

Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*

Evaluation of different sources of carbon and nitrogen in the production of rennet from *Mucor miehei*

*Adriana Osorio, Natalia Gómez, Claudia Sánchez**

Grupo Bioprocesos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia A.A. 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido el 3 de septiembre de 2007. Aceptado el 9 de mayo de 2008)

Resumen

Se estudió la cinética de producción de biomasa y de renina a partir del moho *Mucor miehei*, utilizando medios de cultivo con sustratos alternativos como fuente de carbono y de nitrógeno, que favorecieran la actividad enzimática. Inicialmente se realizó un tamizaje para determinar la viabilidad de cada uno de los subproductos utilizados y a partir de estos resultados se evaluaron los efectos cruzados de las mejores fuentes de carbono y nitrógeno sobre la productividad enzimática, mediante un diseño experimental factorial 2²; lo cual permitió proponer un medio de cultivo alternativo viable para la producción de renina a nivel industrial. Las fermentaciones se realizaron en un reactor por lotes a escala laboratorio, temperatura de 37 °C, pH inicial entre 6,3 -6,5, y agitación de 250 rpm. Finalmente, se establecieron como mejores medios de cultivo los que tenían suero de leche tanto como fuente de carbono y nitrógeno (medio 1) y suero de leche como fuente de carbono y harina de maíz como fuente de nitrógeno (medio 2), en los cuales se lograron fuerzas de cuajo (FC) máximas de 1.333,704 a las 90 h y de 1.069,71 FC a las 85 h, respectivamente.

Abstract

The kinetics of biomass production and rennet from fungi *Mucor miehei* using culture media with alternative substrates as a source of carbon and nitrogen

* Autor de correspondencia: teléfono +57 + 4 + 210 55 35, fax: +57 + 4 + 211 90 28, correo electrónico: csanchez@udea.edu.co

was studied in order to improve the enzymatic activity. An initial screening was performed in order to select the feasibility of each by-product and from these results the crossed effects of the best sources of carbon and nitrogen over enzymatic productivity were evaluated through an experimental factorial 2^2 design. It allowed us to propose an alternative culture media viable for the rennet production at industrial scale. The fermentations were carried out in a laboratory batch reactor, at 37°C , pH between 6.3-6.5 and 250 rpm. The best culture media was established as that which contained whey both as a source of carbon and nitrogen (media 1) and whey as a source of carbon and corn flour as a source of nitrogen (media 2). Maximum Rennet strength achieved (FC) was 1333.704 at 90 h in media 1 and 1069.71 at 85 h in media 2.

----- *Keywords:* *Mucor miehei*, microbial rennet, enzymatic activity, average of culture, milk serum, corn flour.

Introducción

En la industria de los lácteos, particularmente en el proceso de elaboración de quesos, una de las etapas más importantes es la coagulación de la leche, que se realiza mediante la acción específica de una enzima que cumple la función de agente coagulante sobre la caseína. Esa enzima es la quimosina también conocida como renina, una enzima proteolítica que tiene la propiedad de atacar el enlace peptídico 105-106 de la caseína desestabilizándola. La renina se puede obtener de fuentes animales, vegetales y microbianas pero tradicionalmente se ha utilizado la renina sintetizada en el albasumen de los terneros lactantes [1]. Debido a la gran demanda a nivel mundial del cuajo, se ha presentado escasez ya que la obtención de renina animal implica el sacrificio de los terneros lactantes y por ende una disminución del pie de cría bovino. Además de esto la renina extraída de fuentes bovinas presenta altos riesgos para la salud de los consumidores debido a la posibilidad de contaminación por Encelopatía Espongiforme Bovina [2]. Por esta razón se han incrementado las investigaciones encaminadas al desarrollo de fuentes sustitutas para la obtención de la enzima, siendo las de origen microbiano las que mayor interés [3, 4]. Los principales microorganismos que producen proteasas para la coagulación de la leche son de origen fúngico: *Mucor Pusillus*, *Mucor miehei* y *Endothia Parasitica*, siendo la proteasa del *Mucor miehei* la preferida como sustituto del cuajo de ternero por su alta especificidad y por su alta relación coagulante/proteolítica lo cual hace que el queso presente las mismas propiedades organolépticas [5, 6, 7, 8]. La mayoría de los trabajos reportados sobre obtención de renina microbiana utilizan medios de cultivo sintéticos, los cuales incrementan los costos de producción (25-35%) al trabajar a escala industrial, por lo que es indispensable buscar medios de cultivo sustitutos que reduzcan los costos operacionales. Se pueden emplear algunos subproductos de procesos industriales como fuentes de nutrientes para el crecimiento del microorganismo y para la síntesis enzimática, dándoles valor agregado a estos y buscando disminuir costos en la elaboración de los medios de cultivo. Los

costos de las fuentes de carbono y nitrógeno para el medio estándar (sintético) son: 84.000 \$/Kg glucosa, 304.000 \$/Kg de extracto de malta y 380.000 \$/ Kg bactopectona.

En Colombia se han realizado pocos trabajos sobre la obtención de renina a partir de *Mucor miehei* usando diferentes sistemas de fermentación y medios de cultivo sintéticos. En algunas investigaciones se han definido las condiciones operacionales de la fermentación, tales como oxígeno disuelto, pH y velocidad de agitación, sin embargo, no se reportan estudios sobre los efectos de la composición del medio y los requerimientos nutricionales del microorganismo como fuentes de carbono, nitrógeno y concentración de sales necesarias para la producción de renina microbiana. [3, 9].

El propósito de esta investigación fue determinar la viabilidad de utilizar ciertos subproductos orgánicos como fuentes de carbono y nitrógeno alternativas a las utilizadas en los medios sintéticos y encontrar las combinaciones adecuadas para la producción de renina a partir de *Mucor miehei*, con miras a obtener un medio que a futuro posibilite la implementación de un proceso a nivel industrial. Los subproductos de interés estudiados fueron el suero de leche que se produce como desecho de la mayoría de las industrias queseras y debido a su alto contenido de lactosa y diversas proteínas se considera una buena fuente de carbono y nitrógeno [10, 11]; la melaza, subproducto del proceso de refinación del azúcar, constituye una fuente rica de carbono; la cáscara de papa, procedente de la industria alimentaria y la harina de maíz generada en el trillado del mismo, ambas son posibles fuentes de nitrógeno..

Materiales y métodos

Materiales

La cepa de *Mucor miehei* empleada fue la CBS 370,65 cultivada en sobre donada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Valle. Para la preparación del medio de cultivo estándar se empleó: 1,8 % (en P/V) de almidón soluble, 1,8 % de glucosa monohidratada y 0,2 % fosfato diá-

cido de potasio (MERK); 3,1 % extracto de malta y 0,8 % bactopectona (OXOID); 0,8 % caseína (SIGMA) y 91,5% de agua destilada. Todos los reactivos usados fueron grado analítico. El pH del medio se ajustó a 6,3 [3]. Para el estudio del efecto de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno se tuvo en cuenta la relación estequiométrica respecto al medio estándar para reemplazar las fuentes de carbono (glucosa y almidón) y las fuentes de nitrógeno (extracto de malta y bactopectona) por las fuentes de carbono y nitrógeno alternativas.

Para la elaboración de los medios de cultivo alternativos se emplearon: melaza de azúcar de caña, harina de maíz, suero de leche y cáscara de papa; los dos primeros se consiguieron en la Central Mayorista de Antioquia, el suero lo obsequió una planta de leches ubicada en el municipio de San Pedro de los Milagros (Antioquia) y la cáscara de papa la donó una empresa dedicada al procesamiento de papas fritas (Antioquia). Para calcular la fuerza de cuajo se utilizó leche en polvo (PROLECHE) y cloruro de calcio (MERK), el pH se ajustó con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio 1N. Se utilizó papel Whatman N° 41 para filtrar las muestras.

Técnicas analíticas

Para cuantificar biomasa se utilizó el método del peso seco el cual consiste en secar una muestra de cultivo celular de volumen conocido hasta obtener un peso constante [12]. Para determinar la cantidad de carbono presente se cuantificaron los azúcares reductores mediante el método del DNS [13]. La determinación de proteína se llevó a cabo mediante el método de Lowry modificado [14]. Para la determinación de la actividad enzimática el método utilizado fue el de Berridge y las modificaciones sugeridas por Rand y Ernstrom [15]. Este consiste en tomar el tiempo que tarda en coagular una muestra de 5,0 mL de leche, 0,01 M en cloruro de calcio al adicionarle 0,5 mL de sobrenadante del cultivo proveniente de la fermentación. Esta determinación se logra haciendo rotar las muestras en un baño María a una temperatura de 37 °C, a una velocidad de aproximadamente 25 rpm. La lectura del tiempo de coagulación se hace justo cuando el aspecto

de la película de la pared interna del frasco con la muestra cambia de fluido laminar a viscoso formándose pequeños grumos. La actividad enzimática se expresó como la fuerza de cuajo (FC) definida como la cantidad de leche cuajada en mililitros por gramo o mililitro de sobrenadante del cultivo en 40 minutos a 37 °C y se calcula mediante la siguiente relación:

$$FC = \frac{V \times 2.400}{C \times t}$$

Donde: FC: Fuerza de cuajo, V: Cantidad de leche, mL., C: Cantidad de sobrenadante del cultivo, mL, t: Tiempo de coagulación de la muestra, s., 2.400: Tiempo en que normalmente cuaja la leche a 37 °C con un cuajo estándar, s.

La relación de actividad coagulante de la leche / actividad proteolítica, varía ampliamente de una fuente de enzima a otra, y esto influye tanto en la calidad como en el rendimiento del queso. Para una alta razón de actividad coagulante / actividad proteolítica se esperan bajas pérdidas de grasa y proteína a [4,15]. Por tanto, se realizó un seguimiento a la actividad proteolítica con el fin de relacionarla con la actividad coagulante para cada una de las fermentaciones y así corroborar el comportamiento reportado por la literatura para la producción de renina a partir de *Mucor miehei*.

La determinación de la actividad proteolítica se llevó a cabo por el método modificado de Anson [16], cuantificando los péptidos solubles en medio ácido que resultan de la acción proteolítica de la enzima o de un extracto enzimático sobre el sustrato; la cantidad de péptidos liberados se cuantificaron mediante el método colorimétrico que utiliza el reactivo de Folin- Ciocalteu. Una unidad de actividad proteolítica expresa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de 1 mg/L de tirosina a 35 °C y al pH óptimo de la enzima en 1 min [17].

Preparación del inóculo y medios de cultivo

El microorganismo *Mucor miehei* se sembró por punción sobre agar PDA (agar de papa y dextro-

sa) en condiciones asépticas, se incubó a 37 °C durante 72 h y se almacenó a 4 °C realizando repiques cada dos meses.

El hongo se sembró sobre 20 mL de agar PDA en un erlenmeyer de 100 mL. Después de 72 horas de crecimiento a 37 °C, se adicionaron 40 mL de agua destilada y la superficie se raspó con perlas de vidrio. Se inocularon los medios con una suspensión de esporas (2×10^5 esporas /mL, calculada mediante recuento en hemocitómetro).

Caracterización de las materias primas

Para evaluar el desarrollo y la producción de renina a partir de *Mucor miehei* empleando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno alternativas, se propuso evaluar los siguientes sustratos: melaza y suero de leche como fuente de carbono; harina de maíz, suero de leche y cáscara de papa como fuente de nitrógeno, esta última no se propuso como fuente de carbono debido a que la cantidad de azúcares contenidos no era tan significativa comparada con la de los otros dos sustratos seleccionados (datos obtenidos en ensayos preliminares no reportados). Para llevar a cabo el reemplazo de las fuentes de carbono y nitrógeno del medio estándar por las de los sustratos alternativos propuestos, fue necesario el pretratamiento de algunos de ellos para facilitar su manipulación y permitir elaborar los medios de cultivo. La melaza se empleó tal y como se ad-

quirió en el mercado. La harina de maíz, el suero de leche y la cáscara de papa se sometieron a diferentes tratamientos: Tamizado, para eliminar los residuos grandes de cáscara de maíz. El suero de leche se clarificó llevándolo a ebullición y posteriormente a centrifugación durante 30 min a 5.000 rpm. La cáscara de papa se secó durante 48 horas a 110°C y posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillas. A cada uno de estos sustratos se les determinó los azúcares reductores y la proteína con el fin de establecer, de acuerdo con el medio estándar, la cantidad a adicionar para mantener las concentraciones de carbono y nitrógeno en las fermentaciones.

Las fermentaciones realizadas fueron todas por lotes, con el fin de determinar el crecimiento celular, el consumo de azúcares reductores, de proteína y las actividades enzimáticas y proteolíticas, tanto en el medio estándar como en los medios alternativos. Los reemplazos de las fuentes de carbono fueron totales cambiando tanto la glucosa como el almidón y cuando se realizó parcialmente sólo se reemplazó la glucosa. Para el cambio de la fuente de nitrógeno sólo se reemplazó la bactopectona. Los demás componentes del medio de cultivo permanecieron constantes. Las modificaciones realizadas a cada uno de los medios se pueden observar en la tabla 1. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 1 Fuentes de carbono y nitrógeno empleadas

<i>Medio</i>	<i>Fuente a reemplazar</i>	<i>Tipo de reemplazo</i>	<i>Reemplazo</i>
A	Carbono	Parcial	Glucosa por suero
B	Carbono	Parcial	Glucosa por melaza
C	Carbono	Total	Glucosa y almidón por suero
D	Carbono	Total	Glucosa y almidón por suero
E	Nitrógeno	Parcial	Bactopectona por suero
F	Nitrógeno	Parcial	Bactopectona por harina de maíz
G	Nitrógeno	Parcial	Bactopectona por cáscara de papa

Diseño de experimentos

Una vez se determinó la viabilidad de las fuentes de carbono y nitrógeno en los ensayos previos, se realizó un diseño experimental factorial 2², con dos de las mejores fuentes de N y C obtenidas respectivamente, para evaluar el efecto de las interacciones de las fuentes en cuatro medios de cultivo (ver tabla 2) sobre la variable de respuesta productividad la cual se definió:

$$Pr\ oductividad = \frac{FC_{máx}}{t}$$

Donde: FC_{máx}: Fuerza de cuajo máxima y t: Tiempo de fermentación, h.

Tabla 2 Matriz experimental de medios de cultivo

Fuente C Fuente N	Suero -1	Melaza 1
Suero -1	Medio 1 -1 -1	Medio 3 1 -1
Harina de maíz 1	Medio 2 -1 1	Medio 4 1 1

Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico *Stat-Graphics*, para determinar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la productividad.

Resultados y Discusión

Efecto del reemplazo de la fuente de carbono sobre el crecimiento del microorganismo, el consumo de azúcares y de proteína

En la figura 1 se presenta el efecto de las diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento del *Mucor miehei* respecto al medio estándar. Se observa que la tendencia del crecimiento es similar en todos los medios y de manera general se obtuvieron en promedio 4,38 g de biomasa/L a 48h en los medios A, B, y C. Dicho valor es muy parecido al presentado en el medio estándar.

En el medio D se logró un máximo (6,8 g/L), lo cual no permite asegurar que sea el mejor medio para el crecimiento, pues la morfología que el microorganismo presentó en él no fue la más adecuada (masa amorfa). Tanto para los reemplazos parciales como totales, los azúcares reductores mostraron inicialmente una concentración mayor a la concentración del medio estándar y una tendencia a disminuir lentamente durante el transcurso de la fermentación; esto se toma como indicio de que el microorganismo estaba utilizando los azúcares presentes en el medio, aunque cabe anotar que la variación total de ello no es un valor consecuente con la variación total de la biomasa, esto se debe posiblemente a que la técnica cuantifica azúcares reductores y la mayoría de los sustratos usados son azúcares complejos que se van degradando y consumiendo en el transcurso de la misma fermentación produciendo inestabilidad (figura 2).

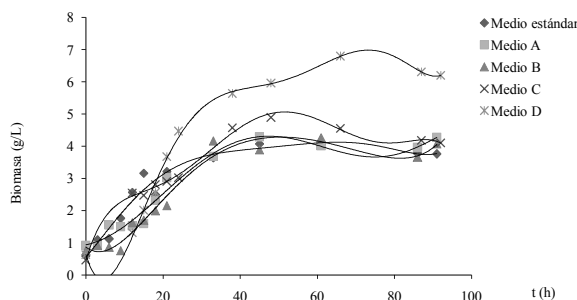


Figura 1 Efecto del reemplazo de la fuente de carbono sobre el crecimiento del microorganismo



Figura 2 Efecto del reemplazo de la fuente de carbono sobre el consumo de azúcares

Al cuantificar el consumo de proteína se notó que ésta aumentó en las primeras horas y posteriormente presentó una tendencia casi constante similar al comportamiento de los azúcares reductores, como lo muestra la figura 3.

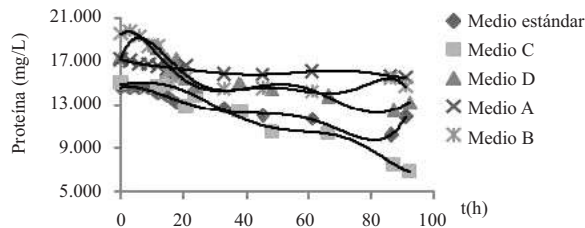


Figura 3 Efecto del reemplazo de la fuente de carbono sobre el consumo de la proteína

Efecto del reemplazo de la fuente de carbono sobre la actividad enzimática

Para las fermentaciones donde se reemplazó parcialmente la fuente de carbono sólo se evidenció la actividad enzimática en el medio A como se muestra en la figura 4. En este medio se logró una actividad máxima 77,90 FC a las 86 h, valor inferior al que presentó el medio estándar, en el cual se obtuvo una actividad muy superior (594,19 FC) en un tiempo menor (45 h). En el medio B no se detectó actividad enzimática, lo cual puede ser debido a la complejidad del medio, pues las mezclas contienen una gran cantidad de iones que pueden inhibir la producción enzimática.

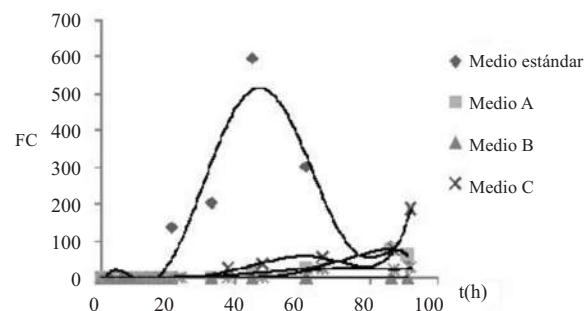


Figura 4 Efecto del reemplazo de la fuente de carbono sobre la actividad enzimática

En el reemplazo total los medios C y D presentaron valores de actividad enzimática muy bajos comparados con la actividad presentada por el medio estándar, en el medio C se alcanzó una fuerza de cuajo de 186,53 a las 92 h, este valor es mayor que el que se obtuvo para el medio A en el reemplazo parcial y en un tiempo ligeramente mayor; el medio D mostró una actividad enzimática de 29 FC a las 92 h.

Efecto del reemplazo de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento del microorganismo, el consumo de azúcares y de proteína

Los sustratos propuestos para reemplazar la fuente de nitrógeno fueron el suero de leche, la harina de maíz y la cáscara de papa; aunque esta última no resultó manejable estequiométricamente, su comportamiento se evaluó en una cantidad menor. Para la preparación del medio se usaron iguales concentraciones de los otros sustratos para lograr en todos los medios las mismas condiciones. En la figura 5 se puede observar el comportamiento de la producción de biomasa en los diferentes medios. Se lograron las siguientes concentraciones celulares máximas: Con el medio E 6,51 g/L a las 66 h, con el medio F 5,11 g/L a las 66 h y con el medio G 6,57 g/L a las 48h; todos estos valores son superiores al máximo del medio estándar, pero inferiores a los reportados en la literatura bajo condiciones similares [10].

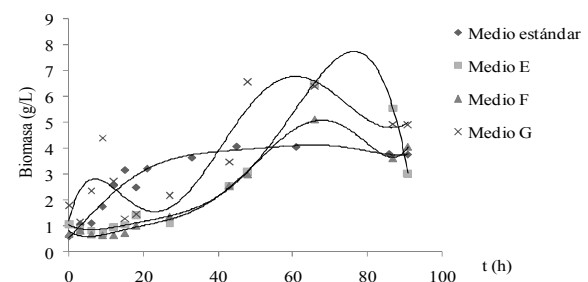


Figura 5 Efecto del reemplazo de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento del microorganismo

Efecto del reemplazo de la fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática

Los resultados obtenidos en estas fermentaciones en cuanto a la actividad enzimática presentaron valores superiores al del medio estándar. El medio de cultivo E presentó una fuerza de cuajo máxima de 1.200 a 91 h, el medio F mostró 1.836,74 FC a 87 h y por último en el medio G se obtuvo 1.764,71FC a las 48 h. Estos valores también superan los reportados por Cárcamo y Vélez [10], quienes a las 96 h lograron 1.500 FC y 967,74 FC a 48 h. Los resultados se presentan en la figura 6.

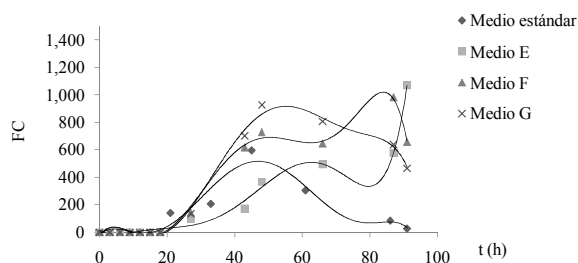


Figura 6 Efecto del reemplazo de la fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática

Efecto de las interacciones de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento del microorganismo

La producción de biomasa de todos los medios exceptuando el medio 1 fue superior a la presentada por el medio estándar tal y como se muestra en la figura 6, el medio 1 exhibió un comportamiento muy similar al del medio estándar a partir de 60 h, inicialmente se mantuvo por debajo de éste, la máxima concentración de biomasa fue de 4,37 g/L a 66 h ; el medio 2 presentó una concentración de biomasa máxima de 6,28 g/L a 60 h, para los medios 3 y 4 se apreció un comportamiento similar obteniéndose 11,46 g/L a 90 h y 12,03 g/L a 85 h respectivamente. Los medios 1 y 2 presentan valores inferiores a los reportados en la literatura [9].

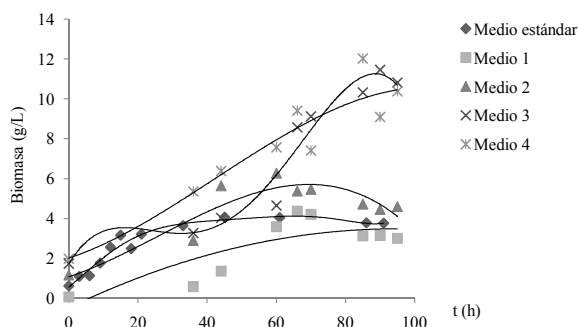


Figura 7 Efecto de las interacciones de las fuentes de carbono y nitrógeno alternas sobre eproducción de biomasa

Efecto de la interacción de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la actividad enzimática

La actividad enzimática obtenida al trabajar con los medios alternos pueden apreciarse en la figura 8, donde los medios 1 y 2 presentaron fuerzas de cuajo mayores a la exhibida por el medio estándar, mientras los medios 3 y 4 mostraron fuerzas de cuajo insignificantes comparadas con el medio estándar. Estos resultados corroboran nuevamente que bajo las condiciones operacionales utilizadas, la melaza no es una fuente de nutriente que favorezca la producción de la enzima. El medio 1 reportó una fuerza de cuajo máxima de 1.333,70 a 90 h, el medio 2 alcanzó su máximo de 1.069,71 FC a 85 h , el medio 3 mostró evidencias de coagulación solo en dos ocasiones, 70 y 85 h con valores muy bajos, 36,84 y 38,48 FC respectivamente, finalmente se notó un comportamiento muy similar entre los medios 3 y 4, con mayores puntos de coagulación pero con fuerzas de cuajo de magnitudes parecidas. El máximo fue de 39,9 FC a 85 h.

Análisis estadístico

Los datos de productividad se obtienen al analizar los datos experimentales de los cuatro medios de cultivo con su réplica mediante el programa estadístico Stat Graphics (tabla 3). Con los medios 1 y 2 se pueden obtener productividades muy simi-

lares a las del medio estándar, o sea que el suero de leche resultó ser muy buena fuente, tanto de carbono como de nitrógeno, al emplearse sólo o con harina de maíz como fuente de nitrógeno. Los medios 2 y 3, que utilizan melaza, no favorecen la producción de renina. Los bajos resultados obtenidos para estos medios y de acuerdo a lo observado experimentalmente en cuanto a la fisiología del hongo, muestran que la formación de pellets es muy importante para lograr la producción de la enzima. En la figura 9 se observa que las fuentes de nitrógeno evaluadas en el diseño experimental no afectan la productividad, mientras que la fuente de carbono si presenta una gran

incidencia, viéndose desfavorecida por el uso de la melaza [11].

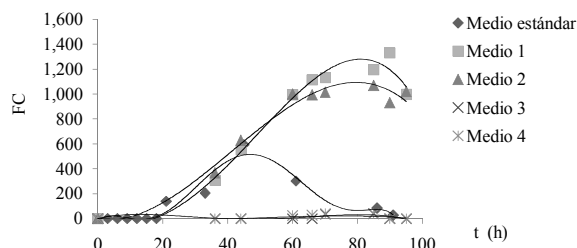


Figura 8 Efecto de las interacciones de las fuentes de carbono y nitrógeno alternas sobre la actividad enzimática

Tabla 3 Productividades de los medios de cultivo con fuentes alternas tanto de carbono como de nitrógeno

<i>Medio</i>	1	2	3	4	<i>estándar</i>
Productividad (FC/h) Corrida 1	15,066	13,256	0,482	0,563	12,52
Productividad (FC/h) Corrida 2	14,572	16,835	0,538	0,569	13,58
Tiempo (h)	90	80	80	80	45

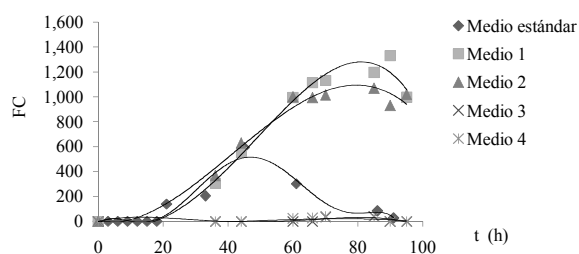


Figura 9 Efectos de las interacciones de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la productividad

tienen suero de leche (como fuente de carbono y de nitrógeno) y harina de maíz (como fuente de nitrógeno). Esto favorece la elaboración de los medios de cultivo a nivel económico, debido a que el suero de leche es un subproducto de la industria láctea y para muchas empresas estos residuos representan altos costos por los tratamientos que deben realizar para minimizar los impactos ambientales. Con respecto a la harina de maíz, es un subproducto del proceso de trillado del maíz que presenta un bajo costo (2.500 pesos/Kg de harina).

Conclusiones

Cuando se hacen los reemplazos de las fuentes de carbono y nitrógeno alternativas en cantidades estequiométricas, los medios que más favorecieron la actividad enzimática son los que con-

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia por su apoyo a través de recursos CODI: Proyecto: Diseño de un medio de cultivo viable para

la producción de renina microbiana de sustratos económicos y al Laboratorio de bioprocesos de la Universidad del Valle por donar la cepa.

Referencias

1. A. Wiseman. *Manual de Biotecnología de las enzimas*. Zaragoza. Ed. Acirbia.1991. pp. 444.
2. C. Ratledge, B. Kristiansen. *Basic Biotechnology*. Cambridge University Press. New York. 2ª. ed. 2001. pp. 396.
3. C. P. Sánchez; J. M. Escobar, A. Rodríguez de Stouvenel. "Características de la producción de la renina microbiana de *Mucor miehei* en un proceso de alimentación por lote". *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 2. 1999. pp. 28-34.
4. US. Patent 505.688, DE 22-9-81 A1. Procedimiento de obtención de renina microbiana de alta actividad coagulante de leche y baja actividad proteolítica. Gist-Brocadest N.V. Holanda.
5. J. Escobar, S. M. Barnett. "Some kinetic studies and effects of agitation and consumption rates on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease". *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 15. 1993. pp.1009-1013.
6. J. Escobar, S. M. Barnett. "Synthesis of acid protease from *Mucor miehei*: Integration of production a recovery". *Process Biochemistry*. Vol. 30. 1995. pp 695-700.
7. S. Seker, H. Beyenal, F Ayhan, A. Tanyolac. "Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter". *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 23. 1998. pp.469-474.
8. S. Seker, H. Beyenal, A. Tanyolac. "Modeling milk clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*". *Journal of Food Science*. Vol. 64.1999. pp. 525-529.
9. S. Cárcamo, L. Vélez. *Producción de renina a partir de Mucor miehei en un reactor tipo batch*. Trabajo de grado Ingeniería Química. Universidad del Antioquia. Facultad de Ingeniería. Medellín. 2003. pp 16-17, 29-31.
10. M. Peñuela, G. Vargas, A.M. Torres, R. Ríos. "Evaluación de medios de cultivo preparados a partir de suero de leche enriquecido, para la producción de ácido láctico, con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casli*" *Revista Facultad de Ingeniería*. Vol. 24. 2001. pp. 35-39.
11. G. Garcia da Silveira, G. Monteiro de Oliveira, E. J. Ribeiro, R. Monti, J. Contiero "Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation". *Brazilian archives of biology and technology Journal*. Vol. 48. 2005. pp. 931-937.
12. A. Scragg. "Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos biotecnológicos". Ed. Limusa. México. 1997. pp. 191-223
13. G. L. Miller. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*. Vol. 31. 1959. pp. 426.
14. O. H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *Journal Biological Chemistry*. Vol. 193. 1951. 265-275.
15. A.G. Rand, C.A. Ernstrom.. "Effect of pH and NaCl on activation of prorennin". *Journal Dairy Science*. Vol. 47. 1964. pp. 1181-1187.
16. Anson. (1938) http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte08/09.html. Consultada el 17 de junio de 2007
17. H. J. Morris, L. Borges, C. E. Martínez, A. Almarales, R.T. Abdala "Composición bioquímica y propiedades bioestimulantes de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Chlorophyceae)". *Revista Cubana de Química*. Vol. 13. 2001. pp. 28-36.