producción máxima y final de enzima respectivamente. X (g/l): concentración celular máxima. SA0, SA (AE máx), SAF (g/l): concentración de azúcares totales al comienzo, cuando se obtuvo la AE máxima y al final de la fermentación. t AEmáx: tiempo en que se alcanzó la máxima producción de enzima en horas. G y A se refieren a glucosa y azúcares totales, respectivamente.

REFERENCIAS

- Acevedo, R, Chamy, R. y Gentina, J. 1991. Cinética de Fermentaciones. Tema No. 2.2. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso, Chile, pp. 44-56.
- Bailey, M. J. and Siika-Aho, M. 1988. Production of Microbial Rennin. *Biotechnology Letters*. 10 (3), 161-166.
- Crueger, W. and Crueger, A. 1990. *Biotechnology: A textbook of industrial Microbiology*. 2nd. ed. Sunderland, pp. 189-206.
- Cheryan, M. and Mehaya, M. 1985. In *Membrane Separations*. In *Biotechnology*, ed. W. C. Me. Gregor, Marcel Dekker.
- Dubois, M., *etal*. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Ernstrom, C. A. 1958. Heterogeneity of Crystalline rennin. *J. Dal/y Sel.* 41:1663-1670.
- Escobar, J. and Barnett, S. M. 1993. Effect of Agitation Speed on the Synthesis of *Mucor miehei* Acid Protease. *Enzyme microbiology technology*, 15:1009-1013.
- Escobar, J. and Barnett, S. 1995. Synthesis of Acid Protease from *Mucor miehei* Integration of Production and Recovery, *Process Biochemistry*, 30(4).
- Holst, O. and Mattiason, B. 1990. *Extractive Bioconversion*. Marcel Dekker, New York, pp. 14.
- Krause, W., Ludwig, E. and Seiler, M. 1992. Kinetic Studies on Hydrolysis of Casein and Casein Components by Milk Coagulating Acid Proteases. *Milchwissenschaft*. 47 (10), 641-644.
- Lasure, L. L. 1980. Regulation of Extracellular Acid Protease in *Mucor miehei*, *Mycologia*, 72:483-493.
- Prazeres, D. M. R and Cabral, J. M. S. 1994. Review, Enzymatic Membrane Bioreactor and their Applications. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16:738-750.
- Pszezola, D. E. 1989. Rennet Containing 100% Chymosin Increases Cheese Quality and Yield. New process optimizes extraction of chimosin from calves, leading to improved rennet product. *Food Technology*. 84-89.
- Rand, A. G. and Ernstrom, C. A. 1964. Effect of pH and NaCl on Activation of Prorennin. *J. Dairy Sci.* 47:1181-1187.
- Rickert, W. S. and Elliott, J. R. 1973. Acid Proteases from the species of *Mucor*: Molecular Weight of *Mucor miehei* Protease from Amino Acid Analysis Data. *Can. J. Biochem.* 51:1638-1646.
- Rhone Poulenc Colombia Ltda. 1997. Análisis para determinar la actividad de tabletas de cuajo. Planta Marschall, Tel: 469882, Cali.
- Rodríguez, S. 1996-1997. Comunicación personal. Bióloga genética, trabajo en investigación en el laboratorio de Bioconversiones, Universidad del Valle, Cali, pp. 87-93.
- Sardinas, J. L. 1972. Microbial Rennets. *Adv. Appl. Microbiol.* 15:39-80.
- Sardinas, J. L. 1976. Calf Rennet Substitutos. *Procces Biochemistry*. 10-17.
- Schmidt, R. H. and Morris, H. A. 1984. Gelation Properties of Milk Proteins, Soy Proteins, and Blended Protein Systems. *Food Technology*, 85-87.
- Sin autor. 1985. Industrial Enzymes from Microbial Sources. Recent Advances. *Chemical Technology Review*, 186:264-266.
- Smith, J. L. and Yada, R. Y. 1991. Characterization of two Aspartyl Proteinases from a Comercial Fungal (*Mucor miehei*) Rennet. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 24(1-2), 48-56.