



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo da Produção de Coalho Microbiano
por Fermentação com *Mucor miehei*
utilizando meios à base de Glicose e Sacarose
como fontes de Carbono**

Guilherme Garcia da Silveira

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Dezembro de 1999

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo da Produção de Coalho Microbiano por Fermentação com
Mucor miehei utilizando meios à base de Glicose e Sacarose como
fontes de Carbono**

Guilherme Garcia da Silveira

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 23/12/99 NOTA 4,0

Euclides Honório de Araújo



Eloízio Júlio Ribeiro

Ângela H. A. Beicher

Uberlândia, 23 de Dezembro de 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo da Produção de Coalho Microbiano por Fermentação com
Mucor miehei utilizando meios à base de Glicose e Sacarose como
fontes de Carbono**

Guilherme Garcia da Silveira

Euclides Honório de Araújo
Orientador

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Dezembro de 1999

INDÍCE

1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	02
3. MATERIAL E MÉTODOS	05
3.1. Microrganismo utilizado	06
3.1.1. Meios de Estoque e da Cultura Submersa.....	06
Meio de Estoque	06
Cultura Submersa	06
Contagem de esporos.....	06
3.2. Fermentação	07
3.2.1. Determinação da Massa Seca	08
3.2.2. Leitura do pH dos Meios de Cultivo	09
3.2.3. Determinação da Concentração de Açúcares	09
3.2.4. Determinação da Curva de Calibração	09
3.2.5. Produção da Enzima	10
4. RESULTADOS	11
4.1. Consumo de Carboidratos e Crescimento Celular	11
4.2. pH	11
4.3. Produção da Enzima	12
5. DISCUSSÃO.....	13
6. CONCLUSÕES	15
LISTA DE GRÁFICOS	16
7.1. Acompanhamento da fermentação utilizando Sacarose	16
7.2. Acompanhamento da fermentação utilizando Glicose e extrato de malte	17
7.3. Acompanhamento da fermentação utilizando Glicose sem extrato de malte.	18
7.4. Comparação das atividades coagulantes das três fermentações	19
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO

A demanda de coalho de origem animal na produção de queijo, tem aumentado, provocando um déficit na sua produção e, para atender a esse mercado, houve necessidade da procura de fontes alternativas para sua obtenção. Dentre estas foi isolado o zigomiceto *Mucor miehei* que produz uma enzima proteolítica, a renina, com boas qualidades coagulantes.

No atual trabalho, analisou-se o crescimento do fungo *Mucor miehei* e a produção de renina em um meio constituído de glicose, extrato de malte, peptona, caseína e fosfato de potássio, denominado meio de referência bem como à base de sacarose ou glicose, juntamente com os demais nutrientes e sais.

As fermentações foram realizadas em incubador rotativo, à temperatura de 35° C e pH inicial entre 5,5-6.

Nos meios à base de glicose a concentração celular alcançou 15,95 g/L, expressa em massa seca e a atividade catalítica atingiu 166 Unidades Soxhlet, após 144 horas de fermentação. Para o meio à base de sacarose, o crescimento celular foi menor em relação ao referencial, atingindo uma atividade enzimática máxima de 140 Unidades Soxhlet após 100 horas de fermentação.

O meio de cultivo à base de sacarose é mais interessante para ser usada do que o meio à base de glicose, porque, apesar dos dois tipos de meios terem tido atividades enzimáticas próximas, para a sacarose o tempo para a produção da enzima, foi bem menor.

2. Introdução

O queijo é um dos alimentos mais antigos que o homem conhece. Na fabricação da maioria de seus diferentes tipos, ocorre coagulação da caseína pela ação de enzimas proteolíticas (coalho), dentre as quais a mais usada é a renina, que é uma mistura das enzimas quimosina e pepsina (REED, 1993). A renina é obtida industrialmente por extração a partir do quarto estômago de Bezerros (REED, 1993; SCRIBAN, 1985). Devido ao aumento crescente da produção mundial de queijos, o fornecimento de renina, obtida através da técnica atual, tornou-se insuficiente implicando na necessidade de fontes alternativas para obtenção de enzimas coagulantes (SCRIBAN, 1985).

Uma tentativa tem sido a utilização de pepsina, extraída do quarto estômago de bovinos adultos, porém de uso limitado à fabricação de queijos que não passam por processo de maturação, tais como os frescos, devido à ação proteolítica de tal enzima (SCRIBAN, 1985). Uma outra alternativa que tem sido pesquisada é a obtenção de enzimas coagulantes de origem microbiana produzidas por microrganismos, tais como: *Endothia parasitica*, *Mucor pussilus*, *Cryptococcus albidus*, *Bacillus cereus* e *Mucor miehei* (ROSE, 1980; BAYLEY, 1988). Desses, o que mais tem sido utilizado industrialmente é o *Mucor miehei*, que sintetiza uma enzima altamente ativa e de baixa atividade proteolítica, a renina (E.C. 3.4.23.10) (SCRIBAN, 1985; REED, 1993; BAYLEY, 1988).

A relação entre atividade coagulante e atividade proteolítica é menor para enzimas microbianas do que para coalho puro bovino (ROSE, 1980).

Relação entre atividade coagulante e atividade proteolítica
para três fontes de coalho (ROSE, 1980)

Taxa de Atividade (Unidades Arbitrárias)	
Coalho Bovino	500 – 1.000
Coalho de <i>Mucor</i>	270 – 300
Enzima de <i>Endothia parasitica</i>	80

Várias empresas comercializam o coalho microbiano proveniente de *Mucor miehei*, com diferentes nomes comerciais, tais como Renilase da Novo Nordisk, Marzyme da Miles e Fromase da Societé Rapidase (SCRIBAN, 1985). Até o presente momento, não se tem conhecimento da produção de coalho microbiano por indústrias nacionais, assim acredita-se ser oportuno começar a pesquisar nesta área, contribuindo para a produção destas enzimas no Brasil.

O fungo *Mucor miehei* tem a seguinte classificação taxonômica :

FILO : Zygomycota
 CLASSE : Zygomycetes
 ORDEM : Mucorales
 FAMÍLIA : Mucoraceae

É um fungo saprófita com micélio cenocítico extenso, ocorrendo septo apenas para separar o esporângio durante seu amadurecimento. A reprodução ocorre por meio de esporos de resistência denominados esporangiósporos que ficam armazenados dentro de esporângios que são estruturas globosas infladas, apresentando uma columela central (PUTZKE e PUTZKE, 1998; GRIFFIN, 1981).

Os fungos filamentosos crescem em meio sólido, por alongação e ramificação das hifas, formando um fino tapete entrelaçado sobre o meio sólido; já em meio líquido (submerso), o fungo cresce na forma de “ pellets” que, dependendo do seu diâmetro e quantidade, podem levar a uma maior ou menor aumento na concentração de produtos sintetizados (PANBOKIAN et al, 1998; WANG, 1979).

Os processos de produção de enzimas coagulantes por processos fermentativos, ou envolvem patentes ou não são apresentados detalhes sobre os meios de cultivos e condições operacionais. Dessa forma e levando em consideração que o Brasil é grande produtor de leite e de queijo, acreditamos que uma pesquisa sobre a produção de coalho microbiano justifica-se plenamente (ROSE, 1980).

A produção e processamento de proteínas sempre ocuparam uma parte importante nas atividades industriais. Neste contexto, está incluso a produção de enzimas, que são tradicionalmente, de origem animal ou vegetal (ROSE, 1980).

No oriente o uso de proteases microbianas na preparação de diversas substâncias alimentares é uma antiga tradição. Nos últimos 50 anos as indústrias de fermentação desenvolveram muitos métodos de produção de enzimas proteolíticas microbianas à baixo custo e alta taxa de pureza (ROSE, 1980).

Depois da 2ª Guerra Mundial houve um desenvolvimento na produção de antibióticos por fermentação submersa, que contribuiu, posteriormente, para um melhoramento na produção de enzimas microbianas obtidas, também, por fermentação submersa (ROSE, 1980).

O leite pode ser coagulado por quase todas as proteases, mas a maioria destas enzimas hidrolizam excessivamente a caseína impedindo a obtenção de um queijo palatável. Dentre os microrganismos produtores de coalho microbiano, AUNSTRUP descobriu que o zigomiceto *Mucor miehei* produzia

coagulante com características muito similares ao coalho comercial aliado a altas taxas de produção (ROSE, 1980).

A protease produzida por *Mucor miehei* é uma protease aspartato ácida com peso molecular 38.000 . A molécula consiste de uma simples cadeia peptídica contendo aproximadamente 6% de carboidratos. Esta enzima é estável entre os pH 3 e 6 com um pH ótimo de 4,5 para estabilidade comparando com hemoglobina desnaturada (ROSE, 1980).

Durante o cultivo, há a síntese de lipases que devem ser removidas, pois estas podem levar à uma rancificação indesejável do queijo, interferindo na palatabilidade do mesmo (REED, 1993). Isto pode ser feito através de adsorção e tratamentos térmico ou ácido (pH 2-4) (ROSE,1980).

ESCOBAR e BARNETT (1993) relataram que é importante manter o processo de fermentação com pH abaixo de 6,5, pois valores acima deste poderiam afetar a estabilidade da enzima. Sua produção parece ser afetada por repressão do tipo “feedback”, pois houve uma diminuição de sua síntese quando produtos metabólicos eram acumulados.

A enzima hidrolisa, especificamente, ligações peptídicas envolvendo as parcelas aromáticas e hidrofóbicas da cadeia (ROSE, 1980).

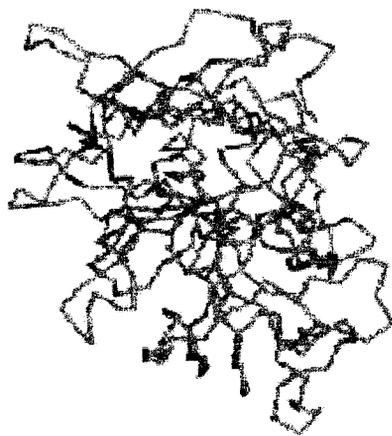


Figura 2 - Protease aspártica de *Mucor miehei* (Resolução: 2.80 Å)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo usado

O microrganismo usado foi o fungo *Mucor miehei* NRRL 3420 adquirido na forma liofilizada na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” sediado em Campinas, SP.

3.1.1 MEIOS DE ESTOQUE E DA CULTURA SUBMERSA

Meio de Estoque

O frasco, com o fungo liofilizado, foi aberto e ressuspenso em aproximadamente 3 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, com o uso de uma alça de platina foi efetuado a inoculação em tubos de ensaio (slants) tampados com chumaço de algodão, contendo aproximadamente 10 mL de Ágar Sabouraud da marca Biobrás. Após este processo, os frascos foram colocados em uma câmara fria (5° C) com o intuito de diminuir o metabolismo do fungo, e mantidos até futura necessidade de uso. Os repiques foram efetuados a aproximadamente cada 2 meses.

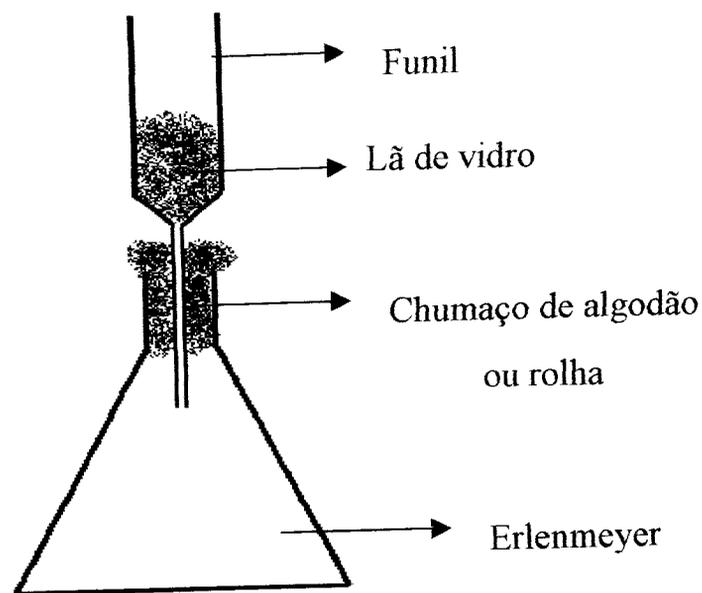
Cultura Submersa

Antes do início da inoculação em cultura submersa, os tubos com os meios de estoque foram retirados da câmara fria e colocados em uma estufa à temperatura de aproximadamente 35°C até posterior colonização e esporulação no Ágar Sabouraud. Após este processo, para a obtenção do inóculo, aproximadamente 25 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo e a quantidade de tubos necessários foi calculado de modo a se obter 10% do volume do meio submerso. Os tubos eram individualmente abertos e, após a adição da água destilada, eram raspados suavemente com a ajuda de uma alça de platina previamente flambada, obtendo-se, assim, uma solução heterogênea de

esporos e hifas. Em todas as fermentações o inóculo era da ordem de 10^6 esporos por mL.

Esta solução heterogênea foi filtrada através de um aparelho adaptado de acordo com a tese de mestrado de ARAÚJO (1979) no qual segue o esquema :

Figura 1 – Esquema do aparelho filtrador para separação dos esporos.



Contagem de Esporos

Para a inoculação em meio líquido era preciso o conhecimento da quantidade de inóculo inicial, expressa em esporos/mL . Isto foi feito com auxílio de uma Câmara de Neubauer que é uma lâmina para microscópio especial onde há divisões quadriculadas com volume conhecido no qual permite saber-se a quantidade de esporos/mL presentes no inóculo (LIMA, 1977).

A contagem foi conduzida da seguinte forma :

A partir da solução filtrada no aparelho acima retirava-se uma amostra com auxílio de uma pipeta Pasteur colocando-a na Câmara de Neubauer. Em

seguida, com auxílio de um microscópio com objetiva de 40X contava-se 5 quadrados com volume conhecido de 4.10^{-4} mL.

3.2. FERMENTAÇÃO

Os ensaios foram realizados em 20 Erlenmeyers de 250 mL de volume, em duplicata utilizando um volume útil de 110 mL incluindo neste o meio de cultura e o inóculo, que é constituído da solução filtrada de esporos. Estes foram mantidos à temperatura constante de 35°C em incubadora horizontal rotativa .

Os meios de cultura utilizados foram numerados cada qual com sua formulação e foram modificados tomando-se como referência o meio desenvolvido por ESCOBAR (1993) e têm como constituintes os seguintes compostos :

Meio de Referência	
Glicose	18 g/L
Amido	18 g/L
Peptona de Carne	8 g/L
Caseína	8 g/L
Extrato de Malte	8 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L

Meio 1

Glicose	40 g/L
Peptona de carne	8 g/L
Caseína	8 g/L
Extrato de Malte	31 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L

Meio 2

Glicose	40 g/L
Peptona de carne	8 g/L
Caseína	4 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L

Meio 3

Sacarose	40 g/L
Peptona de carne	8 g/L
Caseína	4 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L

Pretendeu-se, a partir do meio de referência mencionado, a modificação de sua formulação até posterior substituição da Glicose por Sacarose que, por sua vez, é mais barata e de fácil aquisição.

3.3. ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES

Após a inoculação, os Erlenmeyers (em duplicata) foram incubados em “shaker” com controle de temperatura (35°C) e agitação, sendo realizados em duplicata, diariamente os seguintes ensaios analíticos :

3.3.1 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA

A massa seca foi determinada retirando-se dois erlenmeyers ao acaso, entre os 20 da incubadora .

O material dos dois erlenmeyers foram filtrados separadamente, à vácuo, utilizando-se papel de filtro tipo 10, previamente pesado, para separação do micélio do resto da solução, e foram, logo em seguida, colocados em uma estufa à temperatura de 80 °C durante 24 horas para eliminação de quaisquer indícios de umidade.

Os papéis de filtro foram novamente pesados e a massa seca foi obtida pela diferença entre as massas. Para as pesagens, utilizou-se uma balança analítica com sensibilidade de 0,1 mg.

3.3.2 LEITURA DO pH DOS MEIOS DE CULTIVO

A leitura do pH dos meios de cultivo foi feita a partir da solução filtrada para a obtenção da massa seca. O aparelho utilizado foi um pH-metro marca Lutron modelo PH-206, previamente aferido.

3.3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES

CONSUMIDOS - Método do D.N.S.

A determinação da concentração de açúcares consumidos foi feita pelo método do D.N.S. (Ácido 3,5 Dinitro Salicílico). Tal método dosa a concentração de açúcares redutores (A.R.). Os valores obtidos são inseridos em uma equação obtida a partir de uma curva de calibração feita anteriormente, obtendo-se assim a concentração em gramas por litro consumidos diariamente.

3.3.4- Determinação da curva de calibração

Para a construção da curva, realizou-se o seguinte procedimento:

- Em balões volumétricos, colocou-se soluções de glicose de tal forma que as concentrações variaram de 0,1 a 1,0 g/L;
- Misturou-se, em um tubo de Folin, 1 mL de cada solução de glicose com 2 mL de solução de DNS;
- Foram aquecidos por cinco minutos em banho de água em ebulição e, a seguir, foram resfriados em água corrente;
- Logo após o resfriamento, completou-se o volume, com água destilada, com 25 mL nos tubos e homogeneizou-os;

- Fez-se as leituras no espectrofotômetro a uma absorvância de 540 nm;
- Com as leituras, construiu-se a curva de calibração, que é a concentração de açúcar redutor em função da absorvância.

A curva padrão é uma reta, que é obtida por regressão linear fornecendo a concentração de glicose consumida ao longo da fermentação.

Quando havia açúcares não redutores neste meio de cultivo, foi preciso a realização de uma inversão ou hidrólise total, para posterior leitura de açúcares redutores totais (A.R.T.), também feita pelo método D.N.S.

3.3.5 PRODUÇÃO DA ENZIMA

A atividade enzimática foi verificada a partir do Método de Soxhlet (JAFELICE, 1985) onde foi usado 10 mL de substrato : leite em pó desnatado Mólico da Nestlé diluído a 10% com água contendo uma concentração de 0,01 M de CaCl_2 , previamente aquecido á 35°C durante 10 minutos, e 1 ml da solução filtrada e com pH ajustado a 6,5, resultante do cultivo, anotando-se o tempo exato para o aparecimento dos primeiros coágulos no recipiente e, logo após, os dados foram inseridos na equação de Soxhlet, que nos dará o resultado em Unidades Soxhlet (S.U.).

$$\text{S.U.} = \frac{\text{mL de substrato}}{\text{mL de enzima}} \times \frac{2400}{\text{tempo (seg.)}}$$

4. RESULTADOS

Foram realizadas várias fermentações, mas foram analisadas apenas os resultados de três delas, já que as outras se tornaram inviáveis, por estarem contaminadas.

4.1. Consumo de Carboidratos e Crescimento Celular (Biomassa)

Nas fermentações onde foi usado extrato de malte ou sacarose no meio de cultura fez-se uma inversão ou hidrólise total ácida e a quantidade de carboidratos analisados foi expresso em ART (Açúcares Redutores Totais). Em todos os ensaios houve pouco consumo de açúcar.

Na fermentação à base de sacarose, houve uma oscilação na quantidade deste açúcar presente no meio, que permaneceu em torno 26 g/L e a concentração celular atingiu o pico de 5 g/L, conforme Figura 3.

Na fermentações à base de glicose com extrato de malte, houve um consumo de 18,3 g/L de açúcar alcançando a concentração celular de 15,95 g/L conforme Figura 4 .

Na fermentação à base de glicose sem extrato de malte, houve um consumo de 15 g/L de glicose alcançando a concentração celular de 8,76 g/L, conforme Figura 5 .

4.2. pH

Durante as fermentações nos meios à base de glicose houve um decréscimo nos valores de pH que se mantiveram abaixo de 6 conforme Figuras 4 e 5. Já, no meio à base de sacarose, houve um comportamento diferente. Como nos meios à base de glicose o pH inicial foi em torno de 5,5-6

mas no decorrer da fermentação houve um acréscimo atingindo um pico de 8,55, conforme Figura 3.

4. 3. Produção da Enzima

Como pode-se verificar através da Figura 6, houve a produção da enzima em todos os meios de cultivo.

Observou-se atividades coagulantes iniciais em torno de 72 horas, exceto no meio à base de glicose com extrato de malte que exibiu atividade enzimática de 15 US à partir de 48 horas de cultivo conforme Figura 3.

No meio à base de glicose com extrato de malte a produção enzimática alcançou um pico de 166 US em torno de 144 horas de fermentação .

No meio à base de glicose sem extrato de malte a produção enzimática atingiu o pico de 143 US em torno de 120 horas de fermentação.

No meio à base de sacarose a produção enzimática atingiu o pico de 140 US em torno de 96 horas de fermentação.

5. DISCUSSÃO

A quantidade de sacarose, medido através de açúcares redutores totais (ART), permaneceu em torno de 26 g/L, como se, aparentemente, não tivesse sido consumida. Este fato pode ser explicado através de erros na metodologia analítica, já que houve crescimento do fungo. Não poderia haver crescimento micelial e produção da enzima e metabólitos sem o consumo da fonte de carbono, no caso a sacarose. Estes erros, possivelmente, aconteceram na inversão da sacarose, já que o Método DNS foi usado nos meios à base de glicose e foram obtidos bons resultados.

No trabalho de ESCOBAR (1993) foi relatado que valores de pH acima de 7 influíam negativamente na atividade enzimática. No meio de cultivo à base de Sacarose o pH manteve-se acima de 7 durante todo o tempo, após 72 horas de cultivo, e, mesmo assim, não foi observado que este fato causasse qualquer influência negativa sobre a produção da enzima ou em sua estabilidade.

LASURE (1972) cita que adição de 2% de sacarose em meio ao micélio de *Neurospora crassa* reduzia, em torno de 6 vezes, a produção de protease. No meio à base de sacarose a concentração foi em torno de 4% e não foi observado diminuição da síntese da enzima e sim aumento, segundo o modelo cinético parcialmente associado ao crescimento.

Em relação à produção da enzima, os maiores valores foram alcançados no meio à base de glicose (166 US) e (143 US), com e sem a presença de extrato de malte, respectivamente, seguido pelo meio à base sacarose (140 US). Nota-se que a produção da enzima segue a cinética do tipo parcialmente associada ao crescimento, já que a produção da enzima começa quando a concentração celular já é significativa (BAILEY and OLLIS, 1986).

comparado à literatura (cerca de 10 %) (ESCOBAR,1995). Isto pode ter ocorrido devido a dois fatores. O primeiro é a integridade questionável da caseína usada no meio de cultura, que, pelo menos aparentemente, parecia bastante envelhecida e este fato pode ser relevante já que a caseína é constituinte importante na indução da síntese da enzima (LASURE, 1972). O segundo seria devido à deficiência na produção enzimática pela cepa estudada no presente trabalho.

Mesmo havendo cerca de 23 US de diferença entre os meios à base de glicose e os meios à base de sacarose, há uma grande vantagem no uso de sacarose já que o pico de produção da enzima foi obtido em torno de 96 horas de fermentação. Assim, há a produção da enzima em tempo menor do que os meios à base de glicose e devido a sacarose ser uma fonte de carbono mais barata e de relativa abundância no Brasil, ela é a mais indicada para a obtenção desta enzima.

6. CONCLUSÕES

Deste trabalho podemos concluir que :

Valores de pH acima de 7 não causaram nenhuma influência negativa sobre a estabilidade da enzima.

A produção da enzima foi tímida em relação aos valores alcançados na literatura devido, provavelmente, à baixa qualidade da caseína utilizada ou à deficiência em sua síntese pela cepa estudada.

A diferença de 23 US entre os meios à base de glicose e à base de sacarose é uma diferença que pode ser desprezada já que no meio à base de sacarose há produção da enzima em tempos menores.

A produção da enzima segue o modelo cinético do tipo parcialmente associado ao crescimento.

O uso de sacarose como fonte de carbono na produção de coalho microbiano por *Mucor miehei* permite a produção da enzima em valores aproximados aos meios à base de glicose porém em menor tempo.

Figura 3- Acompanhamento da fermentação utilizando sacarose.

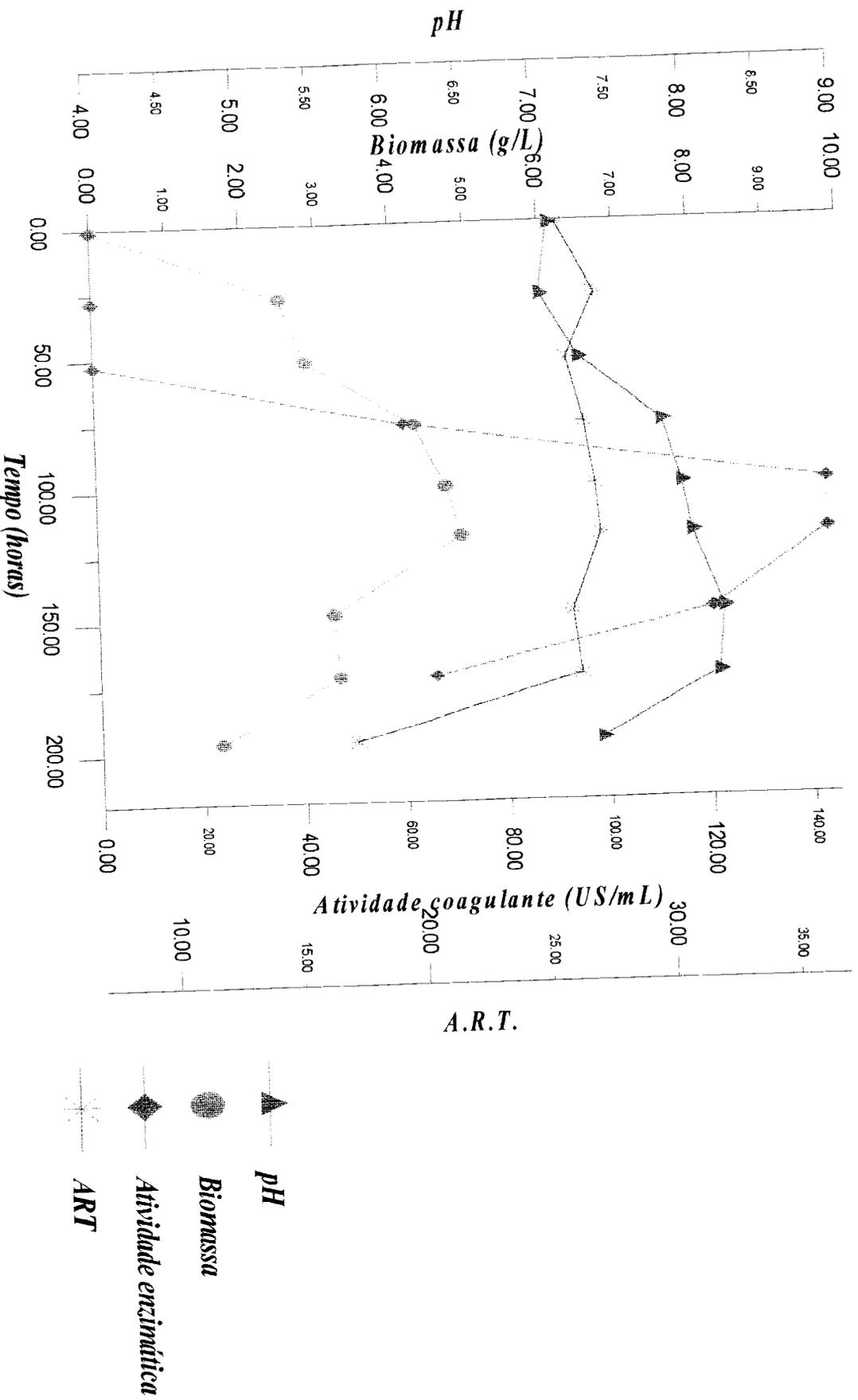


Figura 4 - Acompanhamento da fermentação utilizando glicose e extrato de malte.

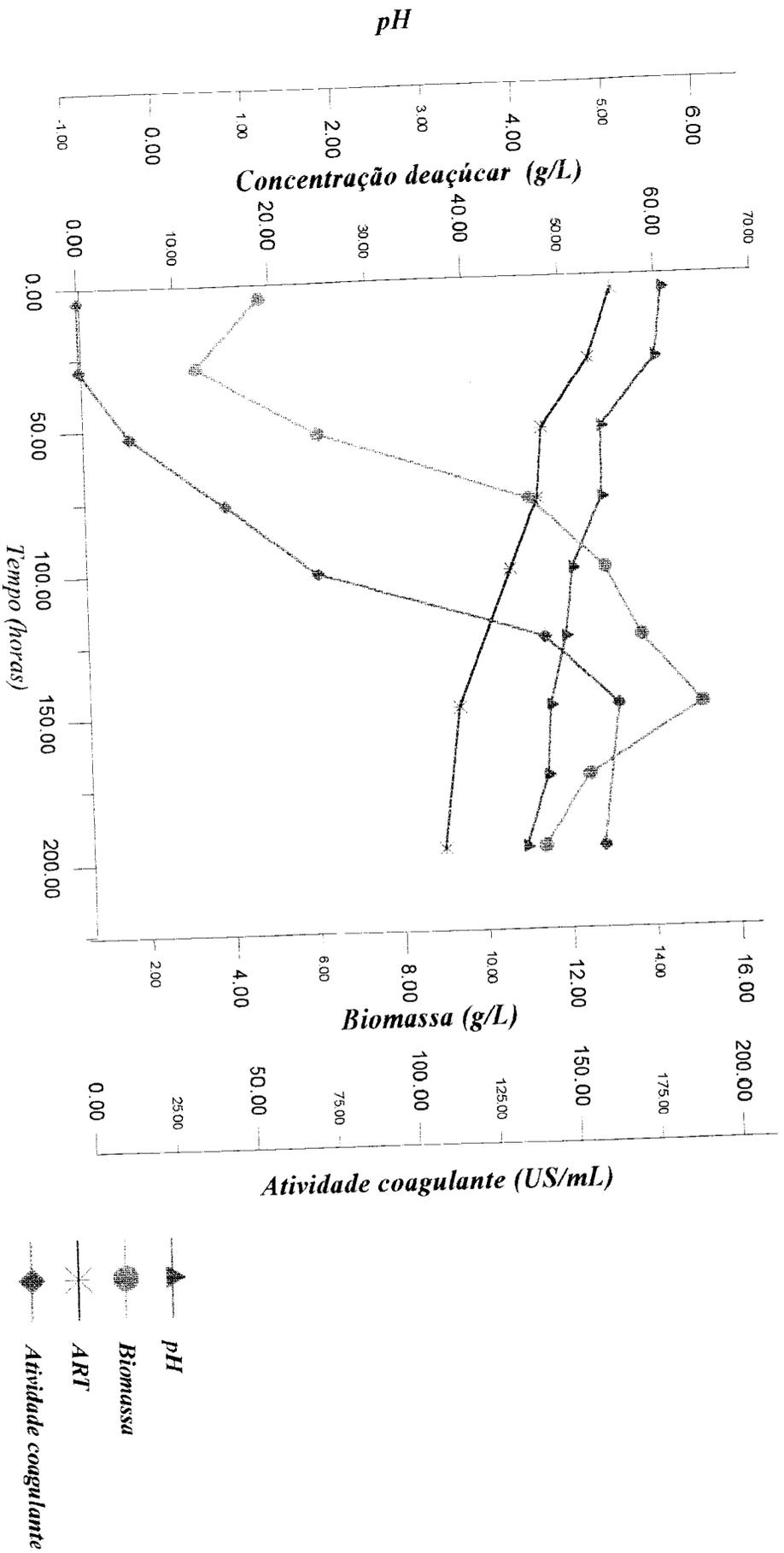


Figura 5 - Acompanhamento da fermentação utilizando 18 glicose sem extrato de malte.

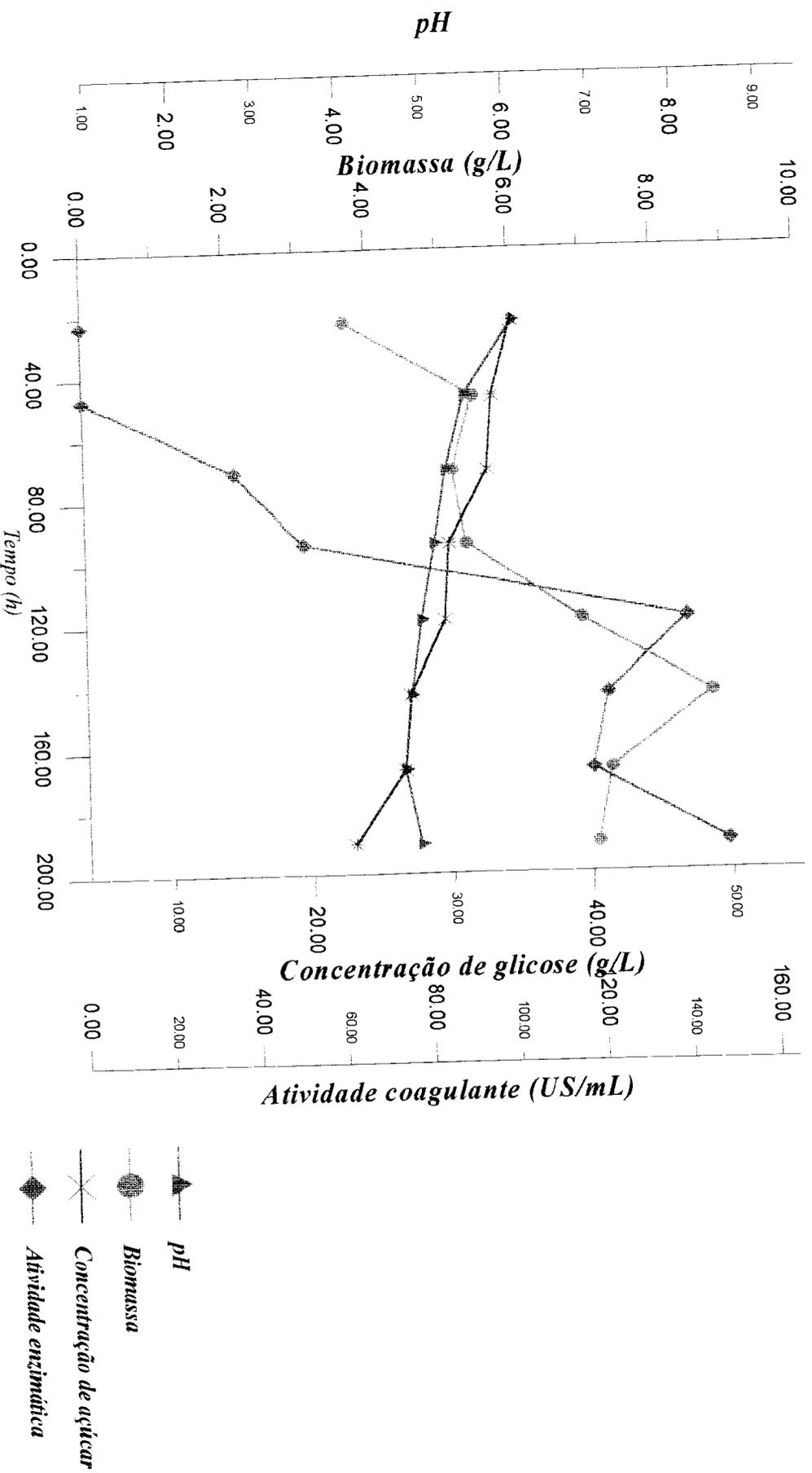
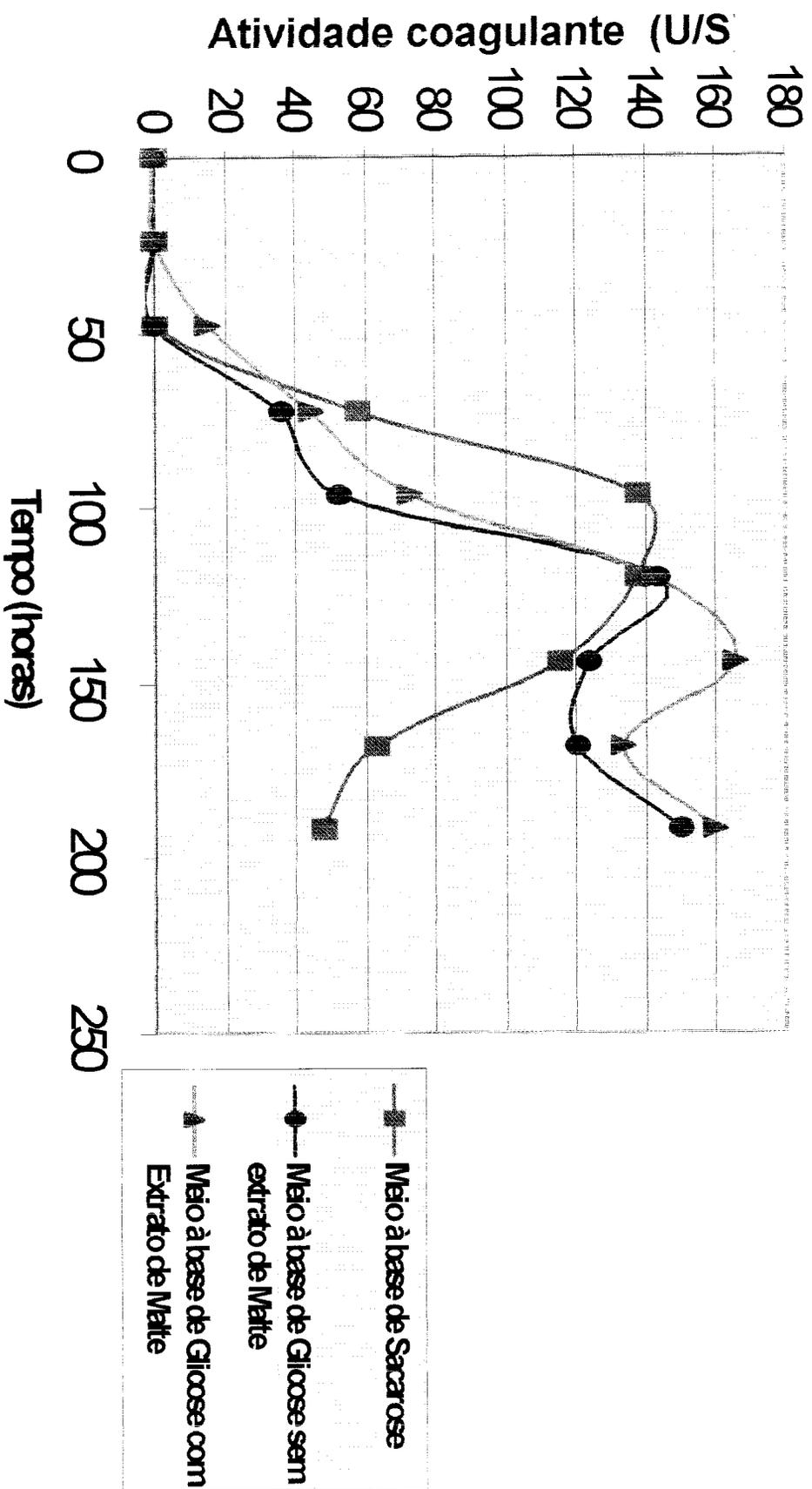


Figura 6 – Comparação entre as atividades coagulantes obtidos nos três meios de cultura



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E.H., Contribuição para o estudo do cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337, em meio contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. São Paulo. EPUSP, 1979, 132p. Dissertação de Mestrado.
- BAYLEY, M. J., SIIKA-AHO, M. Production of microbial rennin. **Biotechnology Letters**, 10 (3) 1988.
- ESCOBAR, J., BARNETT, S. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. **Enzyme Microb. Technol.**, Vol. 15, pp. 1009-1013, 1993.
- ESCOBAR, J., BARNETT, S. Syntesis of Acid Protease from *Mucor miehei* : Integration of Production and Recovery. **Process Bioch.**, Vol. 30. N.8, pp.695-700, 1995.
- GLAZER, A. N., NIKAIDO, H., **Microbial Biotechnology**, W.H. Freeman and Company, 1995.
- GUINNE, T.P. & WILKINSON, M.G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **Journal of the Dairy Technology**. 45(4), 1992.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. New York John Wiley, 1981.
- JAFELICE, L. R. S., Indução de mutantes altamente produtores de renina microbiana de *Mucor miehei*. **Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola . Unicamp. Campinas 1985.**
- Laboratórios Miles do Brasil Ltda – Divisão Dairy – Ficha Técnica do Produto Marzyme.
- LARROCHE, C. Microbial growth and sporulation behavior in solid state fermentation. **J. Sci. Ind. Res.**, 55. 408- 423, 1996.
- LASURE, L.L. Regulation of extracellular acid protease in *Mucor miehei*. **Mycol.**, 72, 483-493 1980.
- LIMA, A. O. et al. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 5ª ed.. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1977.
- LIMA, U.A., AQUARONE, E. & BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. Editora Edgard Blucher. São Paulo. 1975.
- Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda. Ficha Técnica do Produto Rennilase.
- PANBOKIAN, C. R. D., FACCIOTTI, M. C. R., OLIVO, J. E., BADINO, A. C., SCHMIDELL, W., Influência da concentração de esporos na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori*. **XII Congresso Nacional de Fermentações, Uberlândia 1998 – CD ROM.**

PUTZKE, J., PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos, Santa Cruz do Sul - EDUNISC, V.1. 1998**

ROSE, A. H. **Economic Microbiology. Vol 5. Academic Press, 1980.**

REED, G. **Enzymes in Food Processing. 1993.**

SCRIBAN, R. (Ed.). **Biotechnologia. Editora Manole Ltda. São Paulo, 1985**

WANG, D.I.C. **Fermentation and Enzyme Technology. Jonh Wiley & Sons, 1979.**